



**HAL**  
open science

# Apport des modèles PBPK dans l'optimisation thérapeutique des inhibiteurs des calcineurines en transplantation

Cécile Gerard

► **To cite this version:**

Cécile Gerard. Apport des modèles PBPK dans l'optimisation thérapeutique des inhibiteurs des calcineurines en transplantation. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10265 . tel-01127278

**HAL Id: tel-01127278**

**<https://theses.hal.science/tel-01127278>**

Submitted on 7 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.

N° d'ordre 265-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE  
ED N° 205

DIPLOME DE DOCTORAT

**Spécialité : Recherche Clinique**

soutenue publiquement le jeudi 13 décembre 2012

par

**M<sup>elle</sup> Cécile GERARD**

**APPORT DES MODELES PBPK DANS L'OPTIMISATION  
THERAPEUTIQUE DES INHIBITEURS DES CALCINEURINES  
EN TRANSPLANTATION**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Michel TOD

JURY :

Monsieur le Professeur Athanassios ILIADIS, rapporteur  
Madame le Docteur Emmanuelle COMETS, rapporteur  
Madame le Docteur Nathalie BLEYZAC, examinateur  
Monsieur le Professeur François GUEYFFIER, examinateur  
Monsieur le Professeur Pierre MARQUET, examinateur  
Monsieur le Professeur Michel TOD, directeur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur G.  
KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-  
DESCHAMPS

# **REMERCIEMENTS**

## **A Monsieur le Professeur Michel Tod**

Voilà maintenant 6 ans que vous encadrez mes travaux... Votre disponibilité, votre patience et votre soutien m'ont permis d'aller au bout de ce projet de thèse.

Je vous remercie pour vos immenses compétences scientifiques et toutes vos qualités humaines.

Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordée toutes ces années.

## **A Madame le Docteur Nathalie Bleyzac**

Qui a accepté de participer à ce jury.

Je te remercie pour ta gentillesse et tes précieux conseils.

Trouve en ce travail l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **A Monsieur le Professeur François Gueyffier**

Qui a aimablement accepté de participer à ce jury.

Soyez assuré de mes sincères remerciements.

## **A Monsieur le Professeur Marquet**

Qui m'a fait l'honneur de siéger parmi les membres du jury.

Soyez assuré de ma respectueuse considération.

## **A Madame le Docteur Emmanuelle Comets et à Monsieur le Professeur Athanassios Iliadis**

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mes travaux.

Veillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

## **A Madame Pivot,**

Je vous remercie de m'avoir permis de mener à bien ce projet de thèse d'université malgré mon poste de pharmacien assistant.



**A toute l'équipe du secteur Essais Cliniques de la pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot,**

En particulier Elena et Valérie qui m'accompagnent depuis 3 ans, Anne, Hélène, sans oublier les internes et les étudiants en pharmacie qui sont passés sur le secteur : Elise(s), Hélène, Cécile, Anne-Cécile, Isma, Clémentine, Ariane, Maxime et Maude.

Merci de votre bonne humeur et votre sérieux qui font l'ambiance très agréable de ce secteur.

**A toute l'équipe de l'EMR 3738 de la faculté de Lyon Sud,**

En particulier à Mélanie, Emilie, Fabienne, Alex, Arnaud, Raymonde et Olivier, sans oublier mes anciens collègues Inès, Floriane et Maxime.

**A ma famille,**

Tout particulièrement mes grands-parents, mes beaux parents, mes parents, mes frères et sœurs Emilie, Mathilde et Olivier sans oublier Léa, Marco et Natacha bien sûr.

Pour votre affection, vos encouragements et votre soutien.

**A mes amis,**

A mes plus vieux et plus chers amis : Maude et Luis, Florelle, Bertrand et Elodie, Elise, Jean-Christophe.

A mes amis de la fac de « Besac », Aude, Mathieu, Stéphanie, Vanessa, Benoit, Michael, Cécile.

A mes amis de l'internat et de l'assistantat : Cécile, Christel, Christelle, Mélanie, Marion, Magali, Pascal, Julie, Justine, Michel, Laurent, Sylvain, Marie, Anne, Stéphanie, Estelle, Marion, Lamine, Elhadji...

Pour tous les bons moments que nous avons partagés !

**A Bertrand,**

Pour ton soutien sans faille et ton amour.

**A mon petit rayon de soleil Eloïse....**

# **TITRE : APPORT DES MODELES PBPK DANS L'OPTIMISATION THERAPEUTIQUE DES INHIBITEURS DES CALCINEURINES EN TRANSPLANTATION**

---

## **RESUME**

En transplantation d'organes solides ou en greffe de moelle osseuse, la ciclosporine et le tacrolimus ont prouvé leur efficacité. Ils sont cependant de maniement délicat du fait d'un intervalle thérapeutique étroit et d'une grande variabilité pharmacocinétique inter et intra-individuelle. Un suivi thérapeutique et une adaptation des posologies de ces médicaments sont nécessaires pour diminuer le risque de rejet et limiter leur toxicité.

Un modèle PBPK est construit à partir de considérations anatomiques, physiologiques et biochimiques. Il permet d'apporter des informations sur les cinétiques tissulaires et sur les répercussions des altérations physiologiques ou pathologiques.

Les modalités optimales d'administration de la ciclosporine en greffe de moelle osseuse pédiatrique, ainsi que les zones thérapeutiques à atteindre, font l'objet de débats. Un modèle PBPK-PD pour la ciclosporine construit à partir de données chez le rat puis extrapolé et validé chez l'homme a permis d'estimer l'exposition à la ciclosporine dans les organes cibles de la GVH, de comparer les modalités d'administration en perfusion intraveineuse, et de définir des concentrations cibles en fonction des indications.

L'adaptation posologique du tacrolimus en transplantation hépatique par la méthode Bayésienne reste relativement imprécise dans la période initiale après la greffe, parce que les facteurs de variabilité sont imparfaitement connus. Un modèle PBPK a été construit et évalué afin de rechercher les covariables pertinentes par une approche bottom-up : la fonction hépatique, l'hématocrite, le génotype du cytochrome P450 3A5 du donneur, la fraction libre et certaines comédications ont été retrouvées.

---

**MOTS-CLES :** médicaments immunosuppresseurs, modélisation PBPK, suivi thérapeutique

---

## **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

EMR 3738 Ciblage Thérapeutique en Oncologie

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux

Chemin du Grand Revoyet, BP12

69921 OULLINS Cedex

**TITLE: PBPK MODELS IN OPTIMIZATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY BY CALCINEURIN INHIBITORS IN TRANSPLANTATION**

---

**ABSTRACT**

In solid organ or bone marrow transplantation, cyclosporine and tacrolimus have proven their effectiveness. However, their handling remains difficult because of a narrow therapeutic window and high inter- and intra-individual pharmacokinetic variabilities. Therapeutic drug monitoring and dose adjustments of these drugs are necessary to reduce the risk of rejection and minimize their toxicity.

A PBPK model is built from anatomical, physiological and biochemical data. It can provide information on the kinetics in tissues and on the effects of physiological or pathological alterations.

How to best administer cyclosporine in pediatric bone marrow transplantation, as well as therapeutic ranges to achieve, are discussed. A PBPK-PD model for cyclosporin built from data in the rat and then extrapolated and validated in humans was used to estimate exposure to cyclosporine in the target organs of GVHD, to compare schedules of administration by intravenous infusion, and to define target blood concentration based on therapeutic indications.

Dose adjustment of tacrolimus in liver transplant patients by the Bayesian method is relatively inaccurate in the initial period after transplantation because factors of variability are incompletely understood. A PBPK model was constructed and evaluated in order to find relevant covariates by a bottom-up approach. Liver function, hematocrit, cytochrome P450 3A5 genotype of the donor, the unbound fraction and some comedications were found. New dosing regimen recommendations have been developed from this model.

---

**KEYWORDS:** immunosuppressant drugs, PBPK modeling, therapeutic drug monitoring

# **TABLE DES MATIERES**

LISTE DES ARTICLES	10
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES	12
INDEX DES TABLEAUX	17
INDEX DES FIGURES	19
INTRODUCTION	22
<b>1<sup>ERE</sup> PARTIE : REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE</b>	<b>28</b>
<b>1. Greffe de moelle osseuse et transplantation hépatique</b>	<b>29</b>
1.1. Greffe de moelle osseuse	29
1.1.1. Généralités	29
1.1.2. Indications	29
1.1.3. Origine des cellules souches hématopoïétiques	30
1.1.4. Types de greffes	31
1.1.5. Conditionnement de la greffe	32
1.1.6. Maladie du greffon contre l'hôte	33
1.2. Transplantation hépatique	39
1.2.1. Généralités	39
1.2.2. Indications	39
1.2.3. Origines du foie	41
1.2.4. Types de transplantations	43
<b>2. Médicaments immunosuppresseurs inhibiteurs des calcineurines</b>	<b>46</b>
2.1. Généralités	46
2.1.1. Ciclosporine	46
2.1.2. Tacrolimus	47
2.2. Indications	48
2.3. Mécanisme d'action	50
2.4. Propriétés PK	50
2.4.1. Ciclosporine	51
2.4.2. Tacrolimus	53
2.5. Effets de covariables sur la PK	57
2.5.1. Covariables physiologiques	57
2.5.2. Covariables biologiques	59

2.5.3.	Covariables génétiques	60
2.5.4.	Autres covariables	65
2.6.	Effets indésirables	66
2.7.	Interactions médicamenteuses	67
2.7.1.	Actions de médicaments sur la ciclosporine et le tacrolimus	67
2.7.2.	Actions de la ciclosporine et du tacrolimus sur d'autres médicaments	69
2.7.3.	Autres interactions	71
<b>3.</b>	<b>Suivi thérapeutique de la ciclosporine et du tacrolimus</b>	<b>73</b>
3.1.	Concentrations cibles	73
3.2.	Contrôle adaptatif des posologies de la ciclosporine	75
<b>4.</b>	<b>Modèle physiologique ou modèle PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetics)</b>	<b>77</b>
4.1.	Généralités sur le modèle PBPK	77
4.2.	Méthode de développement	78
4.2.1.	Sélection des compartiments et architecture du modèle	79
4.2.2.	Structure interne des compartiments	80
4.2.3.	Ecriture mathématique du modèle	81
4.2.4.	Obtention des paramètres du modèle	81
4.2.5.	Validation du modèle	82
4.2.6.	Utilisation du modèle	82
4.3.	Implémentation dans le logiciel de PK ADAPT II®	84
4.3.1.	Présentation du logiciel ADAPT II®	84
4.3.2.	Applications du logiciel ADAPT II®	84
<b>5.</b>	<b>Approche Bottom up</b>	<b>85</b>
5.1.	Généralités	85
5.2.	Méthodologie	86
5.3.	Applications	89

<b>2<sup>EME</sup> PARTIE : TRAVAUX DE LA THESE</b>	<b>90</b>
<b>1. Etude de la ciclosporine en greffe de CSH</b>	<b>91</b>
1.1. Etude clinique préliminaire	91
1.1.1. Patients et méthode	91
1.1.2. Résultats	93
1.2. Intérêt d'un modèle PBPK	95
1.3. Historique du modèle PBPK de la ciclosporine	96
1.4. Construction du modèle PBPK	97
1.4.1. Modèle global	97
1.4.2. Structure des compartiments tissulaires	98
1.4.3. Paramètres physiologiques	98
1.4.4. Paramètres liés à la ciclosporine	100
1.4.5. Transposition du modèle PBPK à l'échelle humaine	118
1.4.6. Evaluation du modèle	121
1.4.7. Comparaison des expositions tissulaires en fonction du type de perfusion	123
1.4.8. Adaptation du modèle à l'enfant	125
1.4.9. Evaluation du modèle PBPK	131
1.5. Applications du modèle PBPK	135
1.5.1. Influence des modalités de perfusion intraveineuse sur l'exposition à la ciclosporine	135
1.5.2. Liens entre l'exposition tissulaire à la ciclosporine et la GVH	136
<b>2. Etude du tacrolimus en transplantation hépatique</b>	<b>137</b>
2.1. Patients	137
2.2. Etude de PK de population et modèle PBPK du tacrolimus	139
<b>3<sup>EME</sup> PARTIE : Articles</b>	<b>140</b>
<b>4<sup>EME</sup> PARTIE : Discussion générale et conclusions</b>	<b>198</b>
ANNEXE 1	204
Code du modèle PBPK de la ciclosporine	204
ANNEXE 2	230
Code du modèle PBPK du tacrolimus	230

# **LISTE DES ARTICLES**



## **Communications écrites dans des revues internationales avec comité de lecture**

Links between cyclosporin exposure in tissues and Graft-Versus-Host Disease in pediatric bone marrow transplantation: analysis by a PBPK Model.

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod.  
*Pharmaceutical Research*. 2011 Mar;28(3):531-9.

Influence of dosing schedule on organ exposure to cyclosporin in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: analysis with a PBPK-PD model.

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod.  
*Pharmaceutical Research*. 2010 Dec;27(12):2602-13.

## **Communication écrite soumise à une revue internationale avec comité de lecture**

Determination of the most influential sources of variability of tacrolimus trough blood concentrations in adult liver transplant patients: *a bottom-up approach*

**C. Gérard**, J. Stocco, A. Hulin, B. Blanchet, C. Versuyft, M. Tod  
Soumis à AAPS journal en décembre 2012.

## **Communications affichées dans des congrès internationaux**

Determination of the most influential sources of variability of tacrolimus trough blood levels in adult liver transplant patients: *a bottom-up approach*.

**C. Gérard**, J. Stocco, A. Hulin, B. Blanchet, M. Tod.  
Communication affichée au congrès de Population Approach Group in Europe (PAGE) 2012.

Factors influencing pharmacokinetics of tacrolimus during the early liver post-transplantation period: a population analysis.

**C. Gérard**, C. Verstuyft, J. Stocco, A. Hulin, B. Blanchet, M. Tod.  
Communication affichée au congrès du PAGE 2011.

Influence of cyclosporin dosing schedule on receptor occupancy in bone marrow transplantation: analysis with a PBPK-PD model.

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, B. Tranchand, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod.  
Communication affichée au congrès du PAGE 2010.

Influence of cyclosporin infusion duration on efficacy in paediatric bone marrow transplantation: analysis by a PBPK model.

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, B. Tranchand, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod.  
Communication affichée au congrès du PAGE 2009.

Link between cyclosporin exposure in tissues and graft versus host disease in paediatric bone marrow transplantation: analysis by a PBPK model.

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, B. Tranchand, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod.  
Communication affichée au congrès du PAGE 2009.

# **LISTE DES ABREVIATIONS ET DES** **SYMBOLES**

## Abréviations

AIC : critère d'Akaike

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ALAT : Alanine Amino Transférase

AUC (Area Under the Curve) : aire sous la courbe

CHC : carcinome hépatocellulaire

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CSH : cellule souche hématopoïétique

CV : coefficient de variation

CYP : cytochrome P 450

DICS : déficit immunitaire combiné sévère

EDO : équation différentielle ordinaire

FO : fonction objective

GCSF (Granulocyte colony-stimulating factor) : facteur de croissance

GLS (Generalised Least Squares) : moindres carrés généralisés

GVH (Graft *Versus* Host Disease) : maladie du greffon contre l'hôte

GVL (Graft *Versus* Leukemia) : greffon contre la leucémie

HB : hémoglobine

JAMA : Journal of the American Medical Association

HCT : hématocrite

HDL (High-Density Lipoprotein) : lipoprotéines de haute densité

HLA (Human Leucocyte Antigen) : antigène leucocytaire humain

IHOP : Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique

LAL : leucémie aiguë lymphoïde

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LDL (Low-Density Lipoprotein) : lipoprotéines de faible densité

LMC : leucémie myéloïde chronique

LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile

MAP : estimateur bayésien du maximum *a posteriori*

ML (Maximum Likelihood) : maximum de vraisemblance

PAL : Phosphatases alcalines

PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic) : modèle physiologique

PBPK-PD (Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic) : modèle physiologique-pharmacodynamique

PD : pharmacodynamique

P-gp : glycoprotéine P

PK (Pharmacokinetic) : PK

PBM (Peripheral Blood Monocytes) : monocytes du sang périphérique

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

RMSE (Root Mean Square Error) : racine carré de l'erreur quadratique moyenne

RIA (Radio Immuno Assay) : analyse radio immunologique

SAL : sérum anti-lymphocytaire

SCR (serum creatinin) : concentration sérique de créatinine

TBI (Total Body Irradiation) : irradiation corporelle totale

TGF  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) : facteur de transformation de croissance  $\beta$

TH : transplantation hépatique

VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) : lipoprotéine de très faible densité

WLS (Weighted Least Squares) : moindres carrés pondérés

WRSS (Sum of Weighted Squared Residuals) : somme des carrés des écarts pondérés

## Symboles des équations

B (Blood) : sang total

BBB (Blood-Brain Barrier) : barrière hémato-encéphalique

BC (Blood Cell) : cellule sanguine

$B_T$  : nombre de sites de liaison tissulaire

C : concentration

CL : clairance

CP : coefficient de partage

E : milieu extracellulaire

F<sub>ci</sub> : coefficient de proportionnalité entre la concentration interstitielle et extracellulaire

F<sub>cv</sub> : coefficient de proportionnalité entre la concentration plasmatique et extracellulaire

f<sub>u</sub> : fraction de ciclosporine libre (non lié aux protéines ou aux cellules sanguines)

hel : élimination hépatique

I : milieu interstitiel

$K_{ass}$  : constante d'association

$K_{D,BC}$  : constante de dissociation au niveau des cellules sanguines

$K_{D,TC}$  : constante de dissociation au niveau des cellules tissulaires

$K_{dis}$  : constante de dissociation

$K_m$  : constante de Michaelis-Menten

LD : linéaire

NL : non linéaire

$nP_T$  : capacité de liaison sur les sites de liaison des cellules sanguines

P : plasma

PS : produit perméabilité par surface

Q : débit sanguin

R : équilibre rapide

S : équilibre lent

SS (Steady State) : état stationnaire

T : total

TC (Tissue Cell) : cellule tissulaire

u (unbound) : libre

V : volume

Vmax : vitesse maximum

# **INDEX DES TABLEAUX**

Tableau I. Grades de sévérité de la GVH aiguë selon la classification adaptée de Glucksberg <i>et al.</i> (26) modifiée par Armitage (28, 29) .....	34
Tableau II. Stades de sévérité de la GVH aiguë selon la classification adaptée de Glucksberg <i>et al.</i> (26) modifiée par Armitage (28, 29) .....	35
Tableau III. Clairance du tacrolimus en fonction du génotype du CYP3A5 .....	63
Tableau IV. Caractéristiques des patients des deux groupes .....	92
Tableau V. Caractéristiques du traitement par ciclosporine pour les 2 groupes.....	93
Tableau VI. Fréquences et types de GVH des deux groupes.....	94
Tableau VII. GVH aiguës souhaitées et observées pour chacun des groupes.....	95
Tableau VIII. Valeurs des paramètres physiologiques chez le rat .....	99
Tableau IX. Rapport de concentration de lipoprotéine entre le milieu interstitiel et le plasma (IPR) et la fraction libre de ciclosporine dans le milieu interstitiel ( $f_{u_i}$ ) pour chaque organe .....	101
Tableau X. Valeurs des paramètres de distribution tissulaire chez le rat.....	104
Tableau XI. Comparaison des AUC en perfusion discontinue <i>versus</i> continue pour le foie, la peau et l'intestin .....	117
Tableau XII. Valeurs des paramètres physiologiques chez l'Homme .....	118
Tableau XIII. Valeurs des paramètres liés à la ciclosporine extrapolées à l'Homme.....	120
Tableau XIV. Comparaison des AUC en perfusion discontinue <i>versus</i> continue pour le foie, la peau et l'intestin .....	124
Tableau XV. Valeurs des fractions de volume vasculaire et d'espace interstitiel chez l'enfant .....	126
Tableau XVI. Concentrations moyennes de triglycérides et de cholestérol total en fonction de l'âge .....	128
Tableau XVII. Valeurs des paramètres liés à la ciclosporine extrapolées chez l'enfant.....	130
Tableau XVIII. Valeurs manquantes des covariables .....	138



## **INDEX DES FIGURES**

Figure 1. Structure chimique de la ciclosporine A.....	46
Figure 2. Structure chimique du tacrolimus .....	47
Figure 3. Exemple d'organisation pour un modèle physiologique .....	80
Figure 4. Vue d'ensemble des relations entre les variables (1).....	88
Figure 5. Schéma du modèle physiologique global de la ciclosporine .....	97
Figure 6. Schéma d'un compartiment tissulaire.....	98
Figure 7. Schéma d'un tissu selon le modèle 1 .....	102
Figure 8. Schéma d'un tissu selon le modèle 2 .....	103
Figure 9. Evolution de la concentration de ciclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 60 µg/h .....	109
Figure 10. Comparaison des profils de concentration de ciclosporine en fonction du temps dans le sang total après une dose de 6 mg/kg selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite) .....	110
Figure 11. Comparaison des profils de concentration de ciclosporine dans le plasma (trait plein) et dans les cellules sanguines (trait en pointillés) après une dose de 6 mg/kg, selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite) .....	111
Figure 12. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le muscle, tissu adipeux et poumons selon ce modèle (gauche) et selon l'article de Kawai (droite).....	112
Figure 13. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le cœur, l'os et la peau selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite) .....	113
Figure 14. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le thymus, les reins et la rate selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite) .....	114
Figure 15. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le foie et l'intestin selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite) .....	115

Figure 16. Profils de concentration de ciclosporine dans foie en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	116
Figure 17. Profils de concentration de ciclosporine dans la peau en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	116
Figure 18. Profils de concentration de ciclosporine dans l'intestin en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	117
Figure 19. Evolution de la concentration de ciclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 14 583 $\mu\text{g/h}$ .....	121
Figure 20. Evolution des concentrations de ciclosporine en fonction du temps dans le sang total en cas de perfusion discontinue à raison d'une perfusion de 2 heures toutes les 12 heures et une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	122
Figure 21. Profils de concentration de ciclosporine dans le foie en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	123
Figure 22. Profils de concentration de ciclosporine dans la peau en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	123
Figure 23. Profils de concentration de ciclosporine dans l'intestin en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg .....	124
Figure 24. Evolution de la fraction libre de ciclosporine en fonction de l'âge. ....	128
Figure 25. Evolution de la clairance hépatique intrinsèque en fonction de l'âge .....	131
Figure 26. Evolution de la concentration de ciclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 6 250 $\mu\text{g/h}$ .....	131
Figure 27. Correspondance entre les concentrations observées et prédites .....	133
Figure 28. Distribution des résidus pondérés .....	134

# **INTRODUCTION**

## **Les médicaments immunosuppresseurs inhibiteurs des calcineurines**

La ciclosporine et le tacrolimus, les deux médicaments immunosuppresseurs de la classe des inhibiteurs des calcineurines, sont actuellement largement utilisés dans le cadre de transplantation d'organes solides et de greffe de moelle osseuse. Ils ont prouvé leur efficacité en diminuant significativement le risque de rejet et en améliorant le résultat de la transplantation. Ces deux médicaments sont cependant d'utilisation délicate du fait d'un intervalle thérapeutique étroit et une grande variabilité pharmacocinétique (PK) inter et intra-individuelle. Dans le cadre de transplantation ou de greffe, il est important de maintenir une posologie adaptée de ces médicaments, afin d'éviter un sous dosage avec le risque de rejet ou un surdosage avec l'apparition des effets indésirables. Actuellement, un suivi thérapeutique de ces médicaments est mis en place systématiquement afin de vérifier le respect de l'intervalle des concentrations sanguines totales cibles qui sont corrélées à l'efficacité et à la toxicité de ces médicaments.

Dans le cadre de cette thèse, une étude sur la ciclosporine en greffe de moelle osseuse pédiatrique puis une sur le tacrolimus en transplantation hépatique chez des adultes ont été réalisées.

## **Les intérêts du modèle physiologique**

Le modèle physiologique encore appelé modèle PBPK (Physiologically-Based Pharmacokinetic Models) est une catégorie particulière de modèles PK compartimentaux construite à partir de considérations anatomiques, physiologiques et biochimiques. Ce modèle représente alors plus ou moins finement l'organisme sous forme de compartiments correspondant à des organes et des tissus. Il fait appel aux masses des différents tissus, aux débits sanguins locaux et aux différents coefficients de partage entre les tissus et le sang. Si nécessaire, ils peuvent prendre en compte d'autres informations comme la liaison aux protéines plasmatiques et autres éléments sanguins, les capacités enzymatiques d'un organe épurateur, etc... Ce type de modèle permet, contrairement au modèle PK compartimental classique, d'apporter des informations sur les cinétiques locales (tissulaires), sur les répercussions des altérations physiologiques (par exemple une cirrhose hépatique) ou encore permettre des extrapolations inter-espèces.

L'utilisation de ces modèles présente donc un intérêt dans la phase critique post-transplantation afin de tester des hypothèses sur l'effet d'un type d'administration sur la distribution tissulaire du médicament ou encore les facteurs physiologiques qui auront une importance dans la variabilité des concentrations sanguines d'un médicament.

### **L'approche bottom-up**

De manière générale, il existe deux méthodes pour rechercher les sources de variabilités en PK. La première approche est nommée « top-down » et correspond à la recherche de covariables par analyse statistiques à partir d'études cliniques. La deuxième approche, l'approche « bottom-up » consiste en une recherche de paramètres influents avec un modèle mécanistique. On utilise alors les connaissances sur le corps humain et l'information acquise précédemment sur des molécules ayant des caractéristiques similaires.

L'approche top-down, fondée sur des approches statistiques pour déterminer les covariables significatives entre un grand nombre d'indices démographiques ou biologiques dans une étude clinique de PK, a montré ses limites. En effet, on n'explique rarement plus de 50% de la variabilité.

Pour l'identification de covariables pertinentes, l'approche bottom-up a été récemment préconisée (1, 2). Les facteurs influant sur la PK du médicament sont déterminés par l'analyse d'un modèle PBPK. Les paramètres influents peuvent être des volumes, des débits sanguins, des coefficients de partage tissulaires, l'activité de la glycoprotéine P et celle de cytochromes. Les causes de variations peuvent être génotypique ou phénotypique (pathologique, iatrogène ou autre). L'élément clé de cette approche est la séparation de l'information sur le système (corps humain), de celle sur le médicament (caractéristiques physico-chimiques pour déterminer la perméabilité à travers les membranes, répartition entre les tissus, liaison aux protéines plasmatiques, affinités envers certaines enzymes et transporteurs) et enfin de celle sur la conception de l'étude (dose, fréquence et voie d'administration, médicaments et nourriture concomitants).

Ces trois éléments doivent être convenablement séparés mais interagissent les uns avec les autres. L'information sur le corps humain est indépendante et peut être utilisée de manière répétée avec des médicaments différents sous différents schémas d'étude.

## **Etude de la ciclosporine en greffe de moelle osseuse**

La greffe de moelle osseuse est aujourd'hui largement reconnue dans le traitement d'un grand nombre d'affections hématologiques et extra hématologiques de nature maligne ou non. Elle a pour objectif de remplacer les cellules souches hématopoïétiques déficientes ou détruites par chimiothérapie afin de reconstituer un potentiel hématologique fonctionnel.

La greffe de moelle osseuse comporte, en dehors du risque de rejet, un deuxième risque immunologique très spécifique qui est la réaction du greffon contre l'hôte (*Graft Versus Host Disease* ou GVH), facteur de morbidité et de mortalité. Les GVH aiguës ou chroniques ne sont pas souhaitées, sauf dans le cadre de pathologies malignes où une GVH aiguë de grade léger à modéré est intéressante afin d'éliminer les cellules malignes résiduelles post chimiothérapie chez le receveur.

La ciclosporine est utilisée pour prévenir et traiter la GVH. Elle nécessite un suivi thérapeutique ainsi qu'une adaptation de la posologie permettant d'atteindre la concentration sanguine cible déterminée pour chaque patient en fonction notamment de la nature de sa pathologie. L'adaptation de la posologie est fréquemment réalisée par l'utilisation de données issues d'études PK de population et de la méthode bayésienne.

La mesure de la concentration sanguine de la ciclosporine ne permet pas de connaître l'exposition (représentée par l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations en fonction du temps) des tissus cibles de la GVH à la ciclosporine et il est difficile d'interpréter la relation dose-effet en ne se basant que sur des mesures de concentration sanguine. En effet, la présence de processus saturables dans la distribution et l'élimination de la ciclosporine implique l'absence de proportionnalité entre les concentrations sanguines et tissulaires.

Lorsqu'elle est administrée par voie parentérale, il n'existe pas de consensus dans les modalités d'administration de la ciclosporine : elle peut être administrée en perfusion intra-veineuse continue ou en une perfusion de 2 heures toutes les 12 heures. Il semblerait que les perfusions continues, à dose journalière équivalente, soient moins efficaces que les perfusions discontinues, car il y aurait une plus grande incidence de GVH chroniques et de GVH aiguës sévères, notamment au niveau hépatique (3). La distribution intracellulaire de la ciclosporine pourrait donc être moins importante ou ralentie dans certains organes (notamment le foie) en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinue. Notre hypothèse est donc que ces différences d'efficacité s'expliquent par des différences de profils de concentration tissulaires en fonction du temps selon le type de perfusion. L'approche actuelle est limitée car

elle n'est basée que sur des mesures de concentrations sanguines du fait de la grande difficulté chez l'Homme de mesurer directement les concentrations tissulaires d'un médicament. Par conséquent, nous avons envisagé de recourir à une modélisation pour tester l'hypothèse de la moindre exposition tissulaire en début de traitement en cas de perfusion continue.

L'équipe de Rowland a élaboré un modèle physiologique de la ciclosporine suite à des travaux chez le rat (4-6). Ce modèle physiologique de la ciclosporine chez le rat sera implémenté dans un logiciel de PK et validé. Il sera ensuite transposé à l'échelle humaine, puis adapté à une population pédiatrique par ajustement des paramètres physiologiques.

L'objectif de l'étude sur la ciclosporine est d'utiliser le modèle PBPK validé chez l'enfant pour dans un premier temps, tester l'hypothèse de moindre exposition tissulaire à la ciclosporine en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinue (cinétique non linéaire) puis dans un deuxième temps, de confronter les concentrations tissulaires simulées dans les organes cibles de la GVH et les grades de GVH observés, afin d'établir les concentrations cibles à atteindre.

### **Etude du tacrolimus en transplantation hépatique**

Le tacrolimus est utilisé pour la prévention du rejet de greffe après transplantation d'organes solides (foie, les reins et le cœur). Il présente un intervalle thérapeutique étroit et une grande variabilité PK avec une faible corrélation entre la posologie et les concentrations sanguines des médicaments. Un suivi thérapeutique doit être instauré. Dans la pratique, les concentrations résiduelles sur sang total de tacrolimus mesurées 12 h après la dose (juste avant la prochaine dose) sont utilisées pour adapter la posologie. Après transplantation hépatique, les concentrations sanguines cibles sont situées entre 5 à 20 ng/mL (7, 8). Atteindre et maintenir les concentrations sanguines résiduelles cibles sont essentiels au cours de la période précoce post-transplantation, lorsque le risque de rejet est le plus important.

Le tacrolimus est un substrat de la P-glycoprotéine (P-gp), un transporteur d'efflux, et du cytochrome (CYP) P450 3A, principalement le CYP3A5. Le polymorphisme des gènes codant pour CYP3A5 et la P-gp a été largement étudié et explique une partie de la variabilité interindividuelle de la PK du tacrolimus (9). En transplantation hépatique, le génotype de CYP3A5 et la P-gp du donneur et le receveur peuvent différer. En phase précoce post-transplantation hépatique, le traitement par le tacrolimus est délicat. En effet, dans les premiers jours après la transplantation, l'ajustement de la posologie est rendue complexe par influence de la prise concomitante de nourriture sur l'absorption, y compris l'alimentation



entérale, l'interaction du CYP3A4 intestinal et de la P-gp, l'élimination hépatobiliaire très variable, la demi-vie d'élimination longue et très variable, etc. En outre, la reprise progressive de la fonction hépatique, principalement dans les deux premières semaines, peut provoquer un changement dans l'élimination du tacrolimus, imposant un ajustement réactif de la posologie. Certaines études PK de population ont été menées et une caractérisation partielle des facteurs de variabilité de la PK du tacrolimus dans la transplantation hépatique, chez des adultes ou des enfants a été réalisée (9-14). Les facteurs de variabilité de la clairance les plus souvent retrouvés étaient le type de greffe (9, 13), l'activité de l'ASAT (9, 11) et le délai post-transplantation (12, 14). Cependant, la variabilité inexplicée dans ces études de population, reste élevé et d'autres facteurs devraient être explorées.

L'objectif de l'étude du tacrolimus dans la transplantation hépatique est d'identifier les facteurs prédictifs (facteurs physiologiques et pharmacogénomiques) qui influent sur les concentrations sanguines résiduelles du tacrolimus en utilisant un modèle PBPK et une approche bottom-up. Le modèle a été construit et évalué en utilisant les données d'une étude PK de population classique du tacrolimus au cours des 15 premiers jours après la transplantation hépatique. La détermination de ces covariables pertinentes aidera le clinicien à sélectionner la posologie initiale du tacrolimus en fonction des caractéristiques du patient transplanté.

### **Objectifs généraux de la thèse**

Ces deux médicaments immunosuppresseurs largement utilisés actuellement sont d'utilisation délicate, en particulier dans la phase critique post-transplantation, du fait de leur grande variabilité PK inter et intra-individuelle. La construction d'un modèle PBPK, sa validation dans la population de patients étudiée et son utilisation a pour objectif de tester des hypothèses sur l'exposition tissulaire au médicament ou encore l'effet de paramètres physiologiques sur les concentrations du médicament. La modélisation PBPK permettra à terme au clinicien de choisir le schéma posologique initial le plus approprié au patient, et de mieux appréhender l'adaptation posologique, pour une efficacité et une tolérance optimales.

**1<sup>ERE</sup> PARTIE : REVUE GENERALE**  
**DE LA LITTERATURE**

# **1. Greffe de moelle osseuse et transplantation hépatique**

## **1.1. Greffe de moelle osseuse**

### **1.1.1. Généralités**

La greffe de moelle osseuse ou transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a pour objectif de remplacer les CSH déficientes ou détruites par chimiothérapie, afin de reconstituer un potentiel hématologique fonctionnel. Elle consiste en une perfusion par voie veineuse centrale de cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur à un receveur. En France en 2010, 79 centres ont réalisé un total de 4 718 greffes (autogreffes et allogreffes) (15).

### **1.1.2. Indications**

Deux indications sont distinguées : les hémopathies malignes et les pathologies non malignes.

#### **Hémopathies malignes**

Les principales hémopathies malignes sont les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les syndromes myélodysplasiques, les leucémies myélomonocytaires juvéniles (LMMJ), les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les lymphomes. En pédiatrie, à l'hôpital Debrousse, les leucémies représentent environ 67% des indications (16). Les patients sont greffés lorsque le pronostic est moins favorable avec une chimiothérapie qu'avec une greffe de moelle osseuse. La greffe a lieu après un traitement éradicateur des cellules leucémiques par chimiothérapie. En effet, l'efficacité de la greffe sera d'autant plus importante que le nombre de cellules résiduelles leucémiques est faible au moment de la greffe. Le greffon apporte alors des CSH en remplacement de celles qui auront été détruites par les traitements cytotoxiques.

#### **Pathologies non malignes**

Elles entraînent un déficit constitutionnel ou acquis de tout ou d'une partie du tissu hématopoïétique. Il s'agit notamment de maladies hématologiques non malignes comme l'aplasie médullaire, les hémoglobinopathies (thalassémies majeures et drépanocytoses homozygotes sévères) et l'anémie de Fanconi. Il y a également les déficits immunitaires

combinés sévères (DICS) et des maladies métaboliques comme les déficits enzymatiques congénitaux (sialidose, ostéopétrose et fucosidose par exemple). Pour ces pathologies, il ne peut s'agir que d'allogreffe.

### **1.1.3. Origine des cellules souches hématopoïétiques**

#### **Moelle osseuse**

Il s'agit de la source « historique » de CSH utilisée dans le cadre des allogreffes et des autogreffes. La moelle est prélevée au bloc opératoire sous anesthésie générale par ponction multiple (17) au niveau des crêtes iliaques et éventuellement du sternum. Le volume de moelle prélevée varie avec le poids du receveur : en moyenne, un volume de 600 mL à 1 L permet de recueillir de l'ordre de  $2 \text{ à } 3 \times 10^8$  cellules nucléées par kg de poids de receveur. La moelle prélevée est recueillie sur un milieu anticoagulant (18). Actuellement, pour les allogreffes, le greffon est constitué de moelle osseuse dans 31% des cas (15).

#### **Sang périphérique**

L'intérêt de prélever des CSH périphériques est lié au fait que le recueil est plus facile et que l'on évite une anesthésie générale. Le sang périphérique adulte renfermant physiologiquement un très petit nombre de CSH, celles-ci sont mobilisées grâce à l'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF). Les CSH sont ensuite recueillies par cytophérèse. Cette source de CSH est surtout utilisée en matière d'autogreffe mais de façon plus récente, elle est également utilisée dans le cadre des allogreffes. Ce type de greffe permettrait une reconstitution hématologique plus rapide que lorsque l'origine des CSH est la moelle osseuse (19, 20). Actuellement, pour les allogreffes, le greffon est constitué de sang périphérique dans environ 56% des cas. Cette source de CSH est la principale depuis 2004 (avant il s'agissait de la moelle osseuse) et son pourcentage d'utilisation est en constante augmentation (15).

#### **Sang placentaire**

Le sang contenu dans le cordon ombilical renferme un nombre limité de CSH mais celles-ci possèdent une plus grande capacité de prolifération par rapport aux CSH contenues dans le sang périphérique (21). De plus, les CSH de sang placentaire sont intéressantes car elles présentent une certaine « naïveté » immunologique autorisant une liberté un peu plus grande

en matière de compatibilité HLA sans aggraver pour autant les risques de conflits immunologiques post-greffe (21-23). Ces CSH peuvent être utilisées dans le cadre d'allogreffes familiales ou non apparentées, notamment chez les enfants. Actuellement ce type de greffe représente environ 13% des allogreffes (15).

#### **1.1.4. Types de greffes**

##### **Autogreffes ou greffes autologues**

Le donneur et receveur sont une même personne. Ce type de greffe est réalisé en cas de pathologies où la moelle est saine, c'est-à-dire pour les lymphomes seulement et éventuellement des rechutes extra médullaires de leucémies. Les CSH sont alors prélevées puis cryoconservées pour une durée variable, jusqu'à utilisation à des fins de réinjection autologue. Actuellement, ce type de greffe représente environ 65% de la totalité des greffes, avec 3 047 autogreffes en 2010 (15).

##### **Allogreffes ou greffes allogéniques**

Elle suppose un donneur de CSH différent du receveur mais sélectionné en fonction de sa compatibilité au niveau des antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) ou système HLA (Human Leucocyte Antigen). Ce système comprend principalement 2 catégories d'antigènes : les antigènes de classe I (groupes HLA-A, HLA-B et HLA-C) et les antigènes de classe II (groupes HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP). Le système HLA obéit aux lois de la génétique mendélienne en terme de transmission héréditaire. Chaque individu possède 2 gènes HLA pour chaque groupe, l'un d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle. En 2010, 37 centres français ont eu une activité d'allogreffe de CSH et réalisé 1671 greffes (15). L'activité d'allogreffe de CSH est en progression constante, et ce principalement en raison de l'augmentation des allogreffes non apparentées : augmentation de 85% de ce type de greffe entre 2005 et 2010 *versus* 4.5% pour les greffes intrafamiliales pour la même période.

Selon le degré de compatibilité, il existe différents types de greffes :

##### - Les greffes géno-identiques

Le donneur est apparenté. Il s'agit d'un frère ou d'une soeur qui a hérité des mêmes antigènes du système de compatibilité tissulaire (chaque frère ou sœur a une chance sur quatre

d'avoir les mêmes antigènes). Dans le cadre d'allogreffe, il s'agit de la meilleure possibilité car il y a un faible risque de conflit immunologique (rejet ou GVH) mais non absent du fait de l'existence de différence sur des antigènes non identifiables aisément (24).

En France en 2010, 43% des allogreffes ont été réalisées à partir d'un donneur apparenté (15).

#### - Les greffes phéno-identiques

Le donneur peut être un parent ou un donneur volontaire non apparenté inscrit sur un registre national et international partageant avec le patient les mêmes antigènes du système de compatibilité tissulaire.

En effet, lorsqu'un patient n'a pas de donneur familial compatible, le médecin greffeur a la possibilité de faire appel au registre France Greffe de Moelle, registre national de l'Agence de la biomédecine, pour l'aider à identifier soit un donneur non apparenté compatible susceptible de donner sa moelle osseuse, soit une unité de sang placentaire et permettre ainsi au patient d'être greffé. Au 31 décembre 2010, 2 930 patients nationaux étaient inscrits sur le registre français pour une recherche de greffon dont 1 624 ont été inscrits en 2010. 187 519 donneurs volontaires étaient inscrits à la même date (15).

#### - Les greffes incompatibles

Dans certains cas, une moindre compatibilité peut être acceptée. Il s'agit alors de greffes «mismatch» où existe une différence entre donneur et receveur portant sur un ou deux antigènes HLA de classe I ou II. Seules les incompatibilités A, B, C, DR et DQ entraînent un risque immunologique important (25).

### **Greffes syngéniques**

Il s'agit d'un cas particulier d'allogreffe géno-identique qui est réalisée entre deux jumeaux homozygotes. Le donneur est donc totalement HLA-identique au receveur.

## **1.1.5. Conditionnement de la greffe**

Le conditionnement est une étape préalable de préparation, débuté 8 à 10 jours avant la greffe afin d'éviter le rejet de greffe et d'éradiquer d'éventuelles cellules tumorales résiduelles dans le cadre des hémopathies malignes. Classiquement, il consiste en

l'association d'une irradiation corporelle totale (TBI ou Total Body Irradiation) et de cyclophosphamide, avec de nombreuses variantes selon l'indication de la greffe et les protocoles locaux. La recherche d'une meilleure activité antileucémique et d'une moindre toxicité a conduit depuis une dizaine d'années à utiliser aussi des conditionnements purement chimiques comprenant alors toujours du busulfan. D'autres médicaments (cyclophosphamide, étoposide, fludarabine, melphalan et cytarabine) peuvent être associés à la TBI ou au busulfan. Par ailleurs, la démonstration du rôle primordial de l'effet immunologique dans le contrôle de la maladie tumorale en post-allogreffe a permis d'ouvrir la voie à l'utilisation des conditionnements d'intensité réduite dits « atténués », qui privilégient la composante immunosuppressive à la composante chimiothérapique du conditionnement. Le pourcentage de greffes réalisées après conditionnement d'intensité réduite est en augmentation (15).

### **1.1.6. Maladie du greffon contre l'hôte**

#### **Définition**

La maladie du greffon contre l'hôte (GVH) est une complication immunologique fréquente des allogreffes de CSH. Bien que de mécanisme encore incomplètement compris, la GVH est liée à l'activation des lymphocytes T matures du greffon qui reconnaissent sur les tissus de l'hôte une différence des antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité. L'activité cytotoxique qui en résulte est alors directe (lymphocytes cytotoxiques) ou indirecte par recrutement d'autres cellules effectrices et sécrétion de cytokines (TNF, IL1 et INF). Elle se traduit par des manifestations cliniques d'intensité variable touchant principalement la peau, le tube digestif et le foie.

Il en existe deux types : la GVH aiguë et chronique. La GVH aiguë apparaît dans les 100 premiers jours post greffe, le plus souvent au cours du premier mois et touchant surtout la peau, le tube digestif et le foie. L'atteinte cutanée la plus évocatrice est une éruption maculopapuleuse extensive débutant souvent au niveau des paumes des mains, des plantes des pieds et des régions rétro-auriculaires. Tous les intermédiaires sont possibles entre l'érythème localisé atypique et le syndrome de Lyell.

La GVH chronique apparaît à au moins 100 jours post-greffe, peut toucher tous les organes (notamment les yeux, les poumons et les articulations) et entraîne une forte mortalité ou invalidité.

## Classification

Le classement originel de la GVH a été proposé par Glucksberg *et al.* en 1974 (26) et identifiait 5 catégories de patients (grades 0 à 4) en fonction des degrés d'atteinte de chaque organe cible (rash cutané, concentration sérique de la bilirubine et volume de la diarrhée). Cette classification a été largement utilisée et se trouve bien corrélée à la mortalité liée à la greffe de CSH (TRM, transplant related mortality) (27). La classification adaptée de Glucksberg *et al.* (26) modifiée par Armitage (28, 29), pour laquelle la GVH est classée selon sa sévérité en 4 grades cliniques, est présentée dans le tableau I. Ces grades cliniques sont fonction des stades correspondant à des degrés d'atteinte de chaque organe cible (tableau II). De manière générale, les grades I et II ont un pronostic favorable, alors que la mortalité des GVH de grade IV avoisine 100%

Tableau I. Grades de sévérité de la GVH aiguë selon la classification adaptée de Glucksberg *et al.* (26) modifiée par Armitage (28, 29)

Grades Glucksberg	Stade peau	Stade intestin	Stade foie
I	1	0	0
I	2	0	0
II	0-2	1	0-1
II	0-2	0-1	1
II	3	0	1
II	3	0-1	1
II	3	0	0
III	0-2	2	0-2
III	0-2	0-2	2
III	3	0-3	2-3
III	3	2-3	0-3
III	0-3	0-3	4
IV	0-3	4	0-4
IV	4	0-4	0-4



Tableau II. Stades de sévérité de la GVH aiguë selon la classification adaptée de Glucksberg *et al.* (26) modifiée par Armitage (28, 29)

Stade	Peau	Foie	Intestin
1	Eruption maculopapuleuse touchant moins de 25% de la surface corporelle	Bilirubine : 2-3 mg/dL (34-50 µmol/L)	Diarrhée > 500 mL/jour ou nausée, anorexie ou vomissement avec confirmation d'une GH dans le tractus gastro-intestinal haut par biopsie
2	Eruption maculopapuleuse touchant moins de 25 à 50% de la surface corporelle	Bilirubine : 3.1-6 mg/dL (51-102 µmol/L)	Diarrhée > 1000 mL/jour
3	Eruption maculopapuleuse touchant plus de 25 à 50% de la surface corporelle	Bilirubine : 6.1-15 mg/dL (103-255 µmol/L)	Diarrhée > 1500 mL/jour
4	Erythrodermie généralisée avec formation de bulles et de desquamation	Bilirubine > 15 mg/dL (>255 µmol/L)	Diarrhée > 1500 mL/jour et douleurs abdominales +/- iléus

Par la suite, la fondation IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry) a proposé une autre classification en utilisant une grande base de données de patients ayant été greffés de CSH avec un donneur apparenté (30). Cette classification est connue sous le nom de l'index de sévérité IBMTR. Le classement se fait en 5 catégories (0, A, B, C et D) basées sur les différences de TRM, avec un degré de signification de 0.05. L'index IBMTR est un bon indicateur du résultat de la greffe. Cependant, la classification classique de Glucksberg est encore utilisée dans la plupart des centres.

### **Facteurs de risque**

De nombreuses études ont cherché à déterminer des facteurs de risque de GVH. Beaucoup de facteurs sont à prendre en compte, certains étant discutables du fait de résultats contradictoires suivant les études. Les principaux facteurs de risque retrouvés sont les suivants.

#### - Concentration sanguine de ciclosporine

En cas d'administrations discontinues (voie orale ou intra-veineuse), il existe des concentrations sanguines totales cibles de ciclosporine à atteindre pour une efficacité

suffisante de la ciclosporine associée à un moindre de risque de toxicité. Lorsque les concentrations sont mesurées sur un prélèvement effectué juste avant le début de l'administration suivante, il s'agit de concentrations résiduelles (C0). Depuis les années 80, de nombreuses études ont montré une corrélation entre la C0 de ciclosporine et le risque de GVH aiguë (31-36). Plus tard, cette corrélation a également été confirmée en greffe de CSH pédiatrique (37-42). De la même manière, plus la concentration de ciclosporine est faible 5 heures après l'administration, plus le risque de GVH aiguë sévère est important (43). Quelques études n'ont cependant pas retrouvé cette corrélation entre la C0 et le risque de GVH (44-46). Lorsque la ciclosporine est administrée en perfusion continue, pour rendre le risque de GVH acceptable, il faudrait augmenter la concentration cible de ciclosporine à 450-500 ng/mL (47). Ces résultats montrent l'importance d'un suivi thérapeutique précis de la ciclosporine et de l'ajustement de ses doses pour atteindre les concentrations cibles.

#### - Origine des CSH

Il semblerait que les GVH aiguës de type II à IV soient plus fréquentes lorsque les CSH sont issues du sang périphérique plutôt que de la moelle osseuse (48). Cet effet de l'origine des CSH a été évalué par de nombreuses études et se trouve de manière constante associée avec les GVH chroniques (49-60) et de manière un peu moins fréquente avec les GVH aiguës (53, 54).

#### - Donneur apparenté ou non

En cas de LAM, il a été retrouvé une incidence plus importante de GVH chroniques extensives en cas de donneur non apparenté *versus* apparenté (61). Cependant, la survie globale à 4 ans a été similaire entre les deux groupes (61). Des GVH aiguës sévères (grades III et IV) plus fréquentes lorsque le donneur était non apparenté que lorsqu'il l'était ont été observées mais la différence n'était pas significative ( $p = 0.056$ ) (35).

#### - Disparité HLA entre le donneur et le receveur

Plusieurs études montrent qu'une disparité HLA (ou le « mismatch ») importante est un facteur de risque de GVH (3, 62-66). L'utilisation de sérum anti-lymphocytaire (SAL) permet de diminuer le risque. Chez les enfants atteints de GVH chronique, cette disparité est significativement associée à de moins bons résultats en terme de survie (67).

#### - Age du receveur

Il s'agit d'un facteur de risque pour certaines études (68-70) mais pas pour d'autres études comme celle de Storb (71). Par ailleurs, les très jeunes patients auraient un faible risque de GVH aiguë (72). Chez les enfants atteints de GVH chronique, l'âge supérieur à 10 ans est significativement associé à de moins bons résultats en terme de survie (67).

#### - Sexe du donneur et du receveur

Le couple donneur de sexe féminin et receveur de sexe masculin est associé à un plus grand risque de GVH aiguë sévère (66). Une incidence plus élevée de GVH chroniques a également été retrouvée lorsque le donneur était une femme par rapport à un homme (69, 73).

#### - Infections virales ou bactériennes

La sérologie positive à certains virus du groupe Herpès chez le donneur ou chez le receveur peut également être considérée comme un facteur de risque de GVH (64, 74). La présence d'une infection bactérienne pendant la période péritransplantation (de 3 mois avant la greffe à 100 jours post greffe) est un facteur de risque de GVH (75).

#### - GVH aiguë

La GVH aiguë, en particulier de grade II à IV, est un des facteurs de risque les plus importants de l'apparition d'une GVH chronique chez les adultes (68, 69) comme chez les enfants (75, 76).

#### - Type de perfusion de cyclosporine

Il semblerait que le mode d'administration de la cyclosporine en perfusion intra-veineuse continue soit moins efficace en augmentant l'incidence des GVH aiguës sévères par rapport aux perfusions discontinues (3).

#### - Indication de la greffe

La LAM est un facteur de risque de GVH (70). Chez les patients greffés de moelle osseuse avec un donneur non apparenté, la LMC est associée à un risque plus important de GVH aiguë sévère (66).

#### - Etat d'avancement de la maladie au moment de la transplantation

Chez les enfants atteints de GVH chronique, plus l'état d'avancement de la maladie au moment de la transplantation était important, moins la survie est bonne (67).

#### - Administration de G-CSF

L'administration de facteurs de croissance spécifique des polynucléaires neutrophiles (G-CSF) semblerait associée à une augmentation des GVH aiguës et chroniques (77).

#### - Conditionnement

Le conditionnement d'intensité réduite est associé à une diminution des GVH (66, 78-80).

#### - Traitement prophylactique de la GVH

Deux grands essais cliniques randomisés de phase III comparant tacrolimus et methotrexate *versus* ciclosporine et methotrexate ont montré qu'il y avait une réduction significative de l'incidence des GVH aiguës chez les patients recevant le tacrolimus (81-83). Par la suite, ce résultat a été confirmé par une autre étude (66). Cependant, les deux essais n'ont pas montré de différence concernant les GVH chroniques et dans l'étude impliquant des greffes avec donneur apparenté, la survie globale a été en fait moins bonne dans le bras tacrolimus (83).

#### **Analyse à partir de facteurs de risque combinés**

Des analyses avec des facteurs de risque combinés ont également été réalisées. Par exemple, en 2012, l'équipe de Jagasia a déterminé 6 catégories de patients en fonction du type de conditionnement de greffe, de l'origine des cellules souches et le type de donneur. Chez les patients dont le donneur était apparenté, il a été montré que les patients ayant eu un conditionnement myéloablatif sans irradiation totale et dont l'origine de la greffe était la moelle osseuse ainsi que chez les patients ayant eu un conditionnement d'intensité réduite et dont l'origine de la greffe étaient les cellules souches périphériques avaient un risque significativement réduit de GVH aiguë de grade B à D par rapport aux autres groupes (66).

Par ailleurs, compte tenu de la grande quantité de facteurs de risque retrouvés dans la littérature et leur grande variabilité, à partir d'un grand nombre de patients une étude a élaboré des scores de risques en fonction de plusieurs facteurs de risque de GVH chronique. Le score de risque multicritère de mortalité à 5 ans non liée au rejet prend en compte les 10 facteurs suivants : âge, GVH aiguë précédente, temps entre la greffe et la GVH chronique, le type de donneur, le statut de la maladie au moment de la transplantation, la prophylaxie de la GVH, la différence de sexe entre le donneur et le receveur, la bilirubine sérique, le score de Karnofsky et le taux de plaquettes. Six groupes de risque ont été déterminés, dont le risque de mortalité à 5 ans non liée au rejet va de 5 à 72% (84).

## **1.2. Transplantation hépatique**

### **1.2.1. Généralités**

La première transplantation hépatique (TH) a eu lieu en 1963 (85). Elle avait été réalisée par le Pr Thomas Starzl chez un enfant de 3 ans atteint d'une atrésie des voies biliaires ayant conduit à une insuffisance hépatique. L'enfant est décédé d'une hémorragie lors de l'opération qui a eu lieu à Denver, Colorado. En 1983, une conférence de consensus marque la fin de la période expérimentale de cette technique. Depuis, des centaines de milliers de transplantations ont été réalisées.

La TH est une intervention chirurgicale lourde permettant de remplacer un foie malade par un foie sain. Elle représente le seul traitement possible d'un certain nombre d'affections mortelles du foie pour lesquelles il n'existe pas de thérapeutique alternative. Elle s'adresse à des patients en insuffisance hépatique terminale.

L'activité de prélèvement d'organe (tous organes confondus) est en augmentation régulière depuis 1994 avec une légère régression entre 2009 et 2010. Le taux d'opposition au prélèvement reste stable au dessus de 30% chez les personnes en état de mort encéphalique recensées. Concernant l'activité de TH, qui semblait atteindre un plateau en 2009, elle a légèrement progressé en 2010. En effet, l'activité de TH a augmenté de 8% en deux ans avec 1 092 transplantations en 2010 contre 1 011 en 2008, alors que le taux de prélèvement des donneurs a baissé de 5.5%. Ce résultat a été obtenu grâce à l'amélioration de l'efficacité du prélèvement hépatique (taux de donneurs prélevés du foie parmi les donneurs prélevés d'au moins un organe) (15).

En France en 2010, 1 092 personnes dont 75 de moins de 18 ans ont été transplantées et au 31 décembre 2010, 9 844 personnes étaient porteuses d'un greffon fonctionnel (15).

### **1.2.2. Indications**

D'après l'article sur la TH paru en 2012 dans le Journal of the American Medical Association (JAMA) (86) et les recommandations de la Haute Autorité de Santé suite à la Conférence de Consensus de 2005 (87), les indications de la TH sont majoritairement les maladies chroniques du foie (69% des indications) : dans ce groupe 58% sont des cirrhoses et 11% des cholestases chroniques. Dans le groupe des cirrhoses, celles liées à l'alcool, au virus

de l'hépatite C et à celui de l'hépatite B représentent respectivement 18%, 14% et 3% des indications de TH. Les carcinomes hépatocellulaires (CHC) totalisent 12% des indications.

En cas d'hépatites virales B et C, la TH doit être envisagée en cas d'hépatite fulminante, de cirrhose décompensée et/ou de carcinome hépatocellulaire. En 2003, les hépatites virales représentaient 20% des indications des TH en France, soit environ 200 à 250 TH par an (sans compter les TH pour CHC). Le bien-fondé de l'indication de TH pour hépatite B n'est aujourd'hui plus discuté, et la survie à moyen et long terme est parmi les meilleures (75% à 5 ans et 63% à 10 ans dans le registre européen en 2003). Le principal problème est la prévention de la récurrence sur le greffon, dont le risque (de l'ordre de 80% avant l'instauration de mesures préventives) croît avec la charge virale prétransplantation.

Les maladies cholestatiques chroniques du foie sont une des indications de la TH et correspondent à la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante chez l'adulte et à l'atrésie des voies biliaires chez l'enfant.

La cirrhose est une indication quelle qu'en soit l'origine : infection virale B ou C, hépatite chronique auto-immune ou alcoolisme.

La cirrhose alcoolique représente la première cause de TH en France et la seconde en Europe et aux États-Unis. Sur les 850 TH réalisées en France en 2003, 270 l'ont été pour des cirrhoses alcooliques. La survie selon le registre européen est de 83% à 1 an, 72% à 5 ans, 59% à 10 ans. Dans le cas d'une cirrhose alcoolique, la TH ne doit être envisagée qu'après une période d'abstinence minimale de 6 mois.

Dans le cas d'une cirrhose à virus B répliquant, il existe un risque élevé de réinfection du greffon par le virus B et l'administration prolongée de très hautes doses d'immunoglobulines anti-HBs après la transplantation permet de diminuer de façon significative le taux de réinfection du greffon, mais le traitement pré ou post transplantation par interféron et/ou lamivudine est encore mal codifié. Dans le cas d'une cirrhose virale C, la persistance du virus C après la transplantation est constante mais n'altère pas la survie. Le pronostic à plus long terme est mal connu.

Les hépatites fulminantes et sub-fulminantes causées par la prise de certains médicaments, un surdosage en paracétamol ou encore l'ingestion de certains champignons vénéneux, sont également des indications de la TH. L'indication de transplantation est basée sur la chute du taux de prothrombine et surtout de l'accéléline (facteur V inférieur à 20%) associée à une encéphalopathie hépatique.

Enfin, certaines maladies métaboliques et génétiques avec atteinte hépatique comme la maladie de Wilson, le déficit en  $\alpha$ -1-antitrypsine, l'hémochromatose génétique décompensée au stade de cirrhose, les déficits du cycle de l'urée comme la Carbamyl Phosphate Synthétase peuvent être des indications de TH.

### **1.2.3. Origines du foie**

Le greffon est prélevé essentiellement sur des personnes décédées en état de mort encéphalique. Sinon, de manière très marginale, il peut être prélevé sur des personnes décédées d'un arrêt cardiaque ou encore sur des donneurs vivants dans certaines conditions.

#### **Donneur décédé en état de mort encéphalique**

Il s'agit de l'immense majorité de l'origine des greffons des patients actuellement transplantés : 1 072 / 1 092 des patients transplantés hépatiques en 2010.

#### **Donneur décédé après arrêt cardiaque**

En accord avec les recommandations du comité d'éthique de l'Établissement français des Transplantations diffusées en juin 2004 et après modification de la réglementation (décret du 2 août 2005) autorisant les équipes médicales à mettre en place des moyens de préservation des organes en attendant l'entretien avec les proches, le prélèvement d'organes sur des sujets décédés après arrêt cardiaque (et non par mort encéphalique) a démarré en France en 2006 à la condition que tous les centres adoptent une procédure médicale et chirurgicale commune.

Un comité de pilotage coordonné par l'Agence a rédigé l'ensemble des procédures et encadré le démarrage et le suivi de cette activité de prélèvement, de rein dans un premier temps puis de foie en 2010. Douze centres ont signé la convention et sont donc autorisés à pratiquer ce type de prélèvement. L'activité de prélèvement a effectivement démarré en 2010, avec 3 prélèvements suivi de transplantation en 2010 (15).

## **Donneur vivant**

Le don d'organe de son vivant concerne essentiellement la transplantation de rein et dans une moindre mesure la transplantation d'un lobe de foie.

Pour répondre aux attentes des patients et de leurs familles et favoriser ce type de transplantation, la loi de bioéthique de 2004 a élargi le cercle des donneurs vivants d'organes. La procédure de don, définie par le Code de la Santé Publique, pose les conditions permettant l'expression libre et éclairée du consentement du donneur. Ce dernier est auditionné par un comité d'experts qui donne l'autorisation de prélèvement. L'Agence de la biomédecine est chargée de la gestion de ces comités d'experts, dénommés « comités donneur vivant », et de la tenue d'un registre national de suivi de l'état de santé des donneurs vivants, sans limite dans le temps. Elle s'efforce également, par différents moyens, de favoriser ce type de transplantation pour les patients, d'en améliorer les conditions de réalisation pour les équipes tout en s'assurant des mesures de protection pour les donneurs.

La transplantation à partir de donneur vivant tarde à prendre son essor en France et reste très marginale pour le foie : 17 transplantations en 2010 (1.6%) (15).

En effet, le risque trop élevé de complications graves après un don de foie entre adultes explique en grande partie la prudence des équipes de TH vis-à-vis de ce type de transplantation. Dans ce contexte, les TH sont essentiellement pédiatriques, résultant de dons de parents à enfants.

L'Agence de la biomédecine assure au niveau local le secrétariat des comités donneur vivant, qui sont répartis sur tout le territoire. Elle favorise également les échanges entre eux et avec les équipes de transplantation.

En France en 2010, les comités ont auditionné 23 personnes donneuses potentielles d'un lobe de foie (15). Dans leur très grande majorité, ces donneurs potentiels appartiennent à la famille au premier degré du receveur (parents, enfants, frère et soeurs, conjoints).

Le don du vivant est régi par une procédure strictement encadrée par la loi.



## **1.2.4. Types de transplantations**

### **Transplantation orthotopique**

Le type de TH le plus souvent réalisé en France est la transplantation d'un foie entier qui provient d'un donneur décédé. C'est une TH orthotopique, ce qui veut dire que le greffon est implanté, après l'ablation du foie natif, en lieu et place du foie malade.

### **Transplantation hépatique "Domino"**

Certains patients nécessitent une TH pour une maladie neurologique liée au foie (neuropathie amyloïde). Cette maladie ne se déclare qu'après plusieurs décennies. Leur foie, même s'il a été responsable de l'apparition de la maladie neurologique, est tout à fait fonctionnel et peut-être utilisé chez un autre patient qui a besoin rapidement d'un foie fonctionnel. Chez ce second patient, la neuropathie amyloïde, si elle apparaît, mettra aussi plusieurs années à devenir active.

Ce type de TH est appelé "TH domino". Ces stratégies sont utilisées avec l'accord du patient donneur et du receveur : ils sont informés longuement au cours d'un entretien des avantages et des inconvénients de cette technique. Dans l'hypothèse où la maladie neurologique deviendrait active chez le patient receveur, une nouvelle TH serait réalisée.

### **Transplantation de foie partiel ou "Split"**

Un foie entier, prélevé chez un donneur en mort encéphalique ou dans le cadre d'un programme domino, s'il est suffisamment volumineux, peut être divisé en 2 pour être donné à deux receveurs. On parle de transplantation « split », du mot anglais qui signifie diviser ou répartir.

Dans l'immense majorité des cas, ce « split » est fait pour permettre une TH chez un enfant et un adulte. Exceptionnellement, il est possible de partager un foie pour transplanter 2 adultes de petites tailles. Cette technique a été inventée à l'hôpital Paul Brousse par Henri Bismuth en 1980 devant la présence au même moment de 2 enfants en insuffisance hépatique aiguë et la disponibilité d'un seul foie entier.

## **Transplantation partielle à donneur vivant**

La TH dite « à donneur vivant » consiste à effectuer un prélèvement d'une partie du foie chez un membre de la famille pour en réaliser la transplantation chez le patient en attente de TH.

Alors qu'elle est la stratégie principale en Asie où le don d'organe après le décès est quasi-inexistant pour des raisons religieuses, ce type de méthode est utilisé dans moins de 5% des transplantations réalisées en Europe. Outre l'existence du don après décès, le principal frein au développement de la transplantation à donneur vivant est lié aux risques de l'hépatectomie qu'impose la réalisation du prélèvement chez le donneur sain.

En France, la réalisation d'une TH dans le cadre d'un don intrafamilial est très encadrée sur le plan réglementaire. Le principal intérêt de cette technique est de permettre à des patients en attente de TH d'accéder plus rapidement à un greffon, mais en aucun cas elle ne change les règles d'accès à la transplantation. En cas de doute quant à la faisabilité de l'hépatectomie chez le donneur dans des conditions satisfaisantes de sécurité, la transplantation n'est pas effectuée. Dans tous les cas, c'est la sécurité du donneur qui prime sur la nécessité de réaliser la transplantation chez le receveur.

Le risque de l'hépatectomie chez le donneur est d'abord dépendant des possibilités de régénération hépatique, phénomène qui permet de retrouver en une semaine une fonction puis un volume hépatique nécessaire et suffisant à une vie normale. La régénération hépatique est dépendante de la compliance du foie, c'est à dire de la capacité du foie à absorber à volume presque constant un plus fort débit de sang comme le ferait une éponge. C'est cette capacité qu'a le foie à se comporter comme une éponge qui est responsable du phénomène de régénération hépatique. C'est la régénération hépatique, grâce à la multiplication des cellules du foie, qui permet de retrouver un volume et une fonction identiques à ce qu'elles étaient avant l'hépatectomie.

En dessous d'un certain volume de foie restant, la compliance hépatique est dépassée, comme le serait une petite éponge face à un très grand volume de liquide, et la régénération hépatique ne débute pas. Ainsi, l'hépatectomie chez le donneur ne doit pas emporter plus de 60% du volume du foie total. Ce volume de foie chez le receveur doit correspondre au minimum à 0.8% du poids corporel afin de permettre, là aussi, une régénération hépatique.

### **Transplantation hépatique auxiliaire**

Ce type de transplantation s'adresse à des patient extrêmement sélectionnés atteints d'une pathologie extrêmement sévère (hépatite fulminante le plus souvent) mais ayant un espoir de guérison de leur foie natif. La TH auxiliaire correspond à la mise en place d'un greffon (entier ou partiel) en conservant tout le foie ou une partie du foie natif. L'objectif à terme est de retirer le foie greffé si le foie natif guérit, afin d'arrêter les traitements immunosuppresseurs.



Pour la voie injectable, il n'existe que la spécialité SANDIMMUN® dosée à 50 mg/mL et en volume de 1 et 5 mL. Par ailleurs, la ciclosporine est également le principe actif du RESTASIS®, un collyre utilisé dans le syndrome de l'œil sec.

La ciclosporine peut être administrée par voie intraveineuse sous forme d'une solution injectable à 50 mg/mL d'alcool éthylique et d'huile de ricin polyoxyéthylée (SANDIMMUN®). Elle peut également être administrée *per os*, soit en capsules de 25 et 50 mg ou en soluté buvable à 100 mg/mL (SANDIMMUN®), soit sous forme d'une microémulsion disponible en soluté buvable à 100 mg/mL et de capsules à 10, 25, 50 et 100 mg (NEORAL®).

### 2.1.2. Tacrolimus

Le tacrolimus (initialement appelé FK 506) est un macrolide lactone immunosuppresseur isolé du champignon *Streptomyces tsukubaensis*. Il s'agit d'une molécule très lipophile et son poids moléculaire est de 804 (figure 2) (90).

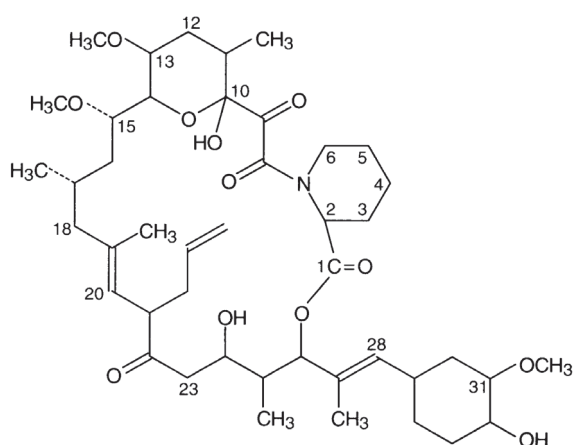


Figure 2. Structure chimique du tacrolimus

En France, le tacrolimus est la molécule active des spécialités suivantes : PROGRAF®, MODIGRAF® et ADVAGRAF® LP. PROGRAF® est une forme à libération immédiate qui s'administre en 2 prises par jour. Pour la voie orale, cette spécialité existe sous forme de gélule de 0.5, 1 et 5 mg et pour la voie injectable en solution de 5 mg/1 mL. MODIGRAF® existe sous forme de sachets dose destinés à la voie orale dosés à 0.2 et 1 mg. ADVAGRAF® LP est une spécialité qui est apparue plus récemment et qui correspond une forme à libération

prolongée qui s'administre en une seule prise par jour afin d'améliorer l'observance des patients. Cette spécialité existe sous forme de gélules de 0.5, 1, 3 et 5 mg.

Les essais cliniques d'équivalence entre ces 2 formes promus par des laboratoires pharmaceutiques ont montrés que chez des patients transplantés hépatiques ou rénaux stables, la forme à libération prolongée entraînait des concentrations maximales plus faibles mais une exposition (définie par l'AUC) équivalente et des concentrations résiduelles similaires (91). Cependant, il semblerait en fait que la majorité des études indiquent qu'à dose journalière égale, l'exposition soit moindre avec la forme à libération prolongée, en particulier pendant la phase précoce post-transplantation (92, 93). Enfin, des études de phase III ont montré plus de rejets chez des patients transplantés hépatiques et rénaux avec ADVAGRAF® LP qu'avec PROGRAF® (92).

Par ailleurs, des confusions entre ces 2 formes ont eu lieu (à la prescription, à la dispensation ou à l'administration) entraînant d'une part des sous-doses de tacrolimus et des rejets aigus confirmés par des organes transplantés et d'autre part des surdoses (94).

Enfin, le tacrolimus est également le principe actif de la spécialité PROTOPIC® sous forme de pommade dosée à 0.03% et 1% et utilisée pour le traitement de la dermatite atopique.

## **2.2. Indications**

La ciclosporine et le tacrolimus sont principalement utilisés dans le cadre de greffe ou de transplantation. D'après le résumé des caractéristiques du produit (RCP) du VIDAL® 2012 pour la ciclosporine (95) et le tacrolimus (96), les indications de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) sont, dans les greffes d'organe (foie, reins et cœur) :

- Prévention du rejet du greffon, y compris dans la phase initiale de transplantation hépatique.
- Traitement du rejet, chez des patients initialement traités par d'autres protocoles immunosuppresseurs.

La ciclosporine est également utilisée dans la greffe de CSH :

- Prévention du rejet après greffe.
- Traitement préventif ou curatif de la GVH.

Malgré l'arrivée de nouveaux médicaments immunosuppresseurs (tacrolimus, mycophénolate mofetil, sirolimus), la ciclosporine reste l'agent de référence pour la prophylaxie de la GVH dans la plupart des centres. Dans ce cas, la ciclosporine peut être associée au méthotrexate ou au mycophénolate mofetil ou encore être administrée seule comme par exemple à l'hôpital Debrousse. Dans le cadre d'une greffe phéno-identique, il est également ajouté du sérum anti-lymphocytaire (SAL) : THYMOGLOBULINE®. La ciclosporine est d'abord administrée par voie parentérale, puis lorsque le patient peut s'alimenter, en général vers la troisième semaine post-greffe, un relais *per os* est effectué. Le traitement est poursuivi pendant au moins 6 mois puis, en l'absence de GVH ou en cas de GVH contrôlée, diminué très progressivement jusqu'à l'arrêt total.

En ce qui concerne les pathologies non malignes, une GVH aiguë est non souhaitée. En revanche, dans le cadre des hémopathies malignes, une GVH aiguë légère à modérée (limitée si possible à la GVH cutanée) est souhaitée car elle entraîne une diminution des rechutes leucémiques par l'effet GVL (Graft *Versus* Leukemia) (97) : les lymphocytes T du donneur permettent d'éliminer les clones des cellules leucémiques (la maladie résiduelle).

Lorsqu'une GVH aiguë non souhaitée apparaît, son traitement consiste en l'augmentation des doses de ciclosporine. Puis, selon la sévérité, des corticoïdes peuvent être ajoutés. La corticothérapie, à la dose d'attaque de 2 à 10 mg/kg/j selon la gravité de la GVH et les protocoles locaux, est poursuivie de plusieurs jours à plusieurs semaines à dose lentement régressive. En cas de cortico-résistance, il est possible de recourir aux anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs à l'IL-2 voire au SAL. La survie dépend de la bonne qualité du contrôle de la GVH.

D'après le RCP, la ciclosporine est également indiquée dans :

- Le traitement de deuxième intention des syndromes néphrotiques corticodépendants et corticorésistants avec lésions glomérulaires minimales ou hyalinoses segmentaires et focales primitives. La ciclosporine peut être prescrite pour induire et maintenir une rémission ou pour maintenir une rémission induite par les corticoïdes, permettant le plus souvent la réduction ou la suppression de la corticothérapie.
- Les formes étendues et sévères de psoriasis, en cas d'inefficacité, d'intolérance ou de contre-indications des traitements classiques (puvathérapie, rétinoïdes, méthotrexate).

- Les formes sévères de dermatite atopique de l'adulte, en cas d'inefficacité, d'intolérance ou de contre-indications des traitements classiques (photothérapie et/ou photochimiothérapie).
- Les formes actives et sévères de polyarthrite rhumatoïde en cas d'inefficacité, d'intolérance ou de contre-indications des traitements classiques, y compris le méthotrexate.
- Les uvéites intermédiaires ou postérieures non infectieuses sévères, menaçant la vision, en cas d'échec de la corticothérapie.
- Le traitement des aplasies médullaires acquises sévères ne pouvant bénéficier d'une allogreffe de moelle osseuse.

### **2.3. Mécanisme d'action**

La ciclosporine et le tacrolimus produisent des effets identiques sur la transduction du signal dans les lymphocytes T, conduisant à l'effet immunosuppresseur. Cet effet apparaît après la formation d'un complexe hétérodimérique obtenu par la liaison de la ciclosporine ou le tacrolimus à une protéine récepteur cytosolique dans les lymphocytes T. Cette protéine est appelée cyclophiline pour la ciclosporine A et FKBP12 pour le tacrolimus.

Ce complexe se lie ensuite à la calcineurine, inhibant l'activité phosphatase sérine-thréonine  $Ca^{2+}$  dépendante de la calcineurine. Cette activité phosphatasique est indispensable à la déphosphorylation des protéines cytosoliques de régulation qui, après éviction du phosphate, passent dans le noyau pour servir de sous-unités de complexes de facteurs de transcription (98). L'activation des cellules T augmente la transcription de nombreux gènes des cellules T qui codent pour des cytokines spécifiques, particulièrement pour l'interleukine-2 (IL-2), certains protooncogènes et certains récepteurs de cytokines (par exemple le récepteur de l'IL-2) (99). L'inhibition de l'activité de la calcineurine entraîne donc la suppression de la cascade d'évènements qu'elle stimule.

### **2.4. Propriétés PK**

La PK permet d'étudier le devenir d'une substance dans l'organisme suivant plusieurs phases consécutives : l'absorption, la distribution, le métabolisme et enfin l'élimination de cette substance.



## 2.4.1. Ciclosporine

### Absorption

La ciclosporine administrée *per os* dans sa formulation initiale en gélules est absorbée lentement et incomplètement principalement au niveau de l'intestin grêle (100) et plus particulièrement au niveau du duodénum et du jéjunum. Cette faible absorption pourrait être due au rôle de reflux de la P-gp ainsi qu'à un effet de premier passage intestinal et hépatique par le Cytochrome P450 (CYP) 3A4 (15 à 30% de la dose de ciclosporine seraient ainsi métabolisés avant d'atteindre la circulation systémique) (101). Le pic de la concentration sanguine de la ciclosporine survient en général 1.3 à 4 heures après administration orale (102) avec une biodisponibilité de 30% en moyenne (103). Par ailleurs, la prise d'aliments entraîne de fortes variations (augmentations ou diminutions) de l'absorption gastro-intestinale (103). Une nouvelle formulation galénique sous forme de microémulsion (NEORAL®) commercialisée en 1995 a été mise au point pour améliorer l'absorption digestive. La biodisponibilité de la microémulsion est supérieure à celle obtenue avec la formulation initiale (en moyenne 30% plus importante (104)) et la concentration sanguine maximale est obtenue plus précocement (1 à 2 heures après la prise). De plus, l'absorption semble moins dépendante de la prise alimentaire donc moins variable (105). Les essais sur le volontaire sain et chez des greffés rénaux stabilisés ont montré une diminution des variabilités inter et intra individuelles des paramètres PK avec la forme microémulsion (102). La variabilité de la biodisponibilité de la ciclosporine administrée *per os* est en partie attribuée aux différences inter-individuelles de l'activité de la P-gp (106, 107).

### Distribution

#### Liaisons plasmatique et sanguine

Dans la circulation générale, la ciclosporine est liée de façon très importante aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques. Elle se trouve à 30 à 45% dans le plasma, 10 à 20% dans les leucocytes (4 à 9% dans les lymphocytes et 5 à 12% dans les granulocytes) et 40 à 60% dans les érythrocytes. Dans le plasma, une proportion de 93% de la ciclosporine se trouve liée aux protéines. Les lipoprotéines représentent 93% de ces protéines : les HDL surtout (61%) puis les LDL (29%) et dans une proportion moindre les VLDL (3%) (108). Ces chiffres sont valables pour des concentrations physiologiques de lipoprotéines. Les autres

protéines de liaison sont essentiellement l'albumine et les globulines. La fraction libre de ciclosporine est donc très faible et varie de manière importante selon les individus. La distribution sanguine de la ciclosporine dépend principalement de la concentration sanguine de ciclosporine, de la concentration en lipoprotéines (108), de l'hématocrite (109) et de la température corporelle (108).

#### Distribution tissulaire

Du fait de sa lipophilie importante, elle possède un volume de distribution relativement important de 3.5 L/Kg de masse corporelle (110). Ce volume a été calculé à partir des concentrations sanguines totales. Elle se distribue dans de nombreux tissus avec une accumulation dans les tissus riches en lipides comme le tissu adipeux, le foie et les ganglions lymphatiques. Des concentrations importantes de ciclosporine sont retrouvées également dans le pancréas, la rate, les reins, les poumons, la moelle osseuse et le cœur (111).

#### **Métabolisme et élimination**

La ciclosporine est largement métabolisée au niveau de la paroi intestinale, du foie et du rein, en plus de 30 métabolites. Il existe des différences inter-individuelles importantes dans son métabolisme (99). La partie cyclique de la molécule est relativement résistante au catabolisme alors que les chaînes latérales sont très métabolisées, majoritairement par les systèmes de mono-oxygénases du CYP 3A, en particulier 3A4 (90). Les principales voies de biotransformation relèvent de monohydroxylation, de dihydroxylation et de N-déméthylation oxydante. Les principaux métabolites sont l'AM1 (métabolite monohydroxylé actif), l'AM9 (métabolite 9- $\gamma$ ) et l'AM4N (métabolite 4N-déméthylé). Tous les métabolites réunis représentent moins de 10% de l'activité immunosuppressive de la molécule mère et sont moins néphrotoxiques que la ciclosporine.

La ciclosporine et ses métabolites sont éliminés à plus de 90% par voie biliaire, avec moins de 1% sous forme inchangée (112).

La demi-vie d'élimination terminale est en moyenne de 6 heures mais très variable d'un individu à un autre et se trouve significativement augmentée en cas de l'altération hépatique modérée (113).

Les valeurs de clairance apparente retrouvées dans la littérature sont assez variables d'un individu à un autre et sont situées en moyenne entre 20 et 85 L/h (114-117) et se trouvent significativement réduites en cas d'altération hépatique modérée (113).

### **Excrétion**

Moins de 3% de la dose est excrétée dans l'urine et principalement sous forme de métabolites hydroxylés (118).

## **2.4.2. Tacrolimus**

### **Absorption**

Par voie orale, les études chez l'homme ont montré que le tacrolimus peut être absorbé à tous les niveaux du tractus gastro-intestinal. Après administration de gélules d'ADVAGRAF® LP ou de PROGRAF®, les concentrations sanguines maximales (C<sub>max</sub>) de tacrolimus sont atteintes au bout de 1 à 3 heures (T<sub>max</sub>) (96, 119). D'après le résumé des caractéristiques du produit, chez certains patients, le tacrolimus semble être absorbé de manière continue sur une période prolongée, conduisant à un profil d'absorption relativement plat (95). La vitesse et le taux d'absorption du tacrolimus sont augmentés à jeun. Ils sont diminués en présence d'aliments, l'effet étant plus prononcé après un repas riche en graisses et moindre après un repas riche en hydrates de carbone (96).

Après administration orale (0.30 mg/kg/jour) à des patients transplantés hépatiques, l'état stationnaire des concentrations plasmatiques de tacrolimus est atteint en 3 jours chez la majorité des patients.

Une étude chez des patients transplantés hépatique a montrée une absorption orale d'ordre 1 avec une constante de vitesse d'absorption du tacrolimus (K<sub>abs</sub>) de moyenne  $4.5 \pm 3 \text{ h}^{-1}$  (variabilité importante) (120).

La P-gp diminue l'absorption du tacrolimus en le faisant passer dans la lumière intestinale (tout ce qui concerne la P-gp est détaillé dans la partie sur la P-gp dans le paragraphe 2.5.3 covariables génétiques).

Le métabolisme intestinal par les isoenzymes du cytochrome P450-3A gastrointestinal et le transport par la P-gp contribuent à la grande variabilité dans la vitesse et le taux d'absorption du tacrolimus (121-123).

La biodisponibilité par voie orale est faible, en moyenne de 17 à 22% (124). Une forte variabilité a été retrouvée, allant de 5 à 93% avec une moyenne de 25% environ (90, 120, 125). Deux autres études ont trouvé une biodisponibilité par voie orale située entre 5 et 67% (126, 127). Chez des transplantés hépatiques stables, la biodisponibilité orale du tacrolimus est diminuée en cas d'administration après un repas à teneur modérée en graisses (34% de l'apport calorique) (96).

La biodisponibilité varie en fonction du niveau d'expression de la P-gp et des isoenzymes du cytochrome P450-3A chez le patient (124, 128-130). La biodisponibilité du tacrolimus est donc également modifiée en cas d'association avec des médicaments inducteurs ou inhibiteurs de la P-gp et des isoenzymes du cytochrome P450-3A (131). Une altération hépatique entraîne une augmentation de la biodisponibilité orale (132, 133). Une diarrhée persistante chez le patient entraîne une augmentation de la biodisponibilité (probablement par altération de l'activité de la P-gp et/ou des isoenzymes du cytochrome P450-3A intestinaux) (134-137).

## **Distribution**

### Liaison sanguine

Dans le sang total, le tacrolimus est fortement lié aux érythrocytes, avec pour résultat un rapport de distribution des concentrations sang total/plasma d'environ 20 (7). Ce rapport a également été trouvé à 15 (variation entre 4 et 114) (90), à 56 (120) ou encore entre 4 et 39 (127). Enfin, une autre étude a également trouvé une valeur de 6 en moyenne pour des concentrations sanguines de 16.5–28.7 ng/mL et de 107 pour des concentrations sanguines de 3–15.2 ng/mL (138).

En plus de sa liaison aux érythrocytes (environ 83%), le tacrolimus est également lié aux protéines plasmatiques (environ 16%) et aux lymphocytes (0.61%) (138). La liaison aux lymphocytes est saturable (90). Une protéine cytosolique avec un poids moléculaire allant de 18 à 19 kD semblerait être responsable de la liaison du tacrolimus dans les lymphocytes et la concentration par cellule serait plus importante que celle dans les érythrocytes (139).

### Liaison plasmatique

Dans le plasma, le tacrolimus est fortement lié aux protéines plasmatiques, de 72 à 77% à partir d'étude d'ultracentrifugation (140) et 98.8% à partir d'études d'ultrafiltration (139). La fraction libre plasmatique est d'environ 0.012 (141).

Le tacrolimus se lie essentiellement à l'albumine sérique et à l'alpha-1-glycoprotéine acide (90, 125, 138, 139). La proportion de liaison à l'alpha-1-glycoprotéine acide varie entre 67 et 91% (90). Contrairement à la ciclosporine, le tacrolimus ne se lie pas de façon prépondérante aux lipoprotéines, le pourcentage de liaison aux lipoprotéines varie de 24 à 54% (90, 138).

Dans le sang, la répartition entre les érythrocytes et le plasma (rapport de distribution des concentrations sang total/plasma) dépend de la concentration en tacrolimus, de l'hématocrite, de la température de l'échantillon et la concentration dans le plasma des protéines de liaison du tacrolimus (90).

### Distribution tissulaire

Le tacrolimus est largement distribué dans l'organisme. Dans les études animales, il a été montré que le tacrolimus s'accumulait particulièrement dans les poumons, la rate, les reins, le cœur, le pancréas, le cerveau, le muscle et le foie (90, 142). Il passe également la barrière placentaire et dans le lait (90, 143).

La concentration de tacrolimus étant plus importante dans le sang total que dans le plasma, le volume de distribution déterminé à partir de la concentration plasmatique est plus important qu'à partir de la concentration dans le sang total.

*- Volume de distribution déterminé à partir des concentrations plasmatiques :*

Chez les sujets sains, à l'état d'équilibre, le volume de distribution déterminé à partir des concentrations plasmatiques est d'environ 17 L/kg (127, 144). Chez les patients transplantés, ce volume varie entre 5 et 65 L/kg (127).

Chez les patients adultes transplantés hépatiques, à partir des concentrations plasmatiques, le volume de distribution moyen est d'environ 30 L/kg (120).

*- Volume de distribution déterminé à partir des concentrations sanguines :*

Chez les sujets sains, la valeur du volume de distribution déterminé à partir des concentrations dans le sang total est de 45 L en moyenne (0.63 L/kg) (144). Une autre étude a trouvé un

volume de distribution moyen un peu plus élevé à 1.03 L/kg avec une variabilité interindividuelle assez importante (de 0.5 à 1.4 L/kg) (90).

Chez les patients adultes transplantés hépatiques, à partir des concentrations sanguines, le volume apparent de distribution moyen (V/F) est d'environ 400 L avec une variabilité assez importante (11).

### **Métabolisme et élimination**

Après administration intraveineuse et orale de tacrolimus marqué au carbone 14 (<sup>14</sup>C), la plupart de la radioactivité est éliminée dans les fèces : 77.8% de la dose administrée par voie intraveineuse et 94.9% de la dose administrée par voie orale. La voie d'élimination principale est la bile (145).

Le tacrolimus est largement métabolisé dans le foie par le CYP3A4 et le CYP3A5 (125, 146).

#### - Métabolites

Le tacrolimus subit des réactions d'O-déméthylation, d'hydroxylation et/ou des réactions d'oxydation métabolique (124). Plusieurs métabolites proviennent d'une réaction en 2 étapes : oxydation par les enzymes du CYP qui déstabilise le macrolide menant à son réarrangement (124). Bien que le CYP3A soit principalement responsable de la déméthylation du tacrolimus (147), il n'est pas exclu que d'autres CYP en dehors du CYP3A y participent de façon minoritaire (90, 127). Il y a au moins 15 métabolites mais à part le 13-O-déméthyl-tacrolimus qui possède *in vitro* une activité immunosuppressive similaire à celle du tacrolimus (148), les autres métabolites présentent une activité immunosuppressive négligeable (124). Dans la circulation systémique, un seul des métabolites inactifs est présent à faible concentration. Par conséquent, les métabolites ne contribuent pas à l'activité pharmacologique du tacrolimus.

#### - Demi-vie d'élimination

La demi-vie d'élimination du tacrolimus est longue et très variable (4 à 41 heures). La demi-vie moyenne dans le sang total est de 12 heures (90, 120). Elle est respectivement de 11.7 heures et 12.4 heures chez l'adulte et l'enfant transplantés hépatiques, et de 15.6 heures chez l'adulte transplanté rénal (7, 120).

### - Clairance d'élimination

La concentration de tacrolimus étant plus importante dans le sang total que dans le plasma, la clairance déterminée à partir de la concentration plasmatique est plus importante que lorsqu'elle est déterminée à partir de la concentration dans le sang total.

#### *- Clairance déterminée à partir des concentrations sanguines*

Chez des sujets sains, la clairance moyenne déterminée à partir des concentrations sanguines est de  $3.8 \pm 1.2$  L/h (120). Une autre étude a estimé une clairance apparente moyenne de 27.7 L/h avec un modèle bicompartimental avec une absorption d'ordre 1 (149).

Chez les patients adultes transplantés hépatiques, la clairance apparente moyenne (CL/F) déterminée à partir des concentrations sanguines est d'environ 26.5 L/h avec une variabilité assez importante (11). Une autre étude a trouvé une clairance à l'équilibre de 36 L/h (12).

#### *-Clairance déterminée à partir des concentrations plasmatiques*

Chez des adultes transplantés hépatiques, la clairance moyenne déterminée à partir des concentrations plasmatiques est de 1.7 à 1.8 L/h/kg (90, 120).

## **Excrétion**

Après administration intraveineuse et orale de tacrolimus marqué au  $^{14}\text{C}$ , environ 2% de la radioactivité est éliminée dans les urines (124). Moins de 1% du tacrolimus est retrouvé sous forme inchangée dans les urines et les fèces (145), indiquant que le tacrolimus est presque totalement métabolisé avant d'être éliminé principalement par voie biliaire. La clairance rénale est négligeable, représentant moins de 1% de la clairance totale (90).

## **2.5. Effets de covariables sur la PK**

### **2.5.1. Covariables physiologiques**

#### **Sexe**

Concernant la ciclosporine en greffe de CSH, aucune différence statistiquement significative de la concentration résiduelle et de la concentration au pic (2 heures après la prise) n'a été retrouvée entre les 2 sexes (150).

Concernant le tacrolimus, le sexe ne semble pas avoir d'influence sur la PK du tacrolimus. En effet, chez des patients transplantés rénaux, l'AUC après administration orale ou intra-veineuse de tacrolimus, l'AUC était comparable entre les 2 sexes. De même, la clairance et le volume de distribution était similaire entre les 2 sexes (151).

### **Age**

En transplantation pédiatrique, il a été rapporté que les jeunes enfants nécessitaient des doses de tacrolimus plus importantes que les enfants plus âgés et les adultes pour maintenir des concentrations sanguines résiduelles de tacrolimus similaires (152-154). Il a été montré que la clairance d'élimination du tacrolimus rapportée au poids diminuait quand l'âge de l'enfant augmentait (9).

### **Poids du patient receveur**

En transplantation hépatique, plus le poids du patient est important, plus le volume apparent de distribution du tacrolimus est important (11).

### **Type de greffon**

En transplantation hépatique pédiatrique, il a été observé que les patients qui ont reçu un foie entier ont une clairance moyenne environ sept fois plus importante que ceux qui n'ont reçu qu'un lobe de foie (9). Chez les adultes, la même tendance a été observée avec une clairance trois fois plus importante lorsque le foie était entier (13).

Il a également été trouvé que, immédiatement après la chirurgie, la clairance d'élimination du tacrolimus était plus faible après transplantation d'un foie d'un donneur vivant que d'un donneur décédé (155).



## 2.5.2. Covariables biologiques

### Protéines plasmatiques

Les concentrations d'albumine, d'alpha-1-glycoprotéine acide et de lipoprotéines sont corrélées à la fraction libre de tacrolimus (138). Un faible taux d'albumine augmente la clairance du tacrolimus (12).

Par ailleurs, la répartition entre les érythrocytes et le plasma (rapport de distribution des concentrations sang total/plasma) dépend de la concentration dans le plasma des protéines de liaison du tacrolimus (90).

### Hématocrite et nombre d'érythrocytes

Ces paramètres influencent le pourcentage de liaison du tacrolimus aux érythrocytes : plus l'hématocrite et/ou le nombre d'érythrocytes augmentent, plus le pourcentage de liaison aux érythrocytes est important (138). Le ratio concentration dans le sang total / concentration dans le plasma du tacrolimus est corrélée positivement à l'hématocrite (120).

*In vitro*, une diminution de l'hématocrite, alors que la concentration de tacrolimus dans le sang total reste la même, une augmentation de la concentration plasmatique de tacrolimus est observée (156, 157).

L'augmentation du ratio entraîne une augmentation de la clairance plasmatique et du volume de distribution plasmatique du tacrolimus (120). Inversement, l'augmentation de l'hématocrite diminue la clairance sanguine du tacrolimus (11).

Concernant la ciclosporine, le ratio concentration dans le sang total / concentration dans le plasma est également corrélé positivement à l'hématocrite (120). Dans le même sens, une corrélation négative a été retrouvée entre l'hématocrite et la concentration plasmatique de ciclosporine alors que la concentration sanguine n'est pas affectée par l'hématocrite (109). Par ailleurs, plus l'hématocrite est important, plus la clairance plasmatique de la ciclosporine est importante (158) et plus l'AUC est réduite (159).

### Aspartate Amino Transférase (ASAT)

L'activité ASAT est corrélée positivement au temps nécessaire pour atteindre la clairance maximale post transplantation du tacrolimus (12).

Par ailleurs, les patients ayant des taux d'ASAT inférieurs à 70 UI/L nécessitent des doses plus importantes que les patients ayant des taux d'ASAT supérieurs à 70 UI/L probablement du fait d'une clairance plus importante (11). Inversement, le même auteur a trouvé que chez les enfants, la clairance apparente était corrélée négativement avec la concentration en ASAT (9). La dysfonction hépatique entraînant une diminution de la clairance hépatique du tacrolimus (160-162), la concentration en ASAT pourrait s'avérer un marqueur de dysfonction hépatique.

### **Bilirubine totale et conjuguée**

Une concentration élevée de bilirubine pourrait augmenter la fraction libre de tacrolimus (138). Chez des enfants d'origine asiatique, une concentration de bilirubine supérieure ou égale à 200  $\mu\text{mol/L}$  a entraîné une biodisponibilité plus importante que chez les patients ayant une concentration de bilirubine plus faible (132).

### **Gamma glutamyl transférase (GGT)**

Une augmentation de l'activité GGT est corrélée à une augmentation de la clairance apparente du tacrolimus (9).

### **Facteur V**

En transplantation hépatique, lorsque la concentration de ce facteur de coagulation augmente, une augmentation de la clairance du tacrolimus a été observée (13).

## **2.5.3. Covariables génétiques**

La ciclosporine et le tacrolimus sont des substrats des enzymes du Cytochrome P450 (CYP) 3A, en particulier CYP3A4 et CYP3A5 (125, 146). La ciclosporine et le tacrolimus sont également des substrats de la P-gp (163). Ces enzymes du métabolisme dans l'intestin et dans le foie contribuent aux différences intra et interindividuelles au niveau de la PK de la ciclosporine et du tacrolimus (164).

## Le CYP 3A5

Le polymorphisme ou SNP (single nucleotid polymorphism) du CYP3A5 situé au niveau de l'intron 3 (6986A>G) est la première cause du polymorphisme du gène du CYP3A5 (165, 166). L'allèle sauvage est noté CYP3A5\*1 et l'allèle muté est noté CYP3A5\*3. Les 3 génotypes possibles sont donc les suivants :

- homozygotes sauvages : CYP3A5\*1/\*1 (A/A)
- hétérozygotes : CYP3A5\*1/\*3 (A/G)
- homozygotes mutés : CYP3A5\*3/\*3 (G/G)

Ce polymorphisme entraîne un splicing alternatif conduisant à la formation d'une protéine tronquée. La présence d'un seul allèle CYP3A5\*1 (AA6986) a été associée à l'expression du CYP3A5. Les sujets hétérozygote (CYP3A5\*1/\*3), porteurs d'au moins un variant allélique ont une activité enzymatique CYP3A5 similaire à celle des homozygotes CYP3A5\*1/\*1. La présence de l'allèle CYP3A5\*3 à l'état homozygote (CYP3A5\*3/\*3) est associée à une absence d'expression de la protéine CYP3A5.

D'après Blanco (165), la fréquence des génotypes CYP3A5 chez les sujets caucasiens est :

CYP3A5\*1/\*1 : 1.2%

CYP3A5\*1/\*3 : 16.8%

CYP3A5\*3/\*3 : 82.0%

La répartition est différente pour les sujets africains :

CYP3A5\*1/\*1 : 48.4%

CYP3A5\*1/\*3 : 45.2%

CYP3A5\*3/\*3 : 6.4%

Concernant la ciclosporine, quelque soit l'origine ethnique, l'influence du SNP CYP3A5 6936A>G reste incertaine. En effet, un certain nombre d'études n'a pas trouvé d'influence du génotype du CYP3A5 sur la PK de la ciclosporine (167-171). D'autres études ont cependant trouvé que les concentration résiduelles ajustées sur les doses étaient plus faibles chez les porteurs de l'allèle CYP3A5\*1 que chez les sujets homozygotes mutés (107, 131, 172-174)

avec une clairance de la ciclosporine plus importante chez les sujets porteurs de l'allèle CYP3A5\*1 (114).

Concernant le tacrolimus, contrairement à la ciclosporine, une relation forte est retrouvée entre le SNP 6986A>G du CYP3A5 et sa PK, chez les patients transplantés hépatiques, cardiaques et rénaux. En effet, dans la littérature, d'une manière générale, les études sont concordantes et on retrouve donc que chez les patients porteurs d'au moins un allèle CYP3A5\*1, la clairance du tacrolimus est significativement supérieure aux patients ayant un génotype CYP3A5\*3/\*3. Les études ayant montré un effet du génotype du donneur et/ou du receveur sur la clairance du tacrolimus chez le patient transplanté sont détaillées dans le tableau III. Par ailleurs, un très grand nombre d'études a également rapporté des concentrations (C0 et C2) ou des AUC ajustées à la dose significativement plus importantes et/ou des doses requises significativement réduites chez les sujets porteurs d'au moins un allèle CYP3A5\*1 que chez les sujets homozygotes CYP3A5\*3/\*3, ce qui est cohérent avec le métabolisme réduit de l'allèle muté (175).

En transplantation rénale, les sujets homozygotes mutés CYP3A5\*3 nécessitent donc des doses environ 2 fois plus faibles de tacrolimus que les sujets porteurs de l'allèle CYP3A5\*1 (131, 172, 176, 177). Chez ces patients transplantés rénaux, le génotype du CYP 3A5 du receveur explique en partie la variabilité PK interindividuelle du tacrolimus (178). A 2 ans post-transplantation rénale, les résultats cliniques de la transplantation sont équivalents quelque soit le génotype du CYP3A5 du donneur et du patient transplanté (178).

En transplantation hépatique, les patients dont le donneur est porteur d'au moins un allèle CYP3A5\*1 nécessitent des doses plus importantes que les autres patients pour atteindre la même concentration résiduelle cible (179).

Tableau III. Clairance du tacrolimus en fonction du génotype du CYP3A5

nombre et type de patients		Origine des patients	Temps après la transplantation	génotype du :	clairance apparente du :	Résultat	Référence
73 donneurs et 73 transplantés hépatiques	adultes	chinois	1 à 175 jours	donneur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3	(180)
				receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3	
60 donneurs et 60 transplantés hépatiques	adultes	japonais	0 à 50 jours	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3	(181)
65 donneurs et 130 transplantés hépatiques	enfants	chinois	0 à 50 jours	donneur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3	(182)
134 transplantés rénaux	adultes	caucasien	12 mois après transplantation	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (61 vs 20 mL/h)	(183)
41 transplantés rénaux	adultes	caucasien	Au moins 6 mois de traitement par tacrolimus	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (2 fois plus grande chez les expresseurs)	(184)
39 transplantés rénaux	adultes	japonais	28 jours après transplantation	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (0.6 vs 0.2 L/h/kg)	(185)
50 transplantés rénaux	adultes	japonais	28 jours après à 1 an après transplantation	receveur	receveur	*1/*1 diminue plus vite que *3/*3 (0.6-0.4 vs 0.4-0.3 L/h/kg)	(129)
59 transplantés rénaux	adultes	caucasien	3 mois après transplantation	receveur	receveur	*1/*3 > *3/*3 (31.4 vs 17.8 L/h)	(186)
50 transplantés rénaux	enfants	caucasien	1 mois après transplantation	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (117.5 vs 97.2 mL/min)	(187)
78 transplantés pulmonaires	adultes	caucasien	1 an post transplantation	receveur	receveur	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (24.5 vs 17.5 L/h)	(188)
20 volontaires sains	adultes	japonais	NA	NA	NA	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (1.3 vs 0.7 L/h/kg)	(189)
19 patients en attente de transplantation rénale	adultes	mixte	NA	NA	NA	*1/*1 + *1/*3 > *3/*3 (18 vs 7 mL/min/kg)	(190)

### La glycoprotéine P (P-gp, Permeability glycoprotein)

La P-gp est une protéine de transport transmembranaire de nombreuses substances exogènes. La P-gp peut être également appelée ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1) ou MDR1. Sa fonction normale est d'évacuer hors des cellules ces substances

étrangères (191). La P-gp se trouve dans de nombreux tissus dont le tubule contourné proximal du rein et les barrières intestinale (surface apicale) et hémato-encéphalique mais également au niveau du foie et du pancréas. Elle influence la biodisponibilité de nombreux médicaments, par le pompage de ceux-ci vers la lumière du système digestif. Elle se trouve également à la surface des lymphocytes du système immunitaire. La P-gp est codée par le gène MDR1 (ou ABCB1) et possède un polymorphisme chez l'humain, amenant des variations interindividuelles de l'absorption de certains médicaments dont la ciclosporine. Par ailleurs, le polymorphisme génétique du gène de la P-gp influence la concentration intracellulaire de la ciclosporine de façon plus importante que la concentration sanguine totale (173). Ainsi, ceci module l'activité immunosuppressive de la ciclosporine.

Le SNP le plus étudié est situé au niveau de l'exon 26 du gène MDR1 (3435C>T).

- homozygotes sauvages (C/C)
- hétérozygotes (C/T)
- homozygotes mutés (T/T)

Les sujets homozygotes sauvages ont une forte expression de la P-gp intestinale. Les sujets hétérozygotes ont une expression intermédiaire de la P-gp. Enfin, les sujets homozygotes mutés auraient une plus faible expression de la P-gp intestinale.

Concernant la ciclosporine, l'effet du SNP 3435C>T de la P-gp sur la PK reste incertain du fait de résultats d'études non cohérents. En 2010, plus d'une quinzaine d'études a été répertoriée par Staatz (175) et la majorité des études n'a pas trouvé d'association (131, 167, 168, 171-174, 192-194). Deux études en transplantation rénale ont cependant retrouvé que plus l'expression de la P-gp était importante, plus la concentration résiduelle ajustée sur la dose était faible (107, 195). Par ailleurs, la ciclosporine est un substrat mais également un inhibiteur de la P-gp (196, 197). Des différences dans le degré d'inhibition entre les études dues à des différences de concentrations sanguines de ciclosporine peuvent limiter ou obscurcir le sens des effets et expliquer les résultats incohérents.

Concernant le tacrolimus, l'effet du SNP 3435C>T de la P-gp sur la PK reste également très incertain. En effet, d'après la revue de Staatz en 2010 (175), la majorité des études (plus d'une vingtaine) n'a pas mis en évidence d'association entre le génotype de la P-gp et la PK du tacrolimus. En terme de résultats cliniques, à 2 ans post-transplantation rénale et traitement par tacrolimus, une étude récente a montré qu'ils étaient équivalents quelque soit le génotype de la P-gp du donneur et du patient transplanté (178). Cependant, quelques études ont tout de

même montré une concentration résiduelle ajustée à la dose plus grande (171, 198-202) et des doses requises plus petites (171, 199, 200, 203) chez les patients avec le génotype T/T (homozygotes mutés) que ceux avec le génotype C/C (homozygotes sauvages).

#### **2.5.4. Autres covariables**

##### **Délai post-transplantation**

La reprise progressive de la fonction hépatique (surtout les 2 premières semaines) entraîne une modification de l'élimination hépato-biliaire, imposant une adaptation réactive de la posologie. Par ailleurs, une très grande variabilité au niveau de la clairance du tacrolimus est observée au cours des 15 premiers jours post-transplantation et celle-ci est très réduite après cette période (12).

La clairance est nulle juste après la transplantation puis augmente pendant les 3 semaines post-greffe (14, 204). Elle augmente rapidement pour atteindre un plateau et a été modélisée sous forme d'une fonction sigmoïde (12) :

$$CL = \frac{CL_{\max} * POD^{\gamma}}{TCL_{50}^{\gamma} + POD^{\gamma}}$$

avec

POD : nombre de jours post-opératoires

CLmax : clairance à l'équilibre (estimée à 36 L/h)

TCL50 : temps pour obtenir 50% du plateau (estimé à 6.3 jours)

$\gamma$  : coefficient de sigmoïdité (estimé à 4.9 L)

##### **Diarrhée chez le patient transplanté**

Une diarrhée prolongée s'accompagnant d'une baisse de la P-gp intestinale de l'ordre de 50% se traduit par une augmentation de la concentration en tacrolimus par augmentation de la biodisponibilité orale (134-137).

## 2.6. Effets indésirables

Les effets indésirables sont probablement dus en majeure partie à l'inhibition de la calcineurine dans les tissus.

Le profil d'effets indésirables de la ciclosporine et du tacrolimus est principalement constitué de :

- insuffisances rénales dose-dépendantes et généralement réversibles après réduction de la dose (des lésions rénales s'installent parfois à long terme)
- hypertensions artérielles doses-dépendantes non liées à l'insuffisance rénale, tachycardies ;
- troubles digestifs ;
- pilosités excessives et rares alopecies ;
- durcissement des traits du visage avec la ciclosporine ; éruption acnéiforme avec le tacrolimus ;
- atteintes hépatiques ;
- hyperplasies gingivales ;
- tremblements, ataxies, confusions, convulsions, céphalées, paresthésies, encéphalopathies, cécités corticales, neuropathies périphériques ;
- hypertensions intracrâniennes bénignes avec la ciclosporine ;
- hyperlipidémies ;
- hyperkaliémies, hypomagnésémies ;
- hyperuricémies ;
- hyperglycémies ;
- rares aémies, thrombopénies, leucopénies ; la ciclosporine et le tacrolimus ont une myélotoxicité faible ;
- effets indésirables communs aux immunodépresseurs : augmentation des infections et des cancers notamment des lymphomes (205).

Le tacrolimus expose aussi à des anomalies cardiaques telles que des myopathies hypertrophiques et des insuffisances cardiaques. Il expose également d'avantages à des



troubles neurologiques et à un diabète. La ciclosporine expose d'avantages à des hypertensions artérielles, des dyslipidémies, des hyperplasies gingivales et des pilosités excessives (105, 205).

## **2.7. Interactions médicamenteuses**

### **2.7.1. Actions de médicaments sur la ciclosporine et le tacrolimus**

La ciclosporine et le tacrolimus sont métabolisés au niveau gastro-intestinal et hépatique par les enzymes du Cytochrome P450 (CYP) 3A. La ciclosporine et le tacrolimus sont également des substrats de la P-gp. La ciclosporine est également un inhibiteur de la P-gp.

L'utilisation concomitante de médicaments ou de produits à base de plantes connus comme étant des inhibiteurs ou des inducteurs du CYP3A4 peut modifier le métabolisme de ces médicaments et donc augmenter ou diminuer les concentrations sanguines. Il est donc recommandé de surveiller les concentrations sanguines de ciclosporine et de tacrolimus lors de toute administration concomitante de substances pouvant modifier le métabolisme par le CYP3A et d'adapter la posologie de ces médicaments de manière à maintenir une exposition constante à ceux-ci.

#### **Association avec des médicaments inducteurs enzymatiques**

Les inducteurs enzymatiques augmentent le métabolisme de la ciclosporine et du tacrolimus. Ils diminuent leurs concentrations sanguines et leurs effets, entraînant un risque de rejet ou de GVH dans le cadre de greffe de CSH. Par ailleurs, lors de l'arrêt du traitement par l'inducteur enzymatique, il existe un risque accru de surdose du médicament associé. D'après le supplément Interactions Médicamenteuses 2011 de la Revue Prescrire® et le VIDAL® 2012 (95, 205), les principaux médicaments inducteurs enzymatiques du CYP3A4 interagissant avec la ciclosporine et le tacrolimus sont :

- des antiépileptiques : la carbamazépine, la fosphénytoïne, le phénobarbital, la phénytoïne (206), la primidone, le rufinamide ;
- des antibactériens : la rifabutine, la rifampicine ;
- des antirétroviraux y compris quelques uns qui ont aussi un effet inhibiteur de certaines enzymes du CYP 450 : l'efavirenz, l'étravirine, le lopinavir, le nelfinavir, le ritonavir ;

- un antidépresseur (phytothérapie) : le millepertuis (*Hypericum perforatum*) ;
- un vasodilatateur : le bosentan ;

Et, à un moindre degré :

- un psychostimulant : le modafinil ;
- un sédatif : le méprobamate ;
- un antifongique : la griséofulvine.

Pour la ciclosporine, une diminution des concentrations sanguines a également été retrouvée avec les médicaments suivants : le triméthoprime (en intra-veineux), l'orlistat (207-214), la clindamycine, l'octréotide, le lanréotide (215) et la vitamine E (dont le mécanisme d'interaction n'est pas connu) (216).

Concernant le tacrolimus, le métamizol, l'isoniazide et le sirolimus (217) peuvent également diminuer sa concentration sanguine. Par ailleurs, l'administration de doses élevées de corticoïdes (prednisone, prednisolone, méthylprednisolone et dexamétasone) dans le traitement du rejet aigu est susceptible d'augmenter ou de diminuer les concentrations sanguines de tacrolimus (218, 219). Concernant le mycophénolate mofétil, son effet inducteur est discuté.

### **Association avec des médicaments inhibiteurs enzymatiques**

Les médicaments qui inhibent le CYP3A4 diminuent le métabolisme et augmentent la concentration sanguine de la ciclosporine et du tacrolimus. Ces médicaments exposent au risque d'accumulation et d'augmentation des effets indésirables dose-dépendants de la ciclosporine et du tacrolimus. D'après le supplément Interactions Médicamenteuses 2011 de la Revue Prescrire® et le VIDAL® 2012 (95, 205), les principaux médicaments inhibiteurs enzymatiques du CYP3A4 interagissant avec la ciclosporine et le tacrolimus sont :

- des médicaments cardiovasculaires : l'amiodarone, la drodénarone, le diltiazem, le vérapamil, la ranolazine, et à un moindre degré les inhibiteurs calciques ;
- la plupart des macrolides et apparentés sauf la spiramycine : érythromycine (220), josamycine, pristinamycine, roxithromycine, midécamycine, clarithromycine (221) ;
- des antifongiques azolés : l'itraconazole (222, 223), le fluconazole (224), le kétoconazole (225), le miconazole, le posaconazole, le voriconazole ;
- un antiparasitaire : le triclabendazole ;

- des anti-rétroviraux : l'atazanavir, le darunavir, la délavirdine, le fosamprénavir, l'indinavir, le nelfinavir, le ritonavir, le tipranavir ;
- un anti-histaminique H2 : la cimétidine ;
- des anticancéreux : l'imatinib, le lapatinib, le nilotinib, le pazopanib ;
- un androgène : le danazol probablement ;
- des antiémétiques : l'aprépitant et son précurseur le fosaprépitant ;
- des antiépileptiques : le stiripentol, le lincosamide ;
- un antiagrégant plaquettaire : le ticagrélor ;
- le jus de pamplemousse ;
- et à un moindre degré : un antidépresseur, la fluoxétine.

Le stiripentol, des contraceptifs oraux (ethinylestradiol), le méthotrexate, les inhibiteurs de la pompe à protons à dose curative et la micafungine peuvent également augmenter les concentrations sanguines de ciclosporine (215, 226).

Concernant le tacrolimus, le métronidazole augmente ses concentrations sanguines (227). Le lansoprazole et la ciclosporine peuvent également augmenter les concentrations sanguines de tacrolimus. Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que les substances suivantes sont des inhibiteurs potentiels de son métabolisme : la bromocriptine, la dapsonne, l'ergotamine, le gestodène, la lidocaïne, la méphénytoïne, le midazolam, la nilvadipine, la norethindrone, la quinidine, le tamoxifène, et (triacétyl) oléandomycine (95). Enfin, la micafungine, une substance ayant des propriétés inhibitrices moyennes du CYP3A *in vitro*, n'a pas montré d'effet sur la PK du tacrolimus administré à des volontaires sains (228).

L'effet du mycophénolate mofétil sur la PK du tacrolimus est discuté (229).

### **2.7.2. Actions de la ciclosporine et du tacrolimus sur d'autres médicaments**

Concernant la ciclosporine, elle agit sur les médicaments suivants (215) :

- prednisolone (anti-inflammatoire stéroïdien) : inhibition du métabolisme des corticoïdes ;

- digoxine (cardiotonique) : augmentation de la digoxinémie (non répertoriée mais citée dans la littérature) ;
- nifédipine (anti-hypertenseur) : majoration du risque de gingivopathie ;
- sirolimus (immunosupresseur) : augmentation de l'hypercholestérolémie due au sirolimus. *In vitro*, une inhibition du mécanisme d'efflux du sirolimus par le tacrolimus a été retrouvé, augmentant la biodisponibilité orale du sirolimus (230) ;
- acide mycophénolique (immunosuppresseur) : augmentation des concentrations plasmatiques d'acide mycophénolique ;
- statines (hypolipémiant) : diminution du métabolisme hépatique de la simvastatine, de l'atorvastatine et de la cérivastatine, d'où un risque de rhabdomyolyse (124, 207, 231-235) ;
- colchicine (anti-goutteux) : augmentation des effets indésirables neuromusculaires de la colchicine ;
- méthotrexate (cytotoxique) : diminution de la clairance du méthotrexate et augmentation de sa toxicité ;
- caspofungine (antifongique) : augmentation des concentrations de caspofungine ;
- aliskiren (anti-hypertenseur) : augmentation de l'exposition à l'aliskiren (augmentation de l'AUC et de la concentration maximale (236)) ;
- amisulpride (antipsychotique) : augmentation de la concentration d'amisulpride dans le serum et le cerveau associée à un effet antipsychotique plus important et de durée plus longue (interaction possible par inhibition de la P-gp par la ciclosporine) (237).

Le tacrolimus étant un inhibiteur du CYP3A4, l'utilisation concomitante de tacrolimus et de médicaments métabolisés par le CYP3A4 peut modifier le métabolisme de ces derniers. La demi-vie de la ciclosporine est prolongée en cas d'administration concomitante avec le tacrolimus. De plus, les effets néphrotoxiques peuvent s'additionner. Pour ces raisons, l'administration concomitante de ciclosporine et de tacrolimus n'est pas recommandée et il convient d'être prudent lors de l'administration de tacrolimus à des patients qui ont reçu préalablement de la ciclosporine.

Le tacrolimus augmente l'exposition à la phénytoïne et aux contraceptifs hormonaux. Concernant l'effet du tacrolimus sur la PK du mycophénolate mofétil, celle-ci est discutée (229, 238-241).

### **2.7.3. Autres interactions**

#### **Médicaments néphrotoxiques**

La ciclosporine et le tacrolimus sont néphrotoxiques. L'administration concomitante avec des médicaments connus pour avoir des effets néphrotoxiques peut augmenter ces effets indésirables rénaux. Certains médicaments exposent à une insuffisance rénale fonctionnelle : les diurétiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les sartans et l'aliskirène. D'autres médicaments exposent à une insuffisance rénale organique, dont les principaux sont les suivants : surtout des anti-infectieux (les aminosides, la vancomycine, la teicoplanine, la céfalotine, la colistine, l'amphotéricine B, l'aciclovir, le valaciclovir, le tenofovir, l'adefovir, le ganciclovir, le cidofovir, la pentamidine, le focscarnet), des cytotoxiques (le méthotrexate, le carboplatine, le cisplatine, l'oxaliplatine, l'ifosfamide, le raltitrexed, le sorafénib, l'aldesleukine), des immunodépresseurs (le sirolimus, l'évérolimus), les immunoglobulines intraveineuses, le déférasirox, le mannitol, le lithium, les produits de contrastes iodés, le ticagrelor et les fibrates.

Tous ces médicaments justifient une surveillance de la fonction rénale en eux-mêmes et encore plus particulièrement s'ils sont associés à d'autres médicaments néphrotoxiques.

#### **Médicaments hyperkaliémiants**

Comme le traitement par tacrolimus peut provoquer une hyperkaliémie, ou majorer une hyperkaliémie préexistante, les apports élevés de potassium ou les diurétiques hyperkaliémiants (par exemple amiloride, triamtèrene ou spironolactone) doivent être évités.

#### **Médicaments qui augmentent la pression artérielle**

La ciclosporine et le tacrolimus exposent à des augmentations de la pression artérielle dose-dépendante, et indépendamment d'une insuffisance rénale. En cas d'association, ce

risque s'additionne à celui des médicaments qui augmentent la pression artérielle (principalement les AINS, des psychotropes et médicaments vasoconstricteurs).

### **Médicaments hyperlipidémiants**

La ciclosporine et le tacrolimus exposent à un risque d'hyperlipidémie. L'association avec d'autres médicaments hyperlipidémiants augmente ce risque (principalement les androgènes, des rétinoïdes, des anticancéreux, des antirétroviraux, des neuroleptiques et des hypoglycémiants).

### **Addition d'effets indésirables avec d'autres médicaments**

Il peut y avoir des additions d'effets indésirables avec les médicaments hyperuricémiants, ayant des effets indésirables musculaires, hyperglycémiants, induisant des neuropathies périphériques, abaissant le seuil de convulsion, entraînant des hyperplasies gingivales ou encore entraînant ou aggravant des éruptions acnéiformes. En cas d'association avec ces médicaments, la vigilance doit être accrue sur le risque augmenté de l'effet indésirable concerné.

### **3. Suivi thérapeutique de la ciclosporine et du tacrolimus**

Les médicaments de la classe des inhibiteurs de calcineurines sont des agents immunosuppresseurs très efficaces et largement utilisés dans les greffes et transplantation mais sont d'utilisation délicate. En effet, la ciclosporine et le tacrolimus ont un intervalle thérapeutique étroit et présentent une importante variabilité pharmacocinétique, inter et intra-individuelle (146). Du fait par ailleurs de l'importance de maintenir un équilibre entre un sous-dosage et un surdosage, le suivi thérapeutique est indispensable (120, 242). Les mesures de leurs concentrations dans le sang total sont en effet utilisés en routine clinique depuis de nombreuses années (depuis le début des années 1980 pour la ciclosporine) (243). L'objectif du suivi thérapeutique est d'atteindre et de maintenir les concentrations sanguines cibles. Le respect de ces concentrations cibles permet d'avoir une efficacité satisfaisante (en particulier contre le rejet de greffe) en limitant la toxicité de ces médicaments immunosuppresseurs (en particulier la néphrotoxicité qui est la complication principale (244)). Le suivi thérapeutique est particulièrement important durant les 3 premiers mois suivant la transplantation, où le risque de rejet est le plus important (13).

#### **3.1. Concentrations cibles**

A priori, l'effet immunosuppresseur des inhibiteurs de calcineurine doit être mieux corrélé à l'AUC des concentrations (voire à l'AUC de l'inhibition de la calcineurine) qu'à une concentration sanguine mesurée à un temps donné. Cependant, pour des raisons pratiques, en routine la mesure d'une concentration sanguine ponctuelle est préférée à celle d'une AUC qui exigerait plusieurs points. Cette pratique est acceptable à condition que cette concentration ponctuelle soit bien corrélée avec l'AUC.

##### Concentrations sanguines cibles de la ciclosporine en greffe de moelle

Actuellement, il n'existe pas de consensus concernant les modalités d'administration de la ciclosporine par voie intraveineuse : de ce fait, certains centres utilisent la perfusion continue de ciclosporine alors que d'autres font des perfusions discontinues. A l'hôpital Debrousse puis à l'IHOP, elle est administrée en perfusion de 2 heures toutes les 12 heures pendant environ 2 semaines puis un relais par voie orale est instauré dès que possible avec également une administration toutes les 12 heures.

Dans le cadre du suivi thérapeutique, pour de nombreuses institutions, en cas d'administrations discontinues (voie orale ou intra-veineuse), les concentrations sanguines totales cibles de ciclosporine à atteindre sont des concentrations résiduelles (C0), c'est-à-dire des concentrations mesurées sur un prélèvement effectué juste avant le début de l'administration suivante. En effet, depuis les années 80, de nombreuses études ont montré une corrélation entre la C0 de ciclosporine et le risque de GVH aiguë (31-36). Plus tard, cette corrélation a également été confirmée en greffe de CSH pédiatrique (37-42). Quelques études n'ont cependant pas retrouvé cette corrélation (44-46). D'une manière générale, dans la greffe de CSH, la concentration mesurée 2h après la prise de ciclosporine (C2) correspondant au pic ne semblait pas plus appropriée pour le suivi que la concentration résiduelle (C0) (37, 150, 245). Plus récemment, certaines études ont montré que la C2 était mieux corrélée à l'AUC<sub>0-12h</sub> que la C0 (246-248).

Le traitement par ciclosporine est débuté la veille de la greffe de moelle osseuse soit à J-1 et la première mesure de concentration doit être faite dans les 3 premiers jours de traitement de la ciclosporine (le mieux est à J+1 correspondant au lendemain de la greffe), puis 2 à 3 fois par semaine jusqu'à sortie d'aplasie. Le respect des concentrations cibles déterminées pour un patient donné doit être particulièrement important pendant les 15 premiers jours post greffe, afin de contrôler la sévérité de la GVH (37).

En cas d'administration discontinue, par voie intra-veineuse puis par voie orale, les RCP du SANDIMMUN® (249) et du NEORAL® (95) proposent une concentration totale résiduelle cible de la ciclosporine située dans une fourchette comprise entre 100 et 300 ng/ml, fourchette variant en fonction du type de greffe et de la période de prescription. En traitement d'entretien, la concentration résiduelle cible est de 150 ng/ml.

Dans notre centre, quand la ciclosporine est administrée en perfusion discontinue, les concentrations résiduelles cibles sont aux alentours de 90-110 ng/mL dans les pathologies malignes pour obtenir un effet GVL par une GVH de grade I ou II et aux alentours de 120-140 ng/mL en cas de pathologies non malignes (37, 250, 251).

#### - Concentrations sanguines cibles du tacrolimus en transplantation d'organe solide

Pour le tacrolimus, il existe une forte corrélation entre l'AUC et les concentrations résiduelles sur sang total à l'état stationnaire ( $r^2 = 0.9$ ) (90, 120, 252). Le suivi thérapeutique des concentrations résiduelles sur sang total permet donc une bonne estimation de l'exposition



systémique et est habituellement utilisé. Cependant, en transplantation rénale, dans certains cas, la corrélation entre C<sub>0</sub> et l'AUC n'est pas aussi évidente (253).

D'après le RCP de la spécialité PROGRAF® dans le VIDAL® 2012 (96) qui doit être administrée en 2 fois par jour, les concentrations sanguines résiduelles de tacrolimus doivent être surveillées environ deux fois par semaine pendant la période post-transplantation immédiate, puis régulièrement pendant le traitement d'entretien. Les concentrations sanguines résiduelles doivent également être surveillées après toute adaptation de la posologie, après des modifications du protocole immunosuppresseur ou après l'administration concomitante de substances susceptibles d'affecter les concentrations sur sang total du tacrolimus. L'analyse des études cliniques suggère que, lorsque les concentrations sanguines résiduelles de tacrolimus sont maintenues en dessous de 20 ng/mL, la majorité des patients peut être traitée efficacement. Il est nécessaire de tenir compte de l'état clinique du patient lors de l'interprétation des concentrations du produit dans le sang total. Toujours d'après le RCP, en pratique clinique, les concentrations résiduelles sur sang total sont généralement comprises entre 5-20 ng/mL chez les transplantés hépatiques et 10-20 ng/mL chez les transplantés rénaux et cardiaques dans la période post-transplantation immédiate. Au cours du traitement d'entretien, les concentrations sanguines sont généralement comprises entre 5-15 ng/mL chez les transplantés hépatiques, rénaux et cardiaques.

En mai 2007, une conférence de consensus européenne a eu lieu sur l'utilisation du tacrolimus en transplantation d'organes solides. En ce qui concerne la transplantation hépatique, les recommandations pour les concentrations sanguines totales résiduelles sont les suivantes : entre 10 et 20 ng/ml le premier mois, entre 5 et 15 ng/ml entre de 1 à 3 mois post-transplantation et entre 5 et 10 ng/ml à partir du 3<sup>ème</sup> mois (254).

### **3.2. Contrôle adaptatif des posologies de la ciclosporine**

Les doses de ciclosporine et de tacrolimus sont adaptées à chaque patient afin d'atteindre au plus vite et de maintenir la concentration résiduelle cible déterminée pour un patient donné. Cette adaptation des posologies peut se faire par "essai et erreur" (simples augmentation ou diminution des doses en fonction de la valeur de la concentration résiduelle mesurée) ou par la méthode Bayésienne, utilisant un modèle de population (10, 11). Par exemple, le laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Limoges effectue du suivi thérapeutique pharmacologique de médicaments immunosuppresseurs (tacrolimus et

ciclosporine entre autres) via le programme ABIS (adaptation bayésienne des immunosuppresseurs) (184, 188, 255).

Dans le cadre de la greffe de moelle osseuse pédiatrique, dans notre service pharmaceutique le programme de contrôle adaptatif des posologies est réalisé à l'aide de la méthode bayésienne à l'aide du logiciel USC\*PACK® (256). Cette méthode dite bayésienne fait appel aux probabilités conditionnelles utilisées en 1763 par le révérend Bayes. Ce programme permet de déterminer la posologie optimale d'un médicament pour un patient donné après avoir défini ses paramètres PK individuels. Ces paramètres sont estimés à partir de la combinaison des informations apportées d'une part, par une population PK représentée par un ensemble de patients proches de celui pour lequel on cherche à optimiser la thérapeutique (information *a priori*), et d'autre part par les caractéristiques du patient (telles que l'âge, poids, taille et clairance de la créatinine) appelées covariables (valeurs des paramètres PK étant corrélées à ces données), et, après instauration du traitement, par des mesures de concentration sanguine résiduelle de ciclosporine (information *a posteriori*).

USCPACK est composé de plusieurs programmes, notamment :

- NPEM2, permettant d'estimer la distribution (non paramétrique) des paramètres PK au sein d'une population ;
- PASTRX, comportant les données anthropométriques du patient (covariables) et toutes les données relatives au patient et à son traitement : doses administrées ainsi que les jours et les horaires d'administration, mesures de concentrations sanguines et horaires de prélèvements sanguins correspondants.
- BAYESIAN MODELING, qui est le contrôleur MAP (Maximum *A Posteriori*) bayésien.

Celui-ci prend en compte la différence entre la concentration mesurée et celle prédite par le modèle ainsi que la différence entre les paramètres de l'individu et ceux de la population (c'est-à-dire ceux estimés à partir d'un groupe de patients représentatifs de l'individu). Ces valeurs sont respectivement pondérées par l'incertitude sur la mesure (variance de l'erreur analytique) et par la variance du paramètre de population. Cet estimateur permet de minimiser la fonction objective (FO) suivante (257) :

$$FO = \left( \sum_1^{n_C} (C_{\text{mes}} - C_{\text{est}})^2 / SD^2 \right) + \left( \sum_1^{n_P} (P_{\text{pop}} - P_{\text{est}})^2 / SD_{\text{pop}}^2 \right)$$

avec  $C_{\text{mes}}$  = concentrations mesurées

$C_{\text{est}}$  = concentrations estimées par le modèle

$SD^2$  = variance de l'erreur analytique sur les concentrations.

$P_{pop}$  = valeur du paramètre de la population

$P_{est}$  = valeur du paramètre estimé par le modèle pour un individu

$SD^2_{pop}$  = variance du paramètre dans la population

$n_C$  = nombre de concentrations

$n_P$  = nombre de paramètres.

Le modèle utilisé à l'hôpital Debrousse puis à l'IHOP pour l'adaptation de posologie de la ciclosporine en greffe de CSH pédiatrique est un modèle PK bi-compartimental. Deux populations de référence sont utilisées : une pour la voie intra-veineuse et une pour la voie orale.

Dans le cadre de greffe de CSH également, l'équipe de Wilhelme en 2011 a trouvé que les administrations IV et orales de ciclosporine étaient le mieux décrites par un modèle bi-compartimental, avec une absorption d'ordre 1 avec lag time (117).

## **4. Modèle physiologique ou modèle PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetics)**

### **4.1. Généralités sur le modèle PBPK**

Les modèles les plus utilisés en PK sont les modèles compartimentaux "classiques", comportant un très petit nombre de compartiments : ce choix est motivé par leur simplicité et par le fait que ces modèles sont suffisants pour résoudre les problèmes touchant à la posologie des médicaments.

Une telle approche ne peut pas apporter d'informations sur les cinétiques locales (tissulaires), sur les répercussions des altérations physiologiques ou pathologiques (par exemple une hémorragie) ou encore permettre des extrapolations inter-espèces car les modèles compartimentaux couramment utilisés (bi ou tri-compartimentaux) sont définis mathématiquement à partir des données plasmatiques et généralement sans prendre en compte les éléments anatomiques, physiologiques et biochimiques.

Cela a conduit à développer une autre catégorie de modèles beaucoup plus compliqués appelés modèles physiologiques (Physiologically-Based Pharmacokinetic Models ou PBPK).

Ils font appel aux données anatomiques (masse des différents tissus), aux débits sanguins locaux et aux différents coefficients de partage entre les tissus et le sang. Si nécessaire, ils peuvent prendre en compte d'autres informations comme la liaison aux protéines plasmatiques, les capacités enzymatiques d'un organe épurateur, etc... Ainsi, ces modèles représentent plus ou moins finement l'organisme entier (suivant leur complexité) sous forme de compartiments correspondant aux organes et aux tissus. Ils sont de nature hautement mécanistique. Les deux objectifs principaux de ces modèles sont :

- de réaliser des simulations afin de tester des hypothèses (par exemple, l'influence d'une réduction de la fixation aux protéines plasmatiques sur l'accumulation d'une substance dans un tissu) ;
- de réaliser des extrapolations d'une espèce à l'autre (structure commune entre les mammifères).

Cette approche modélisatrice est très utilisée en cancérologie et en toxicologie (évaluation des risques) (258). Elle est actuellement peu utilisée en pharmacologie mais elle semble connaître un regain d'intérêt dans la découverte et le développement de nouveaux médicaments (259, 260). Sur le plan historique, le premier modèle PK retrouvé dans la littérature était d'essence physiologique et proposé par Teorell (261). Teorell avait représenté l'organisme par 5 compartiments (le système circulatoire, le site d'administration, le sang, le rein et l'organe d'élimination). Les conceptions actuelles du modèle physiologique reposent largement sur les travaux de Bischoff et Brown (262). De nombreux articles ont été rédigés sur ce sujet, notamment par Rowland (263, 264).

## **4.2. Méthode de développement**

Le développement d'un modèle physiologique se fait en plusieurs étapes :

- sélection des compartiments devant intervenir dans le modèle et définition de l'architecture du modèle ;
- définition de la structure des compartiments ;
- écriture mathématique du modèle (équations des bilans massiques) ;
- éventuellement, estimation de certains des paramètres du modèle ;
- validation du modèle ;
- utilisation du modèle.

### **4.2.1. Sélection des compartiments et architecture du modèle**

La sélection des compartiments devant figurer dans le modèle est une étape essentielle dans sa construction. Pour que le modèle soit pertinent, il doit considérer les organes suivants :

- les organes impliqués dans la distribution de la substance ;
- les organes impliqués dans l'élimination : pour tous ces modèles, le foie et le rein sont représentés ;
- les sites d'action : ils seront sélectionnés en fonction de la molécule étudiée et des objectifs de la modélisation ;
- les fluides facilement accessibles et pour lesquels on aura de l'information : le sang veineux est systématiquement représenté. Le sang artériel peut être pris en compte, notamment lorsque le poumon joue un rôle métabolique significatif. Dans ce cas, les concentrations sanguines veineuses et artérielles seront différentes.

Chaque compartiment est caractérisé par une valeur de débit sanguin et une valeur de volume tissulaire. Ce sont les paramètres physiologiques. Ces valeurs sont généralement trouvées dans la littérature.

Lorsque les différents compartiments (organes) ont été sélectionnés, la structure du modèle est définie. Celle-ci est représentée par un diagramme montrant les compartiments reliés entre eux. La figure 3 représente un modèle physiologique classique.

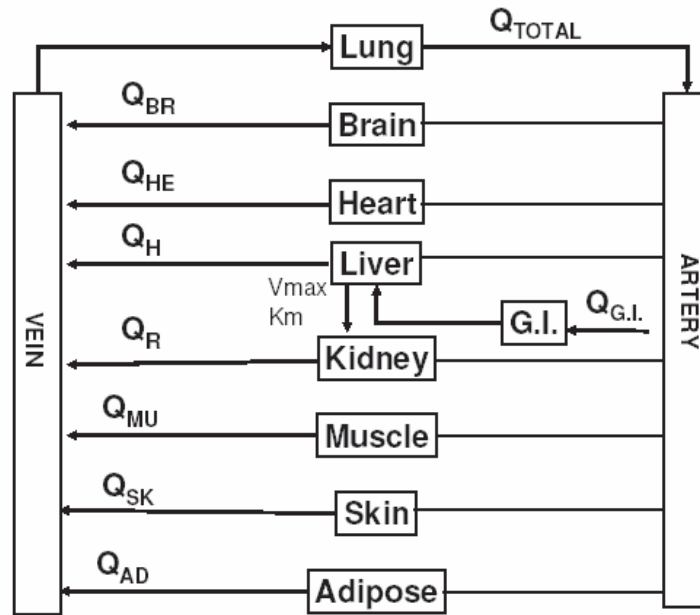


Figure 3. Exemple d'organisation pour un modèle physiologique

Le foie est l'organe d'élimination ( $V_{max}$  : vitesse maximum,  $K_m$  : constante de Michaelis-Menten).

Les débits sanguins sont notés  $Q$ .

#### 4.2.2. Structure interne des compartiments

Chaque compartiment individualisé dans le modèle peut être divisé, *a priori*, en 3 sous compartiments :

- une section vasculaire (capillaire) par laquelle l'organe est perfusé ;
- un espace interstitiel qui forme la matrice baignant les cellules ;
- un espace intracellulaire.

Chacun de ces espaces est considéré comme étant homogène (« well mixed »), ce qui implique que le sang efférent (quittant l'organe) a la même concentration de produit que celle du sous compartiment vasculaire. Avec ce système de 3 sous compartiments, la substance arrive au tissu *via* le milieu vasculaire, passe la barrière capillaire pour diffuser dans l'espace interstitiel et passe la barrière membranaire pour gagner l'espace intracellulaire. La cinétique de la molécule dans chacun de ces 3 sous compartiments peut être modélisée (265).

Dans la plupart des cas, le débit de perfusion est le processus limitant vis-à-vis de la pénétration tissulaire. L'équilibre est rapide entre les compartiments intra et extracellulaire,

l'organe se comporte alors comme un seul compartiment. Dans cette majorité des cas, les 3 sous compartiments sont alors dits « agrégés » et correspondent à un seul compartiment homogène (« well-mixed »).

Dans d'autres cas, la diffusion est limitante du fait de la présence de membrane à perméabilité limitée. L'organe est alors décrit sous forme de deux compartiments et l'équilibre entre les deux est atteint lentement. Si la membrane à perméabilité limitée est celle des capillaires, les compartiments sont les espaces vasculaire et extravasculaire ; s'il s'agit de la membrane cellulaire, les compartiments sont les milieux intracellulaire et extracellulaire. Si les deux types de membrane sont à diffusion limitée, alors l'organe se trouve sous forme de trois compartiments : milieux vasculaire, interstitiel et intracellulaire.

Dans un modèle PBPK, les différents types de sous compartiments (perfusion limitée et diffusion limitée) peuvent être représentés. Par ailleurs, des modèles de sous compartiments de complexité plus importante peuvent exister comme par exemple celui de la ciclosporine proposé par l'équipe de Rowland (266).

#### **4.2.3. Ecriture mathématique du modèle**

Après avoir choisi les tissus ou les organes pour construire le modèle ainsi que les modèles locaux les plus appropriés pour chacun des organes, les équations décrivant le modèle physiologique global doivent être définies. Le plus souvent il s'agit d'équations différentielles ordinaires (EDO) qui décrivent les transferts de masse au niveau de chaque compartiment.

#### **4.2.4. Obtention des paramètres du modèle**

La résolution des équations requiert de connaître trois types de paramètres : les paramètres physiologiques et anatomiques (volumes tissulaires, débits sanguins locaux), les paramètres thermodynamiques (coefficients de partage, perméabilité cellulaire, constantes de liaison) et des paramètres biochimiques ou PK décrivant les processus d'absorption, de métabolisme et d'élimination. Il est impossible d'avoir toutes les informations pour un animal donné et les données de la littérature permettent de fixer *a priori* ces paramètres.

L'affinité du tissu pour le médicament est caractérisée par le coefficient de partage tissu/sang (CP) de la substance entre le sang artériel et le tissu de l'organe étudié, selon la relation :

$$CP = \frac{C_{SS} \text{ tissulaire}}{C_{SS} \text{ artérielle}}$$

$C_{SS}$  représente la concentration à l'état stationnaire (Steady-State) de la molécule lors d'une perfusion continue.

Ce coefficient est propre à chaque molécule et peut varier entre les différentes espèces, notamment en raison des différences d'affinité pour les protéines plasmatiques et tissulaires. Il sera donc déterminé expérimentalement, *in vitro* ou *in vivo*.

Les équations décrivant les modèles physiologiques doivent être résolues numériquement avec un algorithme approprié. Des logiciels spécialisés ont été développés pour ce type de modèle (267).

#### **4.2.5. Validation du modèle**

La validité du modèle est réalisée en comparant des jeux de données expérimentaux (par exemple, concentrations sanguines) avec les valeurs prédites par le modèle. Cependant, le but n'est pas d'ajuster ces données expérimentales mais simplement de voir si elles sont compatibles avec le modèle. Cette appréciation est qualitative. La démarche est donc opposée à celle suivie dans les modèles compartimentaux classiques où on part des données pour construire le modèle.

#### **4.2.6. Utilisation du modèle**

Les modèles physiologiques sont des modèles à visée heuristique c'est-à-dire destinés à la compréhension physiologique de la cinétique d'une substance. Ils sont utilisés pour réaliser des simulations en vue de tester des hypothèses (par exemple, l'effet d'un choc hémorragique sur la cinétique d'un médicament (268) et pour réaliser des extrapolations inter-espèces ou de l'*in vitro* à l'*in vivo*.

Les modèles physiologiques sont très utilisés en cancérologie (269). En effet, la tumeur représente un compartiment dont la diffusion membranaire est limitée. A ce titre, il n'y aura pas de parallélisme entre les concentrations plasmatiques et celles se trouvant dans les cellules cancéreuses de l'organe atteint. Le but général est de maximiser la concentration de la



molécule au site d'action tout en minimisant l'exposition systémique ; c'est ainsi que l'on peut modéliser l'intérêt de l'administration locale d'un médicament.

Les modèles physiologiques sont également très utilisés en toxicologie prédictive (258). Pour des raisons éthiques relatives à la fois à l'Homme et à l'animal, on ne peut pas tester toutes les situations toxiques. En toxicologie prédictive, il y a trois types d'extrapolations réalisables : de l'espèce expérimentale à l'Homme, d'une faible à une forte dose et d'une voie d'administration à l'autre.

Les extrapolations inter-espèces sont un deuxième objectif majeur de ce type de modèle. Cela repose sur le principe selon lequel l'organisation anatomique et physiologique des différentes espèces est la même. Il en résulte que l'on peut passer d'une espèce à l'autre en changeant simplement les paramètres physiologiques (taille des organes, débit sanguin) : ce passage peut faire appel aux lois de l'allométrie (270).

Par exemple, pour le débit sanguin d'un organe :

$$Q_i = Q_{\text{std}} * \left(\frac{W_i}{W_{\text{std}}}\right)^b$$

Où  $Q_i$  est le débit sanguin chez le sujet  $i$  de masse corporelle  $W_i$  et  $Q_{\text{std}}$  est le débit sanguin chez le sujet standard de masse corporelle  $W_{\text{std}}$ .  $b$  l'exposant allométrique (compris entre -1 et +1). Ces coefficients sont valables pour un médicament donné. Cette approche est peu performante pour l'extrapolation des paramètres PK, mais beaucoup plus pour l'extrapolation des volumes et des débits physiologiques.

En 2011, Zhao *et al.* ont analysé les demandes faites à la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis et ont observé que l'utilisation des modèles PBPK était en constante augmentation à tous les stades du processus de développement du médicament (271). L'utilisation de la modélisation PBPK a facilité les types de décisions suivants : la nécessité de mener des études spécifiques de pharmacologie clinique et la conception des études spécifiques.

Actuellement, il y a un élan de l'industrie pharmaceutique et les agences réglementaires telles que la FDA dans la modélisation PBPK dans le développement de médicaments qui a grandement facilité la compréhension mécanistique des processus qui affectent l'évolution des concentrations et la clairance des médicament et leur métabolites (272).

## **4.3. Implémentation dans le logiciel de PK ADAPT II®**

### **4.3.1. Présentation du logiciel ADAPT II®**

Le logiciel ADAPT II® a été développé principalement pour des applications de modélisation PK et PD et d'analyse de données. Il a été développé sous la direction de David Z. D'Argenio en collaboration avec Alan Schumitzky au BioMedical Simulation Resource (BMSR) à l'université de la Californie (273). Ce logiciel a été utilisé dans plus de 200 publications internationales.

Le langage utilisé est le FORTRAN (Formula Translation). Les compilateurs utilisés peuvent être Compaq Visual Fortran v 6.0 ou supérieur, Digital Visual Fortran v 6.0/5.0 ou MS Fortran PowerStation v 4.0. Les algorithmes de l'analyse numérique sont utilisés pour optimiser une fonction critère (maximum de vraisemblance, maximum a posteriori, etc...) par rapport aux paramètres des modèles décrivant la dynamique du système observé. Les modèles peuvent être implémentés sous forme d'EDO ou de solutions analytiques.

Ce logiciel est composé de 3 modules :

- Le module « SIM » (simulation) incluant des possibilités de simulations de population ou pour un individu avec les covariables cliniquement pertinentes.
- Le module « ID » (identification) pour l'estimation des paramètres. Les estimateurs inclus sont les suivants : les moindres carrés pondérés (Weighted Least Squares ou WLS), le maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood ou ML), les moindres carrés généralisés (generalized squares ou GLS) et l'estimateur MAP bayésien.
- Le module « SAMPLE » (échantillon) permet d'estimer les temps optimaux de prélèvements.

### **4.3.2. Applications du logiciel ADAPT II®**

Ce logiciel peut être utilisé pour des études de PK, PD et de PK-PD, pour tous les xénobiotiques.

Il a été utilisé pour implémenter les modèles PBPK de la ciclosporine et du tacrolimus.

## 5. Approche Bottom up

### 5.1. Généralités

De manière générale, il existe deux approches pour localiser les sources de variabilités en PK (274) :

- l'approche « top-down » qui correspond à la recherche de covariables par analyse statistique de données provenant d'études classiques (petit effectif, données riches) ou de population (grand effectif, données éparses recueillies en phases II et III).
- l'approche « bottom-up » qui consiste en une recherche de paramètres influents avec un modèle mécanistique. On utilise alors les connaissances sur le corps humain et l'information acquise précédemment sur des molécules ayant des caractéristiques similaires.

La première méthode a montré ses limites. En effet, une proportion importante de la variabilité reste souvent inexplicée (275).

Les paramètres influents peuvent être des volumes, des débits sanguins, des coefficients de partage tissulaires, l'activité des transporteurs (P-gp) et des cytochromes. Les causes de variations peuvent être génotypiques ou phénotypique (pathologique, iatrogène ou autre). D'après Jamei en 2009 (1), il existe un nombre important d'échecs dans les stades de développement clinique de médicaments dû à des effets différents observés dans un sous-groupe de patient par rapport au patient « moyen ». L'attente d'un effet extrême ou l'absence d'effet thérapeutique dans certains sous-groupes suivant l'administration de doses similaires exige une pleine compréhension de la question de la variabilité et l'importance de l'identification des covariables qui déterminent l'exposition du médicament chez chaque sujet. Dans tout processus de développement de médicaments le plus tôt ces covariables sont connues, le mieux c'est. Pour diminuer ce taux d'échec dans le développement de médicaments, Jamei propose de tenter d'utiliser une approche bottom-up avec modélisation et simulation PBPK en respectant les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME). Cependant, ce point de vue n'est pas communément accepté.

## 5.2. Méthodologie

L'élément clé de cette approche est la séparation des :

- Informations sur le système (corps humain),
- Informations sur le médicament (caractéristiques physico-chimiques pour déterminer la perméabilité à travers les membranes, répartition entre les tissus, liaison aux protéines plasmatiques, affinités envers certaines enzymes et transporteurs),
- Informations individuelles (dose, fréquence et voie d'administration, médicaments et nourriture concomitants).

Ces trois éléments doivent être convenablement séparés mais interagissent les uns avec les autres. L'information sur le corps humain est indépendante des autres et peut être réutilisée avec des médicaments différents sous différents schémas d'étude.

### Données du système

Les données du système correspondent à :

- la motilité de l'estomac et de l'intestin, surface intestinale et dynamique des fluides (si l'absorption doit être modélisée),
- taux circulants de protéines plasmatiques et taux de cellules sanguines,
- composition, taille et débit sanguin des organes,
- enzymes / transporteurs et leur abondance, les génotypes, les taux de synthèse et de dégradation principalement dans le foie et l'intestin,
- valeurs de ces paramètres pour des populations cibles différentes (paramètres variant selon le sexe, l'âge, l'origine ethnique, les génotypes affectant les enzymes ou transporteurs).

### Données sur le médicament

Les données sur le médicament correspondent :

- à l'affinité aux protéines plasmatiques, aux globules rouges, à des enzymes et capacité à inhiber ou induire certaines enzymes,

- aux données spécifiques au médicament peuvent être logiquement divisées en différentes catégories telles que : « physicochimie », « absorption par voie orale », « distribution dans les organes », « organes d'élimination », « potentiels d'inhibition ou d'induction »,
- à certains paramètres susceptibles d'affecter plus d'un processus ADME.

L'intensité, la précision et qualité des données spécifiques au médicament augmentent généralement au fur et à mesure des phases de développement du médicament. Certaines des données nécessaires à des stades précoces peuvent être calculées à partir de modèles *in silico*. Par exemple, le pKa et logP d'une molécule peuvent être calculés *in silico* à partir de la structure moléculaire. Couplé à la mesure *in vitro* de la fraction libre plasmatique et du rapport de concentration du médicament dans le plasma et dans le sang total, il est possible d'estimer les coefficients de partage tissulaires *in silico* (276, 277). Par ailleurs, à partir de la mesure des clairances intrinsèques *in vitro* sur microsomes ou sur hépatocytes, il est possible d'estimer la clairance hépatique *in vivo* (278).

### **Données individuelles**

Les informations individuelles sont les suivantes :

- les liquides ou la nourriture ingérée avec la prise de médicament, la dose administrée et les intervalles de prises,
- certaines covariables potentielles (le sexe, les génotypes de certaines enzymes, l'âge, l'appartenance ethnique...) et l'utilisation concomitante d'autres médicaments.

### **Vue d'ensemble des relations entre les variables**

Une vue d'ensemble des relations entre les variables qui affectent les phases ADME peut être schématisée (1) (figure 4). L'interaction entre les 3 éléments fournit une matrice complexe de covariables et chacun de ces facteurs influe sur de multiples éléments des phases ADME.

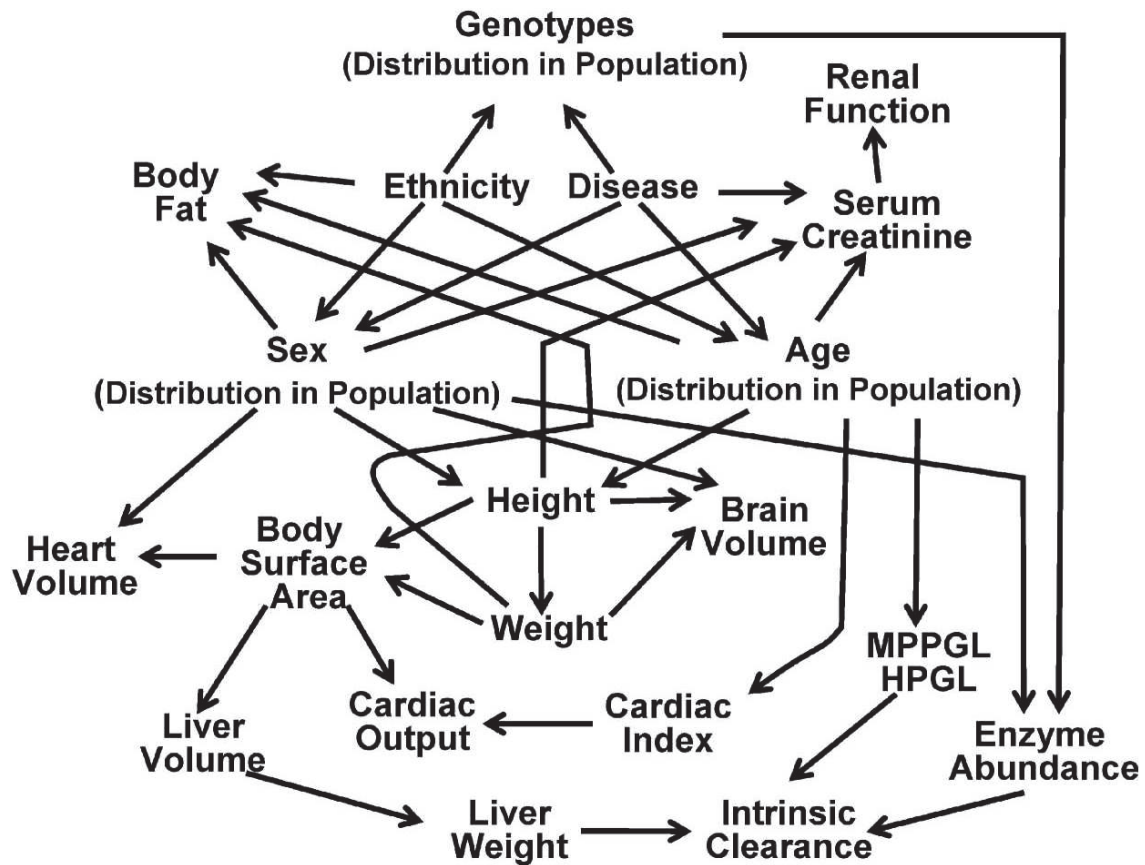


Figure 4. Vue d'ensemble des relations entre les variables (1)

### Éléments constitutifs des phases ADME

Un modèle PBPK devrait idéalement décrire en détail les déterminants des paramètres suivants :

- Absorption orale du médicament : biodisponibilité, fraction de la dose traverse la paroi intestinale, clairance métabolique intrinsèque de l'intestin, etc...
- Distribution du médicament à travers le corps humain : volumes de distribution, fractions libres plasmatique et sanguine, etc...
- Métabolisme du médicament : clairance métabolique intrinsèque du foie, débit sanguin hépatique etc...
- Excrétion rénale du médicament : taux de filtration glomérulaire, débit sanguin rénal, etc...
- Changement dans les phases ADME quand co-administration d'autres médicaments et de nourriture.

De la même manière, les sources de variabilité des composants du système doivent être décrites en détail :

- Absorption orale : les facteurs influant sur le pH dans le TGI (nourriture, liquide, âge...), le temps de résidence dans l'estomac et l'intestin, les niveaux et activités des enzymes et transporteurs dans les parois de l'intestin et dans le foie, les débits sanguins intestinaux et hépatiques, la liaison aux protéines plasmatiques ;
- Distribution : la taille et composition du corps, facteurs influant sur la liaison aux protéines plasmatiques, l'hématocrite, les niveaux et activités des transporteurs ;
- Métabolisme : facteurs influant sur les niveaux et activités d'enzymes et transporteurs hépatiques, sur le débit sanguin hépatique, sur la liaison aux protéines plasmatiques ;
- Excrétion rénale : covariables générales de la fonction rénale, facteurs influant sur les niveaux et activités des transporteurs dans le rein, le débit rénal, la liaison aux protéines plasmatiques, le pH et le débit ;
- Effets de la co-administration d'autres médicaments.

### **5.3. Applications**

De récentes études ont utilisé l'approche bottom-up avec modélisation et simulation PBPK, par exemple pour une recherche prospective de covariables pertinentes comme la distribution des cellules sanguines, le sexe et l'expression du CYP3A5 sur la clairance du tacrolimus (2).

L'équipe de Rostami a développé un logiciel spécialement conçu pour cette approche, le « Simcyp population-based ADME simulator » (279). Ce logiciel a été utilisé par exemple pour étendre le nombre de modèles pour prédire la clairance de diverses molécules en relation avec le degré de sévérité de la cirrhose hépatique (280) ou en cas d'obésité (281). Il a été également utilisé pour la construction d'un modèle PBPK pédiatrique et de la reproduction d'études cliniques pédiatriques et entreprendre des études théoriques pour montrer les applications potentielles de modèle PBPK mécanistique dans la recherche clinique pédiatrique en mettant l'accent sur l'anesthésie pédiatrique (282).

**2<sup>EME</sup> PARTIE : TRAVAUX DE LA**  
**THESE**



# **1. Etude de la ciclosporine en greffe de CSH**

## **1.1. Etude clinique préliminaire**

Notre étude de modélisation a été motivée par une étude clinique préliminaire qui avait pour objectif de comparer les types de GVH ainsi que leurs fréquences respectives en fonction du type de perfusion de la ciclosporine, c'est-à-dire continue *versus* discontinue.

### **1.1.1. Patients et méthode**

Il s'agissait d'une étude rétrospective et non randomisée. Les patients étaient hospitalisés dans le service d'hématologie pédiatrique de l'Hôpital Debrousse à Lyon. Deux groupes de 31 et 30 patients ont été constitués. Les patients du premier groupe ont reçu de la ciclosporine en perfusion continue entre novembre 2001 et septembre 2003. Les patients du second groupe ont reçu de la ciclosporine en 2 perfusions quotidiennes de 2 heures entre août 2006 et novembre 2007.

Les caractéristiques des deux groupes sont représentées dans le tableau IV. Il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes au risque  $\alpha$  fixé à 5% sur les caractéristiques étudiées, les deux groupes sont alors comparables sur ces caractéristiques.

Tableau IV. Caractéristiques des patients des deux groupes

NS : non significatif. \* test du chi 2 au (risque alpha =5%), \*\* test du chi 2 corrigé de Yates au risque alpha fixé à 5%, + test t de Student (risque alpha = 5%), ++ test exact de Fisher.

	<b>Perfusion discontinue</b>	<b>Perfusion continue</b>	<b>Différence</b>
<b>N</b>	<b>31</b>	<b>30</b>	
Age moyen (années)	7.7	7.5	NS +
Poids moyen (kg)	25.4	26.6	NS +
Sexe (% sexe masculin)	51.6	56.7	NS *
<b>Type de pathologie</b>			
Leucémie aiguë lymphoïde (%)	27.3	25.8	NS *
Leucémie aiguë myéloïde (%)	21.2	32.3	NS *
Autres pathologies hématologiques malignes (%)	15.2	9.7	NS **
Pathologies hématologiques non malignes (%)	33.3	32.3	NS *
Maladies métaboliques (%)	3.0	0	NS ++
<b>Type de greffe</b>			
Génoïdétique (%)	61.3	43.3	NS *
Phénoïdétique (%)	38.7	56.7	

Concernant le traitement intraveineux, les durées moyennes de traitement par ciclosporine ne sont pas significativement différentes entre l'administration par perfusion continue et celle par perfusion discontinue et se trouve être d'environ 25 jours (23.4 en cas de perfusion discontinue et 25.5 en cas de perfusion continue). Les doses de ciclosporine à J1 (mg/kg) ne sont pas statistiquement différentes entre les 2 types de perfusion (3.71 en perfusion discontinue *versus* 3.55 en perfusion continue). En revanche, les doses moyennes en mg/kg/jour sur la durée totale du traitement par voie intraveineuse diffèrent significativement entre les patients qui ont eu une perfusion continue (2.73 mg/kg/jour) et ceux qui ont eu une perfusion discontinue (4.04 mg/kg/jour) (tableau V).

Tableau V. Caractéristiques du traitement par ciclosporine pour les 2 groupes.

NS : non significatif. S : significatif. <sup>+</sup> test z bilatéral au risque alpha fixé à 5%.

	Perfusion discontinuée	Perfusion continue	Différence
Durée moyenne de traitement (jours)	23.4	25.5	NS+
Dose moyenne (mg/kg) au Jour 1 du traitement	3.71	3.55	NS+
Dose moyenne (mg/kg/jour) sur la totalité du traitement par voie intraveineuse	4.04	2.73	S+

### 1.1.2. Résultats

D'après les résultats bruts de cette étude clinique (tableau VI), on observe que les GVH aiguës ont été plus fréquentes en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinuée. Cependant, la différence n'est pas significative au risque  $\alpha$  fixé à 5%. Il n'existe pas de différence significative entre les 2 groupes concernant le délai d'apparition de la GVH.

Les distributions de grades de GVH (0, 1, 2 et 3-4) ne sont pas statistiquement différentes entre les 2 groupes, mais la proportion de GVH de grades sévères (III et IV) est statistiquement plus importante en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinuée. Cette observation peut éventuellement s'expliquer du fait d'une dose plus importante en perfusion discontinuée que continue.

La moyenne des grades est plus importante en cas de perfusion continue que discontinuée (GVH plus sévères) mais la différence n'est pas statistiquement significative (1.13 *versus* 0.74).

La répartition des 3 localisations (cutanée, intestinale et hépatique) de GVH n'est pas statistiquement différente entre les 2 groupes.

Les stades de GVH cutanées en cas de perfusion continue ou discontinuée ne sont pas significativement différents (moyenne des stades cutanés 0.97 *versus* 0.94).

Les localisations extra cutanées (digestive et hépatique) sont statistiquement plus fréquentes en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinuée (40.7% *versus* 11.1%,  $p < 0.05$ ). De plus, le pourcentage de GVH touchant plus d'un organe est statistiquement plus importante (50% *versus* 12.5%,  $p < 0.025$ ) en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinuée.

Ces différences de scores pourraient être dues à la différence de doses. Cependant, quelque soit le protocole d'administration (perfusion continue ou discontinuée), un suivi thérapeutique a été réalisé de la même manière. Par conséquent, l'exposition est censée être similaire dans les deux groupes. Les différences de dose peuvent être dues à des différences de clairance, qui sont possibles étant donné l'absence de randomisation.

Tableau VI. Fréquences et types de GVH des deux groupes

NS : non significatif. S : significatif. \* test du chi 2 au risque alpha fixé à 5%, \*\* test du chi 2 corrigé de Yates au risque alpha fixé à 5%, + test z bilatéral au risque alpha fixé à 5%, ++ test exact de Fisher.

	Perfusion discontinuée	Perfusion continue	Différence
<b>N</b>	<b>31</b>	<b>30</b>	
<b>Présence de GVH aiguë (%)</b>	51.6	60.0	NS *
<b>Délai moyen d'apparition post-greffe (jours)</b>	13.0	18.1	NS +
<b>Grade total</b>			
I (%)	56.2	33.3	NS *
II (%)	43.8	50.0	NS *
III et IV (%)	0	16.7	S ++
<b>Localisation</b>			
Cutanée (%)	88.9	59.3	S *
Digestive (%)	5.5	22.2	NS **
Hépatique (%)	5.6	18.5	NS **
Présence de plus d'une localisation	12.5	50.0	S *

Les pourcentages de GVH souhaitée (GVH de grade I) ne diffèrent pas significativement entre le traitement par perfusion discontinue et celui par perfusion continue. Cependant, le pourcentage de concordance entre la GVH souhaitée et observée est plus important en cas de perfusion discontinue qu'en cas de perfusion continue (70% vs 52%) et cette différence est proche de la significativité ( $p=0.052$ ) (tableau VII).

Tableau VII. GVH aiguës souhaitées et observées pour chacun des groupes

NS : non significatif. S : significatif. \* test du chi 2 au risque alpha fixé à 5%

	Perfusion discontinue	Perfusion continue	Différence
Proportion de GVH souhaitée (%)	60.6	64.5	NS*
Proportion de concordance GVH souhaitée/observée (%)	69.7	51.6	NS*

## 1.2. Intérêt d'un modèle PBPK

La mesure de la concentration sanguine de la ciclosporine ne permet pas de connaître l'exposition tissulaire à la ciclosporine et il est difficile d'interpréter la relation dose-effet en ne se basant que sur des mesures de concentration sanguine. En effet, il existe différents processus saturables dans la distribution de la ciclosporine. Il n'y a donc pas de proportionnalité entre les concentrations sanguines et tissulaires.

Par ailleurs, il semblerait que le mode d'administration de la ciclosporine en perfusion intra-veineuse continue soit moins efficace du fait d'une incidence des GVH aiguës sévères plus importante par rapport aux perfusions discontinues (3). Notre hypothèse est que ces différences d'efficacité s'expliquent par des différences au niveau des profils de concentrations tissulaires, en fonction de la durée de perfusion.

Enfin, les cliniciens considérant impossible de faire une étude clinique randomisée pour comparer directement les deux modalités de perfusion, l'approche PBPK-PD permettant de prévoir les profils de concentration de ciclosporine en fonction du temps dans des organes cibles de la GVH constitue un outil de choix pour cette étude.

### 1.3. Historique du modèle PBPK de la ciclosporine

Le premier modèle PBPK de la ciclosporine a été proposé par l'équipe de Rowland en 1991 (4) en utilisant les données des concentrations sanguines et tissulaires à l'état stationnaire dans le cadre d'une perfusion continue chez le rat. Ce modèle incorporait une distribution saturable dans les cellules sanguines et supposait qu'à la fois la distribution tissulaire et la clairance étaient des processus linéaires, bien qu'il apparaissait une tendance à la distribution saturable dans certains tissus.

Puis, en 1998, l'équipe de Kawai et Rowland (5) a développé un autre modèle pour caractériser la cinétique de la ciclosporine en utilisant les données toujours chez le rat après une perfusion de 2 minutes. Ce modèle, qui supposait une distribution saturable à la fois dans le sang et les tissus, décrivait avec succès la cinétique de la ciclosporine avec transposition à l'échelle humaine. Cependant, aucune de ces modélisations ne permettait de caractériser tous les aspects de ces processus non linéaires notamment du fait que l'étude ne portait que sur une seule dose thérapeutique (6 mg/kg).

En 2000, l'équipe de Tanaka et Rowland (6) a étudié la ciclosporine administrée par voie intra-veineuse courte (2 minutes) sur une large gamme de doses (1.2 à 30 mg/kg) et a analysé les résultats en utilisant plusieurs méthodes graphiques. Cette analyse a montré clairement qu'à la fois la distribution tissulaire et sanguine sont saturables, de même que la clairance. Par ailleurs, la cinétique de distribution varie beaucoup suivant l'organe étudié. Puis, cette même équipe (266) a repris ces données (concentrations sanguines et tissulaires) et construit un nouveau modèle physiologique qui explique au moins en partie la non linéarité de la liaison observée dans plusieurs tissus par la liaison saturable de la ciclosporine à son récepteur : la cyclophiline.

Finalement, la cinétique de la ciclosporine apparaît linéaire quand on se base sur les mesures de concentrations sanguines. Les modèles PBPK démontrent qu'il s'agit d'une observation apparente résultant de plusieurs processus saturables se compensant les uns les autres. Par exemple, la clairance augmente en même temps que la dose mais de manière infraproportionnelle en raison de la saturation des enzymes du métabolisme et de manière supraproportionnelle en raison de la saturation aux GR. Les deux processus se compensent et il en résulte une augmentation pratiquement linéaire de la clairance en fonction de la dose.

## 1.4. Construction du modèle PBPK

### 1.4.1. Modèle global

Le modèle PBPK global de la ciclosporine que nous avons construit est basé sur celui élaboré par l'équipe de Kawai, validé chez le rat (5). Il est composé de 11 organes (muscle, tissu adipeux, poumons, cœur, os, peau, thymus, rein, rate, foie et intestin) ainsi que de deux compartiments sanguins (sang veineux et sang artériel) (figure 5).

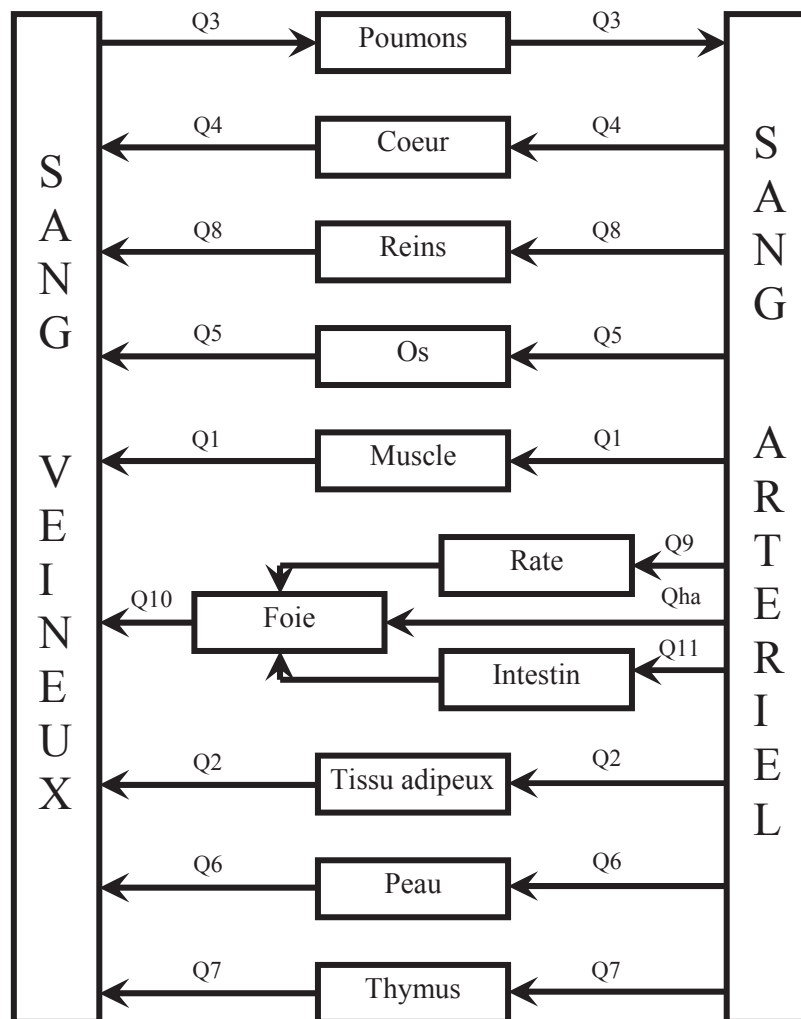


Figure 5. Schéma du modèle physiologique global de la ciclosporine

Q correspond au débit et « ha » signifie artère hépatique.

### 1.4.2. Structure des compartiments tissulaires

La structure d'un organe ou d'un tissu est composée de plusieurs compartiments entre lesquels la ciclosporine se distribue (figure 6). Il y en a 3 principaux : l'espace vasculaire, l'espace interstitiel et l'espace cellulaire. Dans l'espace vasculaire, la ciclosporine peut être sous trois formes : libre, liée aux protéines plasmatiques ou encore se trouver dans les cellules sanguines.

Espace vasculaire (capillaires)	Cellules sanguines
	Plasma
Espace interstitiel	
Espace cellulaire tissulaire	

Figure 6. Schéma d'un compartiment tissulaire

### 1.4.3. Paramètres physiologiques

Les paramètres physiologiques correspondent aux volumes et aux débits sanguins respectifs de chaque compartiment chez le rat. Dans l'étude de Tanaka *et al.* en 1999 (266), les valeurs de ces paramètres ont été tirées de la littérature (4, 5) tout comme leur fraction d'espace vasculaire et d'espace interstitiel (283). Ces valeurs physiologiques chez le rat sont indiquées dans le tableau VIII.

Les compartiments tissulaires ont un volume physiologique total ( $V$ ) qui est la somme du volume vasculaire ( $V_V$ ), extracellulaire ( $V_E$ ) et tissulaire ( $V_{TC}$ ). Le volume du compartiment extracellulaire comprend lui-même le volume du plasma ( $V_P$ ) et le celui du milieu interstitiel ( $V_I$ ).



Tableau VIII. Valeurs des paramètres physiologiques chez le rat

Organe	Volume total (L)	Débit sanguin (L/h)	Fraction de volume vasculaire	Fraction d'espace interstitiel
Poumon	0.001	2.515	0.262	0.188
Cœur	0.0008	0.235	0.262	0.100
Rein	0.0023	0.554	0.105	0.200
Os	0.0158	0.152	0.041	0.100
Muscle	0.1219	0.45	0.026	0.120
Rate	0.0006	0.038	0.282	0.150
Foie	0.0103	0.708	0.115	0.163
Intestin	0.010	0.451	0.024	0.094
Peau	0.040	0.350	0.019	0.302
Tissu adipeux	0.010	0.024	0.010	0.135
Thymus	0.0007	0.042	0.030	0.150
Sang veineux	0.0113	-	-	-
Sang artériel	0.0056	-	-	-
Artère hépatique	-	0.219	-	-

Par ailleurs, pour chaque compartiment  $i$ , le volume des cellules sanguines ( $V_{BC}$ ) et du plasma ainsi que leur débit ( $Q$ ) respectif dépendent de la valeur de l'hématocrite (HCT) et sont tels que :

$$V_{BC}(i) = V_V(i).HCT$$

$$V_P(i) = V_V(i).(1-HCT)$$

$$Q_{BC}(i) = Q(i).HCT$$

$$Q_P(i) = Q(i).(1-HCT)$$

#### 1.4.4. Paramètres liés à la ciclosporine

Les valeurs de ces paramètres ont été estimées antérieurement (266) et ont été fixées *a priori* dans le modèle.

##### Distribution sanguine

Cette distribution est décrite comme résultant de trois processus :

- une liaison aux protéines plasmatiques linéaire avec une fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ) de 0.062. C'est une fraction qui a été mesurée précédemment dans une étude de l'équipe de Bernareggi (4) et cette valeur est considérée comme indépendante de la concentration de ciclosporine.
- une liaison simple spécifique dans les érythrocytes saturable et dépendant de la concentration en ciclosporine. Cette liaison est caractérisée par une constante de dissociation ( $K_{D, BC}$ ) de 0.185  $\mu\text{g/mL}$  et une capacité de liaison ( $nP_T$ ) de 4.64  $\mu\text{g-eq/mL}$ . Ces constantes ont été mesurées *in vitro* par l'équipe de Kawai (284).
- une pénétration dans les érythrocytes selon une diffusion passive et caractérisée par un produit perméabilité par surface des cellules sanguines ( $PS_{BC}$ ) de 560 mL/h par mL de sang. Cette valeur caractérise les échanges de ciclosporine entre le plasma et les cellules sanguines (des compartiments veineux, artériel et tissulaires). Pour avoir le produit perméabilité par surface de chaque tissu, cette valeur a été multipliée par le volume sanguin total de l'organe.

##### Distribution dans le milieu interstitiel des tissus

La distribution dans le milieu interstitiel est décrite par une liaison instantanée et linéaire aux lipoprotéines. Cette liaison aux lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL) représente environ 95% de la liaison protéique totale de la ciclosporine. On considère alors qu'elle ne se lie qu'aux lipoprotéines au niveau plasmatique et interstitiel pour obtenir la fraction libre de ciclosporine dans le milieu interstitiel. Le rapport des concentrations en lipoprotéines entre le milieu interstitiel et le plasma (IPR) pour chaque organe est obtenu à partir de la littérature (283). On considère que les 3 types de lipoprotéines ne représentent qu'une seule classe de protéine.

La valeur de la fraction libre interstitielle ( $f_{uI}$ ) est obtenue par l'équation suivante (5) :

$$f_{uI} = 1/(1+[N^*/K_D^*](IPR)) \quad [1]$$

Où  $N^*$  correspond au nombre de sites de liaison disponibles et  $K_D^*$  à la constante de dissociation.

Par ailleurs, la fraction libre plasmatique est telle que :

$$f_{uP} = 1/(1+[N^*/K_D^*]) \quad [2]$$

La fraction libre plasmatique étant fixée à 0.06, l'équation [2] nous permet de calculer le rapport  $[N^*/K_D^*]$  qui a donc pour valeur 15.67.

Les fractions libres de ciclosporine dans le milieu interstitiel peuvent alors être calculées avec l'équation [1]. Les valeurs des fractions libres se trouvent dans le tableau IX.

Tableau IX. Rapport de concentration de lipoprotéine entre le milieu interstitiel et le plasma (IPR) et la fraction libre de ciclosporine dans le milieu interstitiel ( $f_{uI}$ ) pour chaque organe

Organe	IPR lipoprotéines	$f_{uI}$
Muscle	0.5	0.11
tissu adipeux	0.5	0.11
Poumon	0.5	0.11
Cœur	0.5	0.11
Os	0.5	0.11
Peau	0.25	0.2
Thymus	0.5	0.11
Rein	0.5	0.11
Rate	1	0.06
Foie	1	0.06
Intestin	0.5	0.11

## Distribution dans les cellules tissulaires

### - Perméabilité cellulaire

Comme pour la distribution sanguine, la perméabilité de la membrane des cellules tissulaires (caractérisée par le produit perméabilité par surface ou  $PS_{TC}$ ) à la ciclosporine est définie pour le transfert entre le milieu interstitiel et l'espace intracellulaire ; les valeurs de  $PS_{TC}$  ont été obtenues individuellement pour chaque organe. Au niveau des cellules tissulaires

de chaque organe, la liaison intracellulaire est caractérisée par la fraction libre de ciclosporine ( $f_{u_{TC}}$ ).

Tous les organes sauf le foie, les reins et les poumons, ont une distribution tissulaire limitée par la diffusion (transport membranaire). Dans ce cas, la valeur de la perméabilité de la membrane est en général inférieure ou semblable au débit sanguin de l'organe (celle-ci suggère qu'il existe une barrière substantielle pour la pénétration de la ciclosporine dans les organes concernés). Pour les 3 autres organes, la perméabilité obtenue de manière indépendante est au moins 30 fois supérieure au débit sanguin de l'organe, mais l'intervalle de confiance de l'estimation est très large.

### - Types de sous-modèles tissulaires

Il existe 2 types de modèles décrivant la cinétique de la ciclosporine dans les organes. Selon les organes, l'un ou l'autre des modèles est utilisé. Le meilleur modèle pour chaque organe a été déterminé expérimentalement par l'équipe de Rowland.

#### ➤ Modèle 1 : distribution tissulaire linéaire

Il concerne le muscle et le tissu adipeux. La liaison tissulaire sur un site de liaison intracellulaire est linéaire. La cinétique de la liaison est caractérisée par une constante d'association ( $K_{ass}$ ) et une constante de dissociation ( $K_{dis}$ ). La ciclosporine liée à ce site est appelée « pool profond » (figure 7).

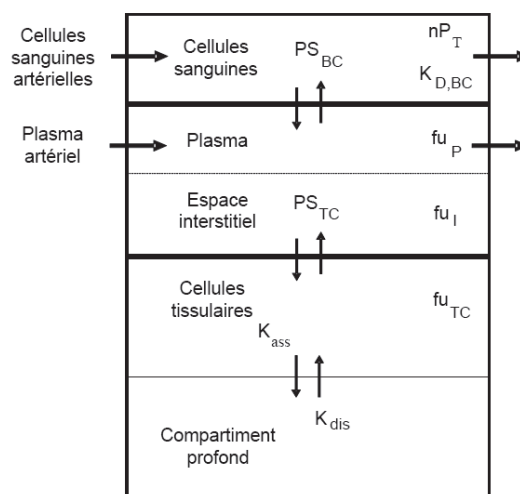


Figure 7. Schéma d'un tissu selon le modèle 1

➤ **Modèle 2 : distribution tissulaire non linéaire**

Il concerne les neuf autres organes soit les poumons, le cœur, les os, la peau, le thymus, les reins, la rate, le foie et l'intestin. La liaison sur le site intracellulaire tissulaire est saturable ( $B_T$  correspondant au nombre de sites de liaison) avec un équilibre instantané. Le modèle est caractérisé par une constante de dissociation ( $K_{D,TC}$ ) (figure 8).

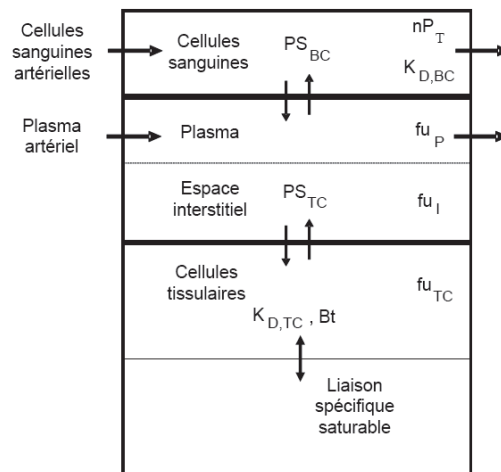


Figure 8. Schéma d'un tissu selon le modèle 2

**Valeurs des paramètres**

Les valeurs des paramètres spécifiques de distribution de la ciclosporine se trouvent dans le tableau X.

Tableau X. Valeurs des paramètres de distribution tissulaire chez le rat

<b>Modèle 1</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	K <sub>ass</sub> (L/h)	K <sub>dis</sub> (L/h)
Muscle	2.4	0.041	0.00055	0.000026
Tissu adipeux	0.079	0.001	1.2	0.0144
<b>Modèle 2</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	B <sub>T</sub> (µg-eq/L)	K <sub>D,TC</sub> (µg/L)
Poumon	30*Q <sub>3</sub>	0.015	4800	0.66
Cœur	0.14	0.017	1900	0.2
Os	0.39	0.1	6000	60
Peau	0.3	0.143	8500	39
Thymus	0.007	0.1002	10000	15
Rein	30*Q <sub>8</sub>	0.013	6300	5.8
Rate	0.074	0.01	7800	10
Foie	30*Q <sub>10</sub>	0.009	14000	16
Intestin	0.039	0.021	2400	4.8

### - Elimination hépatique

L'élimination de la ciclosporine ne se fait qu'au niveau du foie à partir du compartiment intracellulaire, avec une clairance hépatique intrinsèque suivant une cinétique de Michaelis-Menten. La clairance hépatique est caractérisée par un modèle du foie « well stirred » reposant sur l'hypothèse d'un mélange instantané, complet et homogène de la ciclosporine dans le compartiment hépatique.

La clairance hépatique (CL<sub>H</sub>) est identique à la clairance systémique (CL<sub>B</sub>) :

$$CL_H = CL_B = \frac{Q_H \cdot f_{u_B} \cdot CL_{int}}{Q_H + f_{u_B} \cdot CL_{int}}$$

Avec :

f<sub>u<sub>B</sub></sub> : fraction libre sanguine

Q<sub>H</sub> : débit sanguin hépatique

$CL_{int}$  : clairance intrinsèque qui relie le taux de métabolisme à la concentration libre intracellulaire. Cette clairance intrinsèque est telle que :

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + C_{u_{TC}}}$$

$C_{u_{TC}}$  représente la concentration de la forme libre dans les cellules tissulaires.

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) a été fixée à 0.6  $\mu\text{g/mL}$  et la vitesse maximum ( $V_{max}$ ) à 577  $\mu\text{g/h}$  (266). Dans l'article de Tanaka, le CV associé à  $K_m$  est de 13% et celui associé à  $V_{max}$  est de 10%.

### Equations du modèle

Pour chacun des 11 organes, l'évolution des concentrations de ciclosporine en fonction du temps est étudiée dans 4 milieux différents : dans les cellules sanguines des capillaires, dans le milieu extracellulaire (combinaison du plasma et du milieu interstitiel), dans les cellules tissulaires et enfin dans le plasma.

Pour les compartiments veineux et artériel, l'évolution des concentrations en fonction du temps est étudiée dans 2 milieux différents : dans les cellules sanguines et dans le plasma.

L'évolution de ces concentrations en fonction du temps est traduite sous forme d'un système de 40 EDO qui décrivent des transferts de masse. Les équations ont été tirées du modèle élaboré par l'équipe de Rowland (5) et se trouvent ci-dessous. La signification des abréviations des équations est décrite dans la liste qui se trouve page 15.

#### - Cellules sanguines des capillaires des tissus

La concentration de ciclosporine dans les cellules sanguines ( $C_{BC}$ ) des capillaires de chacun des organes  $i$  est telle que :

$$V_{BC}(i) \frac{dC_{BC}(i)}{dt} = Q_{BC}(i) \cdot (C_{BC}(1) - C_{BC}(i)) + PS_{BC}(i) \cdot (f_{u_p} \cdot F_{cv} \cdot C_E(i) - C_{u_{BC}}(i))$$

La concentration libre de ciclosporine dans les cellules sanguines ( $C_{u_{BC}}$ ) est telle que :

$$C_{u_{BC}}(i) = 0,5 \cdot [C_{BC}(i) - K_{D,BC} - nP_T + \sqrt{(C_{BC}(i) - K_{D,BC} - nP_T)^2 + 4 \cdot K_{D,BC} \cdot C_{BC}(i)}]$$

### - Cellules sanguines des compartiments sanguins

Dans le compartiment veineux, la concentration de ciclosporine ( $C_{BC,V}$ ) est telle que :

$$V_{BC,V} \frac{dC_{BC,V}}{dt} = (\sum Q_{BC, \text{organes}} \cdot C_{BC, \text{organes}} - Q_{BC, \text{poumons}} \cdot C_{BC,V}) + PS_{BC} \cdot (fu_p \cdot C_{P,V} - Cu_{BC,V})$$

Dans le compartiment artériel, la concentration de ciclosporine ( $C_{BC,A}$ ) est telle que :

$$V_{BC,A} \frac{dC_{BC,A}}{dt} = Q_{BC, \text{poumons}} (C_{BC, \text{poumons}} - C_{BC,A}) + PS_{BC} \cdot (fu_p \cdot C_{P,A} - Cu_{BC,A})$$

### - Plasma des compartiments sanguins

Dans le compartiment veineux, la concentration dans le plasma ( $C_{P,V}$ ) est telle que :

$$V_{P,V} \frac{dC_{P,V}}{dt} = (\sum Q_{P, \text{organes}} \cdot C_{P, \text{organes}} - Q_{P, \text{poumons}} \cdot C_{P,V}) - PS_{BC} \cdot (fu_p \cdot C_{P,V} - Cu_{BC,V})$$

Dans le compartiment artériel, la concentration dans le plasma ( $C_{P,A}$ ) est telle que :

$$V_{P,A} \frac{dC_{P,A}}{dt} = Q_{P, \text{poumons}} (C_{P, \text{poumons}} - C_{P,A}) - PS_{BC} \cdot (fu_p \cdot C_{P,A} - Cu_{BC,A})$$

### - Milieu extracellulaire des compartiments tissulaires

Pour les compartiments tissulaires, la concentration dans le milieu extracellulaire de chacun des organes  $i$  est telle que :

$$(V_p(i) + V_l(i)) \frac{dC_E(i)}{dt} = Q_p(i) \cdot (C_{P, \text{in}} - C_p(i)) - PS_{BC}(i) \cdot (fu_p \cdot F_{cv}(i) \cdot C_E(i) - Cu_{BC}(i)) \\ - PS_{TC}(i) \cdot (fu_l \cdot F_{ci}(i) \cdot C_E(i) - Cu_{TC}(i))$$

### - Cellules des compartiments tissulaires

#### **- Modèle 1 : distribution tissulaire linéaire**

Ce type de distribution concerne le foie et le tissu adipeux, référencés respectivement par  $i=1$  et  $2$ . Il existe deux sous compartiments dans lesquels la ciclosporine se distribue : le pool à équilibre rapide et le pool à équilibre lent (pool profond).



➤ Au niveau du pool à équilibre rapide

La concentration du pool rapide ( $C_{TC,R}$ ) est :

$$V_{TC}(i) \frac{dC_{TC,R}(i)}{dt} = PS_{TC}(i) \cdot (fu_I(i) \cdot Fci(i) \cdot C_E(i) - fu_{TC}(i) \cdot C_{TC,R}(i) - K_{ass}(i) \cdot fu_{TC}(i) \cdot C_{TC,R}(i) + K_{dis}(i) \cdot C_{TC,S}(i))$$

➤ Au niveau du pool profond

La concentration du pool profond ( $C_{TC,S}$ ) est :

$$V_{TC}(i) \frac{dC_{TC,S}(i)}{dt} = K_{ass}(i) \cdot fu_{TC}(i) \cdot C_{TC,R}(i) + K_{dis}(i) \cdot C_{TC,S}(i)$$

### - Modèle 2 : distribution tissulaire non linéaire

Ce type de distribution concerne les poumons, le cœur, les os, la peau, le thymus, les reins, la rate, le foie et l'intestin, référencé respectivement par  $i=3$  à 11.

La concentration dans les cellules tissulaires ( $C_{TC}$ ) est :

$$V_{TC}(i) \frac{dC_{TC}(i)}{dt} = PS_{TC}(i) \cdot (fu_I(i) \cdot Fci(i) \cdot C_E(i) - C_{u_{TC}}(i))$$

avec la concentration libre de ciclosporine dans les cellules tissulaires telle que :

$$C_{u_{TC}}(i) = 0,5 \cdot fu_{TC}(i) \cdot [C_{TC}(i) - K_{D,TC}(i) / fu_{TC}(i) - B_T + \sqrt{(C_{TC}(i) - K_{D,TC}(i) / fu_{TC}(i) - B_T)^2 + 4 \cdot K_{D,TC}(i) \cdot C_{TC}(i) / fu_{TC}(i)}]$$

### - Coefficients de proportionnalité pour le calcul des concentrations plasmatiques et interstitielles

Il existe deux coefficients ( $F_{cv}$  et  $F_{ci}$ ) permettant le calcul des concentrations plasmatiques ( $C_P$ ) et interstitielles ( $C_I$ ) à partir de la concentration extracellulaire ( $C_E$ ) pour tous les tissus (5).

Pour chacun des organes  $i$ , on a :

$$C_P(i) = F_{cv}(i) \cdot C_E(i)$$

$$C_I(i) = F_{ci}(i) \cdot C_E(i)$$

Ces coefficients dépendent des volumes plasmatique ( $V_p$ ) et interstitiel ( $V_i$ ) des compartiments et des fractions libres plasmatique ( $f_{u_p}$ ) et interstitielle ( $f_{u_i}$ ) et sont tels que :

$$F_{cv} = \frac{(f_{u_i}(i)/f_{u_p}).(V_p(i) + V_i(i))}{(f_{u_i}(i)/f_{u_p}).V_p(i) + V_i(i)}$$

et

$$F_{ci} = \frac{(V_p(i) + V_i(i))}{(f_{u_i}(i)/f_{u_p}).V_p(i) + V_i(i)}$$

## **Implémentation dans ADAPT II®**

### - Equations différentielles du système

Au total, les 40 EDO ont été implémentées dans le logiciel ADAPT II®.

La concentration de ciclosporine est habituellement mesurée dans le sang total, c'est-à-dire qu'il s'agit de la mesure de la concentration totale de ciclosporine. Celle-ci correspond à la somme de la concentration sous forme libre et sous forme liée aux protéines plasmatiques ainsi que la ciclosporine se trouvant dans les cellules sanguines. Cette concentration sanguine est calculée à partir de la concentration plasmatique et de celle dans les globules rouges du compartiment veineux, selon l'équation suivante :

$$C_T = C_{BC} * hct + C_p * (1 - hct)$$

La ciclosporine n'étant pas une substance endogène, sa concentration est nulle avant le début du traitement, pour tous les compartiments  $i$  ( $= 1$  à  $40$ ) : à  $t = 0$ ,  $Q_i = 0$ .

### - Paramètres modifiables lors de l'exécution du programme

Chez le rat, un seul paramètre a été utilisé. Il s'agit de l'hématocrite. Il permet le calcul du volume du plasma et des cellules sanguines dans les différents compartiments. Chez l'Homme, en plus de l'hématocrite, il a été ajouté la masse corporelle du sujet ainsi que la valeur de la clairance intrinsèque.

## **Résultats**

### - Validation du modèle

#### **- Test de la perfusion continue**

Ce test consiste à simuler le profil de concentration sanguine de la ciclosporine lors d'une perfusion continue. Après un temps suffisamment long, nécessaire pour atteindre l'état

d'équilibre, la concentration sanguine se stabilise à un plateau. Le niveau du plateau (concentration sanguine à l'équilibre) doit être égal au rapport entre le débit massique de perfusion et la clairance totale.

Une perfusion intraveineuse continue à une vitesse de 60 µg/h a été simulée et l'évolution de la concentration en fonction du temps dans le sang total a été observée (figure 9).

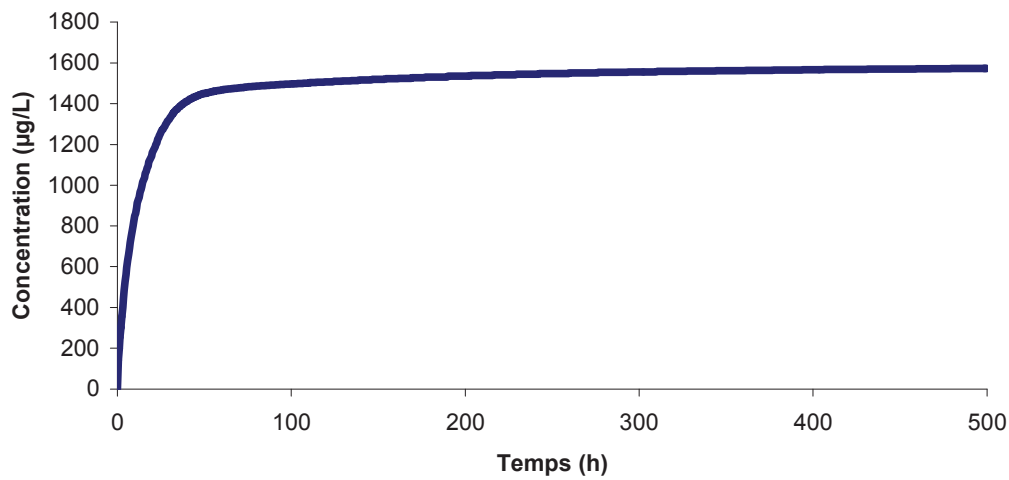


Figure 9. Evolution de la concentration de ciclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 60 µg/h

Le plateau de concentration (ce qui correspond à l'état d'équilibre) est de 1 572 µg/L.

- Calcul de la clairance sanguine, d'après la valeur de concentration au plateau :

$$CL_B = \frac{R}{C_{SS}} = 0.039 \text{ L/h}$$

- Calcul de la clairance sanguine en fonction de la clairance intrinsèque :

$$CL_B = \frac{Q(1) \cdot fu_B \cdot CL_{int}}{Q(1) + fu_B \cdot CL_{int}} = 0.034 \text{ L/h}$$

Les deux modes de calcul de la clairance donnent des résultats voisins, ce qui valide la description du métabolisme et de l'élimination du modèle.

La clairance intrinsèque a été calculée à partir des valeurs fixées de  $K_m$  et  $V_m$  (6) et sa valeur est de 0.734 L/h. Le débit sanguin hépatique a été fixé à 0.708 L/h. La fraction libre ( $f_{u_B}$ ) a été estimée à 0.049, ce qui est cohérent avec l'article de Kawai (5) où elle a été calculée à 0.048.

Remarques : -  $f_{u_B}$  dépend de l'hématocrite. Si l'hématocrite du rat varie entre 0.4 et 0.5, on obtient une  $f_{u_B}$  comprise entre 0.049 et 0.047 selon ce modèle. Ici, l'hématocrite a été fixé à 0.4 qui correspond à la valeur moyenne chez le rat (4).

- la valeur de la clairance sanguine varie en fonction de la dose (6) : elle passe de 0.041 pour une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes à 0.030 pour une dose de 30 mg/kg perfusée en 2 minutes.

### - Test de comparaison entre les concentrations prédites et expérimentales

Ce test vise à valider la description de la distribution tissulaire de la ciclosporine dans le modèle physiologique.

#### ➤ Concentration dans le compartiment sanguin

Les profils de concentration de ciclosporine simulés par notre modèle en cas de perfusion de 2 minutes à la dose de 6 mg/kg ont été comparés à ceux obtenus dans l'étude de Kawai (5) au niveau sanguin (figure 10), plasmatique et des cellules sanguines (figure 11).

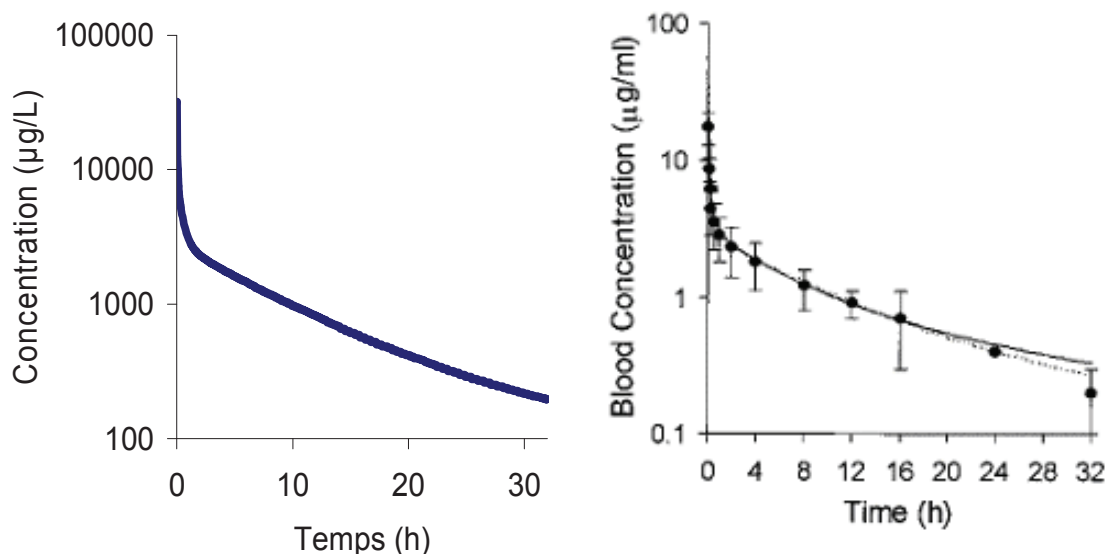


Figure 10. Comparaison des profils de concentration de ciclosporine en fonction du temps dans le sang total après une dose de 6 mg/kg selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite)

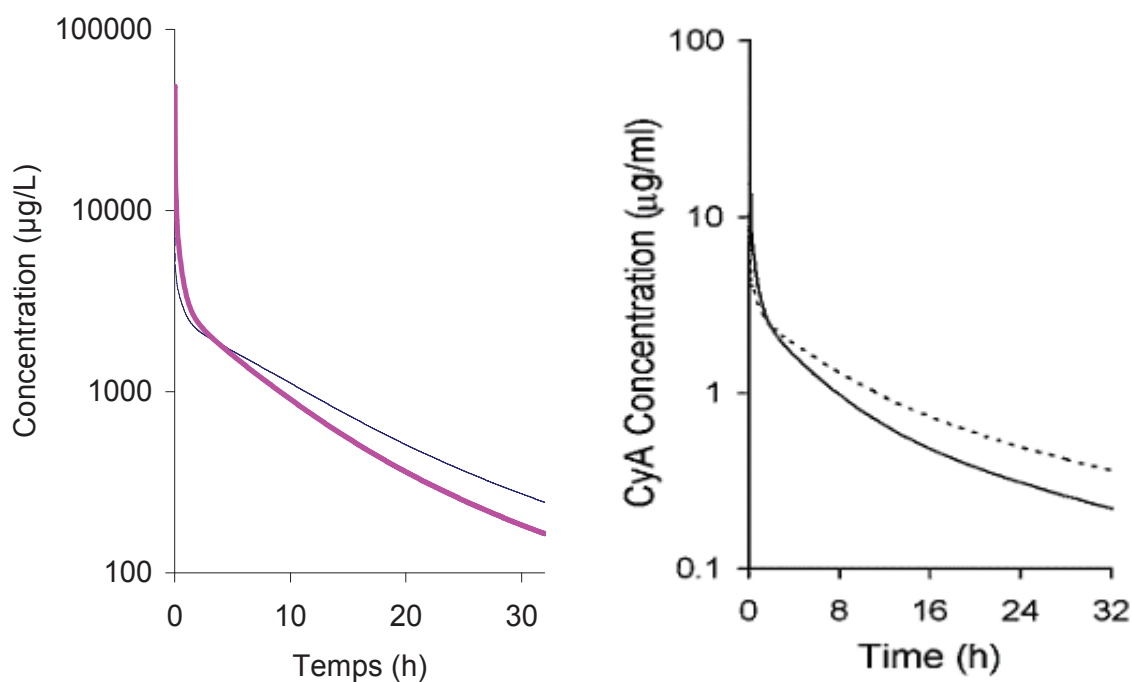


Figure 11. Comparaison des profils de concentration de ciclosporine dans le plasma (trait plein) et dans les cellules sanguines (trait en pointillés) après une dose de 6 mg/kg, selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite)

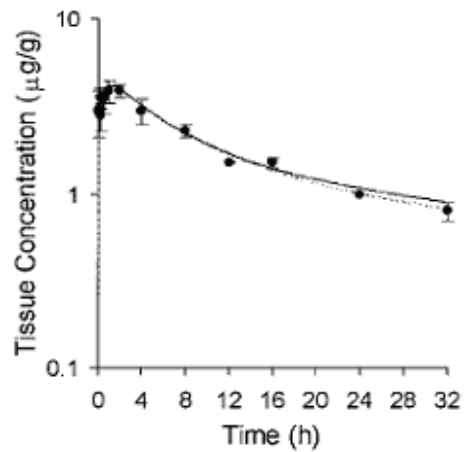
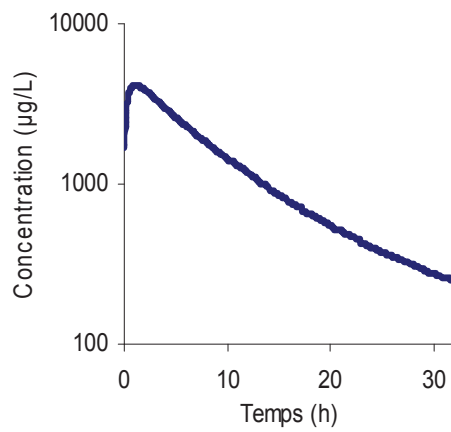
➤ Concentrations totales dans les organes

La concentration totale dans un organe correspond à la somme pondérée des concentrations dans le milieu vasculaire (plasma et cellules sanguines), dans le milieu interstitiel et dans le milieu tissulaire. La pondération se fait selon les fractions volumiques.

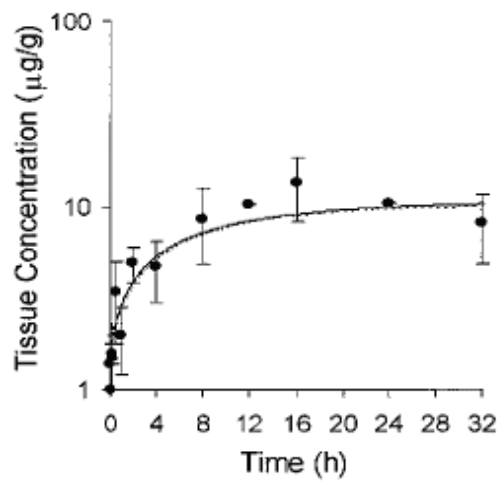
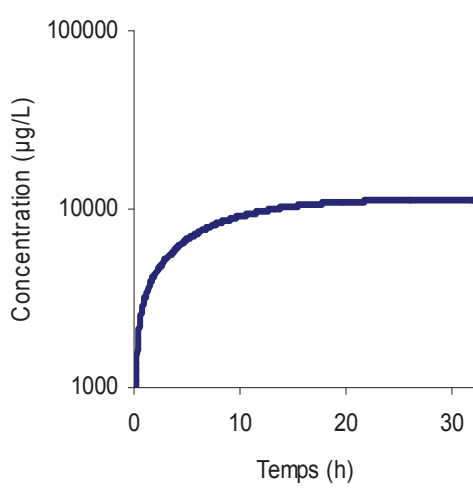
L'évolution de la concentration dans les organes a été simulée pour une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes (figures 12 à 15).

L'hématocrite est fixé à 0,4 (4) et la clairance intrinsèque calculée en fonction des valeurs fixées de  $K_m$  et  $V_m$  vaut 0.882 L/h (6).

### Muscle



### Tissu adipeux



### Poumons

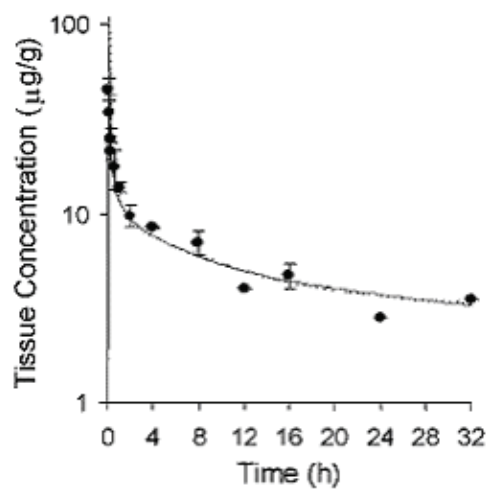
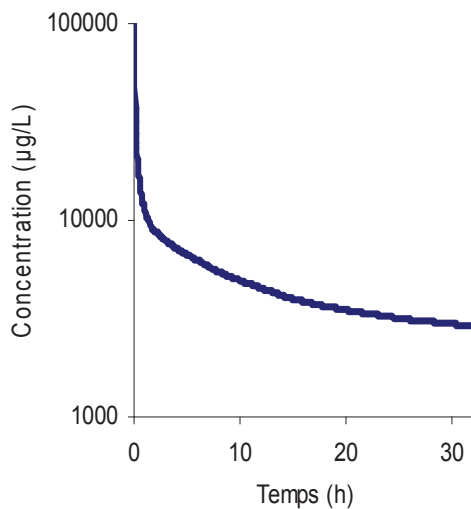
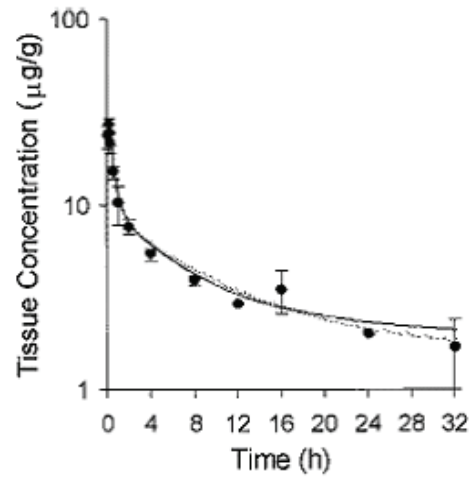
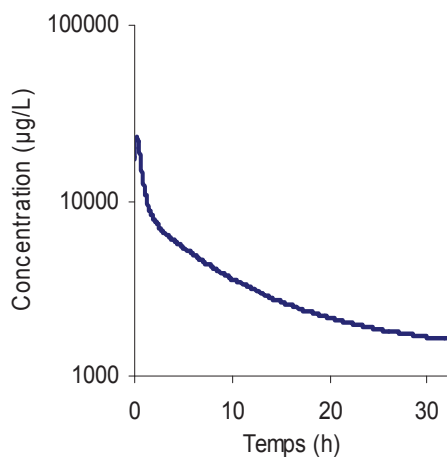
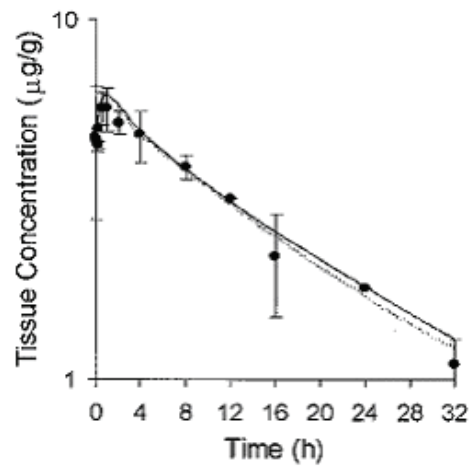
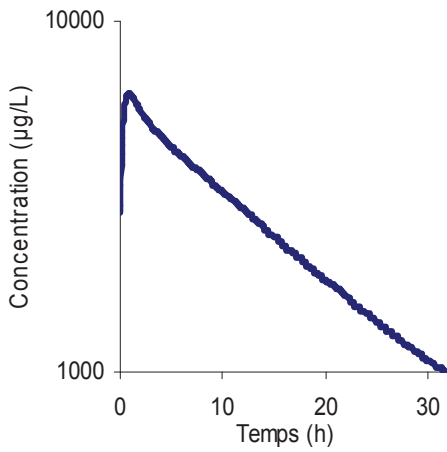


Figure 12. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le muscle, tissu adipeux et poumons selon ce modèle (gauche) et selon l'article de Kawai (droite)

**Coeur**



**Os**



**Peau**

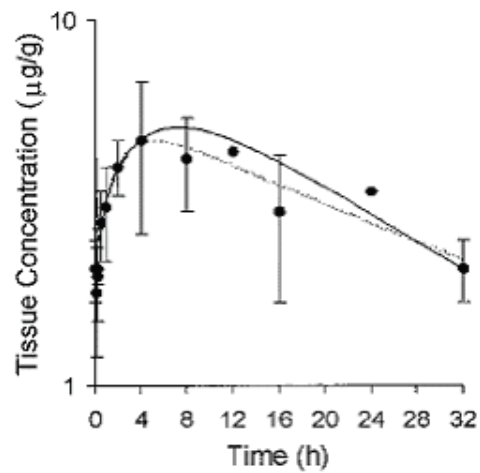
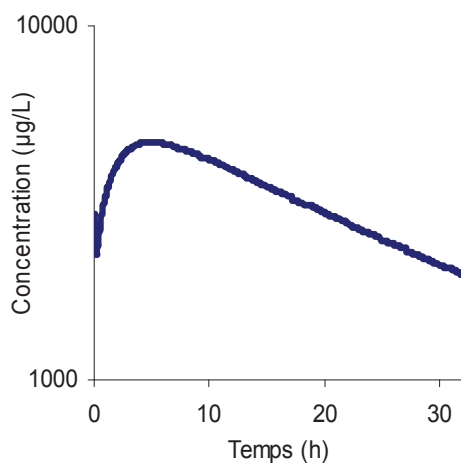
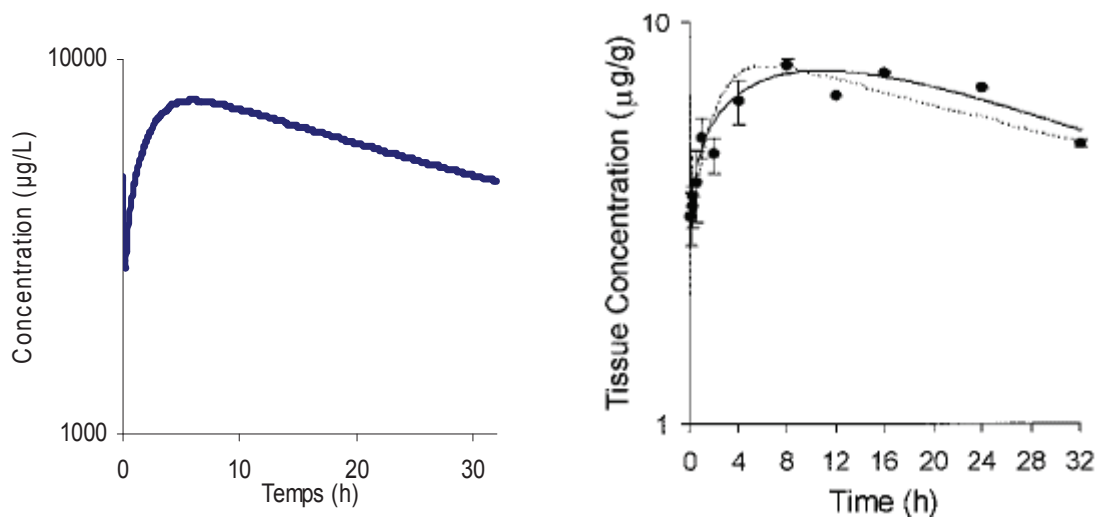
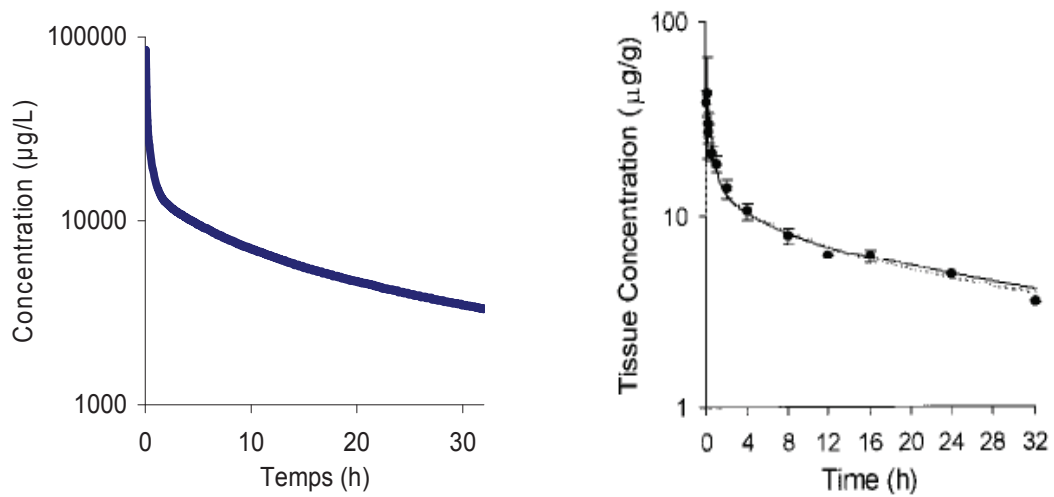


Figure 13. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le cœur, l'os et la peau selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite)

### Thymus



### Reins



### Rate

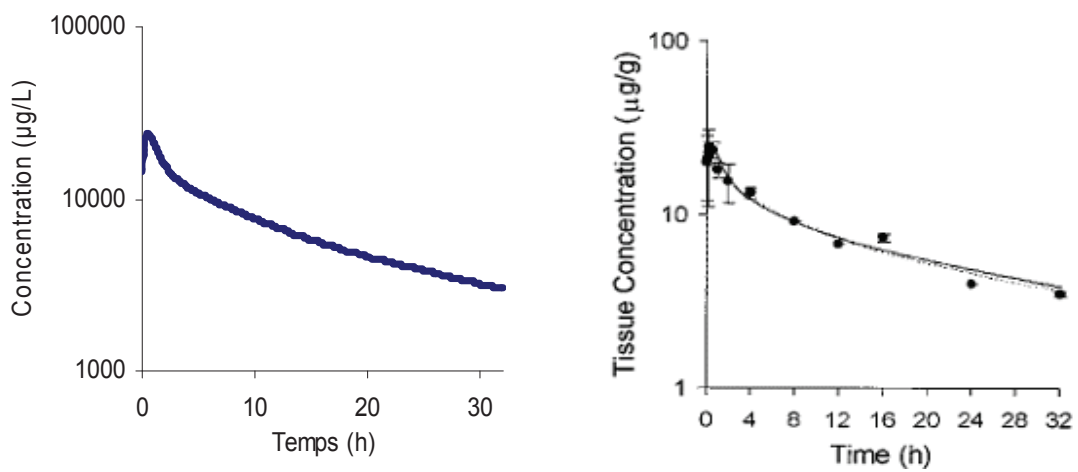
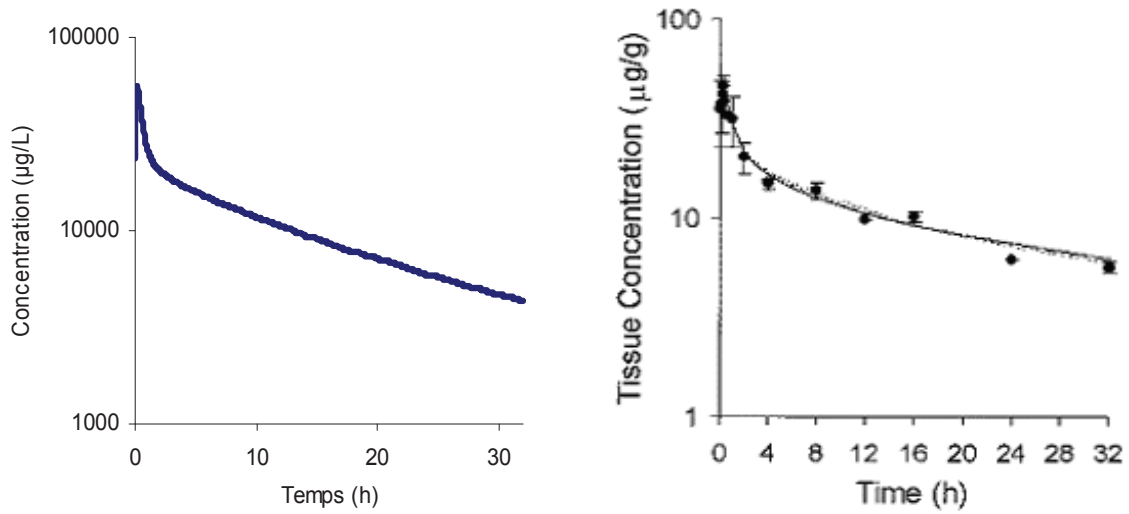


Figure 14. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le thymus, les reins et la rate selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite)



**Foie**



**Intestin**

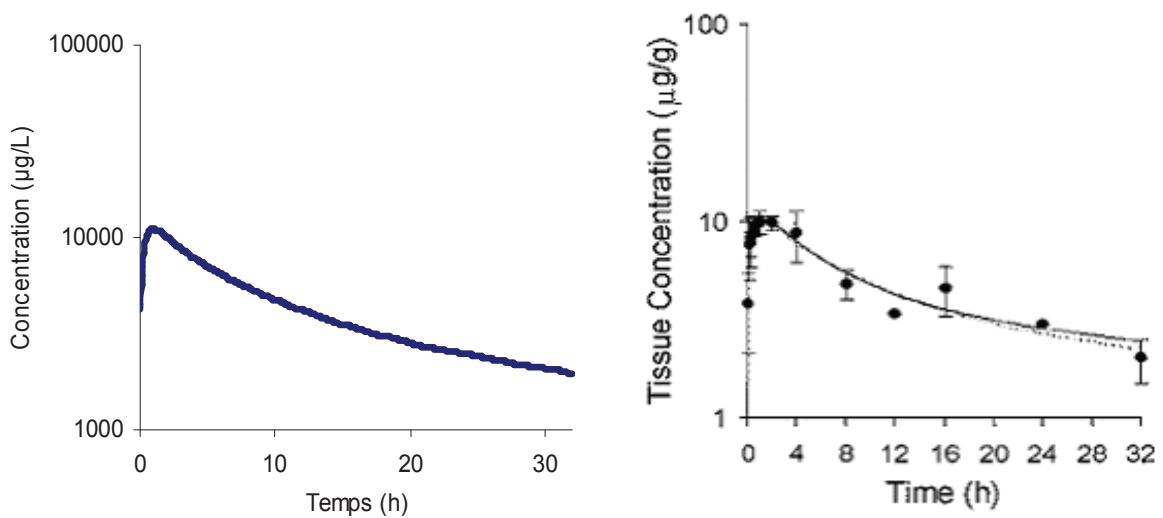


Figure 15. Profils de concentration de ciclosporine après une dose de 6 mg/kg perfusée en 2 minutes dans le foie et l'intestin selon ce modèle (à gauche) et selon l'article de Kawai (à droite)

Ces tests permettent de conclure que le modèle physiologique reproduit fidèlement les profils de concentration de ciclosporine dans les tissus. Par conséquent le modèle peut être utilisé pour tester l'influence de différents modes d'administration sur la pénétration tissulaire de la ciclosporine.

### - Comparaison des expositions tissulaires en fonction du type de perfusion

Sur une période de 5 jours et pour une même dose journalière de 5 mg par kg de masse corporelle, les profils de concentration totale sanguine dans les tissus cibles de la GVH (foie, peau et intestin) en cas de perfusion continue *versus* perfusion discontinue (perfusions de 2 heures toutes les 12 heures) ont été comparés. L'exposition est déterminée par l'aire sous la courbe (ou AUC) des profils de concentration (figures 16 à 18).

#### **- Foie**

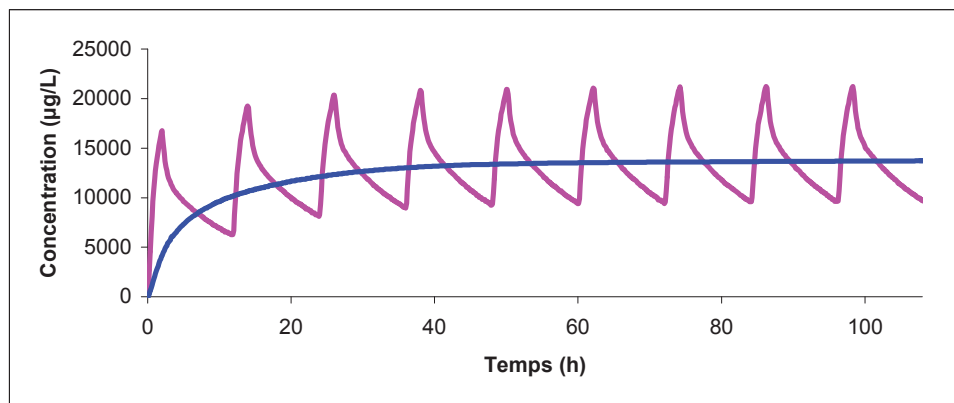


Figure 16. Profils de concentration de ciclosporine dans foie en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

#### **- Peau**

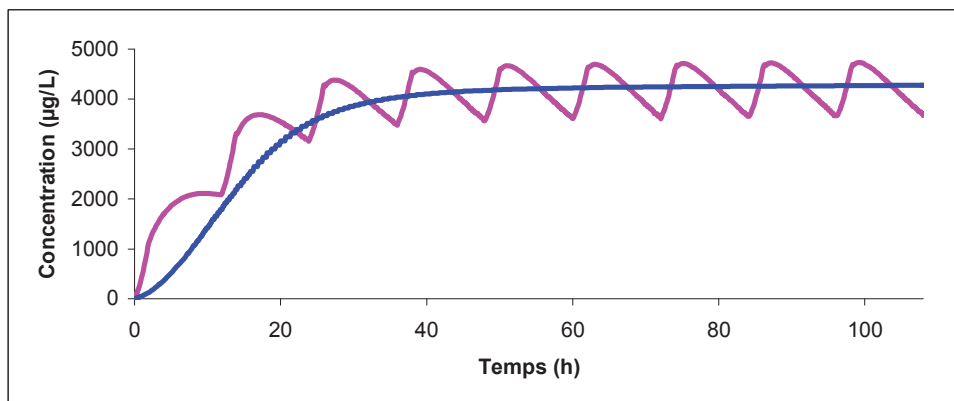


Figure 17. Profils de concentration de ciclosporine dans la peau en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

## - Intestin

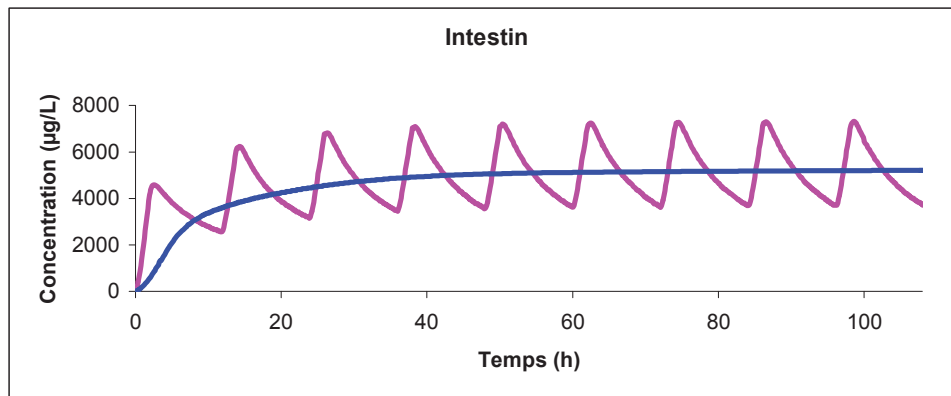


Figure 18. Profils de concentration de ciclosporine dans l'intestin en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

Les AUC ont été calculées par intégration numérique en cas de perfusion continue et de perfusion discontinue pour les 12 et 24 premières heures et pour les 5 premiers jours. Elles ont ensuite été comparées selon le type de perfusion (tableau XI).

Tableau XI. Comparaison des AUC en perfusion discontinue *versus* continue pour le foie, la peau et l'intestin

	Foie	Peau	Intestin
AUC 12h perfusion discontinue <i>versus</i> continue	23% plus importante	120% plus importante	33% plus importante
AUC 24h perfusion discontinue <i>versus</i> continue	12% plus importante	29% plus importante	17% plus importante
AUC 5 jours perfusion discontinue <i>versus</i> continue	AUC comparables		

De manière générale, pour chacun de ces 3 organes cibles, on observe donc une exposition plus importante en cas de perfusion discontinue que continue au début du traitement. Au bout de cinq jours, le niveau d'exposition devient comparable entre les deux types de perfusion.

### 1.4.5. Transposition du modèle PBPK à l'échelle humaine

#### Modification des paramètres physiologiques

Les valeurs du volume et du débit sanguin de chacun des organes du rat sont remplacées par celles de l'Homme standard de 70 Kg (4) (tableau XII). Les fractions des espaces vasculaires et interstitiels par rapport au volume de l'organe sont supposées identiques pour le rat et pour l'Homme (283).

Tableau XII. Valeurs des paramètres physiologiques chez l'Homme

Organe ou compartiment	Volume total (L)	Débit sanguin (L/h)	Fraction de volume vasculaire	Fraction d'espace interstitiel
Poumon	1.17	262	0.262	0.188
Cœur	0.27	9	0.262	0.100
Rein	0.31	66	0.105	0.200
Os	8.7	15	0.041	0.100
Muscle	30	45	0.026	0.120
Rate	0.19	4.6	0.282	0.150
Foie	1.69	88.6	0.115	0.163
Intestin	1.65	66	0.024	0.094
Peau	7.8	18	0.019	0.302
Tissu adipeux	10	15.6	0.010	0.135
Thymus	0.027	4.8	0.030	0.150
Sang veineux	3.6	-	-	-
Sang artériel	1.8	-	-	-
Artère hépatique	-	18	-	-

## **Modification des paramètres liés à la ciclosporine**

### - Paramètres de distribution sanguine

La fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ), la constante de dissociation des cellules sanguines ( $K_{D,BC}$ ) et la capacité totale de liaison spécifique aux cellules sanguines ( $nP_T$ ) sont des paramètres supposés identiques chez le rat et chez l'Homme (5).

Le produit perméabilité par surface des cellules sanguines ( $PS_{BC}$ ) est supposé être identique pour les deux espèces du fait de l'absence de différence significative entre la composition biochimique des membranes cellulaires et du diamètre des cellules sanguines (283).

### - Paramètres de distribution tissulaire

Le ratio de concentration en lipoprotéines entre le milieu interstitiel et le plasma est tiré de la littérature et supposé identique pour tous les mammifères.

Les fractions libres de ciclosporine au niveau tissulaire ( $f_{uT}$ ) et interstitiel ( $f_{uI}$ ) sont supposées identiques pour les deux espèces.

Pour les valeurs des « constantes » d'association ( $K_{ass}$ ) et de dissociation ( $K_{dis}$ ) exprimées en L/h chez l'Homme, la valeur mesurée chez le rat a été multipliée par le rapport des masses corporelles entre l'Homme et le rat, comme l'a proposé Kawai (5).

Le nombre de sites de liaison tissulaire ( $B_T$ ) et la constante de dissociation au niveau des cellules tissulaires ( $K_{D,TC}$ ) sont supposés identiques chez les mammifères, par unité de masse d'organe (5).

Les valeurs de produit perméabilité par surface tissulaire sont transposées chez l'Homme à partir des mesures chez le rat en multipliant par le rapport des masses corporelles entre l'Homme et le rat.

Les valeurs des paramètres de distribution tissulaire sont regroupées dans le tableau XIII.

Tableau XIII. Valeurs des paramètres liés à la ciclosporine extrapolées à l'Homme

<b>Modèle 1</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	K <sub>ass</sub> (L/h)	K <sub>dis</sub> (L/h)
Muscle	672	0.041	0.154	0.00728
Tissu adipeux	22.12	0.001	336	4.032
<b>Modèle 2</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	B <sub>T</sub> (µg-eq/L)	K <sub>D,TC</sub> (µg/L)
Poumon	30*Q <sub>3</sub>	0.015	4800	0.66
Cœur	39.2	0.017	1900	0.2
Os	109.2	0.1	6000	60
Peau	84	0.143	8500	39
Thymus	1.96	0.1002	10000	15
Rein	30*Q <sub>8</sub>	0.013	6300	5.8
Rate	20.72	0.01	7800	10
Foie	30*Q <sub>10</sub>	0.009	14000	16
Intestin	109.2	0.021	2400	4.8

#### - Paramètres d'élimination hépatique

Tout d'abord, la prédiction de la valeur de la clairance intrinsèque chez l'Homme a été réalisée en utilisant la clairance intrinsèque mesurée chez le rat corrigée par la différence entre le rat et l'Homme dans les activités métaboliques *in vitro* (285). Cependant, de cette manière, la clairance intrinsèque qui en résulte se trouve être trop basse pour reproduire la cinétique sanguine observée chez l'Homme (5). Cette anomalie peut être expliquée par plusieurs raisons comme la différence entre les études *in vitro* et *in vivo* ainsi que la variation potentielle de métabolisme au sein même de la population humaine. De plus, on suppose dans ce modèle que le métabolisme n'a lieu qu'au niveau du foie, alors que l'activité métabolique rénale est relativement importante chez l'Homme (285). Une alternative raisonnable a été adoptée pour prédire la clairance intrinsèque chez l'Homme : la clairance intrinsèque hépatique est d'abord calculée à partir de la clairance hépatique et la fraction libre sanguine de ciclosporine chez des sujets sains. Elle a ensuite été corrigée par la différence obtenue entre la

clairance intrinsèque estimée chez le rat et celle obtenue par l'ajustement du modèle PBPK (25% plus petit par l'ajustement PBPK) à l'intérieur d'une gamme de concentration similaire pour l'Homme. Finalement, ceci résulte à une clairance intrinsèque d'environ 6 L/h/kg (5).

### 1.4.6. Evaluation du modèle

#### Test de la perfusion continue

La dose est de 5 mg/kg par jour en perfusion continue chez un adulte standard de 70 kg soit une vitesse de perfusion à 14 583 µg/h.

La concentration atteint à l'état d'équilibre un plateau de 865 µg/L (figure 19).

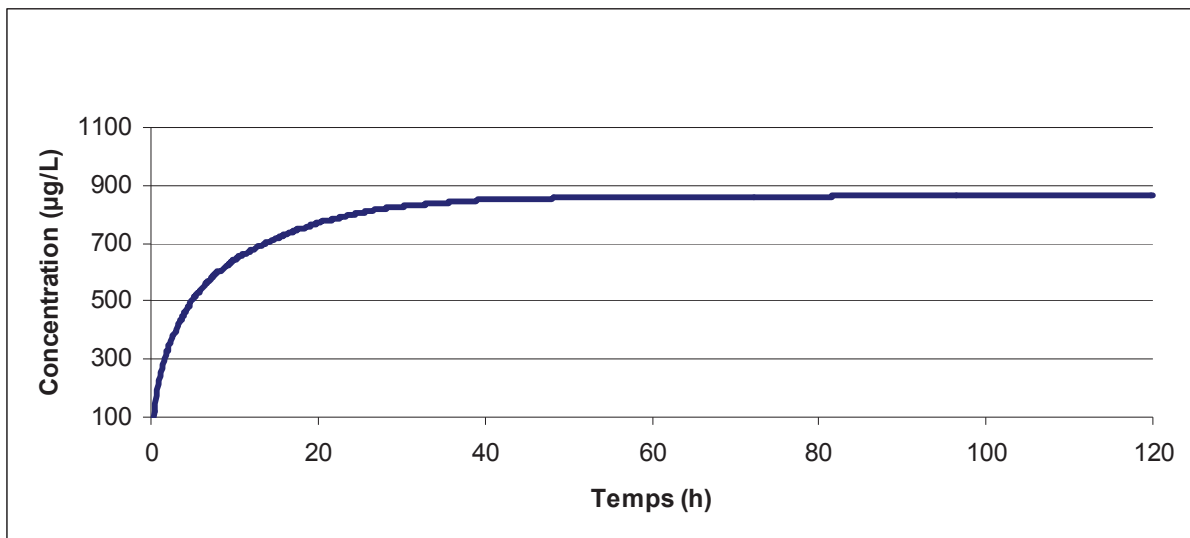


Figure 19. Evolution de la concentration de ciclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 14 583 µg/h

La clairance sanguine est ensuite calculée de deux manières différentes pour vérifier la cohérence des deux résultats obtenus.

- Calcul de la clairance sanguine, d'après la valeur de concentration à l'équilibre :

$$CL_B = \frac{R}{C_{SS}} = 16.8 \text{ L/h}$$

- Calcul de la clairance sanguine en fonction de la clairance intrinsèque :

$$CL_B = \frac{Q(1).fu_B.CL_{int}}{Q(1) + fu_B.CL_{int}} = 16.7 \text{ L/h}$$

Les deux modes de calcul de la clairance donnent les mêmes résultats, ce qui valide la description du métabolisme et de l'élimination du modèle.

La clairance intrinsèque a été fixée à 6 L/h/kg, soit 420 L/h. Le débit sanguin hépatique a été fixé à 88.6 L/h. La fraction libre ( $fu_B$ ) a été estimée à 0.049.

### Concentrations obtenues dans le sang total

La dose est de 5 mg/kg par jour en perfusion discontinue à raison d'une perfusion de 2h toutes les 12 heures chez un adulte standard de 70 kg. L'objectif est de vérifier si les concentrations résiduelles obtenues par simulation *via* le modèle physiologique chez l'Homme sont plausibles (figure 20).

Les valeurs des concentrations résiduelles sont aux alentours de 200 µg/L et celles observées en cliniques chez les enfants sont aux alentours de 100 à 200 µg/L. Par conséquent, ces valeurs sont tout à fait cohérentes entre elles.

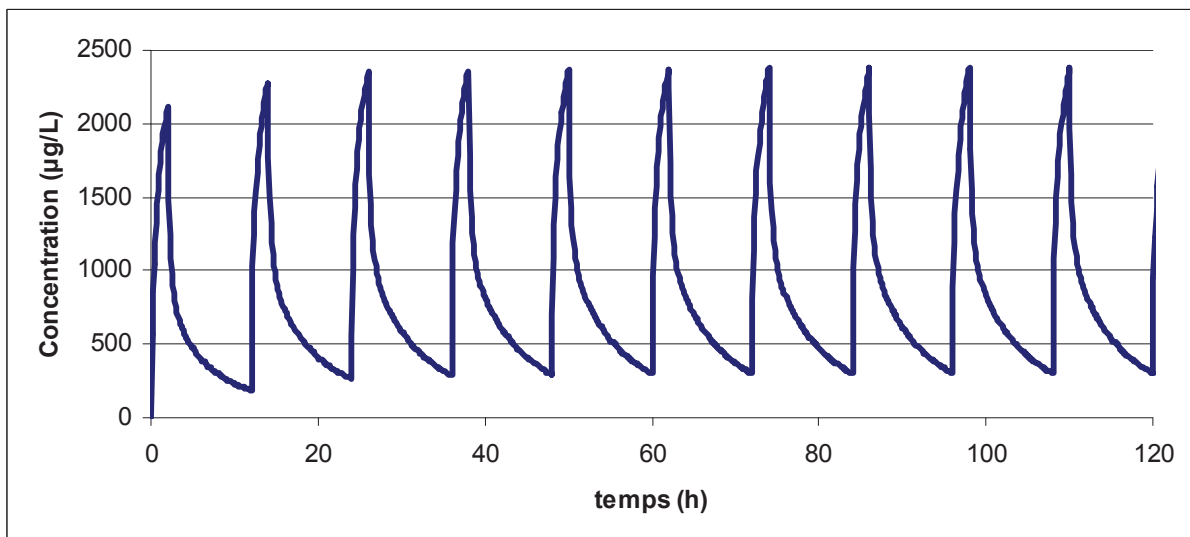


Figure 20. Evolution des concentrations de ciclosporine en fonction du temps dans le sang total en cas de perfusion discontinue à raison d'une perfusion de 2 heures toutes les 12 heures et une dose quotidienne de 5 mg/kg



### 1.4.7. Comparaison des expositions tissulaires en fonction du type de perfusion

#### Exposition tissulaire à la ciclosporine dans le foie, la peau et l'intestin

Comme précédemment, les profils de concentration dans les tissus cibles de la GVH (foie, peau et intestin) en fonction du temps en cas de perfusion continue *versus* perfusion discontinue (perfusions de 2 heures toutes les 12 heures) ont été simulés et comparés. Pour les deux types de perfusion, une même dose journalière de 5 mg par kg de masse corporelle a été testée et ce sur une période de 5 jours. L'exposition tissulaire à la ciclosporine est déterminée par l'AUC (obtenu par intégration numérique) des profils de concentration (figures 21 à 23).

#### - Foie

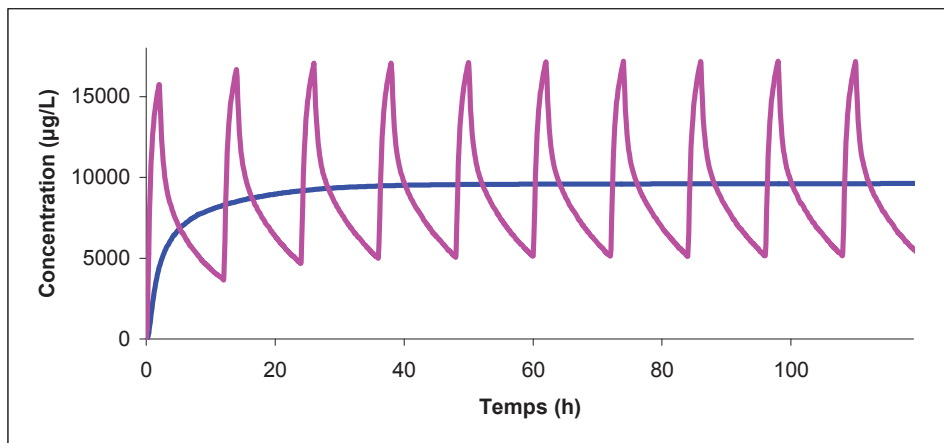


Figure 21. Profils de concentration de ciclosporine dans le foie en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

#### - Peau

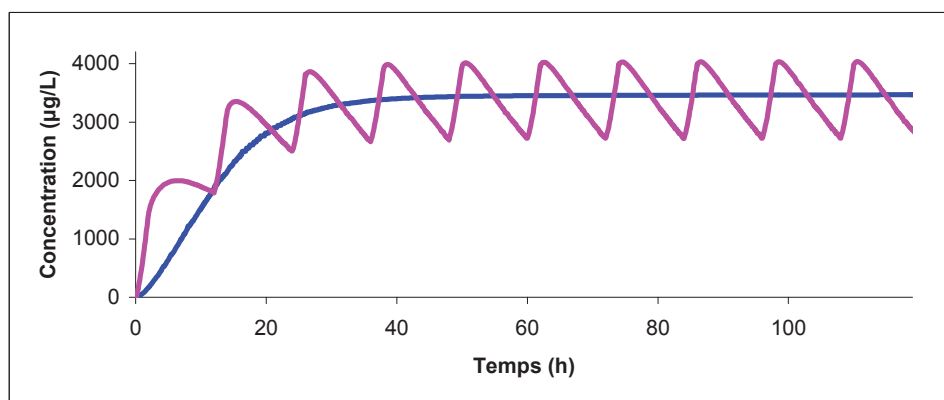


Figure 22. Profils de concentration de ciclosporine dans la peau en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

## - Intestin

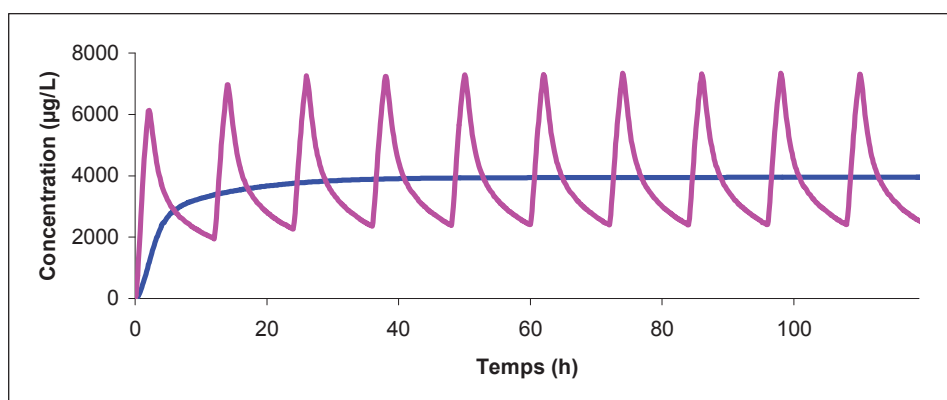


Figure 23. Profils de concentration de ciclosporine dans l'intestin en cas de perfusion continue (trait bleu) et de perfusion discontinue (trait rose) pour une dose quotidienne de 5 mg/kg

## **- Comparaison des expositions tissulaires en fonction du type de perfusion**

Les AUC ont été calculées en cas de perfusion continue et de perfusion discontinue pour les 12 et 24 premières heures et pour les 5 premiers jours. Elles ont ensuite été comparées selon le type de perfusion (tableau XIV).

Tableau XIV. Comparaison des AUC en perfusion discontinue *versus* continue pour le foie, la peau et l'intestin

	Foie	Peau	Intestin
AUC 12h perfusion discontinue <i>versus</i> continue	11% plus importante	100% plus importante	24% plus importante
AUC 24h perfusion discontinue <i>versus</i> continue	AUC comparables	33% plus importante	10% plus importante
AUC 5 jours perfusion discontinue <i>versus</i> continue	AUC comparables		

De manière générale et comme il avait été déjà obtenu pour le rat, pour chacun de ces trois organes cibles, on observe donc une exposition plus importante en cas de perfusion discontinue que continue au début du traitement. C'est au niveau de la peau que la différence

est la plus importante avec une AUC à 12 heures doublée en cas de perfusion discontinue *versus* continue. Au bout de cinq jours, le niveau d'exposition devient comparable entre les deux types de perfusion.

### 1.4.8. Adaptation du modèle à l'enfant

#### Modification des paramètres physiologiques

Les valeurs des volumes totaux sanguins et tissulaires chez l'enfant sont obtenues en corrigeant celles de l'adulte standard de 70 kg par le rapport des masses corporelles entre celle de l'enfant et celle de l'adulte standard (270) :

$$V_{\text{enfant}} = V_{\text{adulte}} \times \frac{BW_{\text{enfant}}}{BW_{\text{adulte}}}$$

V : volume physiologique de l'organe

BW : masse corporelle

Concernant le volume total de l'os, celui-ci correspond à la totalité de l'os, c'est-à-dire le squelette comprenant l'os dur, la moelle osseuse rouge et jaune, le cartilage et le tissu péri articulaire. L'os dur comprend lui-même une partie corticale et une partie trabéculaire. La moelle (association de la moelle rouge et moelle jaune) représente 29 % du volume de l'os total (286). Les valeurs de fractions de volumes interstitiels et vasculaires sont tirées de l'article de Bjorkman (287). Celles-ci diffèrent légèrement de celles de l'adulte. Par ailleurs, la valeur de la fraction de volume interstitiel pour le muscle et le tissu adipeux est fonction de l'âge de l'enfant. Il n'y a pas de valeur pour l'os et le thymus : pour l'os, la valeur est tirée de l'article de Edginton (288) et pour le thymus la valeur chez l'adulte a été gardée. Les valeurs sont regroupées dans le tableau XV.

Tableau XV. Valeurs des fractions de volume vasculaire et d'espace interstitiel chez l'enfant

Organe	Fraction de volume vasculaire	Fraction d'espace interstitiel
Poumon	0.53	0.20
Cœur	0.16	0.12
Rein	0.23	0.200
Os	0.034	0.100
Muscle	0.026	Nouveau né : 0.33 6 mois : 0.27 1 an : 0.26 2 ans : 0.25 5 ans : 0.21 10 ans : 0.16 15 ans : 0.16 20 ans : 0.16
Rate	0.33	0.150
Foie	0.14	0.163
Intestin	0.04	0.094
Peau	0.025	0.302
Tissu adipeux	0.018	Nouveau né : 0.54 6 mois : 0.21 1 an : 0.28 2 ans : 0.30 5 ans : 0.28 10 ans : 0.21 15 ans : 0.16 20 ans : 0.10
Thymus	0.030	0.150

Les valeurs des débits sanguins physiologiques des organes chez l'enfant sont obtenues à partir des valeurs physiologiques chez l'adulte standard de 70 kg corrigées par le rapport des masses corporelles entre l'enfant et l'adulte, selon l'équation allométrique suivante (270) :

$$Q_{\text{enfant}} = Q_{\text{adulte}} \times \left( \frac{BW_{\text{enfant}}}{BW_{\text{adulte}}} \right)^{\frac{3}{4}}$$

Q : débit sanguin physiologique de l'organe

BW : masse corporelle

### **Modification des paramètres liés à la ciclosporine**

#### - Paramètres de distribution sanguine

La fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ) est estimée à 0.06 chez l'adulte standard. Cette fraction libre plasmatique ainsi que la répartition isotherme de la ciclosporine ont été montrées comme indépendantes de la concentration en ciclosporine dans la gamme de concentrations allant de 0.02 à 20 000  $\mu\text{g/L}$  (289). Une corrélation importante ( $R^2 = 0.71$ ) a été trouvée entre la concentration en cholestérol et la fraction liée. Plus la concentration en cholestérol est importante, plus la fraction libre de ciclosporine est faible (290). Cette corrélation est expliquée par la forte liaison de la ciclosporine aux lipoprotéines associées au cholestérol.

La fraction libre peut être modifiée entre l'adulte et l'enfant, par une modification de la concentration en lipoprotéines selon l'ontogénie des lipoprotéines. Selon l'article de Legg en 1988 (290), la fraction libre plasmatique de ciclosporine ( $f_u$ ) est fonction de la concentration en cholestérol [CH] et en triglycérides [TG] selon l'équation suivante :

$$f_u = \frac{1}{K_1[TG] + K_2[CH] + 1}$$

avec  $K_1 = 1.346$  et  $K_2 = 2.815$ .

Les valeurs de concentrations en cholestérol total et en triglycérides varient selon l'âge de l'enfant. Selon ces valeurs de concentrations (tableau XVI) (291-293), la fraction libre est alors peu modifiée par rapport à celle de l'adulte qui est de 0.06 (figure 24). Dans le modèle,

il a été supposé que la fraction libre plasmatique des enfants moins de 15 ans était de 0.07 et celle de la personne de plus de 15 ans était de 0.06.

Tableau XVI. Concentrations moyennes de triglycérides et de cholestérol total en fonction de l'âge

Age (années)	Concentration moyenne de triglycérides (mmol/L)	Concentration moyenne de cholestérol total (mmol/L)
5	0.86	4.4
10	0.86	4.27
15	1.03	3.62
20	1.03	4.91

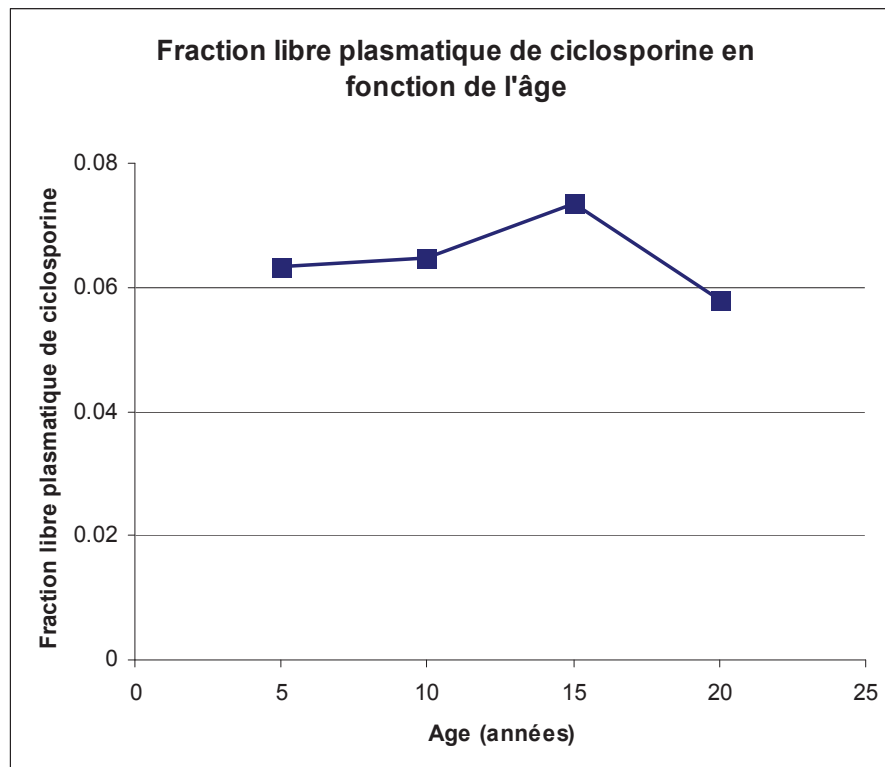


Figure 24. Evolution de la fraction libre de ciclosporine en fonction de l'âge.

La constante de dissociation des cellules sanguines ( $K_{D,BC}$ ) et la capacité totale de liaison spécifique aux cellules sanguines ( $nP_T$ ) sont des paramètres supposés identiques entre le rat et l'Homme. Ils le sont également entre l'Homme adulte standard et l'enfant.

Le produit perméabilité par surface des cellules sanguines ( $PS_{BC}$ ) est supposé être identique pour l'adulte et l'enfant du fait de l'absence de différence significative entre la composition biochimique des membranes cellulaires et du diamètre des cellules sanguines.

#### - Paramètres de distribution tissulaire

Le ratio de concentration en lipoprotéines entre le milieu interstitiel et le plasma est tiré de la littérature est supposé identique entre l'adulte et l'enfant [ajouter ref]. Les fractions libres interstitielles ( $f_{uI}$ ) sont alors les mêmes entre l'adulte et l'enfant.

Les fractions libres de ciclosporine au niveau tissulaire ( $f_{uTC}$ ) sont identiques entre le rat et l'Homme. Elles sont considérées également identiques entre l'enfant et l'adulte.

Pour les valeurs des « constantes » d'association ( $K_{ass}$ ) et de dissociation ( $K_{dis}$ ) exprimées en L/h chez l'Homme : la valeur chez l'enfant est celle de l'adulte multipliée par le rapport des masses corporelles entre l'enfant et l'adulte, comme il avait été fait pour le passage du rat à l'Homme (5).

Le nombre de sites de liaison tissulaire ( $B_T$ ) et la constante de dissociation au niveau des cellules tissulaires ( $K_{D,TC}$ ) sont supposés identiques chez les mammifères, par unité de masse d'organe (5).

Les valeurs de produit perméabilité par surface tissulaire ( $PS_{TC}$ ) sont transposées chez l'enfant à partir de celles des adultes en multipliant par le rapport des masses corporelles entre l'enfant et l'adulte.

Les valeurs des paramètres de distribution tissulaire sont regroupées dans le tableau XVII.

Tableau XVII. Valeurs des paramètres liés à la ciclosporine extrapolées chez l'enfant

<b>Modèle 1</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	K <sub>ass</sub> (L/h)	K <sub>dis</sub> (L/h)
Muscle	672*BW/70	0.041	0.154*BW/70	0.00728*BW/70
Tissu adipeux	22.12*BW/70	0.001	336*BW/70	4.032*BW/70
<b>Modèle 2</b>				
Organe	PS <sub>TC</sub> (L/h)	f <sub>uTC</sub>	B <sub>T</sub> (µg-eq/L)	K <sub>D,TC</sub> (µg/L)
Poumon	30*Q <sub>3</sub> *BW/70	0.015	4800	0.66
Cœur	39.2*BW/70	0.017	1900	0.2
Os	109.2*BW/70	0.1	6000	60
Peau	84*BW/70	0.143	8500	39
Thymus	1.96*BW/70	0.1002	10000	15
Rein	30*Q <sub>8</sub> *BW/70	0.013	6300	5.8
Rate	20.72*BW/70	0.01	7800	10
Foie	30*Q <sub>10</sub> *BW/70	0.009	14000	16
Intestin	109.2*BW/70	0.021	2400	4.8

### - Elimination hépatique

La clairance hépatique intrinsèque chez l'adulte standard de 70 kg a été fixée à 6L/h par kg de masse corporelle soit à 420 L/h. Il faut tenir compte de l'ontogénie du cytochrome P450 : son expression et son activité par mg de protéines microsomales dans le foie. Johnson 2006 (294) indique que la quantité de CYP 3A4/5 hépatique chez l'enfant est exprimée en fonction de l'âge selon une fraction de la quantité chez l'adulte. Cette fraction (F) est telle que :

$$F = \frac{\text{Age}^{0.83}}{0.31 + \text{Age}^{0.83}}$$

La clairance hépatique intrinsèque chez l'enfant correspond à la clairance intrinsèque chez l'adulte multipliée par la fraction de CYP 3A4/5 (figure 25).



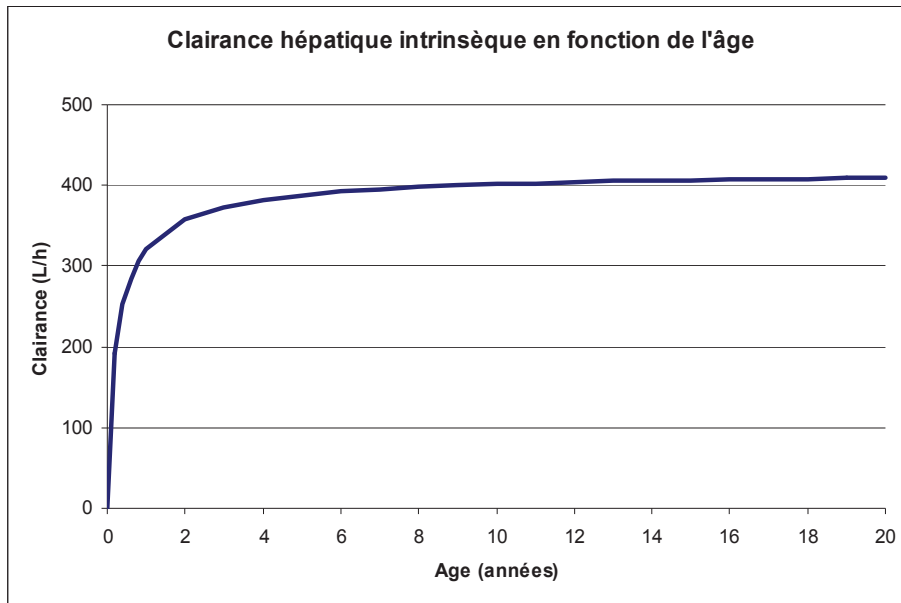


Figure 25. Evolution de la clairance hépatique intrinsèque en fonction de l'âge

### 1.4.9. Evaluation du modèle PBPK

#### Test de la perfusion continue

La dose est de 5 mg/kg par jour en perfusion continue chez un enfant de 30 kg soit une vitesse de perfusion à 6 250  $\mu\text{g/h}$ . La clairance intrinsèque a été calculée en fonction de l'âge (294) : elle est de 402 L/h.

La simulation dans le sang total montre que la concentration atteint un plateau et la concentration à l'équilibre est de 755  $\mu\text{g/L}$  (figure 26).

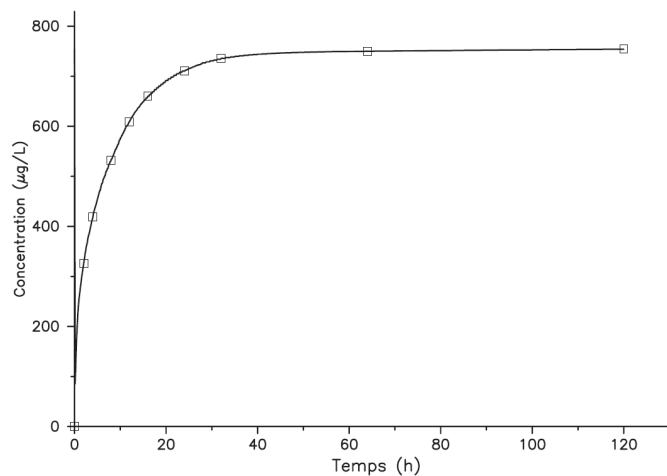


Figure 26. Evolution de la concentration de cyclosporine dans le sang total en fonction du temps en cas de perfusion continue à la vitesse de 6 250  $\mu\text{g/h}$

## Confrontation des concentrations prédites et celles observées en clinique : ajustement du modèle PBPK

### Données cliniques

Les concentrations mesurées de ciclosporine proviennent de 61 enfants dont 30 ont eu une perfusion continue de ciclosporine et 31 une perfusion discontinue (2h toutes les 12h). Les âges vont de 5 mois à 17 ans (8 patients ont moins de 1 an, 1 patient a moins de 6 mois) et les poids de 4 à 72 kg. Les caractéristiques de ces patients sont détaillées dans le tableau IV page 92. Pour chaque patient, les historiques de doses reçues et de concentrations mesurées ont été saisis du début du traitement jusqu'à la deuxième mesure de concentration.

### Inputs du modèle

#### *- Paramètres fixés*

Les paramètres connus pour chaque patient et fixés sont la masse corporelle et l'âge du patient, ainsi que son hématoците.

#### *- Paramètres à estimer*

Le logiciel ADAPT II® a été utilisé. La clairance intrinsèque et la fraction libre plasmatique ont été estimées avec l'estimateur bayésien (Maximum A Posteriori). La distribution *a priori* des paramètres est supposée log-normale. Cette forme de distribution évite les valeurs négatives et se rapproche des distributions empiriques généralement observées en pharmacocinétique.

La valeur typique de clairance intrinsèque fixée est ajustée sur l'âge (294) et multipliée par 3.5 pour permettre un meilleur ajustement avec les données réelles de concentrations :

$$CL_{int_{mean}} = \left( \frac{420 \times Age^{0,83}}{0,31 + Age^{0,83}} \right) \times 3,5$$

Ce facteur 3.5 a été déterminé en recherchant la valeur donnant la meilleure distribution des résidus. Ce facteur de correction signifie que la clairance intrinsèque de la ciclosporine est plus élevée dans cette population (greffés de moelle) que dans les autres populations (transplantés rénaux et hépatiques notamment), ce qui peut s'expliquer par les différences importantes en termes de physiopathologie et de prise en charge des patients.

La valeur typique de la fraction libre plasmatique est de 0.06.

Pour les deux paramètres à estimer, leur variance est fixée à une valeur correspondant à un CV interindividuel de 30%.

*- Erreur associée à la mesure*

Pour l'erreur associée à la mesure, le modèle de variance est hétéroscédastique, avec un CV constant de 15%.

Concentrations prédites *versus* observées

Un graphique des concentrations prédites *versus* concentrations observées dans le sang total est représenté figure 27. Plus de 95% des concentrations prédites se trouvent dans la gamme située entre la moitié et le double des concentrations résiduelles observées. Le biais et la précision (erreur-type, RMSE) ont été de  $-25.1 \mu\text{g/L}$  et  $76.2 \mu\text{g/L}$ , respectivement.

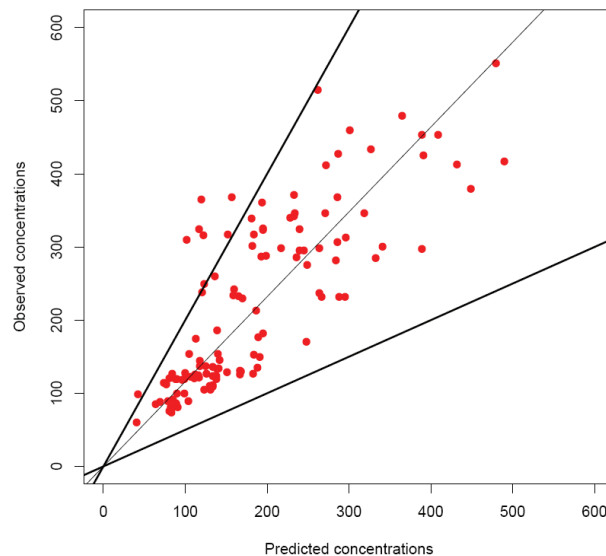


Figure 27. Correspondance entre les concentrations observées et prédites

La distribution des résidus pondérés (figure 28) n'est pas significativement différente de celle d'une distribution normale de moyenne 0 et de variance 1 (test de Shapiro  $W=0.983$ ,  $p=0.12$ ). La totalité des résidus pondérés se trouvent dans la gamme  $(-3 ; +3)$ .

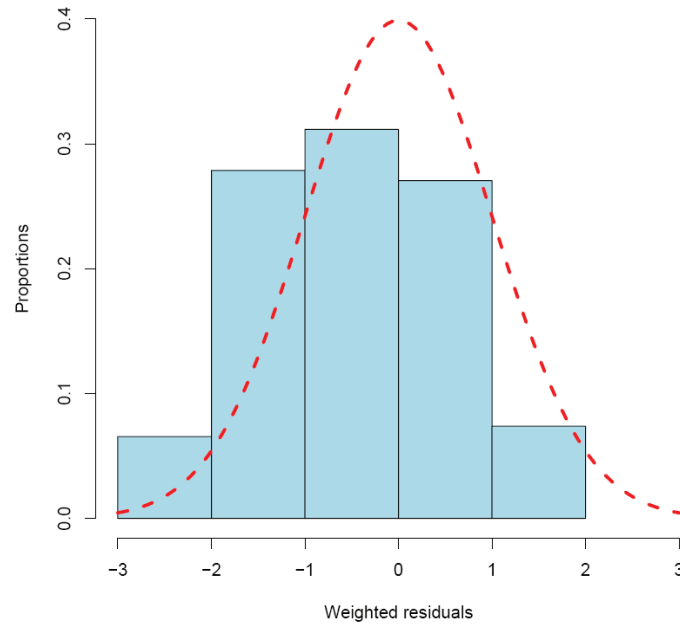


Figure 28. Distribution des résidus pondérés

## Utilisation du modèle

### - Evolution de la concentration en fonction du temps

Les profils cinétiques de la ciclosporine ont été obtenus dans le sang total veineux et dans les tissus cibles (la peau, l'intestin, le foie, l'os, le thymus et les reins)

### - Paramètres secondaires

A partir des estimations de la clairance intrinsèque et de la fraction libre plasmatique, la clairance systémique et la fraction libre sanguine ont été calculées.

### - Calcul des AUC

Les AUC des organes cibles de la GVH (peau, foie, intestin) ainsi que celle du sang, de l'os et du thymus pour les 12 et 24 premières heures de traitement et à l'état stationnaire ont été calculées par intégration numérique dans ADAPT II®.

## 1.5. Applications du modèle PBPK

### 1.5.1. Influence des modalités de perfusion intraveineuse sur l'exposition à la ciclosporine

Le modèle PBPK chez l'enfant a été utilisé pour tester l'influence des modalités de perfusion intra-veineuse de ciclosporine sur l'exposition à la ciclosporine dans les différents organes. Ce travail a fait l'objet de l'article dont les références sont les suivantes :

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod. Influence of dosing schedule on organ exposure to cyclosporin in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: analysis with a PBPK-PD model. *Pharmaceutical Research*. 2010 Dec;27(12):2602-13.

L'article intégral (article 1) se trouve à la page 141 de cette thèse.

Un bref résumé en français se trouve ci-dessous. Les détails se trouvent dans la publication.

#### Résumé de la publication

Le modèle PBPK de la ciclosporine chez l'enfant a été utilisé pour tester l'influence du type d'administration intra-veineuse (continue ou discontinue) sur l'exposition à la ciclosporine et l'occupation des récepteurs dans le milieu interstitiel des tissus cibles de l'efficacité (organes de la GVH donc peau, intestin et foie) et du milieu intracellulaire de ceux de la toxicité de la ciclosporine (reins).

A J1, l'exposition dans le milieu interstitiel des tissus cibles de la GVH est plus importante en cas de perfusion discontinue qu'en cas de perfusion continue. A l'équilibre, cette différence disparaît. Dans le milieu intracellulaire des reins, l'exposition est également plus importante en cas de perfusion discontinue qu'en cas de perfusion continue.

Du fait de l'importance de tenir compte à la fois de l'efficacité et de la toxicité, un index thérapeutique correspondant au rapport de l'occupation des récepteurs dans le sang sur celui sur les reins a été calculé.

Il a été retrouvé légèrement meilleur en cas de perfusion continue qu'en cas de perfusion discontinue.

### **1.5.2. Liens entre l'exposition tissulaire à la ciclosporine et la GVH**

Ce travail a fait l'objet d'un article dont les références sont les suivantes :

**C. Gérard**, N. Bleyzac, P. Girard, G. Freyer, Y. Bertrand, M. Tod. Links Between Cyclosporin Exposure in Tissues and Graft-Versus-Host Disease in Pediatric Bone Marrow Transplantation: Analysis by a PBPK Model. *Pharmaceutical Research*. 2011 Mar;28(3):531-9.

L'article intégral (article 2) se trouve à la page 154 de cette thèse.

Un bref résumé en français se trouve ci-dessous. Les détails se trouvent dans la publication.

#### **Résumé de la publication**

Avec ce même modèle PBPK, la recherche d'un lien entre l'exposition tissulaire à la ciclosporine dans les organes de la GVH (milieu interstitiel) et la GVH observée a été réalisée. L'objectif principal de cette étude était d'identifier un index PK (concentration ou AUC dans le sang ou dans les organes cibles) de l'exposition à la ciclosporine qui était le mieux corrélé avec l'occurrence d'une GVH et de son grade de sévérité.

Un modèle d'interface (approche introduite récemment (295)) a été utilisé pour relier les profils de concentration à la réponse pharmacodynamique. Une régression logisitique binaire (présence ou absence de GVH) ou catégorielle (grades de GVH) a été effectuée reliant la probabilité de présence de GVH ou d'un grade de GVH en fonction de la concentration moyenne du compartiment d'effet. A J1, bien que la GVH se manifeste plus tard, les AUC dans les organes lymphoïdes mais pas celle dans le sang ont été trouvées corrélées à présence ou non de la GVH. A l'état stationnaire, les AUC dans le sang et dans les organes lymphoïdes ont été corrélées à la présence ou non de la GVH.

L'AUC de la ciclosporine dans le milieu interstitiel des organes lymphoïdes a été retrouvé meilleur index que l'AUC dans le sang. Ces deux AUC étant corrélées, des AUC cibles dans le sang peuvent être définies.

Enfin, ce modèle a permis de définir des concentrations cibles de ciclosporine dans le sang total (concentration moyenne à l'équilibre, C2 et C12) selon l'indication de la greffe : d'une part, les pathologies malignes où une GVH de grade I est souhaitée pour son effet GVL et d'autre part les pathologies non malignes où une absence de GVH est souhaitée.

## 2. Etude du tacrolimus en transplantation hépatique

Concernant l'étude du tacrolimus en transplantation hépatique, une étude préliminaire de PK de population à partir d'un échantillon de patients transplantés hépatiques a été réalisée pour mettre en évidence des covariables intéressantes. Puis, un modèle PBPK a été construit et évalué pour rechercher les covariables les plus pertinentes ainsi que pour définir ensuite des posologies initiales en tacrolimus en fonction de celles-ci pour atteindre la concentration cible.

### 2.1. Patients

Il s'agit d'un échantillon de patients adultes transplantés hépatiques qui ont reçu du tacrolimus après transplantation. Le nombre total de patients étudiés est de 66 : 23 patients à l'hôpital Henri Mondor, 40 à l'hôpital Beaujon et 3 à l'hôpital Cochin.

Les données ont été collectées pendant l'hospitalisation de J1 à J15 post-transplantation. Il s'agissait d'une étude prospective multicentrique (3 sites) dont le promoteur était l'APHP. Pour chaque patient, au moins 3 prélèvements (à T0h, 2h and 6h) ont été répétés à J2, J7 et J14.

Le nombre total de doses administrées est de 3 003 (en moyenne 46 doses par patient) et celui des concentrations mesurées est de 1 387 (en moyenne 21 par patient).

Les covariables recueillies sont :

- Sexe, age, poids

- Protéines totales plasmatiques, albumine, facteur V, Taux de Prothrombine (TP), bilirubine totale, bilirubine conjuguée, Phosphatases Alkalines (PAL), Gamma Glutamyl Transférase (CGT), Alanine Amino Transférase (ALAT), Aspartate Amino Transférase (ASAT), créatinine sérique (SCR), nombre de globules rouges (GR), hématocrite (hct),

- Génotypage CYP3A5 intron 3 (6986A>G) et MDR1 exon 26 (3435C>T)

soit 15 covariables quantitatives continues et 5 covariables catégorielles (2 classes ou plus).

Les valeurs manquantes sont indiquées dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII. Valeurs manquantes des covariables

Paramètres	Nombre de valeurs manquantes	Pourcentage de valeurs présentes	Commentaires
Age	0	100%	
Poids	2	97%	
Sexe	0	100%	(1 : homme, 0 : femme)
Protéines	0	100%	
Albumine	21 patients sans valeur, 62 patients avec des valeurs manquantes, 3975 lignes	68% (patients), 15% (lignes)	Valeurs ponctuelles, les valeurs manquantes correspondent au nombre de patients n'ayant aucune valeur.
Facteur 5	6 patients sans valeur, 60 patients avec des valeurs manquantes, 3425 lignes	91% (patients), 27% (lignes)	
TP	4 patients sans valeur, 84 lignes	92% (patients), 98% (lignes)	
Bilirubine totale	1 patient avec des valeurs manquantes, 32 lignes	99% (patients et lignes)	
Bilirubine conjuguée	3 patients, 103 lignes	92% (patients), 98% (lignes)	
PAL	1 patient avec des valeurs manquantes, 32 lignes	99% (patients et lignes)	
GGT	1 patient avec des valeurs manquantes, 32 lignes	99% (patients et lignes)	
ALAT	1 patient avec des valeurs manquantes, 32 lignes	99% (patients et lignes)	
ASAT	2 patients avec des valeurs manquantes, 51 lignes	97% (patients), 99% (lignes)	
SCR	1 patient avec des valeurs manquantes, 32 lignes	99% (patients et lignes)	
GR	0	100%	
HT	0	100%	
<b>Génétique</b>			
3A5 donneur	26	57%	
3A5 receveur	15	77%	
MDR1 donneur	30	54%	
MDR1 receveur	18	73%	
<b>IAM</b>	26	61%	

Il y a beaucoup de données manquantes sur les paramètres génétiques mais le pourcentage de présence moyen est de 65%.



Il n'y a pas de renseignement sur la nature du greffon (lobe ou foie entier) ni sur le poids du greffon qui aurait pu être des paramètres pertinents. En effet, une étude chez des patients pédiatriques transplantés hépatiques a montré que la clairance apparente était plus importante chez les enfants greffés par un foie entier pédiatrique que par un lobe de foie adulte (9). Une autre étude chez des patients adultes transplantés hépatiques a conclu une clairance apparente du tacrolimus trois fois plus grande chez les patients transplantés avec un foie entier que les patients transplantés avec une fraction seulement de foie (13).

Pour 40 patients, la présence d'un médicament inhibiteur du CYP3A4 concomitant et une évaluation du degré de d'inhibition (pas d'inhibition, inhibition faible et inhibition importante) ont été évaluées. Les médicaments inhibiteurs répertoriés étaient le voriconazole, fluconazole, midazolam, nicardipine and amiodarone. Pour le degré d'inhibition, par exemple pour le fluconazole, l'inhibition était considérée comme faible quand la posologie était de 50 à 150 mg par jour et considérée comme forte quand la posologie était entre 200 et 400 mg par jour.

## **2.2. Etude de PK de population et modèle PBPK du tacrolimus**

L'étude de PK de population préliminaire ainsi que la recherche des covariables les plus pertinentes à l'aide du modèle PBPK via une approche bottom-up a fait l'objet d'un article qui a été soumis à AAPS en décembre 2012.

Cet article (article 3) se trouve à la page 164 de cette thèse.

## **3<sup>EME</sup> PARTIE : Articles**

Article 1 :

**Influence of dosing schedule on organ exposure to cyclosporin in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: analysis with a PBPK model**

Publication dans Pharmaceutical Research en 2011

# Influence of Dosing Schedule on Organ Exposure to Cyclosporin in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Analysis with a PBPK Model

Cécile Gérard · Nathalie Bleyzac · Pascal Girard · Gilles Freyer · Yves Bertrand · Michel Tod

Received: 14 June 2010 / Accepted: 16 August 2010 / Published online: 2 September 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

## ABSTRACT

**Purpose** Cyclosporin is administered by intermittent infusions (II) or continuous infusions (CI) to prevent acute graft-versus-host disease (aGVHD). Because cyclosporin disposition is nonlinear, organ exposure may be higher after II than after CI, but saturation of receptors must be accounted for. The aim of the study was to compare both types of administration using a mechanistic model.

**Methods** A physiologically based pharmacokinetic model was developed to estimate cyclosporin exposure and receptor occupancies (RO) in aGVHD target organs and kidneys and to compare these estimations in pediatric patients that received cyclosporin either by II or CI. The relevant biological parameters were based on a clinical study in 2 groups of pediatric patients that received cyclosporin either by II ( $n=31$ ) or CI ( $n=30$ ).

**Results** Simulations showed that the exposure to cyclosporin in the interstitial fluid of aGVHD target organs was greater at day 1 after II than after CI. In kidneys, the opposite order was observed.  $AUC_{RO}$  in all organs was greater after CI than after II. The therapeutic index (the ratio of  $AUC_{RO}$  in blood to  $AUC_{RO}$  in kidneys) was greater with CI than with II.

**Conclusions** CI may be slightly more favorable than II for aGVHD prevention.

**KEY WORDS** cyclosporin · GVHD · hematopoietic stem cell transplantation · PBPK modelling

## INTRODUCTION

Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is curative in several malignant and non-malignant haematological diseases, inborn errors of metabolism and immunodeficiencies. The major complication of allogeneic HSCT is graft-versus-host disease (GVHD) (1). Despite progress in prophylaxis, acute GVHD (aGVHD) is still responsible for significant morbidity and mortality (2). aGVHD mainly occurs in three organs: skin, intestines and liver (3).

Cyclosporin, an immunosuppressant drug belonging to the family of calcineurin inhibitor, is used to prevent aGVHD. Cyclosporin acts on T-lymphocytes, which circulate in blood and lymph. The mechanism of action of cyclosporin is the inhibition of the interleukin-2 (IL-2)-driven proliferation and activation of T-lymphocytes. By impairing IL-2 production by T-helper cells, the drug suppresses proliferation and generation of T-lymphocytes while sparing T-suppressor cell subpopulation. Cyclosporin exhibits a relatively narrow therapeutic window (4) and large inter-individual pharmacokinetic variability. Low exposure to immunosuppressant drugs is one of the risk

C. Gérard · P. Girard · G. Freyer · M. Tod  
Université de Lyon  
Lyon F-69003, France

C. Gérard · P. Girard · G. Freyer · M. Tod  
Faculté de Médecine Lyon Sud, Université Lyon I, EA3738, CTO  
Oullins F-69600, France

N. Bleyzac · Y. Bertrand  
Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique  
Lyon, France

N. Bleyzac  
Faculté de Médecine, Université Lyon I  
CNRS UMR5558,  
Lyon F-69008, France

M. Tod (✉)  
Pharmacie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon  
103 Grande rue de la Croix-Rousse,  
69317 Lyon cedex 04, France  
e-mail: michel.tod@chu-lyon.fr

factors for developing aGVHD. In the early phase following HSCT, it is important to determine the optimal dose of cyclosporin to achieve and maintain the target blood concentration because of the important link between cyclosporin exposure and aGVHD incidence: a negative relationship was found (5–11). A positive impact of a monitoring cyclosporin regimen on aGVHD incidence and outcome was also demonstrated (12,13).

There is no consensus on the appropriate administration route for cyclosporin in the prevention of GVHD; some centers implement one or two intermittent infusions, and others use 24 h continuous infusions (14). Furthermore, there is no consensus on the optimal time to measure cyclosporin blood concentrations or the appropriate target concentrations (5,15). Finally, cyclosporin distribution is diffusion-limited and exhibits several sources of non-linearity, due to saturable binding to red blood cells and to cellular components in most organs (16). There are two consequences of non-linearity. First, given a constant total daily dose, the steady-state exposure of T-lymphocytes to cyclosporin in organs may depend on the rate of infusion. Thus, intermittent and continuous infusion may not be equivalent in terms of efficacy and safety. Second, the ratio of steady-state blood cyclosporin concentration to its concentration in the interstitial space of target organs may depend on the rate of infusion. Thus, the target blood concentrations may depend on the dosing schedule. In theory, it should be possible to address these questions with randomized clinical trials that compare the modes of administration and/or the target concentrations. However, in practice, patients with HSCT frequently require adjustments in the cyclosporin dose and/or target concentration during the early phase; thus, the effect to be studied is confounded, and comparisons are difficult or impossible.

Rowland and co-workers proposed a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model of cyclosporin based on rat physiology that takes into account the various sources of non-linearity (17). This kind of model offers the ability to simulate the kinetics of the drug in several sub-compartments of the main organs. Thus, it may facilitate our understanding of the effect of dosing schedule on exposure and the relationship between exposure in the blood and that in the organs.

In the present work, this previously published PBPK (17) model was used in order to simulate cyclosporin exposure in the target organs of aGVHD, to compare the exposures and receptor occupancies of pediatric patients that received cyclosporin either by intermittent or continuous infusion, and to explore the influence of several factors on these parameters. The relevant biological parameters and their interindividual variability are estimated using a clinical study in pediatric patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical Study

This was a retrospective, monocentric study. We studied the records of pediatric patients (4 m to 17 y) that underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and received cyclosporin for the prevention of graft-versus-host disease. The patients gave written consent to use their data at the time of admission. Cyclosporin treatment started the day before transplantation. The patients comprised two groups. In the first group, 30 patients were treated with cyclosporin administered by continuous infusion (CI group). In the second group, 31 patients received cyclosporin by intermittent infusion, twice daily (for 2 h every 12 h; II group). The patients in the two groups were matched regarding age, sex, indication for transplantation (malignant versus non-malignant disease), proportion of related donors, administration of anti-lymphocyte serum, and number of mismatches when the donor was unrelated. The stem cell source was unmanipulated bone marrow from all donors. No methotrexate was administered.

For each patient, periodic monitoring of whole blood cyclosporin concentration was performed (EMIT; Dade Behring) on a Cobas Mira automate (18). The dosing regimen was adjusted with a Bayesian method (USC\*-Pack® Software, version 10.0, Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, USA) to achieve and maintain the target blood cyclosporin concentration. The target concentrations were defined as described in our previous studies (5,6). In the CI group, the target steady-state concentration was 200 µg/l (malignant disease) or 280 µg/l (non-malignant disease). In the II group, the target was a 12 h-trough concentration of 110 µg/l (malignant disease) or 130 µg/l (non-malignant disease).

The severity of aGVHD was classified according to the Glucksberg classification. This criteria include a rating from grade 0 (no GVHD) to grade IV (maximum severity). Grades are determined by a combination of different organ scores and a reduction in clinical performance. The organs (skin, intestines, and liver) are scored independently based on a 1 to 4 scale that depends on the degrees of skin rash, diarrhoea volume, and total bilirubin concentrations, respectively.

### PBPK Model Of Cyclosporin Disposition

#### PBPK Model of the Rat

**Global PBPK Model Framework.** The physiologically based pharmacokinetics (PBPK) model describes drug disposition

in the blood and in various organs and tissues. Our PBPK model is close to the one proposed by the Rowland *et al.* team, developed in rats (17). Our global PBPK model comprised 11 organs (lung, heart, kidney, bone, muscle, spleen, liver, intestines, adipose tissue, and skin) and the corresponding arterial and venous pools. It assumed that cyclosporin transport occurs solely by blood flow.

**Physiological Parameters.** The physiological parameter values (organ volumes and blood flow rates) and fractions of vascular and interstitial spaces in rats were derived from the literature (17,19,20). The total bone volume included cortical and trabecular bone, red and yellow marrow, cartilage, and periarticular tissue. Marrow represented 29% of the total bone volume (21).

**Blood Distribution.** First, the distribution of cyclosporin in the blood is governed by its binding to plasma proteins and red blood cells. In plasma, cyclosporin is highly bound, principally to lipoproteins (95% of the total protein binding). The unbound fraction of plasma cyclosporin ( $f_{up}$ ) was 6%(19), and this value was independent of the cyclosporin concentration over the range of 20 to 20000  $\mu\text{g/l}$  (22). Second, there is a single specific binding site on or in red blood cells, characterized by a dissociation constant ( $K_{D,BC} = 185 \mu\text{g/l}$ , expressed as unbound concentration) and a binding capacity ( $nP_T = 4640 \mu\text{g-eq./l}$ )(20). Finally, passive diffusion into blood cells is characterized by a permeability-surface-area product ( $PS_{BC} = 0.56 \text{ l/h per l of blood}$ )(20). As a result, the cyclosporin distribution is influenced by the hematocrit.

**Interstitial Space Distribution.** The distribution of cyclosporin in the interstitial space is governed by instantaneous, non-saturable binding to lipoproteins. To estimate the interstitial unbound fraction of cyclosporin ( $f_{ui}$ ), we used the ratio of lipoprotein concentrations between the plasma and the interstitial space (IPR). The ratio for each organ was based on values from the literature (23).

**Tissue Distribution.** The exchange between interstitial and intracellular spaces was characterized by a permeability-surface-area product of the tissue cells ( $PS_{TC}$ ). The value of  $PS_{TC}$  varied among organs and was based on previous estimates for each organ (17). In tissue cells, intracellular binding was characterized by the unbound fraction of tissue cyclosporin ( $f_{uTC}$ ).

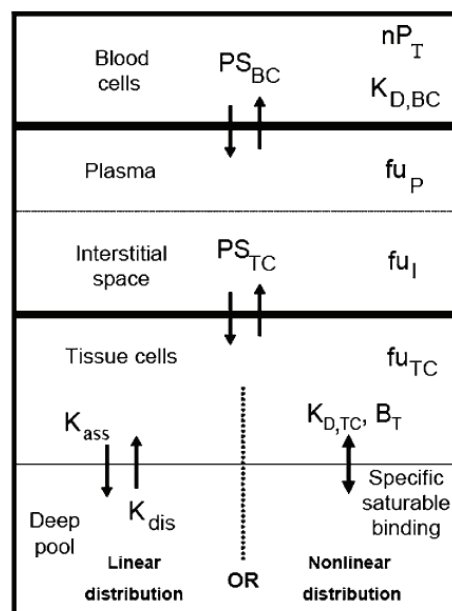
In all organs except liver, kidney, and lung, cyclosporin distribution was limited by diffusion. For the three remaining organs, distribution was limited by blood flow, and  $PS_{TC}$  was fixed at 30 times the organ blood flow.

The local model described the kinetics of distribution in the cells of each organ. Cyclosporin may bind to intracel-

lular components (saturable, nonlinear process) or equilibrate with a deep-pool (non-saturable, linear process) (Fig. 1)(17). The most appropriate model was chosen for each organ: muscle and adipose tissue were well described with a linear tissue distribution, and the other organs were more appropriately described with nonlinear tissue distributions (16). For the linear distribution model, the kinetics of equilibrium was characterized by an association flux ( $k_{ass}$ ) and a dissociation flux ( $k_{dis}$ ). Cyclosporin bound to this site was called the "deep pool." For the nonlinear distribution model, intracellular binding was saturable ( $B_T$  is the number of binding sites) with instantaneous equilibrium characterized by a dissociation constant ( $K_{D,TC}$ ). The values for these tissue distribution parameters are shown in Table I.

The equations for the distribution of cyclosporin in the blood, interstitial, and intracellular spaces of tissues were previously described by Kawai and Rowland (17).

**Clearance.** The excretion of cyclosporin in urine is negligible (24). Cyclosporin metabolism and elimination principally occur in the liver, by cytochrome P-450 (CYP) 3A4 and 3A5(25). In this model, it was assumed that elimination occurred only in the liver (19). Consequently, blood clearance ( $CL_B$ ) was equal to hepatic clearance ( $CL_H$ ). Hepatic clearance was related to  $f_{uB}$  (unbound fraction of cyclosporin in the blood),  $Q_H$  (hepatic blood flow), and



**Fig. 1** Schematic representation of local model for linear tissue distribution and nonlinear tissue distribution.



**Table 1** Values of Tissue Distribution Parameters for Linear and Nonlinear Tissue Distribution in Rats (16,18)

Linear tissue distribution					
Organs	PS <sub>TC</sub> (l/h)	f <sub>uTC</sub>	k <sub>ass</sub> (l/h)	k <sub>dis</sub> (l/h)	
Muscle	2.4	0.041	0.00055	0.000026	
Adipose tissue	0.079	0.001	1.2	0.0144	
Nonlinear tissue distribution					
	PS <sub>TC</sub> (l/h)	f <sub>uTC</sub>	B <sub>T</sub> (μg-eq/l)	K <sub>D,TC</sub> (μg/l)	
Lungs	High <sup>a</sup>	0.015	4800	0.7	
Heart	0.14	0.017	1900	0.2	
Bone	0.39	0.1	6000	60.0	
Skin	0.3	0.143	8500	39.0	
Thymus	0.007	0.1002	10000	15.0	
Kidney	High <sup>a</sup>	0.013	6300	5.8	
Spleen	0.074	0.01	7800	10.0	
Liver	High <sup>a</sup>	0.009	14000	16.0	
Intestines	0.039	0.021	2400	4.8	

<sup>a</sup>PS<sub>TC</sub> was set at 30 times the blood flow in the organ

CL<sub>int</sub> (hepatic intrinsic clearance of cyclosporin) in a well-stirred model. Furthermore, the hepatic intrinsic clearance was assumed to vary with the unbound intracellular cyclosporin concentration in the liver, according to a Michaelis Menten model, characterized by Km (concentration for half maximal rate: 600 μg/l) and Vmax (maximum rate of metabolism: 577 μg/h).

**Validation of the PBPK Model in Rats.** Our PBPK model of the rat was implemented in ADAPT II® software (26). The physiological and cyclosporin distribution parameters were fixed to their typical values. The hematocrit was fixed at 0.4 (19). Cyclosporin kinetics for a 2 min intravenous infusion of 6 mg/kg was simulated. The simulated cyclosporin concentration profiles in the blood and in the 11 organs were compared with those obtained experimentally by the Rowland team (17).

#### Scale-Up for the Adult Human Model

**Physiological Parameters.** The PBPK model of the rat was scaled up to represent an adult human by replacing rat organ volumes and blood flow values with those of a standard adult human (70 kg body weight) (17). The fractions of vascular and interstitial spaces were assumed to be equal in rats and humans (Table II).

**Cyclosporin Distribution Parameters.** Rat and human distribution parameters were assumed to be the same, including the values of f<sub>uP</sub>, K<sub>D,BC</sub>, nP<sub>T</sub>, lipoprotein concentration ratios, f<sub>uTC</sub>, and f<sub>uI</sub>. Values of k<sub>ass</sub>, k<sub>dis</sub>, and PS<sub>TC</sub> in rats were multiplied by the ratio of human to rat body weight.

B<sub>T</sub> and K<sub>D,TC</sub> were assumed to be identical per unit of organ mass (17).

**Clearance.** For the adult human model, the hepatic intrinsic clearance was set to 1470 l/h.

#### Pediatric Population Adaptation

**Physiological Parameters.** The physiological organ volumes in children (V<sub>child</sub>) were obtained by correcting the adult values by the ratio of body weights (BW) for children and a standard adult of 70 kg (27):

$$V_{child} = V_{adult} \times \frac{BW_{child}}{BW_{adult}}$$

The fractions of interstitial and vascular space were derived from Bjorkman (28). The value for bone was taken from Edginton (29), and the value for the adult thymus was used for children.

The values of organ blood flow (Q) were derived from the values of the standard adult according to the following allometric equation (27):

$$Q_{child} = Q_{adult} \times \left( \frac{BW_{child}}{BW_{adult}} \right)^{\frac{3}{4}}$$

**Cyclosporin Distribution Parameters.** The blood distribution parameters, K<sub>D,BC</sub>, and nP<sub>T</sub>, were assumed to be equal in

**Table II** Physiological Parameters and Fraction of Tissue Vascular and Interstitial Spaces in Organs Used for the PBPK Model in a Human Standard Adult (70 kg) (18–20)

Organs	Total volume (l)	Blood flow (l/h)	Fraction of tissue vascular space	Fraction of interstitial space
Lung	1.17	262	0.262	0.188
Heart	0.27	9	0.262	0.100
Kidney	0.31	66	0.105	0.200
Bone	8.7	15	0.041	0.100
Muscle	30	45	0.026	0.120
Spleen	0.19	4.6	0.282	0.150
Liver	1.69	88.6	0.115	0.163
Intestines	1.65	66	0.024	0.094
Skin	7.8	18	0.019	0.302
Adipose tissue	10	15.6	0.010	0.135
Thymus	0.027	4.8	0.030	0.150
Venous blood	3.6	–	–	–
Arterial blood	1.8	–	–	–
Hepatic artery	–	18	–	–

adults and children. Cyclosporin  $f_{up}$  varied as a function of age. Due to cyclosporin binding to lipoproteins, there is a strong correlation ( $r^2=0.71$ ) between cholesterol concentration and cyclosporin  $f_{up}$ : the higher the concentrations of cholesterol [CH] and triglyceride [TG], the lower the unbound fraction (30). This was expressed in the following equation (30):

$$f_{up} = \frac{1}{1.346[TG] + 2.815[CH] + 1}$$

Values of cholesterol and triglyceride concentrations varied with age (Table III)(31,32). Thus, the unbound fraction of plasma cyclosporin in children was slightly different from that in adults: cyclosporin  $f_{up}$  was 0.07 for patients under 15 years old and 0.06 for patients over 15.

For the cyclosporin tissue distribution, the ratio of lipoprotein concentrations,  $f_{uT}$ , and  $f_{uI}$  were assumed to be identical in children and adults. The adult values of  $k_{ass}$ ,  $k_{dis}$ , and  $PS_{TC}$  were adjusted for children by multiplying by the ratio of body weights for children and adults. The  $B_T$  and  $K_{D,TC}$  were assumed to be identical, per unit of organ mass, in children and adults (17).

**Clearance.** Hepatic intrinsic clearance in a standard adult ( $CL_{int-adult}$ ) was set at 1470 l/h. Based on information on the ontogeny of specific CYPs (expression and activity per mg of microsomal proteins in the liver), the abundance of hepatic CYP 3A4/A5 in children was expressed according to age as a fraction of the abundance of CYP 3A4/A5 in adults (33). This fraction ( $f$ ) was calculated as follows:

$$f = \frac{Age^{0.83}}{0.31 + Age^{0.83}}$$

Thus, the hepatic intrinsic clearance in a child, given the age, was calculated as  $f \times CL_{int-adult}$ . The evolution of blood clearance as a function of age (Fig. 2) was incorporated in the model. The range of values is consistent with the typical clearance of cyclosporin in pediatric patients (9 to 17 ml/min/kg, i.e., 5 to 50 l/h for body weights of 10 to 50 kg (34)).

**Fitting the PBPK Model in Children.** The pediatric PBPK model was fitted individually to the venous whole blood cyclosporin concentrations of the 61 pediatric patients in the clinical study. For each patient, the data records included the dosing history, first two concentration measurements, and body weight, age, and hematocrit. The estimated parameters were the hepatic intrinsic clearance and the plasma unbound fraction of cyclosporin. A Bayesian estimator (Maximum a Posteriori) was used to estimate these parameters. The prior distributions were assumed log-normal and independent. Prior means were adjusted for each child according to age for  $CL_{int}$  (as  $f \times CL_{int-adult}$ ) and to TG and CH for  $f_{up}$ , respectively. The inter-individual coefficient of variation of both parameters was set at 30%. To account for the imprecision of cyclosporin concentration measurements, a proportionnal residual error model was used. The coefficient of variation of the residual error was assumed to be constant and was set to 15%. The areas under the concentration *versus* time curves (AUC from 0 to 24 h after the onset of treatment, and at day 13, because the median time to aGVHD was day 14) were estimated by numerical integration in several compartments (venous blood and interstitial compartments of bone, skin, liver, and intestines), using the dosing history of each child.



**Table III** Mean Concentrations of Triglycerides and Cholesterol According to Age of Children<sup>31,32</sup>

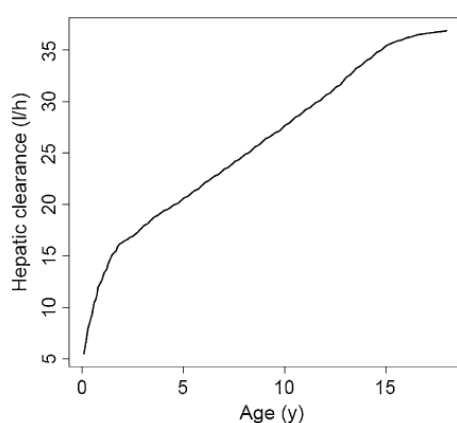
Age (y)	Mean triglycerides concentration (mmol/l)	Mean total cholesterol concentration (mmol/l)
5	0.86	4.40
10	0.86	4.27
15	1.03	3.62
20	1.03	4.91

### Simulations in the Pediatric Population

Individual simulations of the PBPK model were carried out using several set of variables (body weight, age, hematocrit, dose,  $f_{up}$  and  $CL_{int}$ ) chosen according to the results of the clinical study. The AUCs were estimated in venous blood, in interstitial compartments of bone, skin, thymus, liver, kidney and intestines, and in intracellular compartment of kidney. The fractional receptor occupancy (RO) was calculated as

$$RO(t) = \frac{Cu(t)}{IC_{50} + Cu(t)}$$

where  $Cu(t)$  is the unbound concentration of cyclosporin, and  $IC_{50}$  its half-maximal inhibitory unbound concentration. The typical value of total  $IC_{50}$  for IL2 inhibition of production is 200  $\mu\text{g/l}$  (depending on the measured effect, the estimates of total  $IC_{50}$  varies from 40 to 440  $\mu\text{g/l}$  (35–37)), while the typical value of  $f_{uB}$  is 0.05. Therefore, the  $IC_{50}$  of unbound concentration of cyclosporin in blood was fixed at 10  $\mu\text{g/l}$ . The area under the receptor occupancy *versus* time curves ( $AUC_{RO}$ ; from 0 to 24 h after the onset of treatment) was calculated in venous blood, in interstitial compartments of

**Fig. 2** Variation of cyclosporin hepatic clearance with age.<sup>33</sup>

skin, liver, kidney and intestines, and in the intracellular compartment of kidney.

To characterize the impact of nonlinearity in cyclosporin kinetics, the simulations of the nonlinear model described above were compared to simulations with the corresponding linear model. The linear model was obtained by multiplying  $K_{D,BC}$ ,  $nP_T$  and the  $B_{TS}$ , and  $Kd_{TCs}$  by 10,000 in the nonlinear model. The ratios of AUCs calculated by simulation of the nonlinear and linear models were used as index of nonlinearity.

### Statistical Methods

Statistical analyses were performed with the SPSS package (version 17, SPSS, Chicago, Illinois, USA). A non-parametric test (Mann-Whitney test) was used to compare means, and the chi-square test was performed to compare proportions, with an alpha risk fixed at 5%. The goodness-of-fit of the model at the population level was assessed by visual examination of the predicted *versus* observed concentration plot, the proportion of predicted concentrations in the range between two-fold lower and two-fold greater than observed concentrations, and the histogram of weighted residuals. The latter distribution was compared to the normal distribution  $N(0,1)$  by the Shapiro-Wilk test. The bias of the fit was calculated as the mean of the prediction errors (PE), defined as the mean difference between the predicted and the observed concentration. The precision was calculated as the root of the mean squared prediction errors (RMSE).

## RESULTS

### Clinical Study

The two pediatric groups showed comparable demographics, HSCT indication, donor type, initial dosing regimen (Table IV), number of mismatches, and administration of anti-lymphocyte serum (data not shown). The cyclosporin dose range was nearly the same in both groups on day 1. At steady-state, the median dose was 67% higher in the II group than in the CI group. The clinical study showed that the frequency of aGVHD was similar in both groups: 60% after II, compared to 52% after CI. The mean grade was 0.74 after II, compared to 1.13 after CI.

### Analysis of Cyclosporin Disposition

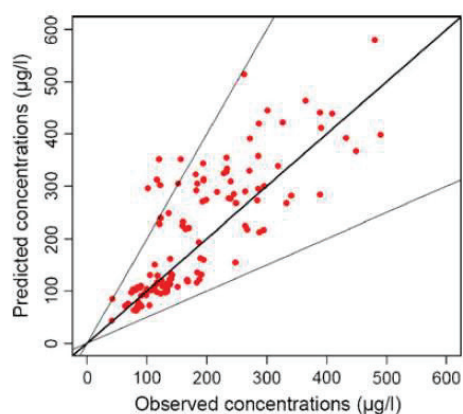
The simulated kinetic profiles of cyclosporin in the blood and all organs of the rat PBPK model were similar to the experimental data of Kawai (17) (figures not shown). Thus, the implementation of the rat PBPK model in the ADAPT II® platform was validated.

**Table IV** Patient Characteristics in Both Groups

<i>n</i>	Intermittent infusion 31	Continuous infusion 30	<i>p</i> value
Median age (range), y	7.58 (0.62–17.0)	5.73 (0.48–15.8)	0.942
Median body weight (range), kg	22.4 (5.62–63.0)	19.8 (7.18–58.6)	0.931
Sex (% male)	51.6	56.7	0.500
Hematocrit (range)	0.26 (0.14–0.32)	0.25 (0.16–0.31)	0.434
Disease			
Acute lymphoblastic leukemia (%)	25.8	26.7	0.50
Acute myeloid leukemia (%)	22.6	33.3	
Other malignant haematological diseases (%)	16.1	10	
Non malignant haematological diseases (%)	35.5	30	
Donor type			
Related (%)	61.3	43.3	0.20
Unrelated (%)	38.7	56.7	
Treatment			
Median dose at day 1 (range), mg/kg	3.14 (2.64–5.51)	3.12 (2.21–5.26)	0.243
Median dose at steady-state (range), mg/kg/d	3.92 (1.34–8.40)	2.35 (1.12–3.84)	<0.001
Median through concentration (II) or plateau concentration (CI) (range), µg/l	115 (41.0–248)	240 (79.0–490)	–

### Goodness-of-Fit of the PBPK Model in Children

Plots of predicted *versus* observed concentrations in venous blood were analysed (Fig. 3). The bias and precision (RMSE) were  $-25.1 \mu\text{g/l}$  and  $76.2 \mu\text{g/l}$ , respectively. More than 95% of the predicted concentrations were in the range between two-fold lower and two-fold greater than the observed concentrations. The weighted residual distribution was not significantly different from the normal distribution with zero mean and unit variance (Shapiro test  $W=0.983$ ,  $p=0.12$ ), and 100% of weighted residuals were in the range  $[-3;+3]$ . A plot showing observations and predictions over



**Fig. 3** Predicted *versus* observed concentrations of cyclosporin in venous blood. The thick line represents the identity line, and the thin lines are  $y=2x$  and  $y=0.5x$ .

time for 8 children (4 with intermittent infusion and 4 with continuous infusion) is represented in Fig. 4.

### Estimation of $CL_{int}$ and $f_{up}$

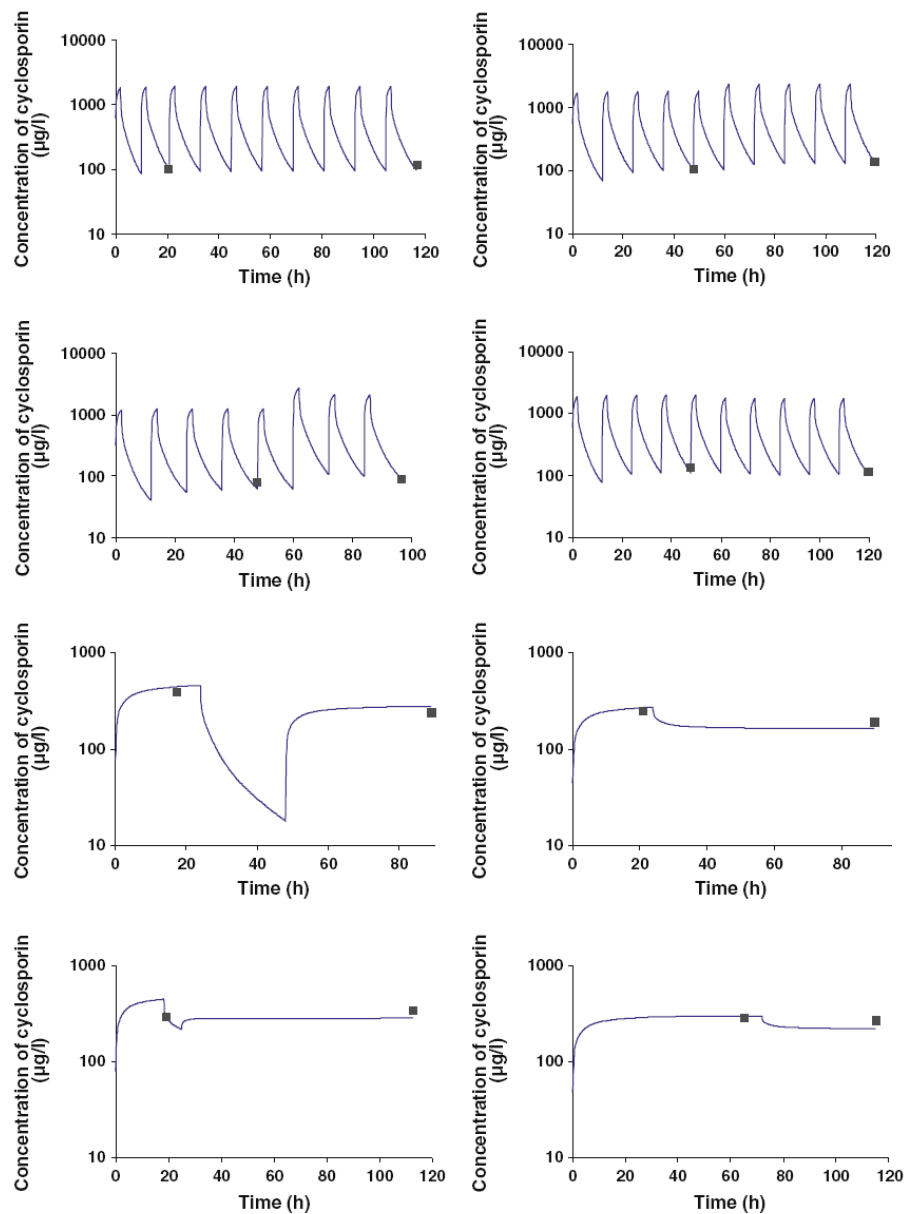
For  $CL_{int}$ , the median and range were 879 l/h (568–1381) and 1219 l/h (836–1463) for patients with intermittent infusion and patients with continuous infusion, respectively.

For  $f_{up}$ , the median and range were 0.045 (0.029–0.066) and 0.063 l/h (0.040–0.075) for patients with intermittent infusion and patients with continuous infusion, respectively.

**Comparisons of Exposure in Blood and Organs According to Infusion Type.** With the fitted PBPK model, cyclosporin exposures, reflected by the AUCs in blood and aGVHD target organs, were calculated for each child. The results showed that at the beginning of treatment (0–24 h), the II showed higher cyclosporin exposure than the CI, with significantly greater AUCs in the blood, interstitial spaces of aGVHD target organs, and lymphoid organs (Fig. 5). However, these results might have been confounded, because this was a parallel group and not a crossover study. To further analyze the differences in cyclosporin exposure induced by both dosing schedules, a simulation study was undertaken.

**Simulation Studies.** The clinical study allowed us to define relevant sets of values for demographic variables, hematocrit, intrinsic clearance and  $f_{up}$  for the simulation study (Table V).

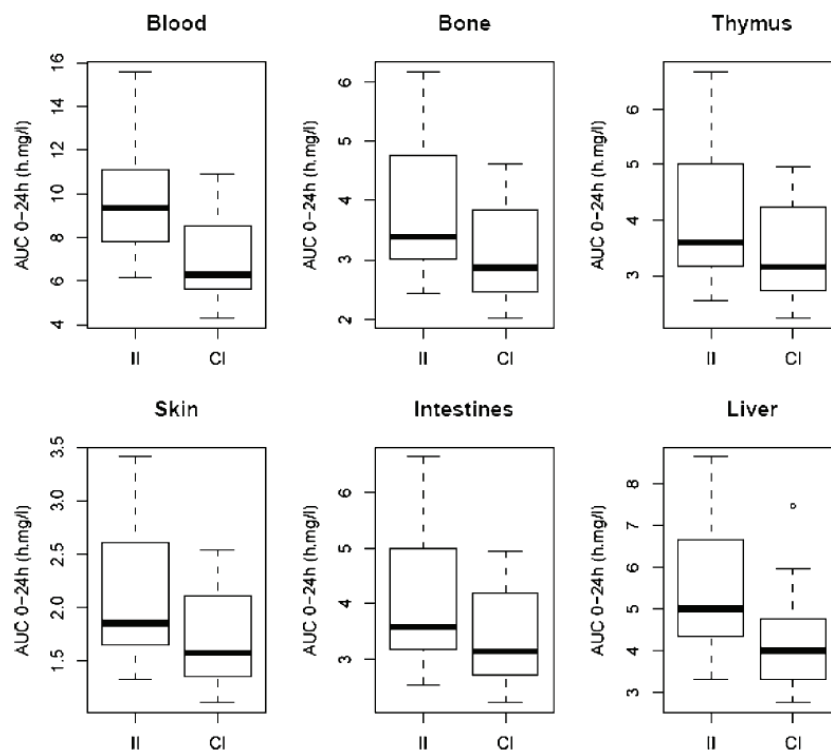
**Fig. 4** Time course of cyclosporin concentration in blood for 4 patients with intermittent infusion and 4 patients with continuous infusion.



First, to compare AUCs in the GVHD target organs according to the type of infusion, an individual simulation was performed using the physiological parameters of a typical patient (age 6.5 y, body weight 26 kg, and hematocrit 0.26). The dosing regimen was 3 mg/kg/day, the intrinsic clearance was set at 1100 l/h (the median value in our population), and the unbound fraction of cyclosporin in plasma was set at 0.053. The change in interstitial cyclosporin concentration over time in the skin is shown in Fig. 6. During the first day of treatment, the exposure was greater after the II than after the CI. Similar curves were obtained in the other organs (data not shown). The

simulation also showed that, upon repeated administration, the average concentration observed after the II or the CI was similar at day 2 and after.

Second, the exposures and receptor occupancies for the different simulation conditions of Table V were calculated. Table VI shows the results for the typical patient defined above. The variations of exposures and receptor occupancies resulting from the different simulation conditions were typically less than 10% from these values (data not shown). Regarding the impact of the dosing schedule (third column of Table VI), the interstitial AUCs calculated at day 1 were 7 to 13% greater after the II than after the CI, but the



**Fig. 5** Box plots of AUC 0–24 h estimated at day 1 in all children. AUCs are in the interstitial space, except for blood. All comparisons between II and CI are significant ( $p < 0.05$ ).

corresponding  $AUC_{ROS}$  were 13 to 20% lower. This difference remained at a steady state. Finally, the total intracellular AUC in kidney was 13% lower after the II than after the CI. Regarding the influence of nonlinearity on cyclosporin disposition (column 4 and 5 of Table VI), the interstitial AUCs were 11 to 28% greater with the nonlinear model than with the linear model. Conversely, the total intracellular AUC in kidney estimated with the nonlinear model was, respectively, 66% and 53% lower after the II and the CI than with the linear model.

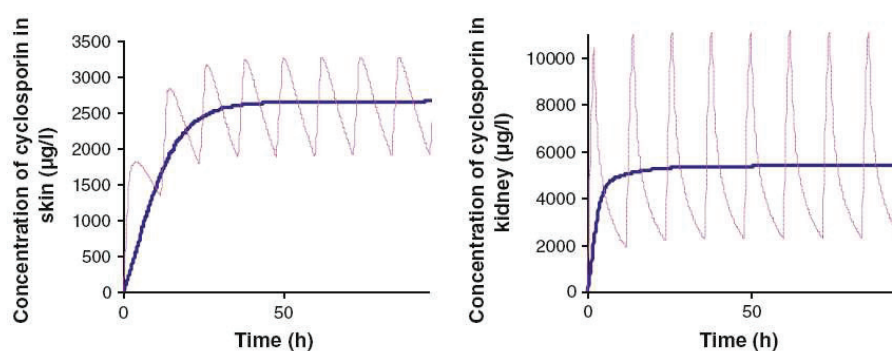
## DISCUSSION

In this retrospective study, two carefully selected groups of patients were comparable in demographic characteristics and pathological status. The two groups differed in the mode of cyclosporin administration: one group received continuous and the other received intermittent infusions. Cyclosporin dose differed between both arms probably because the target concentrations were not equivalent, *i.e.* the target concentrations for II require higher doses to be

**Table V** Simulation Conditions

Body weight (kg)	Dose (mg/kg/d)	Hematocrit	Age (y)	$f_{up}$	$CL_{int}$ (L/h)
20	2	0.26	6.5	0.053	1100
20	3	0.26	6.5	0.053	1100
20	4	0.26	6.5	0.053	1100
20	3	0.26	6.5	0.053	800
20	3	0.26	6.5	0.053	500
20	3	0.16	6.5	0.053	1100
20	3	0.36	6.5	0.053	1100
20	3	0.26	6.5	0.033	1100
20	3	0.26	6.5	0.073	1100
10	3	0.26	1.5	0.053	1000
40	3	0.26	12.5	0.053	1400





**Fig. 6** Individual simulation of the time course of total cyclosporin in the skin (on the left) and in the kidney (on the right) with the two types of infusion (solid line for CI and dotted line for II).

reached than those for CI. Because cyclosporin dose and exposure were significantly different during treatment, no attempt was made to compare the efficacy in both arms. The PBPK model was used to simulate the kinetic profile of cyclosporin in the plasma, red blood cells, and interstitial and intracellular spaces of 11 organs. The model was also used to simulate the kinetic profile of receptor occupancy in blood and tissue cells. This simulation was possible because the unbound concentration of cyclosporin was modelled in all compartments, and the free  $IC_{50}$  for IL2 inhibition was approximately known. The effect on IL2 was considered because IL2 mediates T-lymphocyte activation, which plays a major role in GVHD. The model took into account diffusion-limited kinetics in most organs and the saturable binding of cyclosporin to red blood cells and to intracellular components. Thus, the model was *a priori* well suited for

detecting differences in the pharmacokinetic profiles and receptor occupancies induced by different modes of drug administration. Saturation of binding to red blood cell may increase the proportion of cyclosporin in tissues, while saturation of binding to intracellular components may increase the proportion in blood and interstitial spaces, which contain the target cells for cyclosporin action. Saturation of binding depends, however, on the dose level and dosing schedule.

The simulation of the kinetic profiles for a typical child showed that the exposure in blood and interstitial space of organs was higher with the nonlinear model than with the linear model. The opposite was observed for the intracellular concentration in the kidney (and other tissues, data not shown). This difference shows that the saturation of intracellular binding of cyclosporin (not accounted for in

**Table VI** Exposures and Receptor Occupancies for the Typical Patient

Parameter		II-NL	CI-NL	NL-II/CI	II-NL/Lin	CI-NL/Lin	Lin-II/CI
AUC <sub>24 h</sub> in interstitial space (h.mg/l)	blood	6.31	5.89	1.07	1.11	1.21	1.17
	skin	1.48	1.32	1.12	1.19	1.28	1.20
	intestines	2.88	2.61	1.10	1.19	1.28	1.19
	liver	3.60	3.26	1.10	1.18	1.28	1.19
	bone	2.72	2.40	1.13	1.20	1.28	1.21
	kidney	2.89	2.63	1.10	1.17	1.27	1.19
AUC <sub>RO 24 h</sub> in interstitial space (h)	blood	10.3	12.9	0.80	0.89	1.11	1.00
	skin	10.8	12.4	0.87	0.94	1.15	1.07
	intestines	10.6	12.9	0.82	0.89	1.14	1.05
	liver	8.8	10.6	0.82	0.90	1.17	1.06
AUC <sub>24 h</sub> in intracellular space (h.mg/l)	kidney <sup>o</sup>	106.7	122.2	0.87	0.34	0.47	1.20
		116.6	135.9	0.86	0.29	0.33	1
AUC <sub>RO 24 h</sub> in intracellular space (h)	kidney <sup>o</sup>	19.7	20.7	0.95	0.89	0.94	1.01
		20.2	21.1	0.96	0.89	0.92	1

CI continuous infusion, II intermittent infusion, NL stands for values calculated using the nonlinear model, Lin for linear model

<sup>o</sup> upper value : day 1; lower value: steady-state

the linear model) occurs at the usual dose, resulting in a lower proportion of cyclosporin in tissues and a higher proportion in the blood and interstitial fluid. This saturation, as reflected by the NL/Lin ratios of Table VI, is more pronounced with CI than with II in the interstitial space, while the opposite is observed in the intracellular space of tissues with non linear distribution.

On the other hand, the simulation of the kinetic profiles for a typical child with the nonlinear model showed that, given the same total cyclosporin dose, the exposure in blood and interstitial fluid of organs at day 1 was higher with II than with CI. This difference would also be observed in a linear system and would be more pronounced. In spite of higher exposure, receptor occupancy in blood and interstitial fluid of organs was about 20% lower with II than with CI. The latter result shows that II induces saturation of binding to its receptor at the usual dose level. The simulation also showed that, upon repeated administration, the average concentration in interstitial space of all organs observed after the II or the CI was similar at day 2. Hence, differences in the efficacy of these modes of administration could occur only in circumstances where 1) the exposure at day 1 played a major role or 2) the efficacy was linked to the whole profile of cyclosporin concentration, not the average concentration. In renal transplantation, the effect of exposure was significant in the early post transplantation period; during the 5 days post transplant, a lower risk of rejection was correlated with concentrations of cyclosporin greater than 1 500 µg/l at 2 h after administration (38,39). Furthermore, in hematopoietic stem cell transplantation, cyclosporin administration that started 7 days *versus* 1 day before transplantation, was associated with a trend of reduced probability of severe aGVHD (40) and a significantly higher disease-free survival (41). The CI exhibited higher receptor occupancy than II at day 1; this may result in an improved efficacy of CI.

However, tolerability must also be accounted for. The most frequently limiting side effect of cyclosporin is nephrotoxicity. The mechanism of nephrotoxicity involves altered transcription of genes in kidney cells, due to calcineurin inhibition (42). Hence, the very first step of cyclosporin-induced nephrotoxicity remains binding to intracellular cyclophilin. Simulations show that, given the same total cyclosporin dose, the exposure and the receptor occupancy in intracellular space of kidneys were higher with CI than with II, at day 1 and at steady state. This may result in a greater nephrotoxicity with CI than with II. However, the therapeutic index, roughly estimated as the ratio of  $AUC_{RO}$  in blood to  $AUC_{RO}$  in kidney cells, is 0.62 with CI *versus* 0.52 with II. The latter results suggest that CI may be slightly better than II.

## CONCLUSION

The PBPK model of children showed that the exposure to cyclosporin in the interstitial fluid of aGVHD target organs was greater at day 1 after intermittent infusion than after continuous infusion, given at the same dose. The difference in interstitial exposure vanishes at day 2. By contrast, the exposure to cyclosporin in the intracellular space of kidney was greater at day 1 and at steady state after CI than after II. Finally, the model enabled the estimation of the therapeutic index associated with each mode of administration; it was slightly better after continuous infusion. Factors such as age, body weight, hematocrit, unbound fraction and intrinsic clearance had a moderate influence on the exposure to cyclosporin. Further analyses are required to determine whether cyclosporin efficacy in the prevention of aGVHD depends on the average concentration or on the entire concentration profile in the interstitial space of target organs (this is the topic of a companion paper). Ultimately, this information will contribute to determine the optimal mode of cyclosporin administration.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## REFERENCES

1. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:139–70.
2. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature.* 2001;411:385–9.
3. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-*versus*-host disease. *Lancet.* 2009;373:1550–61.
4. Bowers LD. Therapeutic monitoring for cyclosporine: difficulties in establishing a therapeutic window. *Clin Biochem.* 1991;24:81–7.
5. Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, *et al.* Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-*versus*-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:777–84.
6. Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, *et al.* Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-*versus*-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:881–7.
7. Yee GC, Self SG, McGuire TR, Carlin J, Sanders JE, Deeg HJ. Serum cyclosporine concentration and risk of acute graft-*versus*-host disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1988;319:65–70.
8. Przepiorka D, Shapiro S, Schwinghammer TL, Bloom EJ, Rosenfeld CS, Shadduck RK, *et al.* Cyclosporine and methylprednisolone after allogeneic marrow transplantation: association between low cyclosporine concentration and risk of acute graft-*versus*-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1991;7:461–5.



9. Ghalié R, Fitzsimmons WE, Weinstein A, Manson S, Kaizer H. Cyclosporine monitoring improves graft-*versus*-host disease prophylaxis after bone marrow transplantation. *Ann Pharmacother*. 1994;28:379–83.
10. Eisner MD, August CS. Impact of donor and recipient characteristics on the development of acute and chronic graft-*versus*-host disease following pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:663–8.
11. Punnett A, Sung L, Price V, Das P, Diezi M, Doyle J, *et al*. Achievement of target cyclosporine concentrations as a predictor of severe acute graft *versus* host disease in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and receiving cyclosporine and methotrexate prophylaxis. *Ther Drug Monit*. 2007;29:750–7.
12. Byrne JL, Stainer C, Hyde H, Mifflin G, Haynes AP, Bessell EM, *et al*. Low incidence of acute graft-*versus*-host disease and recurrent leukaemia in patients undergoing allogeneic haemopoietic stem cell transplantation from sibling donors with methotrexate and dose-monitored cyclosporin A prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:541–5.
13. Carlens S, Aschan J, Remberger M, Dilber M, Ringden O. Low-dose cyclosporine of short duration increases the risk of mild and moderate GVHD and reduces the risk of relapse in HLA-identical sibling marrow transplant recipients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24:629–35.
14. Ruutu T, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow, Transplantation (EBMT). Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:759–64.
15. Hendriks MP, Blijlevens NM, Schattenberg AV, Burger DM, Donnelly JP. Cyclosporine short infusion and C2 monitoring in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:521–5.
16. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1999;27:597–623.
17. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:457–68.
18. Dartois C, Freyer G, Michallet M, Henin E, You B, Darlavoix I, *et al*. Exposure-effect population model of inolimomab, a monoclonal antibody administered in first-line treatment for acute graft-*versus*-host disease. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46:417–32.
19. Bernareggi A, Rowland M. Physiologic modeling of cyclosporin kinetics in rat and man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1991;19:21–50.
20. Kawai R, Lemaire M. Role of blood cell uptake on cyclosporin pharmacokinetics. In: Tillement P, Eckert H, editors. *Proceeding of the International Symposium on Blood Binding and Drug Transfer*. Paris: EFC; 1993. p. 89–108.
21. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*. 1997;13:407–84.
22. Niederberger W, Lemaire M, Maurer G, Nussbaumer K, Wagner O. Distribution and binding of cyclosporin in blood and tissues. *Transplant Proc*. 1983;15:2419–21.
23. Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruelisauer A, Niederberger W, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1994;22:327–65.
24. Wagner O, Schreier E, Heitz F, Maurer G. Tissue distribution, disposition, and metabolism of cyclosporine in rats. *Drug Metab Dispos*. 1987;15:377–83.
25. Kelly P, Kahan BD. Review: metabolism of immunosuppressant drugs. *Curr Drug Metab*. 2002;3:275–87.
26. D'Argenio D, Schumitzky A. ADAPT II User's guide. *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software*. Los Angeles: Biomedical Simulations Resource; 1997.
27. Anderson BJ, Holford NH. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:303–32.
28. Bjorkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:691–704.
29. Edginton AN, Schmitt W, Willmann S. Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:1013–34.
30. Legg B, Gupta SK, Rowland M. A model to account for the variation in cyclosporin binding to plasma lipids in transplant patients. *Ther Drug Monit*. 1988;10:20–7.
31. National Cholesterol Education Program (NCEP). highlights of the report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 1992;89:495–501.
32. Girardet J-P. Management of children with hypercholesterolemia. *Pédiatrie*. 2006;13:104–10.
33. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:931–56.
34. Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta*. 2001;313:241–53.
35. Stein CM, Murray JJ, Wood AJ. Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem*. 1999;45:1477–84.
36. Marshall JD, Kearns GL. Developmental pharmacodynamics of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66:66–75.
37. Caruso R, Perico N, Cattaneo D, Piccinini G, Bonazzola S, Remuzzi G, *et al*. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem*. 2001;47:1679–87.
38. Barama A, Perner F, Beauregard-Zollinger L. Absorption profiling of cyclosporine therapy for de novo kidney transplantation: a retrospective randomized study comparing sparse sampling to trough monitoring [abstract no. 190]. *Transplantation*. 2000;69(Suppl):S162.
39. Keown PA. New concepts in cyclosporine monitoring. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11:619–26.
40. Lanino E, Rondelli R, Locatelli F, Messina C, Pession A, Balduzzi A, *et al*. Early (day -7) *versus* conventional (day -1) inception of cyclosporine-A for graft-*versus*-host disease prophylaxis after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children. Long-term results of an AIEOP prospective, randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:741–8.
41. Dini G, Lamparelli T, Rondelli R, Lanino E, Barbanti M, Costa C, *et al*. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;102:544–52.
42. Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*. 2004;36:229S–33S.

Article 2 :

**Links between cyclosporin exposure in tissues and graft-versus-host disease  
in pediatric bone marrow transplantation: analysis by a PBPK model**

Publication dans Pharmaceutical research en 2011



# Links Between Cyclosporin Exposure in Tissues and Graft-Versus-Host Disease in Pediatric Bone Marrow Transplantation: Analysis by a PBPK Model

Cécile Gérard · Nathalie Bleyzac · Pascal Girard · Gilles Freyer · Yves Bertrand · Michel Tod

Received: 18 August 2010 / Accepted: 28 September 2010 / Published online: 21 October 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

## ABSTRACT

**Purpose** In hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), cyclosporin is used to prevent graft-versus-host disease (GVHD). However, cyclosporin distribution in tissues is not linear, resulting in uncertainty regarding optimal dosing and monitoring. The objective of this study was to link the probability and severity of acute GVHD to cyclosporin exposure in blood, GVHD target organs, and lymphoid organs.

**Methods** A physiologically based pharmacokinetic model of cyclosporin disposition and logistic regression models were used. Sixty-one pediatric patients undergoing HSCT were studied. Cyclosporin was administered by intermittent ( $n = 31$ ) or continuous infusion ( $n = 30$ ).

**Results** At steady state (1 day before acute GVHD), exposures in all organs were related with the probability and severity of acute GVHD. Average cyclosporin concentration or, equivalently, its area under the curve (AUC) was the pharmacokinetic index best correlated with the anti-GVHD effect. Cyclosporin AUC in interstitial fluid of lymphoid organs was a superior index than that in blood, but marginally.

**Conclusion** Hence, AUC in blood maybe used as an index of cyclosporin efficacy. Using our model, target AUCs in blood could be defined for malignant and non-malignant diseases, as well as the equivalent target values for  $C_2$  and  $C_0$  concentrations.

C. Gérard · P. Girard · G. Freyer · M. Tod  
Université de Lyon  
Lyon 69003, France

C. Gérard · P. Girard · G. Freyer · M. Tod  
Faculté de Médecine Lyon Sud, Université Lyon I  
EA3738, CTO  
Oullins 69600, France

N. Bleyzac · Y. Bertrand  
Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique  
Lyon, France

N. Bleyzac  
Faculté de Médecine, Université Lyon I  
CNRS UMR5558  
Lyon 69008, France

M. Tod  
Pharmacie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon  
Lyon, France

M. Tod (✉)  
Pharmacie, Hôpital de la Croix-Rousse  
103 Grande rue de la Croix-Rousse  
69317 Lyon cedex 04, France  
e-mail: michel.tod@chu-lyon.fr

Y. Bertrand  
Faculté de Médecine Lyon Est, Université Lyon I  
Lyon, France

**KEY WORDS** bone marrow transplantation · cyclosporin · GVHD · PBPK modelling

## INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) may induce acute graft-versus-host disease (aGVHD), which mainly occurs in skin, liver, and intestines (1). Despite progress in prophylaxis, aGVHD is still responsible for significant morbidity and mortality in HSCT recipients (2). Cyclosporin, an immunosuppressant drug, is used to prevent aGVHD. This drug exhibits a relatively narrow therapeutic window (3) and large inter-individual pharmacokinetic variability. Therefore, in order to improve therapeutic efficacy and reduce aGVHD, it is critical to optimize the dose regimen of cyclosporin to achieve and maintain the concentration in the target range (4–6). Severe

GVHD carries a poor prognosis, with 25% long-term survival for grade III and 5% for grade IV (7).

In HSCT, cyclosporin is usually administered by intravenous infusion during the first 2 or 3 weeks following transplantation, before switching to the oral route. Continuous infusion (CI) and 2-h intermittent infusions (II) are commonly used, but there is no consensus regarding the best mode of administration (8). Our previous study, using a physiologically based pharmacokinetic model, showed that the area under the receptor occupancy *versus* time curve in the interstitial fluid of aGVHD target organs was greater after CI than after II, suggesting that CI maybe more efficacious (9).

There is also no consensus on the best way to monitor cyclosporin concentrations. The indices commonly considered for cyclosporin monitoring include trough concentration ( $C_0$ ), 2-h concentration ( $C_2$ , in case of administration by 2-h infusion or by the oral route), plateau concentration (in case of continuous infusion), and AUC. In solid organ transplantation, concentration sampling 2 h after administration is usually considered as the best single method to predict exposure and effect (side effects and rate of rejection) (10–13). Following renal transplantation, both  $C_2$  and  $C_0$  were shown to be useful in predicting cyclosporin side effects (14). However, abbreviated AUC monitoring identified patients at risk for acute rejection more accurately than  $C_2$  (15). In HSCT,  $C_0$  was found to be a better predictor of aGVHD than  $C_2$  (4,16). An inverse relationship also exists between the probability of severe aGVHD and the median cyclosporin concentration during the week before engraftment (17). Information regarding the possible association between aGVHD and cyclosporin AUC-12 h is not currently available (18).

The main objective of this study was to identify the pharmacokinetic index of cyclosporin exposure best correlated with aGVHD occurrence and severity. The second objective was to determine the target values of this index to maximize the probability of obtaining the desired grade of GVHD in malignant and non-malignant diseases.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical Study

This was a retrospective, monocentric study. We studied the records of pediatric patients (4 months to 17 years of age) that underwent allogeneic bone marrow transplantation and received cyclosporin for the prevention of graft-*versus*-host disease (GVHD). The patients gave a written consent to use their data at the time of admission. Cyclosporin treatment was started the day before transplantation. The patients comprised two groups. In the first group, 30 patients were treated with cyclosporin adminis-

tered by continuous infusion (CI group). In the second group, 31 patients received cyclosporin by intermittent infusion, twice daily (for 2 h every 12 h, II group). The patients in the two groups were matched for age, sex, indication for transplantation (malignant *vs.* non-malignant disease), proportion of related donors, administration of anti-lymphocyte serum, and number of mismatches when the donor was unrelated. The stem cell source was unmanipulated bone marrow from all donors. No methotrexate was administered.

For each patient, periodic monitoring of whole-blood cyclosporin concentration was performed (EMIT, Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA) on a Cobas Mira® analyzer automate. The dosing regimen was adjusted with a Bayesian method (USC\*Pack® Software, version 10.0, Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, USA) to achieve and maintain the target blood cyclosporin concentration. The target concentrations were defined as described in our previous studies (4,19). In the CI group, the target steady-state concentration was 200 µg/l (malignant disease) or 280 µg/l (non-malignant disease). In the II group, the target was a 12-h trough concentration of 110 µg/l (malignant disease) or 130 µg/l (non-malignant disease).

The aGVHD was graded according to the classification of Glucksberg modified by Armitage (20–22). This scale determines aGVHD severity (from grade 0 to IV, no aGVHD to maximum severity) by a combination of the scores of the three target organs (skin, intestines and liver) of aGVHD. These organs are graded independently from 0 to 4, corresponding to the extent of skin rash, diarrhea volume, and total bilirubin concentrations.

### PBPK Model in Pediatric Patients and Predicted Exposure

The pediatric physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model, including 11 organs validated in children (9), was fitted individually to the venous whole-blood cyclosporin concentrations of the 61 pediatric patients undergoing HSCT and receiving only cyclosporin as immunosuppressive treatment. For each patient, the data records included the dosing history, the first two concentration measurements, body weight, age, and hematocrit. The estimated parameters were the hepatic intrinsic clearance and the plasma unbound fraction of cyclosporin. A Bayesian estimator (*Maximum a Posteriori*) was used to estimate these parameters, as described in our previous study (9). The areas under the concentration *vs.* time curves (AUC D1, from 0 to 24 h after the onset of treatment, and AUC SS, at steady state) were estimated by numerical integration in several compartments (venous blood and interstitial compartments of bone including bone marrow, skin, liver, thymus, and intestines), using the dosing history

of each child. The time corresponding to steady state was defined as the day before the occurrence of aGVHD, or day 13 when no aGVHD occurred (median time to aGVHD was 14 days). A three-compartment open model was fitted to the individual concentration profiles in blood, simulated thanks to the PBPK model. The kinetic profiles obtained with the three-compartment model were indistinguishable from the profiles generated by the PBPK model. The three-compartment model was coupled with the interface model (described below) and allowed to calculate  $C_b(t)$ . Substituting the three-compartment model to the PBPK model was necessary for computational reasons, because the software used for subsequent analyses (NONMEM) could not easily handle a PBPK model involving a large system of ordinary differential equations.

**Interface Model**

In order to test the influence of the concentration profile (II versus CI) on the efficacy of cyclosporin (in terms of aGVHD), an interface model was constructed. This approach was introduced recently (23) for relating the drug concentration profile in the body and the pharmacodynamic (PD) response. This model is a nonlinear-effect compartment model that ensures the required sensitivity of the PD response with respect to drug dose and/or concentration variation. The concentration in the effect compartment,  $C_e$ , varies according to the following equation:

$$dC_e/dt = -\alpha \cdot C_e \cdot \exp(-\beta \cdot C_e) + H \cdot (C_b - C_{th})$$

where  $C_b$  is the blood cyclosporin concentration calculated using the three-compartment model,  $C_{th}$  is the threshold concentration, and  $H$  is a categorical variable equal to 1 if  $C_b$  is greater than  $C_{th}$ , and equal to zero otherwise. The parameter  $\alpha$  is the elimination rate constant from the effect compartment; it controls the delay between the kinetics of concentration in blood and the kinetics of effect. The parameter  $\beta$  controls the saturation mechanism from the effect compartment. When  $C_{th}=0$  and  $\beta=0$ , this model reduces to the usual effect compartment model. A nonlinearity in the transduction process would result in  $C_{th}$  or  $\beta$  greater than 0. The average concentration in the effect compartment over the preceding 24 h,  $C_{av}$ , was calculated as the 0–24 h AUC of  $C_e(t)$ , divided by 24. It was taken as a pharmacokinetic index to be related to the probability  $P$  of occurrence of aGVHD in a binary logistic regression model:

$$\text{Logit}(P) = a_0 - a_1 \cdot C_{av}$$

where  $a_0$  and  $a_1$  are regression parameters to be estimated. The parameter  $a_0$  controls the probability of aGVHD

when no drug is given, while  $a_1$  controls the rate of reduction of this probability by cyclosporin concentration unit. Because the estimates of parameters  $\alpha$  and  $a_1$  were expected to be highly correlated, the parameter  $\alpha$  was fixed to 1 so that at equilibrium, under the null hypothesis  $C_{th}=0$  and  $\beta=0$ , the concentrations  $C_e$  and  $C_b$  are equal. Hence, the parameters  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $\beta$ , and  $C_{th}$  were estimated by nonlinear regression, while the remaining parameters were fixed either to a common value ( $\alpha=1$ ) or to their individual estimate (pharmacokinetic parameters). The likelihood ratio test was used to test the hypothesis  $C_{th}=0$  and  $\beta=0$ .

**Binary Analysis of aGVHD Occurrence**

In this analysis, patients were quoted as 0 (no aGVHD) when their Glucksberg’s score was equal to 0, and quoted as 1 otherwise. First, the mean predicted AUC D1 and AUC SS in blood, and interstitial fluid of bone, thymus, and intestines were compared according to the occurrence of aGVHD. In the same way, AUC D1 and AUC SS in blood and skin were compared according to the occurrence of cutaneous aGVHD. Second, the influence of cyclosporin exposure and other covariates on the probabilities of aGVHD and aGVHD in skin was assessed by binary logistic regression with SPSS package (version 17, SPSS, Chicago, Illinois, USA). The covariates considered were AUC, age, body weight, sex, and infusion type. The logit probability of aGVHD was modeled as a linear function of these covariates. Significance of the relationship was assessed by comparing the slope of the linear function to zero by a  $t$ -test.

**Categorical Analysis of aGVHD Occurrence**

In this analysis, the five-grade aGVHD classification of Glucksberg (20–22) was used. In order to visualize the relationship between exposure and aGVHD grades, an exploratory graphical analysis was first performed by plotting the cumulative probabilities of Glucksberg’s grades as a function of cyclosporin AUC tertiles. Second, the mean AUCs in blood and organs by aGVHD grade (grades 0, 1, and  $\geq 2$ ) were compared by analysis of variance (ANOVA). Third, the links between cyclosporin exposure and total aGVHD grade or cutaneous aGVHD score were assessed by multinomial logistic regression. The logit of the cumulated probability of having a grade lower than a given value was modeled as a linear or nonlinear ( $E_{max}$ ) function of exposure.

The linear model was defined by the following equation:

$$\text{Logit}[P(Y \leq m)] = A_m + B \cdot AUC$$



where  $A_m$  and  $B$  were regression parameters to be estimated. The  $E_{\max}$  model was defined by the following equation:

$$\text{Logit}[P(Y \leq m)] = A_m + \frac{E_{\max} \cdot AUC^\gamma}{AUC_{50}^\gamma + AUC^\gamma}$$

where  $E_{\max}$  and  $AUC_{50}$  represent the maximum effect and the AUC producing 50% of the maximum effect, respectively.  $\gamma$  is the coefficient of sigmoidicity.

No random effect was considered. Parameter estimation was performed using the Laplacian method for likelihood computation in NONMEM (version VI, NONMEM Project Group, University of California, San Francisco, CA). In order to test the model's ability to predict the probability of observing a grade, qualification of the PD model was based on a visual predictive check. The distribution of predicted probabilities of aGVHD grades (0, 1, or  $\geq 2$ ) as a function of AUC SS tertiles in blood and intestines, calculated according to the logistic multinomial model, were compared with the observed probabilities. The distribution of the predicted probabilities was obtained by Monte-Carlo simulation, using the posterior distribution of the regression parameters of the multinomial model. The posterior distribution was assumed normal, with mean equal to the point estimate, and standard deviation equal to the standard error of the estimate.

#### Statistical and Pharmacokinetic Methods

Statistical analyses, including binary logistic regression, were performed using the SPSS package. Student's *t*-test was used to compare means, and the chi-square test was performed to compare proportions, with an alpha risk fixed at 5%. Pharmacokinetic and other non-linear regression analyses were carried out using the program NONMEM. For hypothesis testing during model building, the likelihood ratio test was used in case of nested models, based on the difference between the objective function values of the full and the reduced model, with alpha=5%. The Akaike's Information Criterion (AIC) was also calculated for model selection.

## RESULTS

### Clinical Study

Patient characteristics are summarized in Table I. An episode of aGVHD occurred in 34 patients (56%). In most cases, the disease was limited to skin; digestive and hepatic disease occurred only in approximately 10% of the patients. Therefore, only the grade of GVHD and the score of skin GVHD were considered in the analysis. The mean dose at

**Table I** Patient Characteristics

<i>n</i>	61
Median age (range), $\gamma$	6.72 (0.5–17)
Median body weight (range), kg	21.1 (5.6–63)
Sex (% male)	54.5
Disease (%)	
Acute lymphoblastic leukemia	26.2
Acute myeloid leukemia	27.9
Other malignant hematological diseases	13.1
Non-malignant hematological diseases	31.2
Metabolic diseases	1.6
Donor type (%)	
Related	52.5
Unrelated	47.5
aGVHD ( <i>n</i> )	
Total aGVHD	34
Cutaneous aGVHD	32
Digestive aGVHD	7
Hepatic aGVHD	6
Infusion type ( <i>n</i> )	
Intermittent	31
Continuous	30

day 1 was not significantly different in patients, whether aGVHD occurred or not ( $3.40 \pm 0.80$  vs.  $3.93 \pm 1.01$  mg/kg, *p*-value=0.10).

### Interface Model

In the context of the interface model, the average concentration of cyclosporin in the effect compartment was significantly related to the probability of aGVHD occurrence, when  $C_{th}$  and  $\beta$  were set to zero ( $p < 0.001$  compared to a model with  $a_I = 0$ ). Relaxing each assumption ( $C_{th} > 0$  or  $\beta > 0$ ) did not improve the fit; the difference in objective function values was less than 1. Hence, there was no evidence of nonlinearity in the effect compartment (at least those types of nonlinearities), and the transduction (in a broad sense, the link between receptor occupancy and anti-GVHD effect) could be regarded as a linear process. The probability of aGVHD was related to the average concentration, or equivalently, to the AUC over 24 h. Therefore, cyclosporin AUC was retained as a pharmacokinetic index in the pharmacodynamic analysis.

### Cyclosporin AUC and Probability of aGVHD

The PBPK model, fitted to the individual data of each child, allowed the estimation of cyclosporin AUCs in blood and in the interstitial fluid of the target organs. At day 1, mean AUCs were significantly different between patients

**Table II** Comparison of Mean AUC 0–24 h and AUC SS as a Function of Outcome

		aGVHD (n=34)	No aGVHD (n=27)	p-value, t-test
Mean AUC D1 ± SD (h.mg/l)	Blood	8.16±2.54	8.76±2.70	0.380
	Bone	3.22±0.83	3.79±1.11	0.032
	Thymus/Intestines	3.46±0.88	4.05±1.14	0.031
Mean AUC SS ± SD (h.mg/l)	Blood	7.52±3.06	10.1±4.61	0.011
	Bone	3.26±1.34	4.67±2.06	0.004
	Thymus/Intestines	3.27±1.36	4.69±2.07	0.004
		Cutaneous aGVHD (n=32)	No cutaneous aGVHD (n=29)	
Mean AUC D1 ± SD (h.mg/l)	Skin	1.75±0.45	2.08±0.60	0.02
	Blood	8.14±2.55	8.74±2.69	0.38
Mean AUC SS ± SD (h.mg/l)	Skin	1.81±0.76	2.50±1.13	0.007
	Blood	7.63±3.13	9.82±4.58	0.035

with and without aGVHD, in bone and lymphoid organs ( $p$ -value<0.05), but not in blood. At steady state, mean AUC in the same tissues was significantly greater when there was no aGVHD ( $p$ <0.05 in each case, Table II). Regarding cutaneous aGVHD, at day 1 and at steady state, the mean AUC in skin was significantly lower for patients who suffered cutaneous aGVHD, compared to those with no cutaneous aGVHD ( $p$ -value<0.05). In contrast, no significant difference was found for the mean AUC in blood between these two groups at day 1 (Table II).

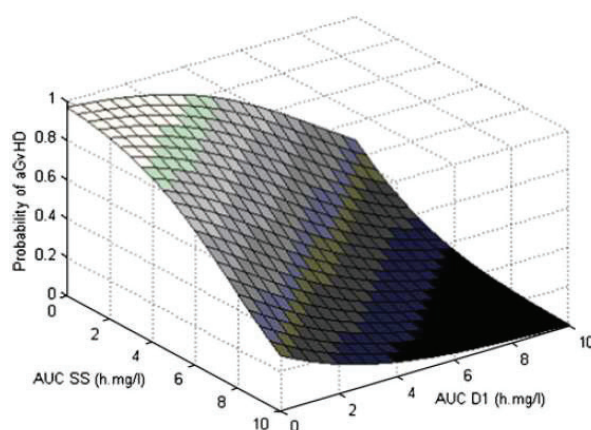
These results prompted us to characterize quantitatively the link between the probability of GVHD and cyclosporin exposure. At day 1, no link between blood cyclosporin AUC and the occurrence of aGVHD was found by binary logistic regression (Table III). Conversely, there were significant links between interstitial AUCs in lymphoid organs at the beginning of the treatment (AUC D1) and the occurrence of aGVHD ( $p$ -value<0.05). In the same way, AUC in skin was significantly related to the probability of

cutaneous aGVHD ( $p$ -value<0.05). At steady state, there were significant links between AUCs in blood and lymphoid organs and the occurrence of aGVHD ( $p$ <0.01 in each case, Table III).

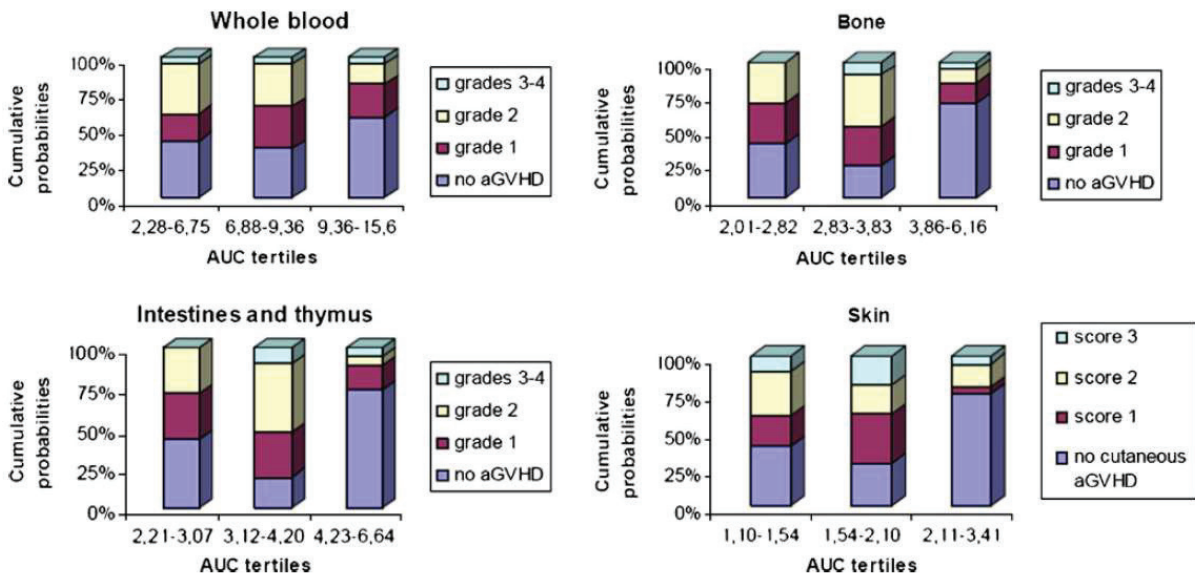
Sex, body weight, type of donor (related or unrelated), number of cells in the graft, and type of infusion were also tested as covariates. However, no covariate was found to be related to the outcome (data not shown). Cyclosporin infusion duration was not a significant covariate of aGVHD occurrence once AUCs were taken into account. When binary logistic regression took into account both AUC SS and AUC D1, only AUC SS remained a significant covariate ( $p$ -value<0.05, data not shown). A 3D representation of the probability of aGVHD as a function of AUC D1 and AUC SS in intestines, the most influential organ, is shown in Fig. 1. The figure shows that AUC SS variations have a greater influence on aGVHD probability than AUC D1.

**Table III** Binary Logistic Regression.  $\text{Logit}(\text{probability of aGVHD}) = a_0 + a_1 \cdot \text{AUC}$ ,  $p$ -value for  $a_1=0$

		Probability	$a_1$	$a_0$	$p$ -value, t-test
AUC D1	Blood	aGVHD	-0.09	0.991	0.37
	Bone	aGVHD	-0.611	2.36	0.03
	Thymus/Intestines	aGVHD	-0.588	2.43	0.03
	Skin	Cutaneous aGVHD	-1.19	2.37	0.04
AUC SS	Blood	aGVHD	-0.177	1.77	0.016
	Bone	aGVHD	-0.506	2.19	0.006
	Thymus/Intestines	aGVHD	-0.503	2.18	0.006
	Skin	Cutaneous aGVHD	-0.812	1.82	0.012



**Fig. 1** 3D representation of the probability of aGVHD function of AUC D1 and AUC SS in intestines.  $\text{Logit}(\text{probability of aGVHD}) = 3.36 - 0.39 \cdot \text{AUC D1} - 0.43 \cdot \text{AUC SS}$ .



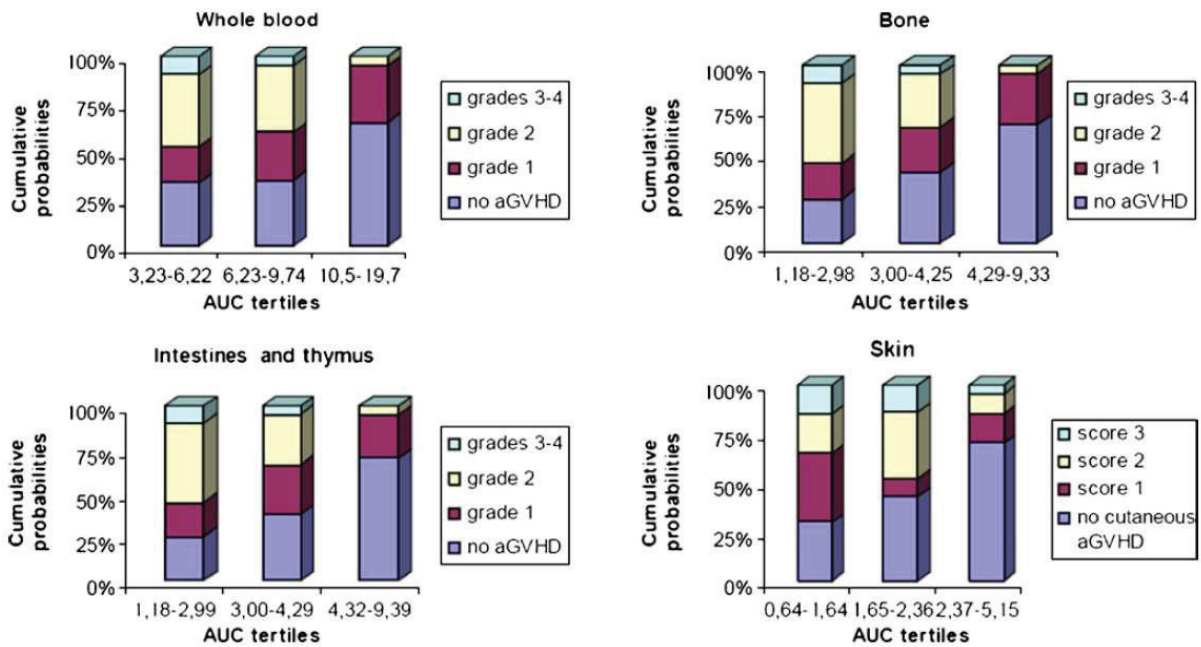
**Fig. 2** Cumulative probabilities of GVHD grades as a function of AUC at day 1 in blood, bone, thymus, intestines, and skin.

**Cyclosporin AUC and aGVHD Grade**

Graphical exploratory analysis revealed that total aGVHD grades and cutaneous aGVHD scores were apparently not related to cyclosporin exposure at day 1. On the contrary, at steady state, high cyclosporin exposure in blood and interstitial fluids seemed to be associated with higher probabilities of low-grade GVHD (Figs. 2 and 3). At the

beginning of cyclosporin treatment, for all lymphoid organs but not for the blood, aGVHD grade increased when there was a lower mean AUC D1. At steady state, for blood and lymphoid organs, the same trend was observed, and the difference between the three grades of aGVHD was statistically significant ( $p < 0.01$ , Table IV).

Regarding total aGVHD, AUC SS was a more significant covariate than AUC D1 ( $p$ -value  $< 0.01$ ). The



**Fig. 3** Cumulative probabilities of GVHD grades as a function of AUC at steady state in blood, bone, thymus, intestines, and skin.



**Table IV** Mean AUC as a Function of Outcome (Grade of aGVHD)

		aGVHD			p-value, t-test
		Grade 0 (n=27)	Grade 1 (n=15)	Grade ≥ 2 (n=19)	
Mean AUC 0–24 h ± SD (h.mg/l)	Blood	8.76 ± 2.70	8.87 ± 3.27	7.60 ± 1.66	0.250
	Bone	3.79 ± 1.11	3.33 ± 1.02	3.14 ± 0.67	0.072
	Thymus/Intestines	4.05 ± 1.14	3.55 ± 1.07	3.39 ± 0.72	0.076
Mean AUC SS ± SD (h.mg/l)	Blood	10.1 ± 4.61	8.74 ± 3.02	6.56 ± 2.81	0.010
	Bone	4.67 ± 2.06	3.61 ± 1.22	2.99 ± 1.42	0.005
	Thymus/Intestines	4.69 ± 2.07	3.62 ± 1.22	3.00 ± 1.43	0.005

$E_{max}$  model was not significantly better than the linear model. Grade of aGVHD was significantly related to AUC SS in blood and in bone, intestines, and thymus ( $p < 0.01$ ). According to the criterion of Akaike, the best model was the linear model involving AUC SS in organs, although the difference with the model involving AUC SS in blood was almost as good (AIC=126.4 vs. 124.2). No other potential covariate exerted a significant influence (data not shown). The parameter values of the best model are summarized in Table V. The predictive check revealed no invalidation of the model (Fig. 4). The probability of aGVHD grades (0, 1, or ≥ 2) as a function of AUC SS in blood, according to the logistic multinomial model, is shown in Fig. 5.

**DISCUSSION**

The main objective of this statistical analysis, based on a modeling approach, was to identify the pharmacokinetic index of cyclosporin exposure best correlated with aGVHD severity. The indices commonly considered for cyclosporin include the trough concentration, 2-h concentration, plateau concentration, and AUC. For practical reasons, all these indices are measured in blood. In our study, patients received cyclosporin by CI or II. In this way, a similar average concentration or AUC could be achieved through very different concentration profiles (with different  $C_2$  and  $C_{12}$  concentrations). This design, coupled with the analysis by an interface model, allowed us to disentangle the

influence of the concentration profile in blood, the hypothetical delay due to cyclosporin diffusion to the receptor, and hypothetical nonlinearity in the transduction process.

We found that average concentration was the pharmacokinetic index related to the anti-GVHD effect, irrespective of the concentration profile. As a consequence, administration of cyclosporin by II or CI may have equal efficacies, provided that the average blood concentration achieved is similar. The higher AUC of receptor occupancy in the interstitial fluid of aGVHD target organs yielded by CI, compared to II in our previous study (9), does not result in increased efficacy, probably because the difference in receptor occupancy is too small. As AUC is equal to the product of average concentration and dosing interval, AUC 0–24 h may also be used as a predictor of efficacy.

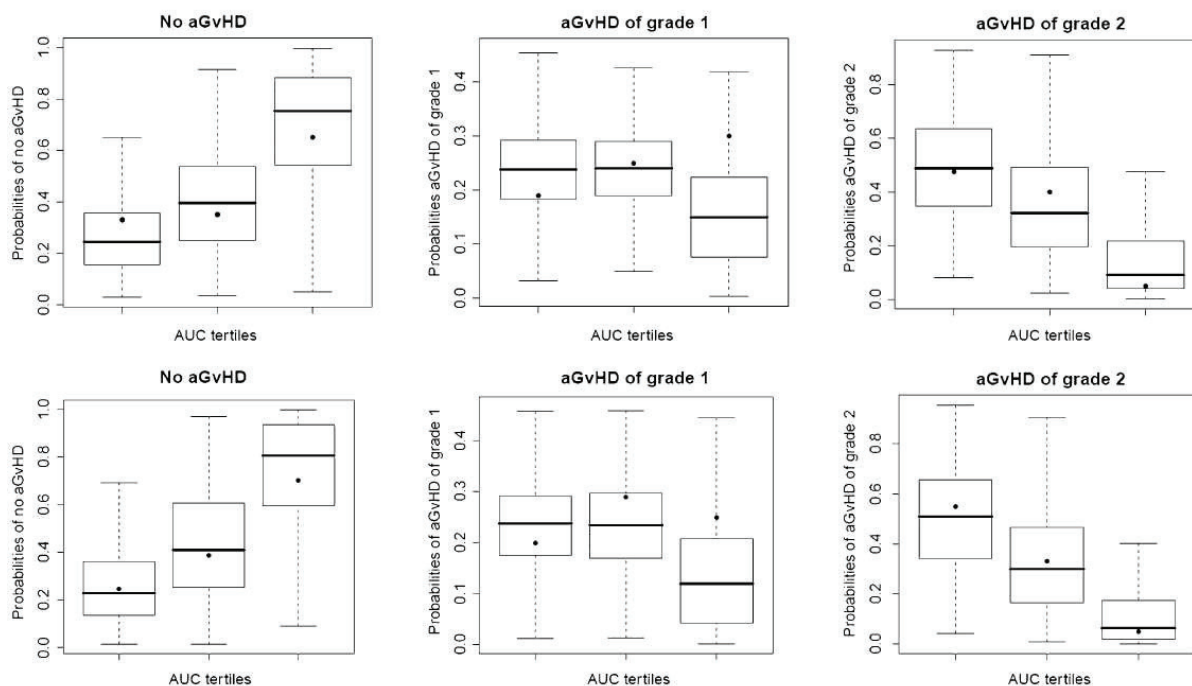
AUC D1 and AUC SS were both related to anti-GVHD efficacy in univariate analysis, but AUC D1 was no longer a predictor once AUC SS was taken into account in a multivariate analysis. This result may be explained by the high correlation between AUC D1 and AUC SS; it does not imply that the early achievement of adequate AUC is not important for prevention of aGVHD.

Cyclosporin AUC in interstitial fluid of lymphoid organs was a more significant index than that in blood, but only marginally, because AUCs in blood and interstitial fluids were correlated (data not shown). As a consequence, considering interstitial AUCs is not a beneficial strategy, and target AUCs in blood may be defined. Two cases should be considered.

**Table V** Parameter Values of the Best<sup>a</sup> Model for aGVHD Grade (RSE: Relative Standard Error)

Total aGVHD linear model with AUC SS in intestines		Estimate	RSE (%)
Logit of baseline probability, grade < 1 (baseline probability, %)		-2.4 (8)	36
Logit of baseline probability, grade < 2 (baseline probability, %)		-1.2 (23)	24
slope B (l.mg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0.56	37
Total aGVHD linear model with AUC SS in blood		Estimate	RSE (%)
Logit of baseline probability, grade < 1 (baseline probability, %)		-2.13 (11)	36
Logit of baseline probability, grade < 2 (baseline probability, %)		-0.96 (28)	24
slope B (l.mg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0.214	35

<sup>a</sup> the best model is the model with the lowest AIC value

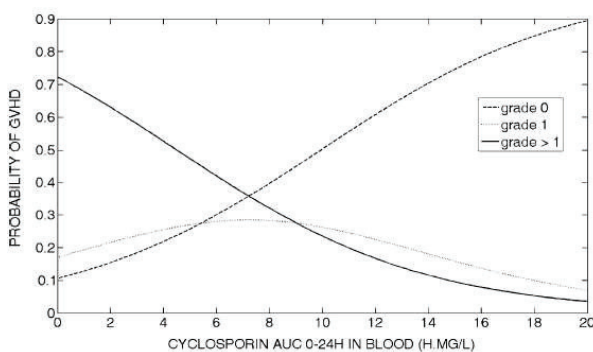


**Fig. 4** Probability of aGVHD grades (0, 1 or  $\geq 2$ ) as a function of AUC SS tertiles in blood (*upper panel*) and intestine (*lower panel*), according to the logistic multinomial model. Each *box-plot* represent the distribution of the predicted probability, obtained by Monte-carlo simulation of the posterior distribution of the regression parameters of the model. The observed probability is represented by the *full circle* (●).

In the case of malignant disease, a grade 1 GVHD is desired for its anti-leukemia effect (24). A target AUC of approximately 10 h.mg/l may be chosen in order to maximize the probability of grade 1, but minimize the probability of grade  $\geq 2$  (Fig. 5). This target AUC is equivalent to an average cyclosporin concentration of 420  $\mu\text{g/l}$ . According to our pharmacokinetic model, under 2-h intermittent infusion, the corresponding values for  $C_2$  and  $C_{12}$  are 1,000  $\mu\text{g/l}$  and 80  $\mu\text{g/l}$ , respectively. These predictions agree with the target concentrations used in several studies: plateau concentration of 450 to 520  $\mu\text{g/l}$  (25), 150 to 400  $\mu\text{g/l}$  (26), 250 to

400  $\mu\text{g/l}$  (27),  $C_2$  observed by Hendriks (28) or Barkholt (16) and  $C_{12}$  observed by Martin (4). The agreement of our prediction with target values considered as relevant on clinical grounds is strongly supportive of our model. As a result, the model may be used to explore *in silico*, by simulation, the efficacy of different dosing strategies.

On the other hand, in the case of non-malignant disease, a grade 0 GVHD is desired. The target exposure is therefore different. An AUC of approximately 16 h.mg/l is associated with the absence of GVHD with a probability of 80% (Fig. 5). This value is equivalent to a plateau concentration of 660  $\mu\text{g/l}$ , a  $C_2$  of 1,600  $\mu\text{g/l}$ , and a  $C_{12}$  of 120  $\mu\text{g/l}$ .



**Fig. 5** Probability of aGVHD grades (0, 1, or  $\geq 2$ ) as a function of AUC SS in blood, according to the logistic multinomial model.

## CONCLUSION

In HSCT, the best pharmacokinetic index relating the anti-GVHD effect to cyclosporin exposure was its average concentration or, equivalently, its AUC. This finding is an indirect argument for equal efficacies of CI and II. Cyclosporin AUC in interstitial fluid of lymphoid organs was a better index than in blood, but only marginally. Because AUCs are much more easily measured in blood than in interstitial fluids, AUC in blood may be used as an index of cyclosporin efficacy. We employed a logistic model and a PBPK model to define target AUCs in blood, as well



as the equivalent target values for  $C_2$  and  $C_{12}$  concentrations. These results may help to better design clinical studies aimed at comparing dosing strategies, rates of infusion and/or targets for therapeutic drug monitoring.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## REFERENCES

- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373:1550–61.
- Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001;411:385–9.
- Bowers LD. Therapeutic monitoring for cyclosporine: difficulties in establishing a therapeutic window. *Clin Biochem*. 1991;24:81–7.
- Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, et al. Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-versus-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:777–84.
- Byrne JL, Stainer C, Hyde H, Milfin G, Haynes AP, Bessell EM, et al. Low incidence of acute graft-versus-host disease and recurrent leukaemia in patients undergoing allogeneic haemopoietic stem cell transplantation from sibling donors with methotrexate and dose-monitored cyclosporin A prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:541–5.
- Carlens S, Aschan J, Remberger M, Dilber M, Ringden O. Low-dose cyclosporine of short duration increases the risk of mild and moderate GVHD and reduces the risk of relapse in HLA-identical sibling marrow transplant recipients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24:629–35.
- Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005;106:1495–500.
- Ruutu T, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow, Transplantation (EBMT). *Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT*. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:759–64.
- Gerard C, Bleyzac N, Girard P, Freyer G, Bertrand Y, Tod M. Influence of dosing schedule on organ exposure to cyclosporin in pediatric hematopoietic stem cell transplantation: analysis with a PBPK-PD model. *Pharm Res*. 2010. doi:10.1007/s11095-010-0252-1.
- Morris RG, Russ GR, Cervelli MJ, Juneja R, McDonald SP, Mathew TH. Comparison of trough, 2-hour, and limited AUC blood sampling for monitoring cyclosporin (Neoral) at day 7 post-renal transplantation and incidence of rejection in the first month. *Ther Drug Monit*. 2002;24:479–86.
- Pescovitz MD, Barbeito R. Two-hour post-dose cyclosporine level is a better predictor than trough level of acute rejection of renal allografts. *Clin Transplant*. 2002;16:378–82.
- Caforio AL, Tona F, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Fortina AB, et al.  $C_2$  is superior to  $C_0$  as predictor of renal toxicity and rejection risk profile in stable heart transplant recipients. *Transpl Int*. 2005;18:116–24.
- Li J, Dahmen U, Beckebaum S, Cicinnati V, Valentin-Gamazo C, Frilling A, et al. Target range maximum of cyclosporine blood concentration two hours post dose in stable liver transplant patients. *Eur J Med Res*. 2006;11:139–45.
- Rodrigo E, Ruiz JC, Angeles de Cos M, Ruiz J, Gago M, Pimera C, et al. Correlation of  $C_0$  and  $C_2$  levels with cyclosporine side effects in kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:2328–31.
- Troncoso P, Ortiz AM, Jara A, Vilches S. Abbreviated AUC monitoring of cyclosporine more adequately identified patients at risk for acute rejection during induction of immunosuppressive therapy after kidney transplantation than recommended  $C_2$  concentration values. *Transplant Proc*. 2009;41:127–30.
- Barkholt L, Remberger M, Bodegard H, Ringden O, Bottiger Y. Cyclosporine A (CsA) 2-h concentrations vary between patients without correlation to graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:683–9.
- Punnett A, Sung L, Price V, Das P, Diezi M, Doyle J, et al. Achievement of target cyclosporine concentrations as a predictor of severe acute graft versus host disease in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and receiving cyclosporine and methotrexate prophylaxis. *Ther Drug Monit*. 2007;29:750–7.
- Sibbald C, Seto W, Taylor T, Saunders EF, Doyle J, Dupuis LL. Determination of area under the whole blood concentration versus time curve after first intravenous cyclosporine dose in children undergoing hematopoietic stem cell transplant: limited sampling strategies. *Ther Drug Monit*. 2008;30:434–8.
- Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, et al. Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-versus-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:881–7.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18:295–304.
- Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994;330:827–38.
- Michallet M, Dhedin N, Michallet AS. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for hematological malignancies. *Bull Cancer*. 2001;88:908–26.
- Meille C, Iliadis A, Barbolosi D, Frances N, Freyer G. An interface model for dosage adjustment connects hematotoxicity to pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008;35:619–33.
- Neudorf S, Sanders J, Kobrin N, Alonzo TA, Buxton AB, Gold S, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myelocytic leukemia in first remission demonstrates a role for graft versus leukemia in the maintenance of disease-free survival. *Blood*. 2004;103:3655–61.
- Miller KB, Schenkein DP, Comenzo R, Erban JK, Fogaren T, Hirsch CA, et al. Adjusted-dose continuous-infusion cyclosporin A to prevent graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 1994;68:15–20.
- Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000;96:2062–8.
- Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, et al. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:549–52.
- Hendriks MP, Blijlevens NM, Schattenberg AV, Burger DM, Donnelly JP. Cyclosporine short infusion and  $C_2$  monitoring in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:521–5.

Article 3 :

**Determination of the most influential sources of variability of tacrolimus  
trough blood concentrations in adult liver transplant patients:  
*a bottom-up approach***

Soumis à AAPS journal en décembre 2012

# Determination of the most influential sources of variability in tacrolimus trough blood concentrations in adult liver transplant recipients: *a bottom-up approach*

**Authors:** C. Gérard<sup>1</sup>, J. Stocco<sup>2</sup>, A. Hulin<sup>3</sup>, B. Blanchet<sup>4</sup>, C. Verstuyft<sup>5</sup>, M. Tod<sup>1</sup>

## **Institutions:**

1. EMR 3738 Ciblage Thérapeutique en Oncologie, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université de Lyon, France
2. Pharmacie, Hôpital Beaujon, APHP, Clichy, F-92110, France,
3. Toxicologie, Hôpital Henri Mondor, APHP, Créteil, F-94010, France,
4. UF de Pharmacochimie et de Pharmacocinétique Plateforme de dosages de médicaments Hôpital Cochin, APHP, F-75014 Paris, France
5. Pharmacologie, Hôpital Bicêtre, Paris, F-75011, France.

## **Name and address for correspondence:**

Pr Michel Tod

EMR 3738, Ciblage Thérapeutique en Oncologie

Faculté de médecine Lyon Sud, BP 12

Chemin du grand revoyet

69921 Oullins

France

E-mail : michel.tod@chu-lyon.fr

Phone number: +33 4 72 07 26 63

Fax number: +33 4 72 07 18 94

**Key words:** tacrolimus, bottom-up approach, therapeutic drug monitoring

**Word counts:** 5100 (5000 recommandés)

**Acknowledgments section**

## **Abstract**

Tacrolimus, an immunosuppressant drug used after liver transplantation, presents a narrow therapeutic window and a large pharmacokinetic variability with poor correlation between drug dosing regimen and blood concentration. The objective was to identify predictive factors influencing tacrolimus trough concentrations ( $C_0$ ) using a bottom-up approach. A physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model of tacrolimus was proposed, taking into account the body weight, the proportion of adipose tissue (p<sub>fat</sub>), hematocrit, lipid fraction of organs, liver function, CYP3A5 genotype of liver donor, plasma unbound fraction of tacrolimus (f<sub>up</sub>) and concomitant drugs (CYP3A4 inhibitors). For the evaluation of the PBPK model, mean trough concentration and concentrations 2 hours after oral dose of tacrolimus were compared with those from 66 liver transplant recipients included in a multicentric pharmacokinetic study and were found very close. Tacrolimus concentration profiles were simulated in a virtual population defined by a set of covariate values similar to those from the real population. The sensitivity of tacrolimus  $C_0$  with respect to each covariate has been tested in order to identify the most influential ones. With the range of covariate values tested, the impact of each covariate on tacrolimus  $C_0$  variation may be ranked as follows: bioavailability, Child-Pugh score, body weight, hematocrit, f<sub>up</sub>, CYP3A5 polymorphism, p<sub>fat</sub>, and CYP3A4 inhibitory drug-drug interaction. Values for initial dosing regimen of tacrolimus in order to reach a  $C_0$  of 15 ng/ml at day 5 as a function of CYP3A5 donor genotype and patient's hematocrit and body weight have been proposed.

## Introduction

Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, is an immunosuppressant agent (1, 2) used for the prevention of graft rejection after solid organ transplantation (liver, kidney and heart). Tacrolimus presents a narrow therapeutic window and a large pharmacokinetic variability with poor correlation between drug dosing regimen and blood concentrations (3). Whole-blood concentration of tacrolimus must be monitored. In practice, the whole-blood trough concentrations of tacrolimus ( $C_0$ ) measured 12 h after the dose (just before the next dose) is used to adjust daily oral doses. After liver transplantation, target whole blood concentrations ranges are 5 to 20 ng/ml (4, 5). A progressive decrease in target whole blood trough concentrations after liver transplantation is commonly used: ranges of 15 to 20 ng/ml during the first 2 weeks, 10 to 15 ng/ml during the next 2 weeks, and 8 to 10 ng/ml thereafter (6). Achieving and maintaining therapeutic trough concentration is essential during the early post-transplantation period, when the risk of acute rejection is the most important. Moreover, maintaining the  $C_0$  below 15 ng/ml decreases the occurrence of nephrotoxicity (7, 8).

Tacrolimus is a substrate for the drug transporter P-glycoprotein (PgP) and cytochrome (CYP) P4503A, mainly CYP3A5. Polymorphisms in genes coding for CYP3A5 and PgP have been widely studied and explain a part of the interindividual variability in tacrolimus pharmacokinetics (9).

Regarding CYP3A5, a very frequent single nucleotide polymorphism (SNP) within intron 3 of CYP3A5 (6986G >A) is the primary cause of CYP3A5 protein polymorphism (10, 11). The presence of *CYP3A5\*3* allele (also called 'mutant' allele) results in the absence of the functional CYP3A5 protein in homozygous carriers (*CYP3A5\*3/\*3*). Patients with at least one *CYP3A5\*1* allele (defined as the 'wild-type' allele) are classified as CYP3A5 expressors (12). The proportion of patients with *CYP3A5\*1/\*1* and *CYP3A5\*1/\*3* genotype in caucasian population is 1.2% and 16.8% respectively (13).

PgP acts as a transmembrane efflux pump that exports substrates from the inside of the cell to the exterior environment (14). PgP affects the absorption of drugs from the gut and their distribution among the body's compartments and also their metabolism and excretion (15). PgP is produced by the multidrug resistance (*MDR1*) or *ABCB1* gene (16). The SNP the most studied is located in exon 26 (3435C>T). In the gut, strong expression of PgP corresponding to patients homozygous carriers of C allele (CC genotype) may reduce drug absorption (14).



In the early post-transplantation period, the adjustment of tacrolimus dosing regimen is difficult. Indeed, during this period, tacrolimus has large and very variable half-life of elimination, variable activity of intestinal CYP3A4 and PgP, etc... In addition, the genotype of CYP3A5 and PgP of the donor and the recipient may differ. Finally, the gradual recovery of liver function, mainly in the first two weeks, may cause a change in the elimination of tacrolimus, requiring a frequent adjustment of the dosing regimen. Some population pharmacokinetic (PK) studies have been conducted, resulting in a partial characterization of factors of variability in the pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant recipients, adult or child (6, 17-21). Factors of variability in clearance most commonly found were type of graft (6, 17), activity of aspartate aminotransferase (AST) (17, 19) and the time post-transplantation (20, 21). However, the unexplained variability in these population studies remains high and other factors should be explored.

Identification of the most significant covariates influencing the dosing regimen might be clinically important for rapid achievement of the optimal therapeutic C<sub>0</sub> of tacrolimus. The current top-down approach, based on statistical approaches to determine significant covariates among a large set of demographic or biologic indices in a clinical PK study, has reached its limits because the unexplained variability remains large. The bottom-up approach for identifying relevant covariates has recently been advocated (22, 23). In the latter approach, the factors influencing the PK of a drug are determined by simulations based on a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model.

The objective of the study was to identify predictive factors (physiological and pharmacogenomic factors) influencing tacrolimus trough whole blood concentrations using a PBPK model and a bottom-up approach. The model was built and evaluated using data from a population PK study of tacrolimus during the first 15 days after liver transplantation. The determination of these relevant covariates may help clinicians to select the initial dosing regimen of tacrolimus as a function of the characteristics of the liver transplant recipient.

## **Patients and Methods**

### **Preliminary population pharmacokinetic study**

This open-label, noncomparative, prospective, observational study was conducted in adult patients in three hospitals (Beaujon, Cochin, Henri Mondor) from the Assistance Publique-Hopitaux de Paris, France. The protocol was approved by the local ethics committee of Henri Mondor hospital, and written informed consent was obtained from each patient.

From September 2006 to July 2010, 66 adult liver transplant recipients receiving oral tacrolimus after liver transplantation were included in this study. Data were collected during hospitalisation from 1 to 15 days following transplantation. For each patient, at least 3 blood samples (at time 0, 2h and 6h after the dose) were collected at D2, D7 and D14.

For each patient, data collected were:

- patient characteristics: body weight (BW), age and gender
- biological data: total protein concentration in plasma, albumin concentration, coagulation factor V, prothrombin time, total and conjugate bilirubin, alkaline phosphatase (AP), Gamma glutamyl transferase (GGT), Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), serum creatinine concentration (SCR), red blood cell count and hematocrit.
- genotypic data for each donor and transplant recipient: CYP3A5 (6986G>A) and PgP (3435C>T) genotypes.
- concomitant CYP3A4 inhibitor drugs for which the level of inhibition (no inhibition, low inhibition and high inhibition) was estimated in function of the inhibitor drug and its dosing regimen. Inhibitor drugs were voriconazole, fluconazole, midazolam, nicardipine and amiodarone. For example, the level of inhibition for fluconazole was considered to be low or strong when the dosing regimen was from 50 to 150 mg per day or from 200 to 400 mg per day, respectively.

Concentrations of tacrolimus in whole blood were assessed by EMIT. According to manufacturer's information, the lower limit of quantification of the assay was 2 ng/ml, and it was linear over the range 2-40 ng/ml.

Population PK analysis was carried out by using Monolix V3.1 software (24). One- and two-compartment models were evaluated. The PK parameters were assumed to follow a lognormal distribution and for intra-individual variability, an exponential error model was used.

The covariate model was established using the forward inclusion–backward elimination method (25). In the first step, the base model was developed without any covariates. In the second step, each candidate covariate was screened one by one. The effect of a covariate was assessed using the likelihood ratio test, i.e. the chi-squared test of the difference between the objective function values (OFVs) of the base model without covariate and the model including the covariate. A  $p$  value less than 0.05 was needed for inclusion in the covariate model. In the next step, all statistically significant covariates were included in turn into the base model to develop an intermediate multivariate model. In the final backward elimination step, a  $p$  value less than 0.01 was required for the retention of a parameter in the model. The predictive performance of the final model was evaluated by a visual predictive check.

### **PBPK model: distribution and absorption**

A PBPK model of tacrolimus was built from the generic model for lipophilic drugs proposed by Levitt (26). As tacrolimus is more lipophilic than cyclosporin, the influence of the intracellular binding to FK binding protein (FKBP) was neglected in comparison to the binding to lipids.

Our PBPK model comprised 13 compartments representing important tissues, organs or other spaces within the human body. These anatomical compartments were arterial and venous blood, portal vein, lung, liver, adipose tissue, kidney, brain, heart, skin, muscles, tendon and others. “Tendon” refers to connective tissue, consisting of tendons, cartilage, and subcutaneous tissues. It was assumed that the drug distributes within the body via transport by the blood flow and via passive diffusion homogeneously into organs and tissues. The flow diagram of the PBPK model is presented in figure 1.

The parameters involved in the PBPK model were as follows. Each organ  $i$  was characterized by its mass,  $V(i)$  (kg), the fraction of water in organ  $i$ ,  $w_{\text{frac}}(i)$  (L/kg) (27), the fraction of lipid in the organ  $i$ ,  $l_{\text{frac}}(i)$  (kg/kg) and the blood flow of the organ  $Q(i)$  (L/h/kg).



All organs were assumed well-stirred and the uptake rate of the drug into tissues is limited by blood flow, not by the diffusion rate across cell membranes (28). Each organ  $i$  was characterised by a tissue-to plasma partition coefficient  $K_p$ , calculated by the following equation:

$$K_p(i) = f_{u_p} * (w_{frac}(i) + l_{frac}(i) * P_{oil}) / w_{frac}_p$$

where  $P_{oil}$  is the oil/water partition coefficient. For tacrolimus, experimental  $\text{Log}P = 3.3$  (29).  $w_{frac}_p$  is the fraction of water in plasma (0.94 L/kg) (30, 31). The plasma unbound fraction of tacrolimus ( $f_{u_p}$ ) was set to 0.012 (32).

The mass of each organ was adjusted with respect to body weight (BW) and mass of adipose tissue, as follows. For a 35 years old patient with body weight and height of the standard human (a male of 70 kg, 1.73 m, 1.83m<sup>2</sup>), the proportion of adipose tissue (denoted  $p_{fat}$ ) is 20% (33). Because the adipose compartment is assumed to contain 80% fat and 20% water, the mass of adipose tissue was a function of the body weight and the proportion of adipose tissue:

$$V_{adipose} = BW * p_{fat} / 0.80$$

For the standard human, the mass of adipose tissue is therefore 17.5 kg. The mass of other organs was corrected by a factor ( $cor$ ) depending on the mass of adipose tissue:

$$cor = (BW - V_{adipose}) / (70 - 17.5)$$

A saturation of the binding of tacrolimus to red blood cells has been shown (34). Hence, blood to plasma ratio (BPR) was related to hematocrit ( $hct$ ) and plasma concentration ( $C_p$ ) of tacrolimus by the following equation:

$$BPR = 1 + hct * \frac{B_{max}}{K_D + C_p}$$

where  $B_{max}$  is the binding capacity and  $K_D$  the affinity constant. This saturation was included in the model from equations proposed by Levitt (26).

The unbound fraction of tacrolimus in blood,  $f_{u_b}$ , was related to tacrolimus concentration in blood,  $C_b$ , by the following equation:

$$f_{u_b} = (1+k*C_b)/(1+k*C_b+k*B_{max})$$

where

$$k = 1/(K_D*f_{u_p})$$

Finally, the binding capacity was linearly related to the hematocrit:

$$B_{max} = \text{median}(B_{max})*(hct / 0.29)$$

where median ( $B_{max}$ ) was estimated from the data of 6 patients (see below) and 0.29 is the median hematocrit in the population of liver recipients.

Tacrolimus absorption was assumed first-order. Values of the rate constant of absorption  $K_a$  and bioavailability  $F$  were set to 4.5 h<sup>-1</sup> (34) and 0.2 (35), respectively. In order to test the possible influence of the PgP genotype, different values of bioavailability were explored, from 0.10 to 0.40.

### **PBPK model: hepatic clearance**

The liver was assumed to be the only eliminating organ and a well stirred model of hepatic clearance was used (36). Thus, hepatic clearance  $CL_h$  was calculated from intrinsic clearance  $CL_i$  and tacrolimus unbound fraction in blood  $f_{u_b}$ , with the following equation:

$$CL_h = (Q_h*f_{u_b}*CL_i) / ((Q_h + f_{u_b}*CL_i)*w_{frac}*1.06)$$

where  $w_{frac}$  is the liver water fraction and 1.06 is blood density.

For a given patient, the value of the intrinsic clearance ( $CL_i$ ) was calculated from the value of the standard human  $CL_{i_{typ}}$  and other parameters accounting for genotype, drug-drug interactions, and severity of cirrhosis. The equation contained 3 parts: for CYP3A5, CYP3A4 and for other routes:

$$CL_i = (CR_{CYP3A5} * FA + CR_{CYP3A4} * FM_{CYP3A4} * (1-IR) + CR_{other}) * FM * CL_{i_{typ}}$$

where CR was the contribution ratio of the CYP, FA was the fraction of activity of CYP3A5 depending on genotype, IR the inhibition ratio of concomitant CYP3A4 inhibitor drug, FM was the fraction of functional liver mass and  $FM_{CYP3A4}$  was the CYP3A4 fraction of FM. FM and  $FM_{CYP3A4}$  may be reduced in case of liver impairment. A value of  $CL_{i_{typ}}$  of 10 600 L/h was used (see below).

The value of the contribution ratio of CYP3A5 for tacrolimus was calculated from oral clearance of \*1\*1 patient (CYP3A5 expressors) and \*3\*3 patient (non-expressors) as proposed by Ohno (37) :

$$CR_{CYP3A5} = (CL_{oral} - CL_{oral(noCYP3A5)}) / CL_{oral}$$

The values of FA were set at 1, 0.5 and 0, for \*1\*1, \*1\*3 and \*3\*3 genotypes of CYP3A5, respectively.

At day 28 after liver transplantation,  $CR_{CYP3A5}$  of tacrolimus was found to be 0.40 (38). Because tacrolimus is more metabolised by CYP3A5 than by CYP3A4, values for  $CR_{CYP3A4}$  and  $CR_{otherCYP}$  were set to 0.25 and 0.35, respectively.

When there was no association with a CYP3A4 inhibitor drug, IR was set to 0. For low and moderate inhibition, IR was set to 0.10 and 0.60, respectively. These values are consistent with the IRs of CYP3A4 inhibitors determined by Ohno (37).

The value of FM and  $FM_{CYP3A4}$  covariates were set to 1 for patients with normal liver function. These values were reduced to simulate cirrhosis and values were function of the severity of cirrhosis (score of Child Pugh) (39) (see below).

## Strategy of the PBPK model building

The PBPK model was written as a set of differential equations that describes the variation of the unbound concentration in the water of the tissue and the total concentration of tacrolimus in whole blood. The model was implemented in the software ADAPT II (40).

The PBPK model was fitted individually by nonlinear regression (weighted least-squares) to the venous tacrolimus concentrations of 6 patients from the clinical study, in order to better adjust the value of some parameters. Estimated parameters were the binding capacity (B<sub>max</sub>) and affinity constant (K<sub>D</sub>) to red blood cells and the hepatic intrinsic clearance for standard human (CL<sub>I<sub>typ</sub></sub>). The median value of each parameter was used to perform simulations for the standard human (body weight of 70 kg with a healthy liver, a CYP3A5 \*3\*3 genotype and without drug-drug interaction).

This model takes into account the body weight, proportion of adipose tissue (related to age, sex and height), hematocrit, lipid fraction of organs, mass and blood flow of organs, liver function, CYP3A5 genotype of liver cells and concomitant drugs (CYP3A4 inhibitors).

## Compartment lumping

A lumping of compartments was done to reduce the number of compartments and simplify the model. The lumping method recently proposed by Pilari and Huissinga was used (41) to identify organs and tissues that can be to be lumped together. This method determines the number and composition of lumped compartments based on the normalized PK profiles in the distribution and elimination phase. Each concentration-time profile C<sub>tis</sub>(t) was normalized by its corrected tissue-to-blood partition coefficient:

$$\text{Normalized Concentration} = \frac{C_{\text{tis}}(t)}{K_{\text{tis}}(1 - E_{\text{tis}})}$$

where E<sub>tis</sub> denotes the tissue extraction ratio. For non-eliminating tissues, E<sub>tis</sub> = 0, while for eliminating tissues E<sub>tis</sub> range from 0 to 1. In our PBPK model, only the liver is an eliminating organ, with extraction ratio E<sub>liv</sub>. This extraction varies with dose, because fu<sub>b</sub> varies, due to red blood cells binding saturation.

The normalized concentration-time profiles are used to identify groups of compartments of the initial PBPK model that are kinetically similar (i.e., superimposable). Organs to be lumped together were identified by a visual inspection of the plot of normalized concentration. Then, for each group of tissues, the lumped volume, blood flow and partition coefficient were determined in order to simulate the lumped model and to predict the lumped concentrations (41).

### **Evaluation of the PBPK model**

Tacrolimus concentration profiles were simulated in a virtual population defined by a set of covariate values (body weight and hematocrit) similar to those from the real population of 66 transplanted patients included in the multicentric PK study. For the evaluation of the PBPK model, simulated  $C_0$  and blood concentrations 2 hours after oral dose of tacrolimus ( $C_2$ ) at steady state (day 5, 120h) were compared with those observed in the clinical study.

Comparisons were made for the different CYP3A5 genotypes of the donor and different degrees of CYP3A4 inhibition by association with CYP3A4 inhibitors. Comparisons with different ranges of values of body weight and of hematocrit were also performed.

### **Evaluation of the impact of potential covariates**

To perform simulations with the PBPK model, coefficient of variation for each variable was chosen to match with the range observed in the population of 66 liver transplant recipients. Values of covariates are represented in table I. For all covariates, a lognormal distribution was assumed.

Physiological variables in the model that could be modified to perform simulations were: body weight, proportion of adipose tissue, hematocrit, plasma unbound fraction of tacrolimus, proportion of fat in organs, bioavailability, blood flows (of hepatic artery, portal vein, adipose tissue and lumped compartment), functional liver mass, fraction of activity of CYP3A5 and CYP3A4 inhibition ratio of the associated drug.

Liver cirrhosis is the end stage of every chronic liver disease. It is characterized by the formation of fibrous tissue associated with the destruction of the architecture of the liver. There is a decrease in functional hepatocytes and alterations in blood flow with the development of portacaval shunts, ascites and gastrointestinal bleeding. The progression of the disease may be classified using the Child-Pugh score which defines the level of severity (42). The scoring system is based on five parameters, namely serum bilirubin, serum albumin, prothrombin time, ascites and encephalopathy. Three scores are possible: A, B or C corresponding to well compensated disease, significant functional compromise and decompensated disease, respectively (43). From the physiological model perspective, four parameters are required to describe the changes occurring in patients with cirrhosis: blood flows of portal vein and hepatic artery, proportion of functional liver mass and proportion of activity of CYP3A4 (39). Values of these parameters are represented in table II (39).

Correlations between variables were accounted for. Positive correlations were integrated between functional liver mass and blood flow of portal vein, fraction of activity of CYP3A4 and blood flow of portal vein and between fraction of activity of CYP3A4 and functional liver mass. Negative correlations were integrated between blood flow of hepatic artery and portal vein, functional liver mass and blood flow of hepatic artery, and between blood flow of hepatic artery and fraction of activity of CYP3A4.  $r$  was arbitrarily fixed at 0.9 or -0.9 for each correlation.

In order to quantify the effect of all these variables on  $C_0$  of tacrolimus, simulations of 500 patients were done with ADAPT II (40). In all cases, the dosing regimen was 0.03 mg/kg every 12 h. Each covariate was fixed to one of three values chosen in the range of variation of this covariate (e.g. 50, 70 and 100 kg for body weight), and the distribution of  $C_0$  was simulated by drawing random values of the other covariates and parameters in their distribution, assuming a normal liver function, CYP3A5 \*3/\*3 genotype and no drug interaction.

Finally, with the PBPK model, simulations (by trial and error method) were made in order to determine the initial dosing regimen of tacrolimus in order to reach a  $C_0$  of 15 ng/ml at day 5. Simulations were made for a standard human (BW of 70 kg, p<sub>fat</sub> of 20%) and without drug interaction.

## **Statistical methods**

Statistical analyses were carried out by using the SPSS package (version 17, SPSS, Chicago, Illinois, USA). Non-parametric tests (Mann Whitney for simple comparison and Kruskal Wallis for multiple comparison) were used with an alpha risk fixed at 5%.

## **Results**

### **Preliminary population PK study**

Mean (SD) patient age and body weight were  $52.9 \pm 10.1$  years and  $70.8 \pm 13.4$  kg, respectively. Mean dosing regimen of tacrolimus was  $0.074 \pm 0.059$  mg/kg/d, with a median of 0.06 mg/kg/d. Characteristics of the 66 liver transplant recipients included are detailed in table III. Genotypes of PgP and CYP3A5 of donor and liver transplant recipients are summarised in table IV.

A one compartment model with first order absorption and elimination rate adequately described the data. Typical population estimates (relative standard error) of absorption rate constant ( $K_a$ ), apparent distribution volume ( $V_d/F$ ) and apparent clearance ( $CL/F$ ) were 0.91 h<sup>-1</sup> (216%), 486 L (21%) and 11.7 L/h (14%), respectively. CL of tacrolimus was negatively related to AP ( $r=-0.96$ ) and AST ( $r=-0.92$ ),  $p<0.05$ .

CYP3A5 donor and PgP recipient genotypes were also significant covariates of CL (figure 2). Mean apparent CL was lower when the donor was CYP3A5\*3/\*3 homozygote rather than carrying at least one CYP3A5\*1 allele:  $12.6 \pm 4.6$  vs  $24.8 \pm 3.1$  L/h ( $p<0.005$ ). For PgP, there was a significant difference between the mean apparent CL of the 3 types of patients:  $13.7 \pm 6.1$  L/h for T/T homozygote ("mutant" alleles),  $14.2 \pm 4.6$  L/h for C/T heterozygote and  $18.5 \pm 5.3$  L/h for C/C homozygote recipients ( $p<0.05$ ).

### **Compartment lumping of the PBPK model**

Figure 3 depicts normalized concentration-time profiles of all 13 compartments of the PBPK full model. For the liver, the value of  $E_{iv}$  was set at 0.17, corresponding to the mean dosing regimen of 0.06 mg/kg/d.

By visual inspection, in addition to venous compartment and arterial compartment, three different groups of tissues with almost identical normalized concentration-time profiles were identified: (1) adipose tissue, (2) liver, (3) others: lung, kidney, heart, brain, skin, muscle, tendons and other organs. Hence a lumped compartment corresponding to "others" was defined, and the lumped PBPK model consisted in only 5 compartments.



### **Estimation of PBPK parameters**

From the fit of the lumped PBPK model to the data of 6 patients, median estimated values of  $B_{max}$ ,  $K_D$  and  $CL_{ityp}$  were 0.243 mg/L,  $7.8 \cdot 10^{-3}$  mg/L and 10 600 L/h, respectively. Time concentration time profiles are represented in figure 4.

### **Evaluation of the PBPK model**

For CYP3A5 \*3/\*3 genotype of liver donor, without drug inhibition, for C0 and C2, mean observed (n=267 for C0 and n=11 for C2) vs simulated concentrations (n=500) at day 5 were 7.84 vs 7.98, and 15.3 vs 14.3 ng/ml respectively. Results are represented in figure 5.

For CYP3A5 \*3/\*3 genotype of liver donor, for low and moderate drug inhibition, mean observed vs simulated C0 of tacrolimus at day 5 were 8.22 vs 8.34 and 10.3 vs 10.6 ng/ml respectively. Results are represented in figure 6.

### **Effect of covariates and cirrhosis on tacrolimus C0**

With a dosing regimen of 0.03 mg/kg every 12 hours, a 2.6-fold increase of tacrolimus mean C0 has been found when BW increased from 50 to 100 kg ( $p < 0.05$ ). When hematocrit and proportion of adipose tissue increased, the same trend in C0 was found. A 4.2-fold decrease in C0 was observed when  $f_{up}$  increased from 0.006 to 0.024 ( $p < 0.05$ ). Results are presented in table V. The blood flow of adipose tissue and lumped compartment, and the proportion of fat in organs had a minor impact on tacrolimus C0 when the value of these covariates varied by 20% around the typical value (data not shown).

When the severity of cirrhosis (Child Pugh score of A to C) increased, a 2.8-fold increase in mean C0 (12.5 to 34.6 ng/ml) was observed ( $p < 0.05$ ) (figure 7).

### **Effect of genetic status and CYP3A4 inhibitors on tacrolimus C0**

In order to test the possible influence of the Pgp genotype, different values of bioavailability were tested, from 0.10 to 0.40. A 3.8-fold increase of C0 was found, from 3.99 to 14.8 ng/ml.

For each genotype of CYP3A5, C0 were simulated for the three levels of inhibition of CYP3A4: no inhibition, low inhibition and moderate inhibition with IR of 0, 0.10 and 0.60 respectively (figure 6). Without drug-drug interaction, mean simulated C0 of tacrolimus for the three genotypes of CYP3A5 were 3.75, 5.31, and 7.98 ng/ml for \*1/\*1, \*1/\*3 and \*3/\*3,

respectively. Means are significantly different ( $p < 0.05$ ) (figure 6A) and CYP3A5\*3\*3 resulted in a 2.1-fold higher C0 than CYP3A5\*1\*1. When a moderate inhibition occurred, a significant but modest increase in C0 tacrolimus was also found for all CYP3A5 genotypes ( $p < 0.05$ ) (figure 6).

### **Proposal of initial dosing regimen of tacrolimus**

Table VI details the proposed initial dosing regimen to reach a C0 of 15 ng/ml at day 5 for a standard human (BW of 70 kg, p<sub>fat</sub> of 20%) and without drug interaction.

## **Discussion**

In this study, a PBPK model was built with the primary intention to determine the most influential factors of variability in tacrolimus trough blood concentration, because this concentration is used for therapeutic drug monitoring.

In a first step, a pharmacokinetic study was carried out, then analyzed by a population approach in order (1) to determine the influence of genetic polymorphisms of CYP3A5 and PgP on the tacrolimus kinetics, (2) to estimate some key parameters of the PBPK model, (3) to evaluate the PBPK model by comparing model simulations to experimental data.

The pharmacokinetic parameters estimated in the PK study were consistent with the literature with regard to  $K_a$  (34) and  $V_d$  (19). Conversely, mean apparent clearance ( $CL/F$ ) from blood concentration was somewhat lower than that previously published in adult liver transplant recipients, between 26.5 and 36 L/h (19, 20).

Regarding CYP3A5, a strong relationship between the CYP3A5 (6986A>G) genotype and tacrolimus pharmacokinetics has been demonstrated in kidney, heart and liver transplant recipients (44). Almost all studies have reported lower dose-adjusted tacrolimus exposure ( $C_0/\text{Dose}$ ,  $C_2/\text{Dose}$  or  $AUC/\text{Dose}$ ) and/or a higher dose requirement in individuals who possessed at least one CYP3A5\*1 allele (CYP3A5 expressers) than in CYP3A5\*3 homozygotes (CYP3A5 non-expressers) (44), as is consistent with lower metabolic capacity in patients with the variant allele. In our study, tacrolimus clearance was related with the CYP3A5 genotype of the transplanted liver. In agreement with earlier observations (45, 46), this result may be explained by the fact that CYP3A5 activity is mainly found in the liver.

On the contrary, influence of the P-gp (3435C>T) genotype on the pharmacokinetics of tacrolimus remains uncertain. Indeed, the majority of studies have failed to find an association between PgP genotype and tacrolimus pharmacokinetics (44). However, some studies have demonstrated a higher tacrolimus  $C_0/\text{Dose}$  and a lower dose requirement in patients with the 3435TT variant genotype than in those with the 3435CC wild-type genotype (44), which is consistent with possible lower functional activity of P-glycoprotein in the variant genotype. A study of 60 liver transplant recipients has shown that intestinal MDR1 mRNA level was correlated at the initial clearance immediately post-transplantation (47). In our study, there was an approximately 1.5-fold difference in tacrolimus clearance between TT and CC

recipients, while PgP genotype of the transplanted liver had no impact on tacrolimus clearance. This may be explained if PgP is involved mainly in tacrolimus efflux in the intestine, but not in the liver.

In a second step, the PBPK model was built. Its main features are that (1) tacrolimus distribution is governed by binding to plasma proteins, saturable binding to red blood cells, and binding to lipids in tissues, while (2) tacrolimus elimination is determined by hepatic metabolism by CYP3A4, CYP3A5 and others. Absorption was described as a first-order process, with variability in tacrolimus absorbed fraction due in part to PgP polymorphism. However, due to the lack of detailed knowledge of the relationship between PgP genotype and F, bioavailability was assumed to vary 4-fold in the population. This is larger than the observed variability in CL/F due to PgP polymorphism (1.5 fold) because other factors such as food or enteral feeding also contribute to variability.

Because our aim was to determine the covariates of tacrolimus pharmacokinetics using the PBPK model, it was important to reduce the dimension (the number of parameters) in the model. Using the lumping approach of Pilari (41), the original 13-compartment model was reduced to a 5-compartment model retaining the full capacity to describe tacrolimus pharmacokinetic profile. Hence the number of parameters in the model was greatly reduced, thereby decreasing the number of simulations required to explore the influence of the parameters of the model on tacrolimus kinetics. With the lumped model, the fitted values of B<sub>max</sub> and k were consistent with these found by Jusko *et al* (k=0.0038 ± 0.0047 mg/L and B<sub>max</sub> = 0.418 ± 0.285 mg/L) (34). Likewise, the median of hepatic clearance was found to 112 L/h, similar to 124 L/h found in the literature (34).

In spite of numerous assumptions and approximations in the construction of the PBPK model resulting from current insufficient knowledge, the evaluation of the model revealed no major discrepancy with the available data. Because of the lack of patient with the genotype \*1/\*1 in the population of the 66 donors, comparison between observed and estimated values could not be performed. Indeed, the genotype \*1/\*1 represents 1.2% of Caucasian population (13). In our study, the fraction of rapid metabolizer recipients and donors was 4 and 0%, respectively. Hence, the predictions of the model could not be fully evaluated and these predictions should be regarded with caution.

With the range of covariate values tested, the impact of each covariate on tacrolimus trough blood concentration variation (fold variation of the mean) may be ranked as follows: bioavailability (3.8 from which PgP polymorphism accounts for 1.5), Child-Pugh score (2.8), body weight (2.6), hematocrit (2.4), unbound fraction in plasma (2.4), CYP3A5 polymorphism (2.1), proportion of adipose tissue (1.4), and CYP3A4 inhibitory drug-drug interaction (1.2).

For continuous covariates such as body weight, these fold-variation factors depend obviously on the range of variation considered in the simulations. Nevertheless, they indicate clearly the trends.

Some of the covariates found in this list were known or anticipated. For example, in adult liver transplant recipients, hepatic dysfunction has been shown to have a major influence on the elimination of tacrolimus (48). Abnormal liver function decreases tacrolimus clearance (49, 50). Some covariates had not been characterized previously and were revealed by the bottom-up approach, such as the proportion of adipose tissue and the unbound fraction in plasma. From a clinical perspective, measuring plasma unbound fraction of tacrolimus may not be practicable in routine. But estimating the unbound fraction knowing alpha-1 acid glycoprotein and lipoproteins may be feasible (51). To evaluate the proportion of adipose tissue of patient, different methods could be used (52) (such as anthropometric methods or bioelectrical impedance analysis for example).

The set of covariates found in this study might be used for dosing adjustments in two ways. First, it may be used to determine the initial dose of tacrolimus, as shown in table VI, where 3 important covariates (body weight, hematocrit and CYP3A5 donor genotype) have been accounted for. Second, it may be used to adjust the dose by the Bayesian method during the treatment, by incorporating these covariates in a population pharmacokinetic model based on the lumped PBPK model. Regarding the first approach, our dosing recommendations are in the 0.08 to 0.33 mg/kg/d range. In the Prograf<sup>®</sup> prescribing informations (53), dosing regimen proposed are from 0.10 to 0.20 mg/kg/d.

A prospective randomized trial in renal transplant recipients has investigated the potential benefit of optimizing the initial tacrolimus dose based on CYP3A5 genotype alone (i.e., 0.30 mg/kg/d for CYP3A5\*1 allele carriers and 0.15 mg/kg/d for CYP3A5\*3/\*3 homozygous patients), and 56.8% of patients still did not have tacrolimus C<sub>0</sub> within the desired target

range in the first days after tacrolimus loading (54). De Jonge *et al* have found that the CYP3A5 genotype is a major determinant of tacrolimus disposition as it explains 29-35% of the pharmacokinetic parameters (55). Consequently, it remains a large proportion of residual variability, which can explain the result of the clinical trial.

Our table, taking into account the CYP3A5 genotype and the hematocrit, is consistent with these data and gives more detailed recommendations.

## **Conclusions**

Bottom up approach allowed taking into account the influence of relevant covariates on C<sub>0</sub> of tacrolimus. The most influential covariates were liver function of the patient, CYP3A5 genotype of the liver donor, and hematocrit of the patient. Our approach also revealed that the unbound fraction had a large influence on tacrolimus kinetics. Future studies should identify the factors determining tacrolimus protein binding. These covariates must therefore be taken into account for the therapeutic drug monitoring of liver transplant recipients.

## REFERENCES

1. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987 Sep;40(9):1249-55.
2. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987 Sep;40(9):1256-65.
3. 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.
4. Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):241-53.
5. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(10):623-53.
6. 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.
7. Backman L, Nicar M, Levy M, Distant D, Eisenstein C, Renard T, et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation*. 1994 Feb 27;57(4):519-25.
8. 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.
9. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T, et al. Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Oct;80(4):331-45.
10. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Sep;74(3):245-54.
11. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003 Oct 27;76(8):1233-5.
12. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001 Apr;27(4):383-91.
13. Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*. 2002 Nov;12(8):605-11.
14. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.



15. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:361-98.
16. 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.
17. Staats CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation.* 2001 Sep 27;72(6):1056-61.
18. Fukudo M, Yano I, Fukatsu S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, et al. Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(13):1161-78.
19. Staats CE, Willis C, Taylor PJ, Lynch SV, Tett SE. Toward better outcomes with tacrolimus therapy: population pharmacokinetics and individualized dosage prediction in adult liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003 Feb;9(2):130-7.
20. Antignac M, Hulot JS, Boleslawski E, Hannoun L, Touitou Y, Farinotti R, et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in full liver transplant patients: modelling of the post-operative clearance. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 Jul;61(5-6):409-16.
21. 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.
22. Jamei M, Dickinson GL, Rostami-Hodjegan A. A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: A tale of 'bottom-up' vs 'top-down' recognition of covariates. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(1):53-75.
23. Ohtani H, Barter Z, Minematsu T, Makuuchi M, Sawada Y, Rostami-Hodjegan A. Bottom-up modeling and simulation of tacrolimus clearance: prospective investigation of blood cell distribution, sex and CYP3A5 expression as covariates and assessment of study power. *Biopharm Drug Dispos.* 2011 Dec;32(9):498-506.
24. Lavielle M. MONOLIX (MOdèles NOn LInéaires à effets miXtes). Orsay, France: MONOLIX group. 2008.
25. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1992 Oct;20(5):511-28.
26. Levitt DG. PKQuest: a general physiologically based pharmacokinetic model. Introduction and application to propranolol. *BMC Clin Pharmacol.* 2002 Aug 15;2:5.
27. Levitt DG. The pharmacokinetics of the interstitial space in humans. *BMC Clin Pharmacol.* 2003 Jul 30;3:3.
28. Pang KS, Rowland M. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977 Dec;5(6):625-53.



29. Tacrolimus. 2012 [updated 2012; cited 2012 May, the 22th]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00864>.
30. Tod M, Lagneau F, Jullien V, Mimoz O. A physiological model to evaluate drug kinetics in patients with hemorrhagic shock followed by fluid resuscitation. Application to amoxicillin-clavulanate. *Pharm Res.* 2008 Jun;25(6):1431-9.
31. Benet LZ. Impact of intraindividual variability of drugs on therapeutic outcomes: lessons from outside transplantation. *Transplant Proc.* 1998 Aug;30(5):1650-1.
32. Zahir H, Nand RA, Brown KF, Tattam BN, McLachlan AJ. Validation of methods to study the distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2001 Jul-Aug;46(1):27-35.
33. Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC. Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *Br J Nutr.* 1991 Mar;65(2):105-14.
34. Jusko WJ, Piekoszewski W, Klintmalm GB, Shaefer MS, Hebert MF, Piergies AA, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1995 Mar;57(3):281-90.
35. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(11):813-51.
36. Wilkinson GR, Shand DG. Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther.* 1975 Oct;18(4):377-90.
37. Ohno Y, Hisaka A, Suzuki H. General framework for the quantitative prediction of CYP3A4-mediated oral drug interactions based on the AUC increase by coadministration of standard drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(8):681-96.
38. Satoh S, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Miura M, Inoue K, et al. Lack of tacrolimus circadian pharmacokinetics and CYP3A5 pharmacogenetics in the early and maintenance stages in Japanese renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Aug;66(2):207-14.
39. Edginton AN, Willmann S. Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(11):743-52.
40. D'Argenio D, Schumitzky A. ADAPT II User's guide. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Ressource. Los Angeles; 1997.
41. Pilari S, Huisinga W. Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2010 Aug;37(4):365-405.
42. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008 Mar 8;371(9615):838-51.
43. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973 Aug;60(8):646-9.
44. 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 1;49(3):141-75.
45. 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.
46. Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ, Zhang GL. Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther*. 2007 Oct;32(5):505-15.
47. Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 May;18(5):413-23.
48. Abu-Elmagd K, Fung JJ, Alessiani M, Jain A, Venkataramanan R, Warty VS, et al. The effect of graft function on FK506 plasma levels, dosages, and renal function, with particular reference to the liver. *Transplantation*. 1991 Jul;52(1):71-7.
49. Jain AB, Abu-Elmagd K, Abdallah H, Warty V, Fung J, Todo S, et al. Pharmacokinetics of FK506 in liver transplant recipients after continuous intravenous infusion. *J Clin Pharmacol*. 1993 Jul;33(7):606-11.
50. Winkler M, Ringe B, Rodeck B, Melter M, Stoll K, Baumann J, et al. The use of plasma levels for FK 506 dosing in liver-grafted patients. *Transpl Int*. 1994 Aug;7(5):329-33.
51. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Mar;57(3):298-309.
52. Arroyo M, Rocandio AM, Ansotegui L, Herrera H, Salces I, Rebato E. Comparison of predicted body fat percentage from anthropometric methods and from impedance in university students. *Br J Nutr*. 2004 Nov;92(5):827-32.
53. VIDAL. PROGRAF® gélule et solution à diluer pour perfusion. [database on the Internet]. 2012 [cited 03/08/2012]. Available from: <http://www.vidalpro.net/medicaments/front/recherchemedic.asp?site=2&cartouche=17&id=41863&lib=PROGRAF+1+mg+g%E9I+%3A+Plq%2F50&type=spe>.
54. 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.
55. de Jonge H, de Loo 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.

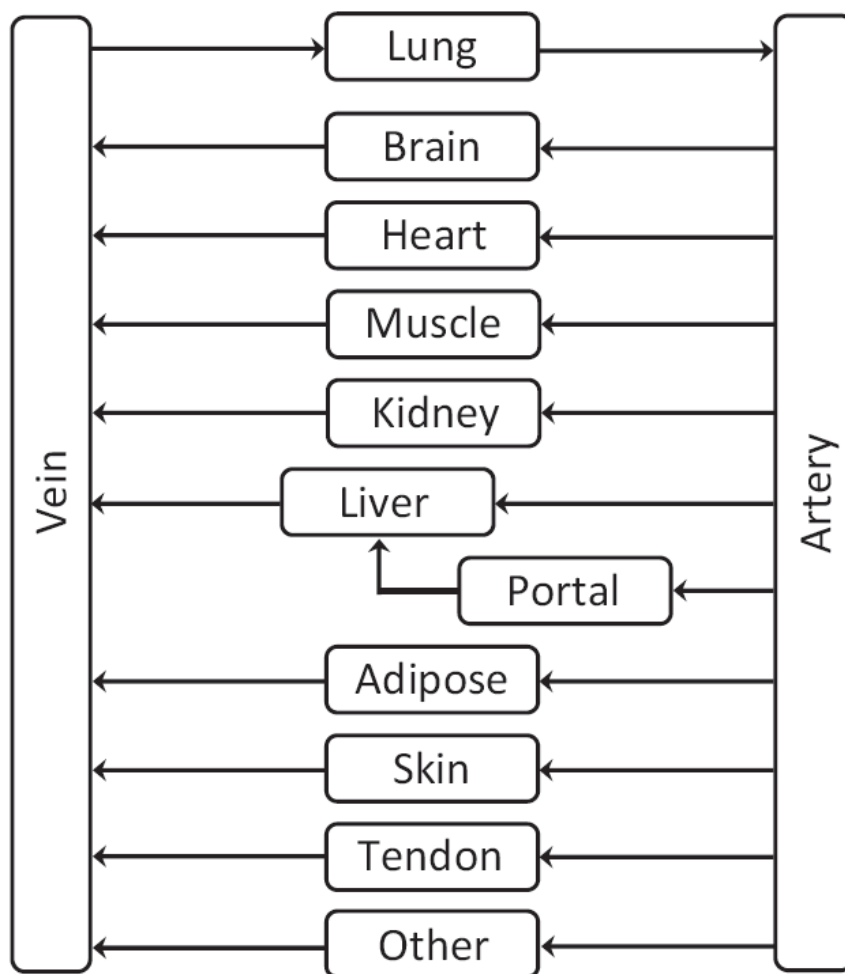


Figure 1. Flow diagram used for initial detailed PBPK model of tacrolimus

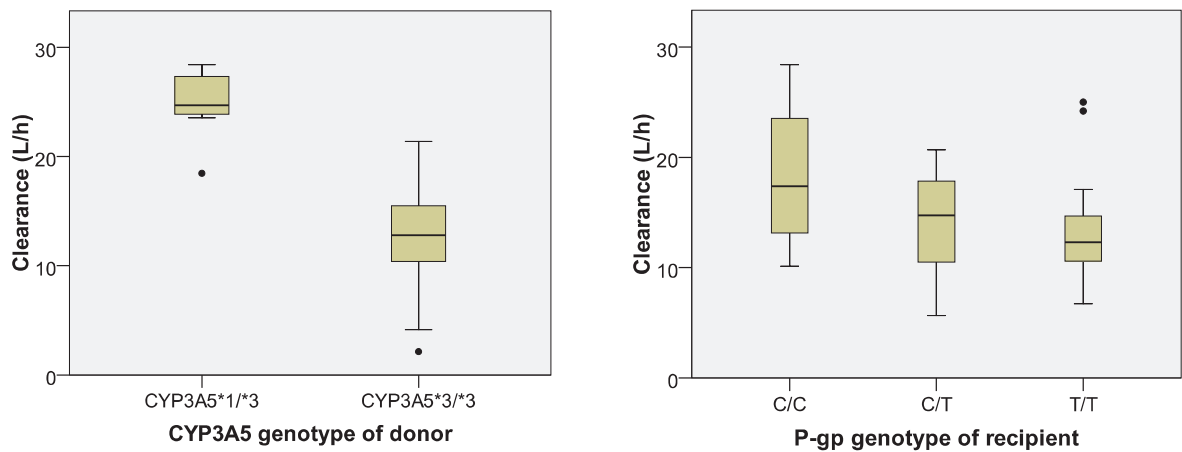


Figure 2. Effects of CYP3A5 genotype of donor (A) and P-gp genotype of recipient (B) on tacrolimus clearance of recipients in the clinical study ( $p < 0.05$ )

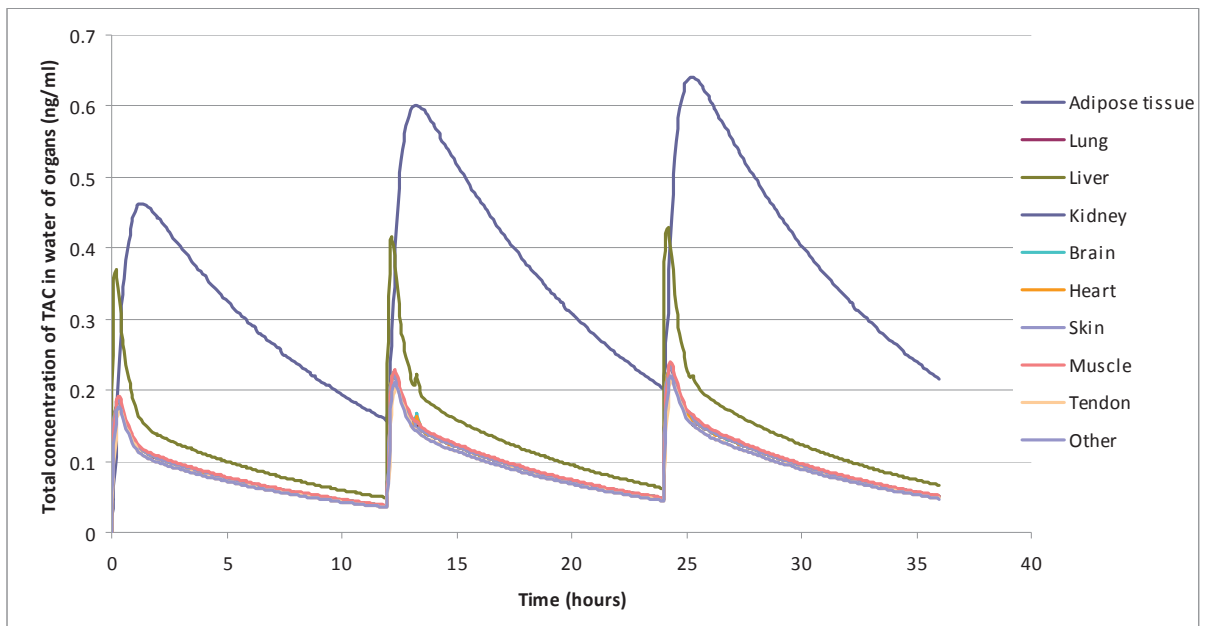


Figure 3. Concentration time profiles of tacrolimus (TAC) in the whole blood of the 13 compartments of the PBPK full model.

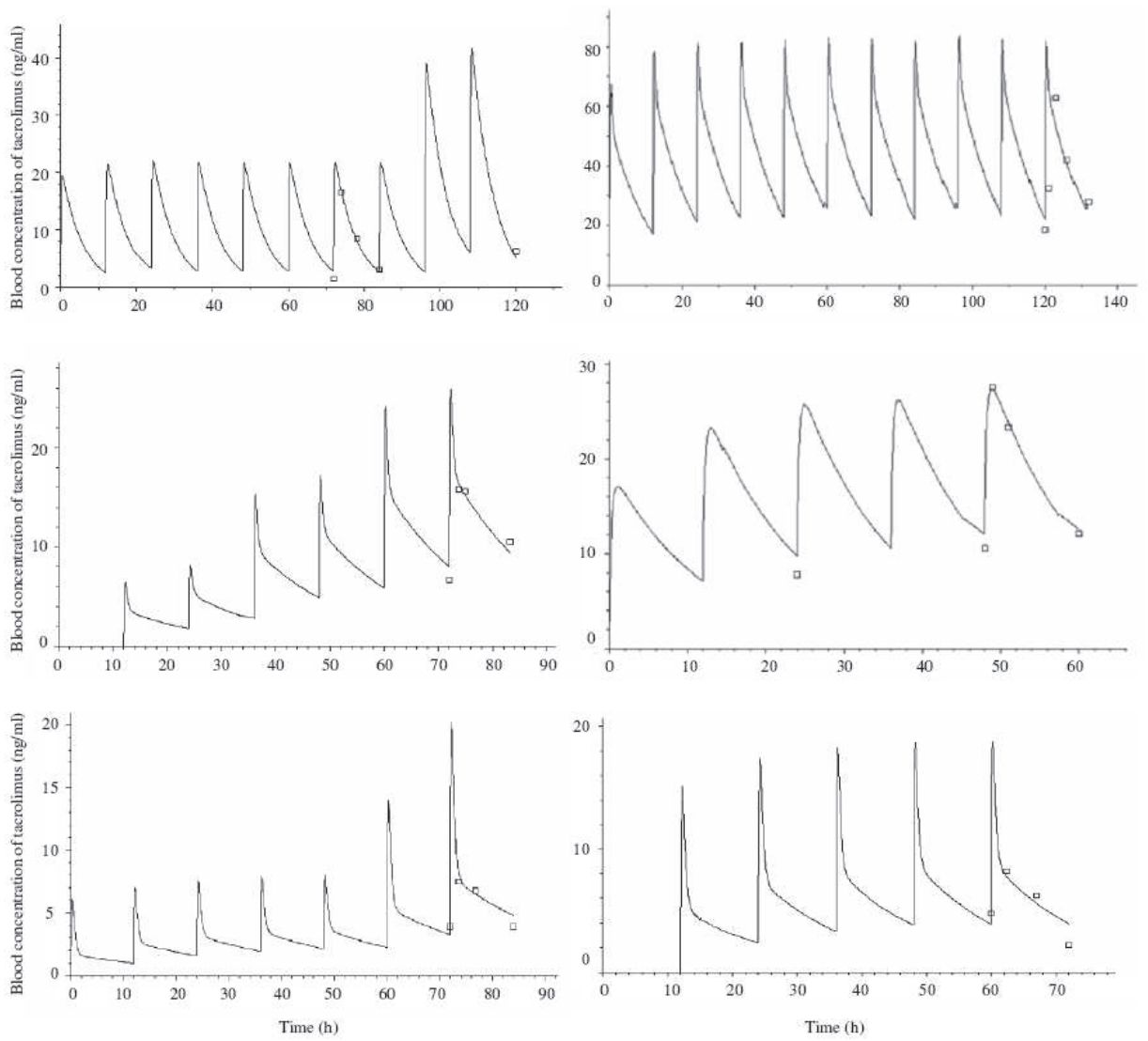


Figure 4. Time concentration curve profiles of the 6 patients. The squares are the measured whole blood concentrations. The line is the fitted lumped PBPK model.

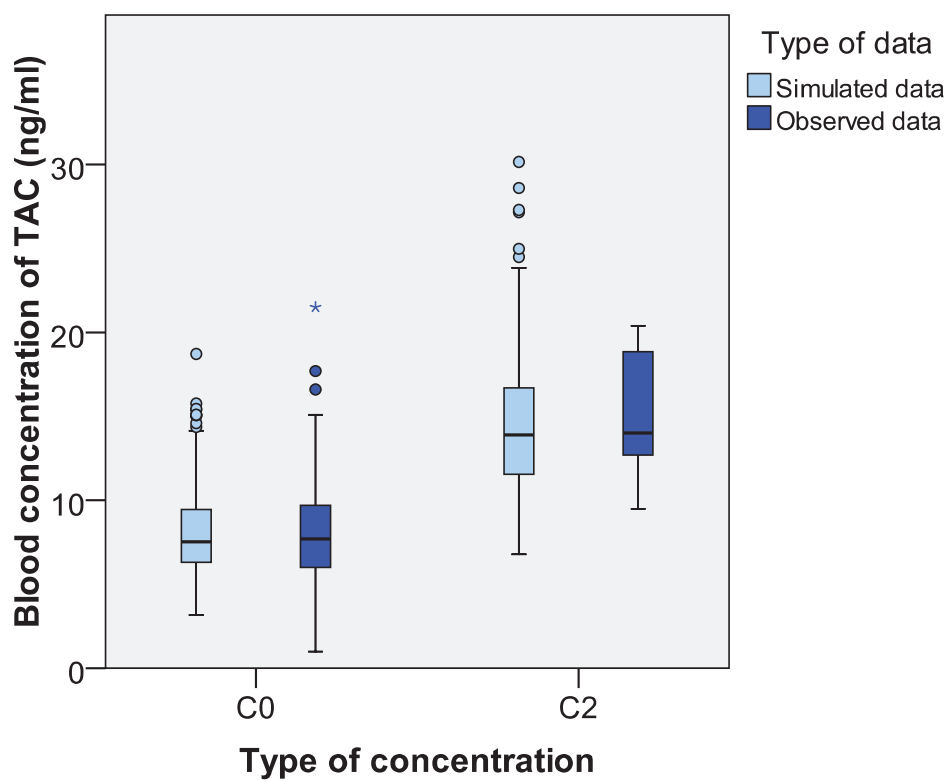


Figure 5. Comparison of tacrolimus (TAC) whole blood concentration between simulated and observed data for recipients of a CYP3A5 \*3/\*3 liver, without drug-drug interaction

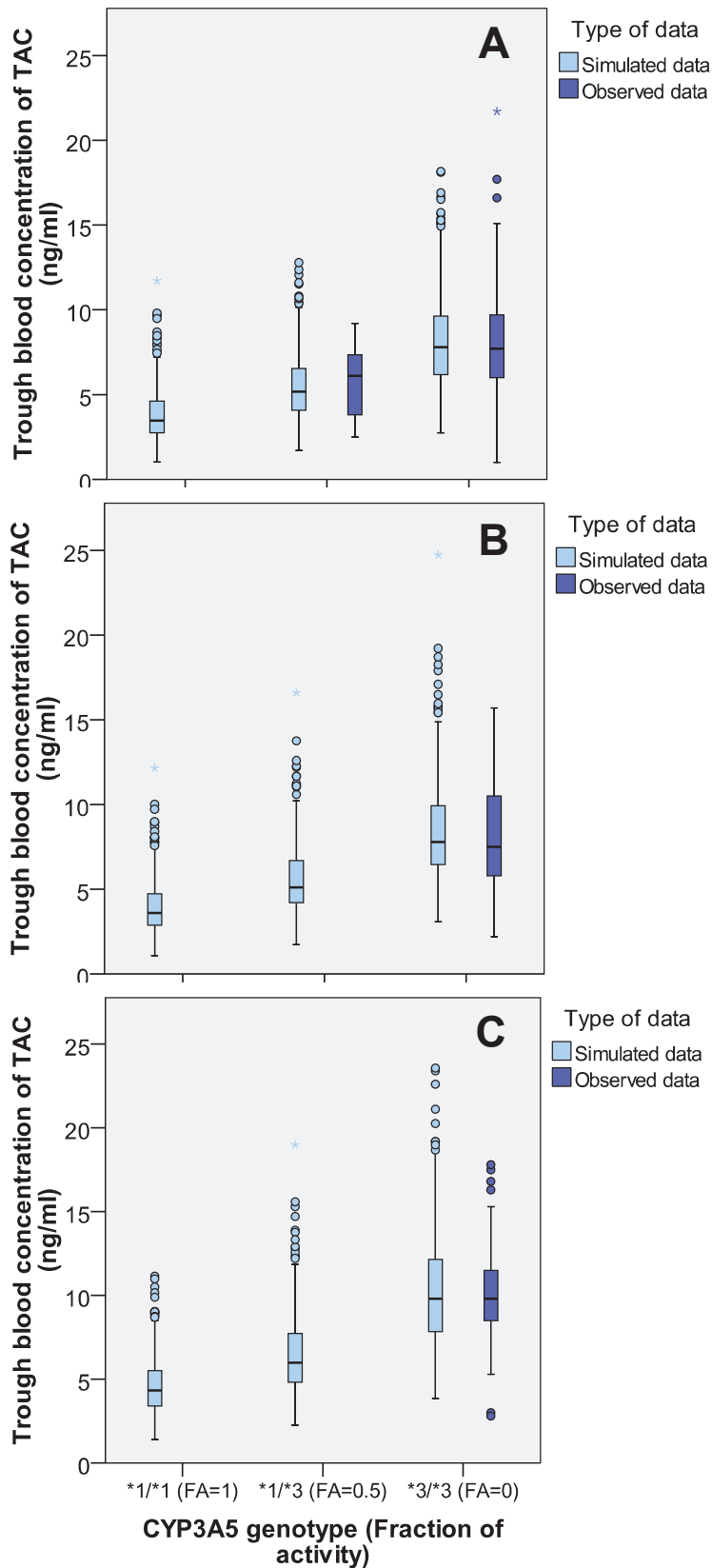


Figure 6. Comparison of tacrolimus (TAC) exposure between simulated and observed data without drug-drug interaction (A), when association with a CYP3A4 inhibitor drug with moderate IR (B) and when association with a CYP3A4 inhibitor drug with moderate IR (C)

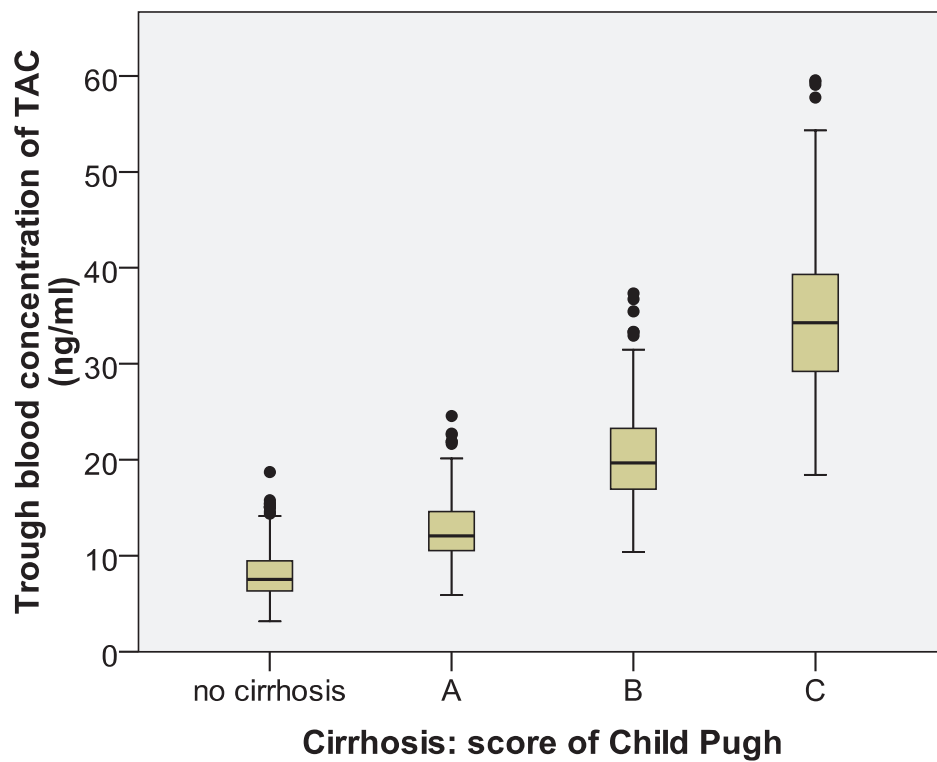


Figure 7. Effect of cirrhosis on simulated trough blood concentration of tacrolimus (TAC)



Table I. Values of physiological covariates used for simulations

	Mean	SD
Body weight (kg)	70.0	12.1
Proportion of adipose tissue	0.20	0.039
Hematocrit	0.29	0.039
Blood flow of adipose tissue (L/h)	44.3	4.71
Blood flow of lumped compartment (L/h)	196.4	23.2
Factor of lipid fraction in organs <sup>a</sup>	1	0.15
Unbound fraction in plasma	0.012	0.003

<sup>a</sup> multiplying factor of  $f_{frac}(i)$

Table II. Values of physiological variables according to the score of Child Pugh

	Normal liver	Child Pugh A	Child Pugh B	Child Pugh C
Blood flow of portal vein (L/h/kg)	45	18	16.2	1.8
Blood flow of hepatic artery (L/h/kg)	15	19.5	34.5	51
Proportion of functional liver mass	1	0.69	0.55	0.28
Proportion of CYP3A4 activity	1	1	0.4	0.4

Table III. Clinical study: patient characteristics

	n	mean	SD	median	range
Age (years)	66	52.9	10.2	55	26-67
Body Weight (kg)	64	71.5	13	72.5	45-107
Total Plasma Proteins (g/L)	66	56.3	11.6	57	26-97
Albumin concentration (g/L)	44	27.9	10.5	27	11-87
Coagulation Factor V (%)	57	97.5	38.2	93	17-196
Prothrombin times (%)	66	79.3	20	79	1.9-180
Total Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	66	54.9	85.3	23	4-631
Conjugate Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	66	38.9	65.3	13	2-487
Alkaline Phosphatase (UI/L)	66	204	185	144	9-1648
Gamma Glutamyl Transferase (UI/L)	66	217	208	160.5	4-1854
Alanine aminotransferase (UI/L)	66	242	527	97	8-12337
Aspartate aminotransferase (UI/L)	66	155	536	43	6-9391
Serum Creatinin Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	66	92.6	43.7	84	11-525
Red blood cells count (T/L)	66	3.24	0.51	3.2	2-4.7
Hematocrit (%)	66	29.5	4.37	29	19-43
Initial dosage regimen (mg/day)	66	3.78	4.06	2	0.5-16
Initial dosage regimen (mg/kg/day)	64	0.05	0.06	0.03	0.01-0.29

Table IV. Genotypic characteristic of donor and liver transplant recipients in the clinical study

		Genotype	n	%
CYP 3A5 intron 3	Donor	*1/*1	0	0
		*1/*3	8	20
		*3/*3	32	80
	Recipient	*1/*1	2	4
		*1/*3	6	12
		*3/*3	43	84
MDR1 exon 26	Donor	C/C	7	20
		C/T	20	57
		T/T	8	23
	Recipient	C/C	17	35
		C/T	17	35
		T/T	14	30

Table V. Simulated distributions of tacrolimus trough blood concentration as a function of covariate values, assuming a 0.03 mg/kg bid regimen, a normal liver function, CYP3A5 \*3/\*3 genotype and no drug interaction

		Mean	Median	5th percentile	95th percentile
Hematocrit	0.19	5.14	4.92	3.19	7.65
	0.29	8.07	7.78	4.91	11.9
	0.43	12.1	11.7	7.32	17.9
Body weight (kg)	50	4.86	4.73	2.82	7.70
	70	7.92	7.65	4.75	12.3
	100	12.5	12.2	7.64	19.4
Plasma unbound fraction	0.006	15.4	15.4	11.04	19.7
	0.012	7.57	7.57	5.45	10.0
	0.024	3.67	3.67	2.56	4.74
Proportion of adipose tissue	0.1	6.34	5.81	3.02	11.0
	0.2	8.11	7.47	4.51	13.3
	0.4	8.90	8.40	5.21	14.7

Table VI. Proposal of tacrolimus initial dosage regimen (mg/kg/d) as a function of CYP3A5 donor genotype and recipient hematocrit.

CYP3A5 genotype	Hematocrit		
	0.19	0.29	0.43
*1/*1	0.33	0.26	0.17
*1/*3	0.28	0.19	0.12
*3/*3	0.20	0.11	0.08

# **4<sup>EME</sup> PARTIE : Discussion générale** **et conclusions**

## **Résumé des principaux résultats**

Pour la ciclosporine et le tacrolimus, médicaments à marge thérapeutique étroite et à forte variabilité inter et intra-individuelles, l'individualisation des posologies est nécessaire en particulier dans la période critique post-transplantation ou post-greffe.

Contrairement à une approche classique de PK de population, l'approche PBPK a permis de tester des hypothèses et de quantifier l'influence des variations de covariables physiologiques, pathologiques et pharmacogénétiques sur les expositions sanguines et tissulaires au médicament.

Des applications cliniques utiles aux praticiens pour le choix de la posologie la plus adaptée à chaque patient ont découlées des résultats de cette approche mécanistique. En effet, pour la greffe de moelle osseuse pédiatrique, des concentrations cibles pour la ciclosporine en fonction de l'indication de la greffe et des modalités de perfusion intraveineuse ont été définies. En ce qui concerne la transplantation hépatique, des posologies initiales de tacrolimus en fonction des caractéristiques des patients transplantés et du donneur ont été proposées.

## **Discussion sur la méthodologie des travaux de la thèse**

### ***Limites de l'étude clinique préliminaire de la ciclosporine***

Concernant l'étude préliminaire, l'absence de randomisation des patients pour la constitution des 2 groupes de patients traités par ciclosporine représente une limite de cette étude. Pour les critères physiologiques étudiés, il n'existe pas de différence significative et les deux groupes sont ainsi comparables sur ces critères. Il est possible cependant qu'il existe des différences significatives entre les deux groupes sur d'autres critères non étudiés. Par ailleurs, l'effectif de chacun des groupes est minimal du fait d'un recrutement limité à des patients provenant d'un seul hôpital. Afin d'obtenir un effectif plus important, une étude multicentrique aurait été nécessaire.

### ***Modèle physiologique de la ciclosporine***

Les cinétiques de transfert de la ciclosporine entre les différents compartiments (milieu extracellulaire et intracellulaire) doivent être prises en considération pour caractériser pleinement la distribution de la ciclosporine dans les différents organes. La modélisation par

les modèles physiologiques permet d'atteindre cet objectif. C'est ainsi un outil utile pour d'une part, prendre en considération de manière simultanée les données locales (tissus) et systémiques (sang) et d'autre part pour permettre des transpositions d'une espèce à une autre par l'ajustement des paramètres physiologiques selon les différences inter-espèces connues. L'utilisation du modèle physiologique est particulièrement intéressante pour la ciclosporine du fait de sa distribution sanguine saturable (283), dont l'impact ne peut pas être évalué correctement lorsque seules les données de cinétiques sanguines sont étudiées par les approches PK traditionnelles.

Concernant la liaison de la ciclosporine aux lipoprotéines, une fraction libre plasmatique de ciclosporine fixée à 0,06 a été utilisée (5). Cette valeur, obtenue par ultracentrifugation est probablement surestimée, car une valeur plus faible (0,02) a été obtenue par microdialyse (296).

Dans les études de Kawai et de Tanaka (5, 6, 266), la méthode utilisée pour ajuster le modèle physiologique aux données expérimentales chez le rat, certains paramètres (paramètres physiologiques) ont été fixés à l'aide de valeurs référencées dans la littérature et les autres paramètres d'intérêt (paramètres d'élimination par exemple) ont été estimés. Cette méthode a cependant des limites puisque les valeurs typiquement référencées sont des valeurs moyennes de population et ne reflètent donc pas l'hétérogénéité de ces valeurs au sein d'une population. Alternativement, l'équipe de Gelman (297) a proposé d'ajuster les modèles physiologiques dans un cadre bayésien. Contrairement à la première méthode, une valeur unique n'est pas assignée à chaque paramètre mais une distribution de probabilité, reflétant la connaissance actuelle (avec son incertitude) sur le paramètre et sa variabilité au sein de la population étudiée (298). Il est possible de différencier l'incertitude et la variabilité en utilisant un modèle de population (299). Cependant, l'ajustement d'un modèle physiologique à des données expérimentales peut se révéler difficile en raison de la complexité du modèle, du nombre important de paramètres à estimer, et de la nature des données (parfois peu nombreuses et entachées d'erreurs de mesure). De plus, ces modèles ont tendance à devenir de plus en plus détaillés et donc complexes, notamment dans le cadre d'études sur un organisme entier (300). Pour être fiable et pertinent, l'ajustement de modèles de grande dimension nécessite alors de nombreuses données et informations, ce qui était le cas dans l'étude de Kawai (5), avec 13 temps de prélèvements de concentration sur 32 heures (avec 2 ou 3 rats par temps de prélèvement) et ce pour chacun des 11 organes étudiés.

Notre étude s'est basée sur le modèle physiologique élaboré par Kawai *et al.* en 1998. Un autre modèle a été développé par Tanaka *et al.* en 2000, qui comporte 12 compartiments. Cet autre modèle physiologique présente 4 modèles d'organes au lieu de 2 comme dans notre étude. Certains organes étaient mieux décrits par un modèle linéaire (muscle, tissu adipeux), d'autres par un modèle à saturation instantanée (poumons, cœur, os, peau, thymus) ou encore un modèle à saturation non instantanée (rein, rate, foie et intestin) et enfin un modèle à efflux saturable pour le cerveau. Ce modèle est validé chez le rat mais n'a pas été transposé à l'Homme. Il possède un nombre de paramètres plus important, ce qui lui donne une flexibilité plus grande, mais aussi une incertitude plus grande sur les prédictions, raison pour laquelle nous ne l'avons pas retenu.

Pour la transposition à l'échelle humaine, pour les paramètres spécifiques de la ciclosporine, il a été utilisé le rapport des masses corporelles chez l'Homme et le rat. Dans l'article de Kawai (5), pour un des paramètres, le produit perméabilité par surface, il était proposé une équation allométrique pour la transposition. Cette méthode ne s'est pas trouvée satisfaisante et pour ce paramètre il a également été utilisé le rapport des masses corporelles.

Par ailleurs, la fraction libre plasmatique n'a pas été modifiée au moment de la transposition à l'échelle humaine. En effet, une étude de Kawai *et al.* (283) a montré que pour les dérivés de la ciclosporine, les fractions libres plasmatiques étaient similaires entre le rat et l'Homme.

Du fait d'une forte liaison de la ciclosporine aux lipoprotéines, il aurait pu être intéressant d'avoir chez les enfants étudiés également des dosages de lipoprotéines. Cependant, il ne s'agit pas de dosages réalisés en routine. Ces concentrations peuvent être un facteur de variabilité de la concentration libre en ciclosporine. Selon l'étude de Urien *et al.* (108), la concentration libre en ciclosporine varie entre 3.7 et 13.4% pour des concentrations en lipoprotéines trois fois supérieures et trois fois inférieures aux valeurs physiologiques, respectivement.

### ***Agrégation***

Le modèle physiologique global de la ciclosporine et celui du tacrolimus (13 compartiments chacun dont les compartiments sanguins) sont très complexes et le principe de parcimonie n'est pas respecté. Une simplification en agrégeant des organes peut être faite afin de limiter le nombre de paramètres et par conséquent les incertitudes. Les organes pouvant être agrégés entre eux doivent avoir des caractéristiques communes et un non respect de la

méthodologie d'agrégation peut entraîner une perte d'information utile ou encore fournir des résultats erronés (301). Plusieurs méthodes pour le lumping existent et la plus récente est celle proposée par l'équipe de Huisinga en 2010 (302).

Dans l'étude sur la ciclosporine, un essai de simplification en agrégeant des organes a été réalisé mais les caractéristiques physiologiques des organes et de leur distribution tissulaire respective étaient trop différentes entre chacun des organes pour permettre des regroupements satisfaisants. De plus, par la suite, les organes agrégés n'auraient pas permis l'obtention de profils de concentration pour un organe donné, notamment pour les organes cibles de la GVH.

En revanche, pour l'étude sur le tacrolimus, un lumping a été effectué par la méthode de Huisinga et a permis de simplifier grandement le modèle PBPK.

### **Comment favoriser le développement des modèles PBPK ?**

La modélisation PBPK-PD est une approche très utile pour prédire les profils de concentration de substances dans différents tissus, pouvant permettre à terme de prévoir les effets d'un médicament en termes d'efficacité et de toxicité. Son application est très intéressante dans des populations spécifiques, comme par exemple les populations pédiatriques, les sujets obèses ou encore les patients en réanimation. En termes de connaissances physiologique et biochimique, pour la population pédiatrique, de nombreuses données sur le domaine de l'ontogénie sont maintenant disponibles et peuvent être incorporées dans les modèles (282).

Il existe actuellement de nombreux articles décrivant leur méthodologie et leurs applications. Cependant, la modélisation PBPK concerne plus la recherche académique et plus particulièrement la toxicologie environnementale que le développement de médicaments. Une utilisation fréquente de cette modélisation dans le développement de médicaments est toutefois observée.

Des logiciels ont été spécifiquement développés pour ce type de modèles, comme celui intitulé Simcyp® Population-based Simulator (Simcyp Ltd, Sheffield, UK, <http://www.simcyp.com>) (279). Ces outils ont pour avantage d'intégrer une base de données importante sur les valeurs biologiques et physiologiques (incluant les différences ethniques, d'âge et de pathologie).



## **Limites des données disponibles**

Des transporteurs tels que la P-gp interviennent dans la cinétique de la ciclosporine et du tacrolimus. Il manque actuellement des informations concernant leur affinité et leur activité pour chacune des localisations possibles de ces transporteurs. Ces informations sont indispensables pour faire un modèle correct. Dans notre travail, nous avons du donc faire beaucoup d'hypothèses.

Concernant les cytochromes, nous avons retrouvé beaucoup d'informations concernant les interactions médicamenteuses avec le CYP3A4 mais beaucoup moins sur le CYP3A5. De la même façon, le ratio de contribution de chaque cytochrome pour chacun de ces deux médicaments est difficile à estimer à partir de la littérature.

L'idéal serait la création d'une base de données académique nationale à laquelle aurait accès toute la communauté scientifique et qui permettrait de tracer l'origine des données et leurs modifications. Celles-ci devraient être consensuelles et des fréquences de mise à jour de ces données devraient être définies.

## **Limites de la validation des modèles PBPK**

Il faudrait également définir jusqu'à quel point on peut valider un modèle PBPK. Théoriquement, en plus des concentrations sanguines ou plasmatiques, il faudrait pouvoir valider également les profils de concentrations dans chacun des tissus. Actuellement, des techniques d'imagerie (par exemple l'imagerie TEP pour Positron-Emission Tomography appelée également PET-Scan, ou encore l'IRM pour imagerie par résonance magnétique) pourraient nous permettre de valider les concentrations dans les tissus si toutefois ces méthodes possédaient une résolution importante et que le système soit bien calibré.

En conclusion, dans ce travail nous avons tenté de développer de nouvelles applications des modèles PBPK en situation pathologique. Les résultats de ces études permettent de mieux comprendre certains aspects de la pharmacologie des inhibiteurs des calcineurines. Sur le plan pratique, ces études ont débouché sur la proposition de nouvelles concentrations cibles pour la ciclosporine en greffe de moelle selon le mode d'administration et le type de pathologie traitée, et pour le tacrolimus, sur des recommandations posologiques plus affinées en fonction des covariables.

## **ANNEXE 1**

### **Code du modèle PBPK de la ciclosporine**

```

C*****
                                ADAPT II
                                Release 4
C*****
C
C                                MODEL CICLOSPORINE
C
C This file contains the Fortran subroutines listed below in
C which the user must enter the relevant equations and constants.
C Consult the user's manual for details concerning the format for
C entered equations and definition of symbols.
C
C 1. DiffEq- System differential equations.
C 2. Amat - System state matrix.
C 3. Output- System output equations.
C 4. Symbol- Parameter symbols and model constants.
C 5. Varmod- Error variance model equations.
C 6. Prior - Parameter mean and covariance values
C 7. Sparam- Secondary parameters
C
C*****

```

```

Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
Implicit None

```

```

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

```

```

Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

```

```

C-----C
C 1. Enter Differential Equations Below {e.g. XP(1) = -P(1)*X(1)} C
C-----C

```

```

C Modèle PBPK
C Implémenté selon Tanaka / Kawai / Rowland
C Perfusion ou diffusion limitée. Prise en compte de fu.

```

```

C Version V3 permettant de simuler un modèle linéaire. Modifié de V2
C Le rein est ajouté dans les sorties modèles

```

```

Integer i,Ncomp,I1,I2
real*8 PSbc,KDbc
real*8 Kassmu,Kassfa,Kassbr,Kdismu,Kdisfa,Kdisbr
real*8 BTlu,BThe,BTbo,BTsk,BTh,BTki,BTsp,BTli,BTgu
real*8 V(11),Vart,Vvei,Vi(11),Vv(11),Vtc(11)
real*8 Vbc(11),Vbcart,Vbcvei,Vp(11),Vpart,Vpvei
real*8 Q(11),Qvei,Qart,Qha,Qp(11),Qpart,Qpvei,Qpha
real*8 Qbc(11),Qbcart,Qbcvei,Qbcha
real*8 futc(11),fui(11),fup,PS(11),PSb(11),PSbv,PSba

```

real\*8 Cbcin,Cpin  
real\*8 KDtclu,KDtche,KDtcho,KDtcsk,KDtcth,KDtcki,KDtensp  
real\*8 KDtcli,KDtegu,nPT  
real\*8 Km,Vm,Rmax,KDefbr  
real\*8 Cutc(11),Cubc(11),Cubca,Cubev  
real\*8 Cp(11),FCV(11),FCI(11),Vhel  
real\*8 QCbcorg,QCporg  
real\*8 Hct,BW,Ka,F,Lag,HGT,AGE,GDR,BSA  
real\*8 dum,CLint  
real\*8 fub,CLb  
real\*8 AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe  
real\*8 AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os  
real\*8 AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE  
real\*8 fac

Common fub,CLb  
Common AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe  
Common AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os  
Common AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE

C 11 organes  
C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os  
C 6=peau 7=thymus 8=rein 9=rate 10=foie 11=intestin  
C 12=compartiment veineux 13=compartiment arteriel

C Unités: h, L, dose en µg, concentration en µg/L

C Le compartiment extracellulaire = plasma + milieu interstitiel pour chaque organe

C Distribution diffusion limitée (PS de la membrane tissulaire pour chaque  
C organe) pour le muscle, les poumons, le coeur, les os, la peau, le thymus,  
C tissu adipeux, la rate et l'intestin  
C Distribution perfusion limitée pour le poumon,le rein et le foie.

C Nombre de compartiments physiologiques  
Ncomp = 11

C Hématocrite Hct permettant le calcul du volume des cellules sanguines  
C ainsi que celui du plasma dans les différents compartiments  
 $hct = P(1)$

C Poids BW de l'enfant (kg)  
 $BW = P(2)$

C Age de l'enfant (années)  
 $AGE = P(3)$

C Clairance intrinsèque (L/H) Clint =  $1470 * (AGE^{**}0.83)/(0.31 + AGE^{**}0.83)$

$$CLint = P(4)$$

C Fraction libre plasmatique

$$fup = P(5)$$

C Facteur de multiplication des Kd (pour rendre le modèle linéaire)

C fac = 1 pour modèle d'origine. fac = 10000 pour le modèle linéaire

$$fac = P(6)$$

C XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES XXXX

C Paramètres physiologiques de l'homme standard (70 kg)

C VOLUMES

C Volume total de chaque organe (L) pour les 11 organes et pour

C les compartiments veineux et artériel pour l'enfant en fonction de son age (Bjorkman 2004)

$$V(1) = 30.0 * BW/70.0$$

$$V(2) = 10.0 * BW/70.0$$

$$V(3) = 1.17 * BW/70.0$$

$$V(4) = 0.27 * BW/70.0$$

$$V(5) = 8.7 * BW/70.0$$

$$V(6) = 7.8 * BW/70.0$$

$$V(7) = 0.027 * BW/70.0$$

$$V(8) = 0.31 * BW/70.0$$

$$V(9) = 0.19 * BW/70.0$$

$$V(10) = 1.69 * BW/70.0$$

$$V(11) = 1.65 * BW/70.0$$

C Volume des compartiments sanguins veineux et artériel (trouver les valeurs chez les enfants)

$$Vart = 1.8 * BW/70.0$$

$$Vvei = 3.6 * BW/70.0$$

C Volume de milieu interstitiel (L) pour chacun des 11 organes

C soit la fraction de milieu interstitiel multipliée

C par le volume total de l'organe.

C Fraction de milieu interstitiel chez l'enfant (Bjorkman 2004)

C Pour le muscle et le tissu adipeux, elle est fonction de l'âge

C Muscle

if (AGE .ge. 0.0 .and. AGE .lt. 0.5) then

$$Vi(1) = 0.33 * V(1)$$

```

else if (AGE .ge. 0.5 .and. AGE .lt. 1.0) then
    Vi(1) = 0.27*V(1)
else if (AGE .ge. 1.0 .and. AGE .lt. 2.0) then
    Vi(1) = 0.26*V(1)
else if (AGE .ge. 2.0 .and. AGE .lt. 5.0) then
    Vi(1) = 0.25*V(1)
else if (AGE .ge. 5.0 .and. AGE .lt. 10.0) then
    Vi(1) = 0.21*V(1)
else
    Vi(1) = 0.16*V(1)
endif

```

### C Tissu adipeux

```

if (AGE .ge. 0.0 .and. AGE .lt. 0.5) then
    Vi(2) = 0.54*V(2)
else if (AGE .ge. 0.5 .and. AGE .lt. 1.0) then
    Vi(2) = 0.21*V(2)
else if (AGE .ge. 1.0 .and. AGE .lt. 2.0) then
    Vi(2) = 0.28*V(2)
else if (AGE .ge. 2.0 .and. AGE .lt. 5.0) then
    Vi(2) = 0.30*V(2)
else if (AGE .ge. 5.0 .and. AGE .lt. 10.0) then
    Vi(2) = 0.28*V(2)
else if (AGE .ge. 10.0 .and. AGE .lt. 15.0) then
    Vi(2) = 0.21*V(2)
else
    Vi(2) = 0.16*V(2)
endif

```

### C Autres tissus

```

Vi(3) = 0.20*V(3)
Vi(4) = 0.12*V(4)
Vi(5) = 0.10*V(5)
Vi(6) = 0.30*V(6)
Vi(7) = 0.15*V(7)
Vi(8) = 0.20*V(8)
Vi(9) = 0.10*V(9)
Vi(10) = 0.163*V(10)
Vi(11) = 0.10*V(11)

```

### C Volume vasculaire (L) pour chacun des 11 organes chez l'enfant (Bjorkman 2004)

```

Vv(1) = 0.026*V(1)
Vv(2) = 0.018*V(2)
Vv(3) = 0.53*V(3)
Vv(4) = 0.16*V(4)
Vv(5) = 0.034*V(5)

```

$V_v(6) = 0.025 * V(6)$   
 $V_v(7) = 0.030 * V(7)$   
 $V_v(8) = 0.23 * V(8)$   
 $V_v(9) = 0.33 * V(9)$   
 $V_v(10) = 0.14 * V(10)$   
 $V_v(11) = 0.04 * V(11)$

C Calcul du volume des cellules sanguines (L) pour chaque organe et pour  
 C les compartiments veineux et artériel

```

Do i=1,Ncomp
  Vbc(i) = Vv(i)*hct
End do

```

$V_{bcve} = V_{vei} * hct$   
 $V_{bcart} = V_{art} * hct$

C Calcul du volume de plasma (L) pour chaque organe et pour les compartiments  
 C veineux et artériel

```

Do i=1,Ncomp
  Vp(i) = Vv(i)*(1 - hct)
End do

```

$V_{pve} = V_{vei} * (1 - hct)$   
 $V_{part} = V_{art} * (1 - hct)$

C Calcul du volume tissulaire (L) pour chacun des 11 organes  
 C Si V est le volume total de l'organe (secteurs vasculaire + intersitiel + tissulaire)  
 C Le volume tissulaire est égale à  $V - V_v - V_i$

```

Do i=1,Ncomp
  Vtc(i) = V(i) - Vv(i) - Vi(i)
End do

```

C DEBITS

C Débits sanguins (L/h) des 11 organes en fonction de l'âge (Bjorkman 200

C Débit du muscle (1)  
 $Q(1) = 45.0 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit du tissu adipeux (2)  
 $Q(2) = 15.6 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit du coeur (4)  
 $Q(4) = 9.0 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit de l'os (5) Valeurs chez l'adulte corrigées par  
C le rapport de masses corporelles entre l'enfant et l'adulte  
 $Q(5) = 15.0 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit de la peau (6)  
 $Q(6) = 18.0 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit du thymus (7) Valeurs chez l'adulte corrigées par  
C le rapport de masses corporelles entre l'enfant et l'adulte  
 $Q(7) = 4.8 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit des reins (8)  
 $Q(8) = 66.0 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit de la rate (9)  
 $Q(9) = 4.6 * (BW/70)^{0.75}$

C Débit de l'intestin (11)  
 $Q(11) = 66.0 * (BW/70)^{0.75}$

C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os  
C 6=peau 7=thymus 8=rein 9=rate 10=foie 11=intestins  
C Q hépatique total (L/h) = Q rate + Q intestin + Q artère hépatique  
C Dans l'article de Bjorkman 2004, on a les débits de la rate, de l'intestin et du foie, mais pas  
C celui de l'artère hépatique. Il est calculé selon le rapport des masses corporelles.

$$Q_{ha} = 18.0 * (BW/70.0)^{0.75}$$

$$Q(10) = Q(9) + Q(11) + Q_{ha}$$

C Débit des poumons (3)  
C Débit calculé en fonction des autres débits  
 $Q(3) = Q(1) + Q(2) + Q(4) + Q(5) + Q(6) + Q(7) + Q(8) + Q(10)$

C Débit sanguin veineux (L/h) = somme des Q tissus sauf poumon, rate  
C et intestin donc Q veineux = Q muscle + Q tissu adipeux +  
C Q coeur + Q os + Q peau + Q thymus + Q rein + Q foie = Q poumons  
 $Q_{vei} = Q(3)$

C Q artériel (L/h) = Q poumon  
 $Q_{art} = Q(3)$

C Calcul du débit des cellules sanguines (L/h) pour chacun des 11  
C organes, pour les compartiments veineux et artériel et pour l'artère hépatique

$$\text{do } i=1, N_{\text{comp}} \\ Q_{bc}(i) = Q(i) * hct$$



```

end do
Qbcvei = Qvei*hct
Qbcart = Qart*hct
Qbcha = Qha*hct

```

C Calcul du débit du plasma (L/h) pour chacun des 11 organes, pour les  
C compartiments veineux et artériel et pour l'artère hépatique

```

do i=1,Ncomp
  Qp(i) = Q(i)*(1-hct)
end do

```

```

Qpvei = Qvei*(1-hct)
Qpart = Qart*(1-hct)
Qpha = Qha*(1-hct)

```

C XXXXXXXXXXXX FIN DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES XXXXX

C XXXXXXXXXXXX PARAMETRES SPECIFIQUES CICLOSPORINE XXXXX

C Si voie orale:  $K_a=0.91 \text{ h}^{-1}$   $Lag = 0.3 \text{ h}$   $F = 0.47$

C Dose introduite dans le compartiment dépôt (40)

```

Ka = 0.91
F = 0.47

```

C Distribution sanguine

C Liaison aux protéines plasmatiques linéaire : La fraction

C libre plasmatique fuP varie un peu en fonction de l'âge

C if (age.LT.15) then

C fup = 0.07

C else

C fup = 0.06

C endif

C Liaison simple spécifique sur un site dans ou sur les érythrocytes,

C caractérisée par une constante de dissociation  $KD,BC = 0.185 \mu\text{g/mL}$

C soit  $185 \mu\text{g/L}$  et une capacité de liaison  $nPT = 4.64 \mu\text{g-eq/mL}$  soit  $4640 \mu\text{g-eq/L}$

C PSBC de  $560\text{mL/h}$  pour 1 mL de sang

```

KDbc = 185.0*fac
nPT = 4640.0*fac
PSbc = 0.560

```

C Calcul des produits perméabilité par surface L/h des cellules sanguines

C pour chaque compartiment

```

do i=1,Ncomp
  PSb(i)=PSbc*Vv(i)*1000

```

end do

$$PS_{bv} = PS_{bc} * V_{vei} * 1000$$

$$PS_{ba} = PS_{bc} * V_{art} * 1000$$

C Produit-perméabilité tissulaire en L/h pour tous les organes (pour le foie et le C tissu adipeux dont la distribution est limitée par le flux sanguin, la valeur est C fixée à 2 ordres au dessus de la valeur du flux sanguin de l'organe)

C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os

C 6=peau 7=thymus 8=rein 9=rate 10=foie 11=intestin

C Valeurs de l'Homme adulte de 70 kg

$$PS(1) = 672.0$$

$$PS(2) = 22.12$$

$$PS(3) = 30 * Q(3)$$

$$PS(4) = 39.2$$

$$PS(5) = 109.2$$

$$PS(6) = 84.0$$

$$PS(7) = 1.96$$

$$PS(8) = 30 * Q(8)$$

$$PS(9) = 20.72$$

$$PS(10) = 30 * Q(10)$$

$$PS(11) = 109.2$$

C Transposition à l'enfant par le rapport des poids 70/0.25

Do i=1,11

$$PS(i) = PS(i) * (BW/70.0)$$

End do

C Fraction libre dans les tissus pour chacun des 11 organes

$$f_{utc}(1) = 0.041$$

$$f_{utc}(2) = 0.0010$$

$$f_{utc}(3) = 0.015$$

$$f_{utc}(4) = 0.017$$

$$f_{utc}(5) = 0.10$$

$$f_{utc}(6) = 0.143$$

$$f_{utc}(7) = 0.1002$$

$$f_{utc}(8) = 0.013$$

$$f_{utc}(9) = 0.010$$

$$f_{utc}(10) = 0.009$$

$$f_{utc}(11) = 0.021$$

C Fraction libre dans le milieu interstitiel pour chacun des 11 organes

$$f_{ui}(1) = 0.11$$

$$f_{ui}(2) = 0.11$$

$$f_{ui}(3) = 0.11$$

$$f_{ui}(4) = 0.11$$

fui(5) = 0.11  
fui(6) = 0.20  
fui(7) = 0.11  
fui(8) = 0.11  
fui(9) = 0.06  
fui(10) = 0.06  
fui(11) = 0.11

C Constantes d'association Kass et de dissociation Kdis (L/h) pour  
C le modèle 1 (LD) chez l'adulte corrigée par le rapport des masses corporelles

kassmu = 0.154\*(BW/70.0)  
kassfa = 336\*(BW/70.0)

kdismu = 0.00728\*(BW/70.0)  
kdisfa = 4.032\*(BW/70.0)

C Nombre de sites de liaison BT ( $\mu\text{g-eq/L}$ ) pour les modèles 2 (NL)

BTlu = 4800\*fac  
BThe = 1900\*fac  
BTbo = 6000\*fac  
BTsk = 8500\*fac  
BTth = 10000\*fac  
BTki = 6300\*fac  
BTsp = 7800\*fac  
BTli = 14000\*fac  
BTgu = 2400\*fac

C KD,TC ( $\mu\text{g/L}$ ) pour les modèles 2 (NL)

KDtclu = 0.66\*fac  
KDtche = 0.2\*fac  
KDtcbo = 60.0\*fac  
KDtesk = 39.0\*fac  
KDteth = 15.0\*fac  
KDtcki = 5.8\*fac  
KDtcsp = 10.0\*fac  
KDteli = 16.0\*fac  
KDtcgu = 4.8\*fac

C XXXXXXXXFIN DES PARAMETRES SPECIFIQUES CICLOSPORINE XX

C Calcul des coefficients FCV et FCI

C  $C_p = C_e * FCV$

C  $C_i = C_e * FCI$

Do i=1,Ncomp

$FCV(i) = (fui(i)/fup)*(Vp(i)+Vi(i))/((fui(i)/fup)*Vp(i)+Vi(i))$

End do

Do i=1,Ncomp

$$FCI(i) = (Vp(i)+Vi(i))/((fui(i)/fup)*Vp(i)+Vi(i))$$

End do

C Pour tous les modèles, calcul de la concentration de la forme libre  
C dans les cellules sanguines des capillaires de chaque organe et dans  
C les compartiments veineux et artériel

do i=1,Ncomp

$$dum = (X(i)-KDbc-nPT)**2 + 4*KDbc*X(i)$$

$$Cubc(i)=0.5*(X(i)-KDbc-nPT + dsqrt(dum))$$

end do

$$dum = (X(12)-KDbc-nPT)**2 + 4*KDbc*X(12)$$

$$Cubcv=0.5*(X(12)-KDbc-nPT + dsqrt(dum))$$

$$dum = (X(13)-KDbc-nPT)**2 + 4*KDbc*X(13)$$

$$Cubca=0.5*(X(13)-KDbc-nPT + dsqrt(dum))$$

C Pour les modèles 1 et 2 (tous les organes),  
C calcul de la concentration plasmatique ( $\mu\text{g/L}$ )

$$Cp(1)= X(14)*FCV(1)$$

$$Cp(2)= X(15)*FCV(2)$$

$$Cp(3)= X(16)*FCV(3)$$

$$Cp(4)= X(17)*FCV(4)$$

$$Cp(5)= X(18)*FCV(5)$$

$$Cp(6)= X(19)*FCV(6)$$

$$Cp(7)= X(20)*FCV(7)$$

$$Cp(8)= X(21)*FCV(8)$$

$$Cp(9)= X(22)*FCV(9)$$

$$Cp(10)= X(23)*FCV(10)$$

$$Cp(11)= X(24)*FCV(11)$$

C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os  
C 6=peau 7=thymus 8=rein 9=rate 10=foie 11=intestin

C Modèle 2 : calcul des concentrations tissulaires libres (Cutc)

C Poumons

$$dum=dsqrt((X(31)-KDtclu/futc(3)-BTlu)**2 + 4*KDtclu*X(31)/futc(3))$$

$$Cutc(3)= 0.5*futc(3)*(X(31) - KDtclu/futc(3) - BTlu + dum)$$

C Coeur

$$dum=dsqrt((X(32)-KDtche/futc(4)-BThe)**2 + 4*KDtche*X(32)/futc(4))$$

$$Cutc(4)= 0.5*futc(4)*(X(32) - KDtche/futc(4) - BThe + dum)$$

C Os

$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(33)-\text{KDtcbo}/\text{futc}(5)-\text{BTbo})^{**2}+4*\text{KDtcbo}*\text{X}(33)/\text{futc}(5))$$
$$\text{Cutc}(5)=0.5*\text{futc}(5)*(\text{X}(33)-\text{KDtcbo}/\text{futc}(5)-\text{BTbo}+\text{dum})$$

C Peau

$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(34)-\text{KDtsk}/\text{futc}(6)-\text{BTsk})^{**2}+4*\text{KDtsk}*\text{X}(34)/\text{futc}(6))$$
$$\text{Cutc}(6)=0.5*\text{futc}(6)*(\text{X}(34)-\text{KDtsk}/\text{futc}(6)-\text{BTsk}+\text{dum})$$

C Thymus

$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(35)-\text{KDtcth}/\text{futc}(7)-\text{BTth})^{**2}+4*\text{KDtcth}*\text{X}(35)/\text{futc}(7))$$
$$\text{Cutc}(7)=0.5*\text{futc}(7)*(\text{X}(35)-\text{KDtcth}/\text{futc}(7)-\text{BTth}+\text{dum})$$

C Rein

$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(36)-\text{KDtcki}/\text{futc}(8)-\text{BTki})^{**2}+4*\text{KDtcki}*\text{X}(36)/\text{futc}(8))$$
$$\text{Cutc}(8)=0.5*\text{futc}(8)*(\text{X}(36)-\text{KDtcki}/\text{futc}(8)-\text{BTki}+\text{dum})$$

C Rate

$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(37)-\text{KDtcsp}/\text{futc}(9)-\text{BTsp})^{**2}+4*\text{KDtcsp}*\text{X}(37)/\text{futc}(9))$$
$$\text{Cutc}(9)=0.5*\text{futc}(9)*(\text{X}(37)-\text{KDtcsp}/\text{futc}(9)-\text{BTsp}+\text{dum})$$

C FOIE : Calcul des concentrations dans les cellules sanguines et  
C dans le plasma entrant dans le foie

$$\text{Cbcin} = \text{Qbc}(9)*\text{X}(9) + \text{Qbc}(11)*\text{X}(11) + \text{Qbcha}*\text{X}(13)$$
$$\text{Cbcin} = \text{Cbcin}/(\text{Qbc}(9)+\text{Qbc}(11)+\text{Qbcha})$$
$$\text{Cpin}=(\text{Qp}(9)*\text{Cp}(9)+\text{Qp}(11)*\text{Cp}(11)+\text{Qpha}*\text{X}(26))/(\text{Qp}(9)+\text{Qp}(11)+\text{Qpha})$$
$$\text{dum}=\text{dsqrt}((\text{X}(38)-\text{KDtcli}/\text{futc}(10)-\text{BTli})^{**2}+4*\text{KDtcli}*\text{X}(38)/\text{futc}(10))$$
$$\text{Cutc}(10)=0.5*\text{futc}(10)*(\text{X}(38)-\text{KDtcli}/\text{futc}(10)-\text{BTli}+\text{dum})$$

C L'élimination de la ciclosporine ne se fait qu'au niveau du foie  
C à partir du compartiment intracellulaire, avec une clairance  
C hépatique intrinsèque suivant une cinétique de Michaelis-Menten.

C Clairance intrinsèque 6 L/h/kg pour un adulte standard de 70kg.

C soit une clairance intrinsèque de 420 L/h.

C Clairance systémique.

$$\text{fub}=\text{fup}/(1-\text{hct}+\text{fup}*\text{hct}*(1+\text{nPT}/\text{KDbc}))$$

$$\text{CLb} = (\text{Q}(10)*\text{fub}*\text{CLint})/(\text{Q}(10) + \text{fub}*\text{CLint})$$

C XXX

C Calcul des vitesses d'élimination hépatique pour le foie

$$V_{he1} = CL_{int} * Cutc(10)$$

C Intestin

$$dum = \text{dsqrt}((X(39) - KDtcgu/futc(11) - BTgu)**2 + 4 * KDtcgu * X(39)/futc(11))$$
$$Cutc(11) = 0.5 * futc(11) * (X(39) - KDtcgu/futc(11) - BTgu + dum)$$

Somme des (débit\*concentration dans les cellules sanguines) pour tous les organes nécessaire pour le calcul de la concentration dans les cellules sanguines du compartiment veineux

$$QCbcorg = X(1) * Qbc(1) + X(2) * Qbc(2) + X(4) * Qbc(4)$$
$$QCbcorg = QCbcorg + X(5) * Qbc(5) + X(6) * Qbc(6)$$
$$QCbcorg = QCbcorg + X(7) * Qbc(7) + X(8) * Qbc(8) + X(10) * Qbc(10)$$

Somme des (débit\*concentration dans le plasma) pour tous les organes nécessaire pour le calcul de la concentration dans le plasma du compartiment veineux

$$QCporg = Cp(1) * Qp(1) + Cp(2) * Qp(2) + Cp(4) * Qp(4) + Cp(5) * Qp(5) + Cp(6) * Qp(6)$$
$$QCporg = QCporg + Cp(7) * Qp(7) + Cp(8) * Qp(8) + Cp(10) * Qp(10)$$

CXX

C Equations différentielles

C CONCENTRATION DANS LES CELLULES SANGUINES

C 1. Muscle

$$XP(1) = (Qbc(1) * (X(13) - X(1)) + PSb(1) * (fup * FCV(1) * X(14) - Cubc(1)))$$
$$XP(1) = XP(1) / Vbc(1)$$

C 2. Tissu adipeux

$$XP(2) = (Qbc(2) * (X(13) - X(2)) + PSb(2) * (fup * FCV(2) * X(15) - Cubc(2)))$$
$$XP(2) = XP(2) / Vbc(2)$$

C 3. Poumon

$$XP(3) = (Qbc(3) * (X(12) - X(3)) + PSb(3) * (fup * FCV(3) * X(16) - Cubc(3)))$$
$$XP(3) = XP(3) / Vbc(3)$$

C 4. Coeur

$$XP(4)=(Qbc(4)*(X(13)-X(4))+PSb(4)*(fup*FCV(4)*X(17)-Cubc(4)))$$

$$XP(4) = XP(4)/Vbc(4)$$

#### C 5. Os

$$XP(5)=(Qbc(5)*(X(13)-X(5))+PSb(5)*(fup*FCV(5)*X(18)-Cubc(5)))$$

$$XP(5) = XP(5)/Vbc(5)$$

#### C 6. Peau

$$XP(6)=(Qbc(6)*(X(13)-X(6))+PSb(6)*(fup*FCV(6)*X(19)-Cubc(6)))$$

$$XP(6) = XP(6)/Vbc(6)$$

#### C 7. Thymus

$$XP(7)=(Qbc(7)*(X(13)-X(7))+PSb(7)*(fup*FCV(7)*X(20)-Cubc(7)))$$

$$XP(7) = XP(7)/Vbc(7)$$

#### C 8. Rein

$$XP(8)=(Qbc(8)*(X(13)-X(8))+PSb(8)*(fup*FCV(8)*X(21)-Cubc(8)))$$

$$XP(8) = XP(8)/Vbc(8)$$

#### C 9. Rate

$$XP(9)=(Qbc(9)*(X(13)-X(9))+PSb(9)*(fup*FCV(9)*X(22)-Cubc(9)))$$

$$XP(9) = XP(9)/Vbc(9)$$

#### C 10. foie

$$XP(10)=Qbc(10)*(Cbcin-X(10))+PSb(10)*(fup*FCV(10)*X(23)-Cubc(10))$$

$$XP(10) = XP(10)/Vbc(10)$$

#### C 11. Intestin

$$XP(11)=Qbc(11)*(X(13)-X(11))+PSb(11)*(fup*FCV(11)*X(24)-Cubc(11))$$

$$XP(11) = XP(11)/Vbc(11)$$

#### C 12. Compartiment veineux

$$XP(12)=(QCbcorg-Qbc(3)*X(12)+PSbv*(fup*X(25)-Cubcv))/Vbcvei$$

#### C 12. Compartiment artériel

$$XP(13)=(Qbc(3)*(X(3)-X(13))+PSba*(fup*X(26)-Cubca))/Vbcart$$

## C CONCENTRATION DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE

### C 1. Muscle (modèle 1)

$$XP(14)=Qp(1)*(X(26)-Cp(1))-PSb(1)*(fup*FCV(1)*X(14)-Cubc(1))$$

$$XP(14)=XP(14)-(PS(1)*(fui(1)*FCI(1)*X(14)-futc(1)*X(27)))$$

$$XP(14)=XP(14)/(Vp(1)+Vi(1))$$

### C 2. Tissu adipeux (modèle 1)

$$XP(15)=Qp(2)*(X(26)-Cp(2))-PSb(2)*(fup*FCV(2)*X(15)-Cubc(2))$$

$$XP(15)=XP(15)-(PS(2)*(fui(2)*FCI(2)*X(15)-futc(2)*X(29)))$$

$$XP(15)=XP(15)/(Vp(2)+Vi(2))$$

### C 3. Poumon (modèle 2)

$$XP(16)=Qp(3)*(X(25)-Cp(3))-PSb(3)*(fup*FCV(3)*X(16)-Cubc(3))$$

$$XP(16)=XP(16)-(PS(3)*(fui(3)*FCI(3)*X(16)-Cutc(3)))$$

$$XP(16)=XP(16)/(Vp(3)+Vi(3))$$

### C 4. Coeur (modèle 2)

$$XP(17)=Qp(4)*(X(26)-Cp(4))-PSb(4)*(fup*FCV(4)*X(17)-Cubc(4))$$

$$XP(17)=XP(17)-(PS(4)*(fui(4)*FCI(4)*X(17)-Cutc(4)))$$

$$XP(17)=XP(17)/(Vp(4)+Vi(4))$$

### C 5. Os (modèle 2)

$$XP(18)=Qp(5)*(X(26)-Cp(5))-PSb(5)*(fup*FCV(5)*X(18)-Cubc(5))$$

$$XP(18)=XP(18)-(PS(5)*(fui(5)*FCI(5)*X(18)-Cutc(5)))$$

$$XP(18)=XP(18)/(Vp(5)+Vi(5))$$

### C 6. Peau (modèle 2)

$$XP(19)=Qp(6)*(X(26)-Cp(6))-PSb(6)*(fup*FCV(6)*X(19)-Cubc(6))$$

$$XP(19)=XP(19)-(PS(6)*(fui(6)*FCI(6)*X(19)-Cutc(6)))$$

$$XP(19)=XP(19)/(Vp(6)+Vi(6))$$

### C 7. Thymus (modèle 2)

$$XP(20)=Qp(7)*(X(26)-Cp(7))-PSb(7)*(fup*FCV(7)*X(20)-Cubc(7))$$

$$XP(20)=XP(20)-(PS(7)*(fui(7)*FCI(7)*X(20)-Cutc(7)))$$

$$XP(20)=XP(20)/(Vp(7)+Vi(7))$$

### C 8. Rein (modèle 2)

$$XP(21)=Qp(8)*(X(26)-Cp(8))-PSb(8)*(fup*FCV(8)*X(21)-Cubc(8))$$

$$XP(21)=XP(21)-(PS(8)*(fui(8)*FCI(8)*X(21)-Cutc(8)))$$



$$XP(21)=XP(21)/(Vp(8)+Vi(8))$$

#### C 9. Rate (modèle 2)

$$XP(22)=Qp(9)*(X(26)-Cp(9))-PSb(9)*(fup*FCV(9)*X(22)-Cubc(9))$$

$$XP(22)=XP(22)-(PS(9)*(fui(9)*FCI(9)*X(22)-Cutc(9)))$$

$$XP(22)=XP(22)/(Vp(9)+Vi(9))$$

#### C 10. Foie (modèle 2)

$$XP(23)=Qp(10)*(Cpin-Cp(10))-PSb(10)*(fup*FCV(10)*X(23)-Cubc(10))$$

$$XP(23)=XP(23)-(PS(10)*(fui(10)*FCI(10)*X(23)-Cutc(10)))$$

$$XP(23)=XP(23)/(Vp(10)+Vi(10))$$

#### C 11. Intestin (modèle 2)

$$XP(24)=Qp(11)*(X(26)-Cp(11))-PSb(11)*(fup*FCV(11)*X(24)-Cubc(11))$$

$$XP(24)=XP(24)-(PS(11)*(fui(11)*FCI(11)*X(24)-Cutc(11)))$$

$$XP(24)=XP(24)/(Vp(11)+Vi(11))$$

### C CONCENTRATION DANS LE PLASMA

#### C Compartiment veineux

$$XP(25)=(QCporg-Qp(3)*X(25)-PSbv*(fup*X(25)-Cubcv))/Vpvei$$

$$XP(25) = XP(25) + R(1)/Vpvei$$

#### C Compartiment artériel

$$XP(26)=(Qp(3)*(Cp(3)-X(26))-PSba*(fup*X(26)-Cubca))/Vpart$$

### C CONCENTRATION DANS LES CELLULES TISSULAIRES

#### C MODELE 1

#### C 1. Muscle : pool de l'équilibre rapide (27) et pool de l'équilibre lent (28)

$$XP(27)=PS(1)*(fui(1)*FCI(1)*X(14)-futc(1)*X(27))$$

$$XP(27)=(XP(27)-kassmu*futc(1)*X(27)+kdismu*X(28))/Vtc(1)$$

$$XP(28)=(futc(1)*kassmu*X(27)-kdismu*X(28))/Vtc(1)$$

#### C 2. Tissu adipeux : pool de l'équilibre rapide (29)

#### C et pool de l'équilibre lent (30)

$$XP(29)=PS(2)*(fui(2)*FCI(2)*X(15)-futc(2)*X(29))$$

$$XP(29)=(XP(29)-kassfa*futc(2)*X(29)+kdisfa*X(30))/Vtc(2)$$

$$XP(30)=(futc(2)*kassfa*X(29)-kdisfa*X(30))/Vtc(2)$$

C MODELE 2

C 3. Poumon

$$XP(31)=(PS(3)*(fui(3)*FCI(3)*X(16)-Cutc(3)))/Vtc(3)$$

C 4. Coeur

$$XP(32)=(PS(4)*(fui(4)*FCI(4)*X(17)-Cutc(4)))/VTC(4)$$

C 5. Os

$$XP(33)=(PS(5)*(fui(5)*FCI(5)*X(18)-Cutc(5)))/Vtc(5)$$

C 6. Peau

$$XP(34)=(PS(6)*(fui(6)*FCI(6)*X(19)-Cutc(6)))/Vtc(6)$$

C 7. Thymus

$$XP(35)=(PS(7)*(fui(7)*FCI(7)*X(20)-Cutc(7)))/Vtc(7)$$

C 8. Rein

$$XP(36)=(PS(8)*(fui(8)*FCI(8)*X(21)-Cutc(8)))/Vtc(8)$$

C 9. Rate

$$XP(37)=(PS(9)*(fui(9)*FCI(9)*X(22)-Cutc(9)))/Vtc(9)$$

C 10. Foie

$$XP(38)=PS(10)*(fui(10)*FCI(10)*X(23)-Cutc(10))$$

$$XP(38)= (XP(38) - Vhel)/Vtc(10)$$

C 11. Intestin

$$XP(39)=(PS(11)*(fui(11)*FCI(11)*X(24)-Cutc(11)))/Vtc(11)$$

C XXX

C Concentration dans le sang total du compartiment veineux

$$X(53) = X(12)*hct+X(25)*(1-hct)$$

C Concentration dans le foie interstitiel

$$X(54) = FCI(10)* X(23)$$

C Concentration dans l'os interstitiel

$$X(55) = FCI(5) * X(18)$$

C Concentration dans la peau interstitiel

$$X(56) = FCI(6) * X(19)$$

C Concentration dans le thymus interstitiel

$$X(57) = FCI(7) * X(20)$$

C Concentration dans l'intestin interstitiel

$$X(58) = FCI(11) * X(24)$$

C Concentration dans le rein interstitiel

$$X(59) = FCI(8) * X(21)$$

C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os 6=peau 7=thymus 8=rein C 9=rate  
10=foie 11=intestin 12=compartiment veineux 13=compartiment artériel

C XXX

C Calcul des AUC 24 heures

C AUC Sang veineux total (53)

IF (T.GT.24) THEN

$$I2 = 0$$

ELSE

$$I2 = 1$$

ENDIF

$$XP(45) = I2 * X(53)$$

$$AUC24sg = X(45)$$

C AUC Foie interstitiel (54)

IF (T.GT.24) THEN

$$I2 = 0$$

ELSE

$$I2 = 1$$

ENDIF

$$XP(46) = I2 * X(54)$$

$$AUC24fo = X(46)$$

C AUC Intestin interstitiel

IF (T.GT.24) THEN

$$I2 = 0$$

ELSE

$$I2 = 1$$

ENDIF

$$XP(47) = I2 * X(58)$$

$$AUC24in = X(47)$$

C AUC Peau interstitiel

```
IF (T.GT.24) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(48) = I2*X(56)
AUC24pe = X(48)
```

C AUC Os interstitiel

```
IF (T.GT.24) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(49) = I2*X(55)
AUC24os = X(49)
```

C AUC Thymus interstitiel

```
IF (T.GT.24) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(50) = I2*X(57)
AUC24th = X(50)
```

C AUC Rein interstitiel et intracellulaire

```
IF (T.GT.24) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(51) = I2*X(59)
AUC24ki = X(51)

XP(52) = I2*X(36)
AUC24kiic = X(52)
```

C Ratio de E sur Emax pour le sang, la peau et l'intestin (concentration libre interstitielle)  
C IC50 = 10

C AUC de l'effet sur au SS pour le sang

```
IF ((T.GE.120).OR.(T.LT.96)) THEN
```

```

I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(40) = I2*(fub*X(53))/(10 + (fub*X(53)))
EFFSG = X(40)

```

C AUC de l'effet au SS pour la peau

```

IF ((T.GE.120).OR.(T.LT.96)) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(41) = I2*(fui(6)*X(56))/(10 + (fui(6)*X(56)))
EFFPE = X(41)

```

C AUC de l'effet au SS pour l'intestin

```

IF ((T.GE.120).OR.(T.LT.96)) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(42) = I2*(fui(11)*X(58))/(10 + (fui(11)*X(58)))
EFFIN = X(42)

```

C AUC de l'effet au SS pour le foie

```

IF ((T.GE.120).OR.(T.LT.96)) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(43) = I2*(fui(10)*X(54))/(10 + (fui(10)*X(54)))
EFFFO = X(43)

```

C AUC de l'effet au SS pour les reins

```

IF ((T.GE.120).OR.(T.LT.96)) THEN
I2 = 0
ELSE
I2 = 1
ENDIF
XP(44) = I2*(fui(8)*X(59))/(10 + (fui(8)*X(59)))
EFFRE = X(44)

```

```

C
C-----C
C-----C
C

```

Return  
End

C#####C

Subroutine AMAT(A)  
Implicit None

Include 'globals.inc'  
Include 'model.inc'

Integer I,J  
Real\*8 A(MaxNDE,MaxNDE)

DO I=1,Ndeqs  
  Do J=1,Ndeqs  
    A(I,J)=0.0D0  
  End Do  
End Do

C-----C  
C 2. Enter non zero elements of state matrix {e.g.  $A(1,1) = -P(1)$  } C  
C---c-----C

C  
C-----C  
C-----C  
C

Return  
End

C#####C

Subroutine OUTPUT(Y,T,X)  
Implicit None

Include 'globals.inc'  
Include 'model.inc'

Real\*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

C  
C-----C  
C 3. Enter Output Equations Below {e.g.  $Y(1) = X(1)/P(2)$  } C  
C---c-----C

Integer i,Ncomp,I1,I2  
real\*8 PSbc,KDbc  
real\*8 Kassmu,Kassfa,Kassbr,Kdismu,Kdisfa,Kdisbr  
real\*8 BTlu,BThe,BTbo,BTsk,BTth,BTki,BTsp,BTli,BTgu  
real\*8 V(11),Vart,Vvei,Vi(11),Vv(11),Vtc(11)

```

real*8 Vbc(11),Vbcart,Vbcvei,Vp(11),Vpart,Vpvei
real*8 Q(11),Qvei,Qart,Qha,Qp(11),Qpart,Qpvei,Qpha
real*8 Qbc(11),Qbcart,Qbcvei,Qbcha
real*8 futc(11),fui(11),fup,PS(11),PSb(11),PSbv,PSba
real*8 Cbcin,Cpin
real*8 KDtclu,KDtche,KDtco,KDtcsk,KDtcth,KDtcki,KDtensp
real*8 KDtcli,KDtclu,nPT
real*8 Km,Vm,Rmax,KDefbr
real*8 Cutc(11),Cubc(11),Cubca,Cubcv
real*8 Cp(11),FCV(11),FCI(11),Vhel
real*8 QCbcorg,QCporg
real*8 Hct,BW,Ka,F,Lag,HGT,AGE,GDR,BSA
real*8 dum,CLint
real*8 fub,CLb
real*8 AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe
real*8 AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os
real*8 AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE
Common fub,CLb
Common AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe
Common AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os
Common AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE

```

```

Y(1)=X(53) !veineux total
Y(2)=X(38) !foie intracellulaire
Y(3)=X(39) !intestin intracellulaire
Y(4)=X(34) !peau intracellulaire
Y(5)=X(33) !os intracellulaire
Y(6)=X(35) !thymus intracellulaire
Y(7)=X(54) !foie interstitiel
Y(8)=X(58) !intestin interstitiel
Y(9)=X(56) !peau interstitiel
Y(10)=X(55) !os interstitiel
Y(11)=X(57) !thymus interstitiel
Y(12)=X(59) !rein interstitiel

```

C Données de référence: 2000 µg/kg bid en perf IV de 2h  
C C2h = 500 à 2000 µg/L et C12h = 50 à 300 µg/L

C 1=muscle 2=tissu adipeux 3=poumon 4=coeur 5=os 6=peau 7=thymus  
C 8=rein 9=rate 10=foie 11=intestin 12=cerveau 13=veine 14=artere  
C 15=compartiment des cellules sanguines

```

Return
End

```

```

C-----C
C-----C

```

C#####C

Subroutine SYMBOL  
Implicit None

Include 'globals.inc'  
Include 'model.inc'  
integer i

C-----C  
C 4. Enter as Indicated C  
C---c-----C

NDEqs = 52 ! Enter # of Diff. Eqs.  
NSParam = 6 ! Enter # of System Parameters.  
NVparam = 1 ! Enter # of Variance Parameters.  
NSecPar = 15 ! Enter # of Secondary Parameters.  
NSecOut = 0 ! Enter # of Secondary Outputs (not used).  
Ieqsol = 1 ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.  
Descr = 'PBPK ciclo '

C-----C  
C-----C  
C  
C-----C  
C 4. Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel') C  
C---c-----C

Psym(1) = 'hct'  
Psym(2) = 'BW kg'  
Psym(3) = 'Age années'  
Psym(4) = 'CLint L/h'  
Psym(5) = 'fup 0.06'  
Psym(6) = 'fac 1/10^4'

C-----C  
C-----C  
CC  
C-----C  
C 4. Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'} C  
C---c-----C

PVsym(1) = 'Slope 0.25'

C-----C  
C-----C  
CC



```

C-----C
C 4. Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSSym(1)='CLt'} C
C---c-----C

```

```

PSSym(1) = 'fub'
PSSym(2) = 'CLb'
PSSym(3) = 'AUC sg 24h'
PSSym(4) = 'AUC fo 24h'
PSSym(5) = 'AUC in 24h'
PSSym(6) = 'AUC pe 24h'
PSSym(7) = 'AUC os 24h'
PSSym(8) = 'AUC th 24h'
PSSym(9) = 'AUC ki 24h'
PSSym(10) = 'AUC ki ic'
PSSym(11) = 'AUC eff sg'
PSSym(12) = 'AUC eff peau'
PSSym(13) = 'AUC eff intestin'
PSSym(14) = 'AUC eff foie'
PSSym(15) = 'AUC eff reins'

```

```

C
C-----C
C-----C
C

```

```

Return
End

```

```

C#####C

```

```

Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
Implicit None

```

```

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

```

```

Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

```

```

C-----C
C 5. Enter Variance Model Equations Below C
C {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 } C
C---c-----C

```

```

V(1) = (PV(1)*Y(1) + 0.01)**2

```

```

C-----C
C-----C
Return
End

```

```

C#####C

```

```

Subroutine PRIOR(Pmean,Pcov,ICmean,ICcov)
Implicit None

```

```
Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'
```

```
Integer I,J
```

```
Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)
```

```
Real*8 Pcov(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE), ICcov(MaxNDE,MaxNDE)
```

```
C-----C
C 6. Enter Nonzero Elements of Prior Mean Vector      C
C   { e.g. Pmean(2) = 10.0   }                      C
C-----C
```

```
Pmean(1) = -1
Pmean(2) = -1
Pmean(3) = -1
Pmean(4) = (420*(P(3)**0.83)/(0.31 + P(3)**0.83))*3.5
Pmean(5) = 0.06
```

```
C-----C
C-----C
CC
C-----C
C 6. Enter Nonzero Elements of Covariance Matrix (Lower Triang.)  C
C   { e.g. Pcov(2,1) = 0.25   }                      C
C-----C
```

```
Pcov(1,1) = -1
Pcov(2,2) = -1
Pcov(3,3) = -1
Pcov(4,4) = (0.3*Pmean(4))**2
Pcov(5,5) = (0.3*Pmean(5))**2
```

```
C-----C
C-----C
```

```
Return
End
```

```
C#####C
```

```
Subroutine SPARAM(PS,P,IC)
Implicit None
```

```
Include 'globals.inc'
```

```
Real*8 PS(MaxNSECP), P(MaxNSP+MaxNDE), IC(MaxNDE)
```

```
C-----C
C 7. Enter Equations Defining Secondary Paramters      C
C   { e.g. PS(1) = P(1)*P(2) }                      C
C-----C
```

real\*8 fub,CLb  
real\*8 AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe  
real\*8 AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os  
real\*8 AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE

Common fub,CLb  
Common AUC12sg,AUC24sg,AUC12fo,AUC24fo,AUC12pe,AUC24pe  
Common AUC12in,AUC24in,AUC12th,AUC24th,AUC12os,AUC24os  
Common AUC24ki,AUC24kiic,EFFSG,EFFPE,EFFIN,EFFFO,EFFRE

PS(1) = fub  
PS(2) = CLb  
PS(3) = AUC24sg  
PS(4) = AUC24fo  
PS(5) = AUC24in  
PS(6) = AUC24pe  
PS(7) = AUC24os  
PS(8) = AUC24th  
PS(9) = AUC24ki  
PS(10) = AUC24kiic  
PS(11) = EFFSG  
PS(12) = EFFPE  
PS(13) = EFFIN  
PS(14) = EFFFO  
PS(15) = EFFRE

C-----C  
C-----C  
C

Return  
End

**ANNEXE 2**  
**Code du modèle PBPK du tacrolimus**

```

C*****
                                ADAPT II
                                Release 4
C*****
C
C                                MODEL TACROLIMUS
C
C This file contains the Fortran subroutines listed below in
C which the user must enter the relevant equations and constants.
C Consult the user's manual for details concerning the format for
C entered equations and definition of symbols.
C
C 1. DiffEq- System differential equations.
C 2. Amat - System state matrix.
C 3. Output- System output equations.
C 4. Symbol- Parameter symbols and model constants.
C 5. Varmod- Error variance model equations.
C 6. Prior - Parameter mean and covariance values
C 7. Sparam- Secondary parameters
C
C*****

```

```

Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
  Implicit None

```

```

  Include 'globals.inc'
  Include 'model.inc'

```

```

  Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

```

```

CC
C-----C
C 1. Enter Differential Equations Below {e.g. XP(1) = -P(1)*X(1)} C
C-----C

```

```

C Modèle PBPK générique numéro 3 pour les medic neutres liposolubles
C type propofol, mitotane
C Les Kp sont déterminés par le coeff de partage huile/eau
C Implémenté selon Lewitt / PKQuest / 2002
C Perfusion ou diffusion limitée. Prise en compte de fu.
C Prise en compte du poids et de la masse maigre.
C Les unités sont mg L H et kg (pour les masses d'organes)

```

```

  Integer i,j,Ncomp
  real*8 fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs,wfracpl
  real*8 Kp(14),V(14),Q(14),fclear(14),RPS(14),wfrac(14),fw(14)
  real*8 fac(14),Cvq(14),lfrac(14)
  real*8 CLrp,CLhp
  real*8 BW,Pfat,cor,Qi,CLi,Qh,Hstd,Poil,F
  real*8 Bv(14),G(14),Kv(14)

```

real\*8 k,Bmax,Ba,Kb  
real\*8 IR,CR  
real\*8 VL(14),VLI,KI(14),KL  
real\*8 CLdl,QL,facl,FA,MF,CYP,Qvar,nb

Common Ncomp  
Common fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs  
Common Kp,V,Q,fclear,RPS,wfrac,fw  
Common fac,Cvq,CLrp,CLhp  
Common k,Bmax,Ba,Kb  
Common IR,CR  
Common CLdl,QL,facl,FA,MF,CYP,Qvar,nb

C 1=veine 2=artère 3=poumon 4=veine porte 5=foie 6=tissu adipeux  
C 7 = compartiment lumpé (7=rein 8=cerveau 9=coeur 10=peau 11=muscle 12=tendons  
C 13=autres) 8 = dépôt pour les doses orales

C veine porte comprend estomac+intestin+pancréas+rate

C Nombre de compartiments physiologiques (dépot non compté)  
Ncomp = 7

C clairance intrinsèque hépatique (L/H) (standard : 11729.25)  
CLi = P(1)

C constante d'absorption (H-1) (standard : 3)  
kabs = P(2)

C poids du sujet (standard: 70 kg)  
BW = P(3)

C proportion de graisse (standard: 0.20)  
Pfat = P(4)

C biodisponibilité par voie orale en fonction génotype MDR1 (pgp)  
F = P(5)

C hémocrite (0.29)  
hstd = P(6)

C Débit de la veine porte (L/h/kg) (standard : 45 L/h/kg)  
Q(4) = P(7)

C Débit du foie (L/h/kg) (standard : 15 L/h/kg)  
Q(5) = P(8)

C Débit du tissu adipeux (L/h/kg) (standard : 2.532 L/h/kg)  
Q(6) = P(9)

C Débit du compartiment lumpé (L/h/kg) (standard : 15.015 L/h/kg)  
C Valeur pour pouvoir ajouter ou diminuer du débit, valeur standard : 60)  
Q(14) = P(10)

C Clairance selon le génotype du CYP3A5  
C CR : ratio de contribution  
C FA : fraction d'activité  
FA = P(11)  
CR = P(12)

C IR : ratio d'inhibition du médicament inhibiteur (sa puissance) CYP3A4  
IR = P(13)

C Masse hépatique fonctionnelle  
MF = P(14)

C Fraction d'activité du CYP3A4  
CYP = P(15)

C Facteur de la fraction lipidique  
nb = P(16)

C Fraction libre plasmatique  
fup = P(17)

C XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX A SAISIR XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

C fupstd = fu plasmatique standard  
C rblpstd = ratio de concentration blood/plasma standard  
C Hstd = hématocrite standard  
C Poil = coeff partage huile/eau :  
C solubilité dans l'huile (mg/kg) / solubilité dans l'eau (mg/l)

$$\text{Poil} = 10^{*3.77} \cdot \log P \text{ médian des 6 patients (expérimental} = 3.3)$$

C NB:  $K_p = C_{\text{tissu}}(\text{mg/kg}) / C_{\text{plasma}}(\text{mg/kg})$  à l'équilibre

C XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

C Paramètres physiologiques de l'homme sain adulte standart de 70 kg  
C 173 cm, 1.83 m2, 20% de graisse (soit 17.5 kg de tissu adipeux  
C car il y a 80% de graisse dans ce tissu)

C Volumes : masse des organes en kg  
C calcul de la masse adipeuse (tissu adipeux) en kg  
V(6) = BW\*Pfat/0.80

C facteur de correction pour les autres tissus:  
C LBW actuel / LBW standard

$$\text{cor} = (\text{BW} - \text{V}(6)) / (70 - 17.5) \quad ! \text{ cor} = 1 \text{ pour le sujet stdt}$$

$$\text{V}(1) = 4.4 * \text{cor}$$

$$\text{V}(2) = 1.1 * \text{cor}$$

$$\text{V}(3) = 0.536 * \text{cor}$$

$$\text{V}(4) = 1.5 * \text{cor}$$

$$\text{V}(5) = 1.8 * \text{cor}$$

$$\text{V}(7) = 0.31 * \text{cor}$$

$$\text{V}(8) = 1.4 * \text{cor}$$

$$\text{V}(9) = 0.33 * \text{cor}$$

$$\text{V}(10) = 2.6 * \text{cor}$$

$$\text{V}(11) = 26.0 * \text{cor}$$

$$\text{V}(12) = 3.0 * \text{cor}$$

$$\text{V}(13) = 5.524 * \text{cor}$$

$$\text{V}(14) = \text{V}(7) + \text{V}(8) + \text{V}(9) + \text{V}(10) + \text{V}(11) + \text{V}(12) + \text{V}(13)$$

C Fraction que représente l'eau dans le tissu (L/kg)

$$\text{wfracpl} = 0.94 \quad ! \text{ fraction de l'eau dans le plasma}$$

$$\text{wfrac}(1) = 0.82 \quad ! \text{ fraction de l'eau dans sg veineux}$$

$$\text{wfrac}(2) = 0.82 \quad ! \text{ fraction de l'eau dans sg artériel}$$

$$\text{wfrac}(3) = 0.8$$

$$\text{wfrac}(4) = 0.78$$

$$\text{wfrac}(5) = 0.7$$

$$\text{wfrac}(6) = 0.2$$

$$\text{wfrac}(7) = 0.8$$

$$\text{wfrac}(8) = 0.8$$

$$\text{wfrac}(9) = 0.8$$

$$\text{wfrac}(10) = 0.8$$

$$\text{wfrac}(11) = 0.78$$

$$\text{wfrac}(12) = 0.85$$

$$\text{wfrac}(13) = 0.85$$

C NB: volume d'eau tissulaire en L =  $\text{V}(i) * \text{wfrac}(i)$

C eau totale = 41.8 L pour homme standard

C Fraction que représentent les lipides dans le tissu (kg/kg)

$$\text{lfrac}(1) = 0.015 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(2) = 0.015 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(3) = 0.017 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(4) = 0.020 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(5) = 0.025 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(6) = 0.8 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(7) = 0.017 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(8) = 0.022 * \text{nb}$$

$$\text{lfrac}(9) = 0.017 * \text{nb}$$



$lfrac(10) = 0.017*nb$   
 $lfrac(11) = 0.017*nb$   
 $lfrac(12) = 0.017*nb$   
 $lfrac(13) = 0.017*nb$

C Débits sanguins en L/H/kg

$Q(4) = P(7)$   
 $Q(5) = P(8)$   
 $Q(6) = 0.0422*60$   
 $Q(7) = 4.0*60$   
 $Q(8) = 0.56*60$   
 $Q(9) = 0.8*60$   
 $Q(10) = 0.1*60$   
 $Q(11) = 0.0225*60$   
 $Q(12) = 0.01*60$   
 $Q(13) = 0.02*60$

C Calcul des  $Q_i*V_i$  pour chacun des organes

C  $Q_i$  devient en L/h

Do i = 4,13  
   $Q(i) = Q(i)*V(i)$   
End do

$Q(6) = P(9)*cor$   
 $Q(14) = P(10)*cor$

C Calcul du débit des poumons (L/h)

$Q(3) = Q(4)+Q(5)+Q(6)+Q(14)$

C  $Q_{veineux} =$  somme des  $Q_{tissu}$  sauf poumon =  $Q_{art} = Q_{poumon}$

$Q(1) = Q(3)$   
 $Q(2) = Q(1)$

C  $Q_{hépatique\ total} =$  veine porte + artère hépatique (L/h)

$Q_h = Q(4) + Q(5)$

C 1=veine 2=artère 3=poumon 4=veine porte 5=foie 6=tissu adipeux

C 7 = compartiment lumpé (7=rein 8=cerveau 9=coeur 10=peau 11=muscle 12=tendons  
13=autres) 8 = dépôt pour les doses orales

C veine porte comprend estomac+intestin+pancréas+rate

C XXXXXXXXXXXX FIN DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES XXXXXXXXXXXX

C Calcul de la constante d'association k et Bmax  
C à partir de la médiane des 6 patients

$$k = 1/(0.0078 * fup)$$
$$Bmax = hstd * 0.243 / 0.29$$

C Calcul du terme Ba (valable pour tous les organes, sang artériel)  
Ba = k\*Bmax/(1+k\*X(2))

C Calcul du terme Bv (varie selon les organes)  
Do i = 3,(Ncomp)  
Bv(i) = k\*Bmax/(1+k\*Cvq(i))  
End do

C Calcul du terme G(i)  
Do i = 3,(Ncomp)  
G(i) = 1 + k\*Bmax/(1+k\*X(i))\*\*2  
End do

C Calcul du terme Kb (valable pour tous les organes)  
Kb = 1+Ba

C Calcul du terme Kv (varie selon les organes)  
Do i = 3,(Ncomp)  
Kv(i) = 1+Bv(i)  
End do

C Calcul des fractions libres tissulaires (sans unité)  
C Il s'agit des fractions libres dans l'eau du tissu  
C fw(1) correspond à la fraction libre dans l'eau du sg veineux  
C il s'agit aussi de la fraction libre dans le sang total (fub)  
C l'équation se trouve page 3 de l'article de Levitt 2002

$$Do i = 3,13$$
$$fw(i) = wfrac(i)/(wfrac(i) + lfrac(i)*Poil)$$
$$End do$$

$$fw(1) = (1+k*X(1))/(1+K*X(1)+k*Bmax)$$
$$fw(2) = (1+k*X(2))/(1+K*X(2)+k*Bmax)$$

$$fub = fw(1)$$

C Volume libre de tous les organes du compartiment lumpé  
C VL(i)=(V(i)\*wfrac(i)/fw(i))

$$Do i = 7,13$$
$$VL(i) = V(i)*wfrac(i)/fw(i)$$
$$End do$$

C Volume libre du compartiment lumpé en L

C VL=somme(V(i)\*wfrac(i)/fw(i))

$$VLi = VL(7)+VL(8)+VL(9)+VL(10)+VL(11)$$

$$VLi = VLi +VL(12)+VL(13)$$

C Kp = Ctissu(mg/kg) / Cplasma(mg/kg) à l'équilibre

$$Kp(1) = (fup*wfrac(1))/(fw(1)*wfracpl)$$

$$Kp(2) = (fup*wfrac(2))/(fw(2)*wfracpl)$$

Do i = 3,(Ncomp-1)

$$Kp(i) = fup*(wfrac(i) + lfrac(i)*Poil)/wfracpl$$

End do

C Calcul du Kp lumpé (KL)

Do i = 7,13

$$KI(i) = V(i)*wfrac(i)*Kp(i)$$

End do

$$KL = (KI(7)+KI(8)+KI(9)+KI(10)+KI(11)+KI(12)+KI(13))/VLi$$

C Lumping de la clairance de distribution libre

$$CLdl = 1.06*wfrac(1)*Q(14)/fw(1)$$

C Calcul des fractions d'équilibration capillaire (sans unité)

C fclear : "capillary permeability limitation"

C fclear varie entre 0 (impermeable) et 1 (débit limité)

C IF (fclear(10).EQ.1.0) THEN

C Perfusion limitée (débit limité)

Do i = 1,(Ncomp)

$$fclear(i) = 1$$

End do

C Equations différentielles

C X(i) est la concentration libre dans l'eau du tissu en mg/L

C constante de vitesse de sortie (H-1) de chaque organe

C NB: (fw/V.wfrac) est le Vdu en L, (Q/fub) est CLu en L/H

C Vdu et CLu sont des paramètres sanguins

Do i = 3,6

$$Qi = Q(i)$$

IF (i.EQ.5) THEN

$$Qi = Qh$$

ENDIF

$$fac(i) = fclear(i)*(Qi/fub)*fw(i)/(V(i)*wfrac(i))$$

$$fac(i) = fac(i)*1.06*wfrac(1)$$

End do

- C Calcul du fac pour le compartiment lumpé (7)  
 $facL = CL_{dl}/V_L$
- C Sang veineux: la concentration dans le sang veineux qui quitte  
 C les organes est  $C_{vq} = C_a - f_{clear} \cdot (C_a - C_t)$   
 Do i = 4,7  
 $C_{vq}(i) = X(2) - f_{clear}(i) \cdot (X(2) - X(i))$   
 End do
- C poumon: entrée = sang veineux  
 $C_{vq}(3) = X(1) - f_{clear}(3) \cdot (X(1) - X(3))$
- C foie: calcul de la concentration mixte artère hep + veine porte  
 $X_{mix} = (Q(4) \cdot C_{vq}(4) + Q(5) \cdot X(2)) / Q_h$   
 $C_{vq}(5) = X_{mix} - f_{clear}(5) \cdot (X_{mix} - X(5))$
- C sommer les sorties veineuses (hors poumon)  
 $som = Q_h \cdot C_{vq}(5) + Q(6) \cdot C_{vq}(6) + Q(14) \cdot C_{vq}(7)$
- $XP(1) = (1.06/V(1)) \cdot (som - Q(1) \cdot X(1))$   
 $XP(1) = XP(1) + R(1) \cdot f_w(1) / (V(1) \cdot w_{frac}(1))$
- C Sang artériel:  
 $XP(2) = (1.06 \cdot Q(2)/V(2)) \cdot (C_{vq}(3) - X(2))$
- C Poumon: entrée = sang veineux  
 $XP(3) = fac(3) \cdot (X(1) - X(3))$
- C Veine porte (4) : la dose orale est introduite ici  
 $V_{abs} = F \cdot k_{abs} \cdot X(8) \cdot f_w(4) / (V(4) \cdot w_{frac}(4))$   
 $XP(4) = fac(4) \cdot (X(2) - X(4)) + V_{abs}$
- C Foie (5) : élimination  
 C Conversion de CL intrinsèque en CL hépatique puis en constante de vitesse  
 $CL_i = CR \cdot FA \cdot P(1) \cdot MF + 0.25 \cdot P(1) \cdot MF \cdot CYP \cdot (1 - IR) + 0.35 \cdot P(1) \cdot MF$
- $CL_h = (Q_h \cdot f_{ub} \cdot CL_i) / ((Q_h + f_{ub} \cdot CL_i) \cdot w_{frac}(2) \cdot 1.06)$   
 $kh = CL_i \cdot f_w(5) / (V(5) \cdot w_{frac}(5))$   
 $XP(5) = fac(5) \cdot (X_{mix} - X(5)) - kh \cdot X(5)$
- C Tissu adipeux (6)  
 $XP(6) = fac(6) \cdot (X(2) - X(6))$
- C Compartiment lumpé (7)  
 $XP(7) = facL \cdot (X(2) - X(7))$
- C Dépôt des doses orales (X est la quantité en mg)  
 $XP(8) = -k_{abs} \cdot X(8)$

C 1=veine 2=artère 3=poumon 4=veine porte 5=foie 6=tissu adipeux  
 C 7 = compartiment lumpé (7=rein 8=cerveau 9=coeur 10=peau 11=muscle 12=tendons  
 C 13=autres) 8 = dépôt pour les doses orales

C veine porte comprend estomac+intestin+pancréas+rate

```
C-----C
C-----C
C
  Return
  End
```

C#####C

```
Subroutine AMAT(A)
  Implicit None
```

```
  Include 'globals.inc'
  Include 'model.inc'
```

```
  Integer I,J
  Real*8 A(MaxNDE,MaxNDE)
```

```
  DO I=1,Ndeqs
    Do J=1,Ndeqs
      A(I,J)=0.0D0
    End Do
  End Do
```

```
CC
C-----C
C 2. Enter non zero elements of state matrix {e.g. A(1,1) = -P(1)} C
C---c-----C
```

```
C-----C
C-----C
C
  Return
  End
```

C#####C

```
Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
  Implicit None
```

```
  Include 'globals.inc'
  Include 'model.inc'
```

```
  Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)
```

CC

C-----C  
 C 3. Enter Output Equations Below {e.g.  $Y(1) = X(1)/P(2)$  } C  
 C-----C

real\*8 Vdss,Vss,T2p,T2s

Integer i,j,Ncomp

real\*8 fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs,wfracpl

real\*8 Kp(14),V(14),Q(14),fclear(14),RPS(14),wfrac(14),fw(14)

real\*8 fac(14),Cvq(14),lfrac(14)

real\*8 CLrp,CLhp

real\*8 BW,Pfat,cor,Qi,CLi,Qh,Hstd,Poil,F

real\*8 Bv(14),G(14),Kv(14)

real\*8 k,Bmax,Ba,Kb

real\*8 IR,CR

real\*8 VL(14),VLi,KI(14),KL

real\*8 CLdl,QL,facL,FA,MF,CYP,Qvar,nb

Common Ncomp

Common fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs

Common Kp,V,Q,fclear,RPS,wfrac,fw

Common fac,Cvq,CLrp,CLhp

Common k,Bmax,Ba,Kb

Common IR,CR

Common CLdl,QL,facL,FA,MF,CYP,Qvar,nb

C 1=veine 2=artère 3=poumon 4=veine porte 5=foie 6=tissu adipeux

C 7 = compartiment lumpé (7=rein 8=cerveau 9=coeur 10=peau 11=muscle 12=tendons

C 13=autres) 8 = dépôt pour les doses orales

C veine porte comprend estomac+intestin+pancréas+rate

C  $Conc(i) = Cu(i).wfrac(i)/fw(i)$  mg/kg

C Conc sang veineux en mg/L (\*1000 pour avoir en ng/ml)

$Y(1) = (1.06*wfrac(1)*X(1)/fub)*1000$

C Conc libres en mg/L

Do i = 2,6

$Y(i) = X(i)$

End do

C Conc libre dans l'eau du compartiment lumpé (mg/L)

$Y(8) = X(7)$

C Volume de distribution plasmatique (L)

Vdss = 0.0

Do i = 1,6

$Vdss = Vdss + kp(i)*V(i)*wfrac(i)$

End do

$Vdss = Vdss + KL*V(14)*0.8$

$Y(9) = Vdss$

C Volume de distribution sanguin (L)

```
Vss = 0.0
Do i = 1,6
  Vss = Vss + V(i)
End do
Vss = Vss + V(14)
Y(10) = Vss
```

C Demie vie terminale plasmatique en H (approximation)

```
IF (CLh.GT.0.0) THEN
  T2p = 0.693*Vdss/(CLh*Kp(1))
ELSE
  T2p = -1.0
ENDIF
Y(11) = T2p
```

C Demi-vie terminale sanguine en H (approximation)

```
IF (CLh.GT.0.0) THEN
  T2s = 0.693*Vss/CLh
ELSE
  T2s = -1.0
ENDIF
Y(12) = T2s
```

C Fraction libre sanguine

```
Y(13) = fub
```

C Clairance libre

```
Y(14) = CLdl
```

C Clairance hépatique sanguine

```
Y(15) = CLh
```

C Clairance hépatique plasmatique

```
Y(16) = CLh*Kp(1)
```

CC

C-----C

C-----C

C

Return

End

C#####C

Subroutine SYMBOL

Implicit None

Include 'globals.inc'

Include 'model.inc'

integer i

CC

C-----C

C 4. Enter as Indicated C

C---c-----C

NDEqs = 8 ! Enter # of Diff. Eqs.

NSParam = 17 ! Enter # of System Parameters.

NVparam = 0 ! Enter # of Variance Parameters.

NSecPar = 9 ! Enter # of Secondary Parameters.

NSecOut = 0 ! Enter # of Secondary Outputs (not used).

Ieqsol = 1 ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.

Descr = 'PBPK generic 4 '

C-----C

C-----C

C

CC

C-----C

C 4. Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel') C

C---c-----C

Psym(1) = 'CLi 10600 L/H'

Psym(2) = 'Kabs 4.5 H-1'

Psym(3) = 'BW kg 70'

Psym(4) = 'Pfat 0.2'

Psym(5) = 'biod 0.2'

Psym(6) = 'hct 0.29'

Psym(7) = 'Qvp45L/H/kg'

Psym(8) = 'Qh15L/H/kg'

Psym(9) = 'QTA 44.31L/H'

Psym(10) = 'QCL 196.4L/H'

Psym(11) = 'FA 0'

Psym(12) = 'CR 0.40'

Psym(13) = 'IR 0'

Psym(14) = 'foieMF 1'

Psym(15) = 'ActCYP3A4 1'

Psym(16) = 'fac lfrac 1'

Psym(17) = 'fup 0.012'



```

C-----C
C-----C
CC
C-----C
C 4. Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'} C
C---c-----C

```

```

C-----C
C-----C
CC
C-----C
C 4. Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSsym(1)='CLt'} C
C---c-----C

```

```

PSsym(1) = 'Vss pl L'
PSsym(2) = 'Vss sg L'
PSsym(3) = 'Tdemi sg h'
PSsym(4) = 'CO L/H'
PSsym(5) = 'fub'
PSsym(6) = 'CLdl'
PSsym(7) = 'CLh sg'
PSsym(8) = 'CLh p'
PSsym(9) = 'Tdemi pl h'

```

```

C-----C
C-----C
C
Return
End

```

```

C#####C

```

```

Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
Implicit None

```

```

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

```

```

Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

```

```

CC
C-----C
C 5. Enter Variance Model Equations Below C
C {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 } C
C---c-----C

```

```

V(1)=(0.1*Y(1))**2

```

```

C-----C
C-----C
C
  Return
  End
C#####C

```

```

Subroutine PRIOR(Pmean,Pcov,ICmean,ICcov)
Implicit None

```

```

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

```

```

Integer I,J
Real*8 Pmean(MaxNSP+MaxNDE), ICmean(MaxNDE)
Real*8 Pcov(MaxNSP+MaxNDE,MaxNSP+MaxNDE), ICcov(MaxNDE,MaxNDE)

```

```

CC
C-----C
C 6. Enter Nonzero Elements of Prior Mean Vector      C
C   { e.g. Pmean(2) = 10.0   }                        C
C---c-----C

```

```

Real*8 CV

```

```

Pmean(1) = 10600
Pmean(2) = 4.5
Pmean(3) = 70
Pmean(4) = 0.2
Pmean(5) = 0.2
Pmean(6) = 0.29
Pmean(7) = 45
Pmean(8) = 15
Pmean(9) = 44.31
Pmean(10) = 196.4
Pmean(11) = 1
Pmean(12) = 0.40
Pmean(13) = 0.5
Pmean(14) = 1
Pmean(15) = 1
Pmean(16) = 1
Pmean(17) = 0.012

```

```

C-----C
C-----C
CC
C-----C
C 6. Enter Nonzero Elements of Covariance Matrix (Lower Triang.)  C
C   { e.g. Pcov(2,1) = 0.25   }                        C
C---c-----C

```

CV = 0.2

Pcov(1,1) = (CV\*Pmean(1))\*\*2  
Pcov(2,2) = (CV\*Pmean(2))\*\*2  
Pcov(3,3) = (0.17\*Pmean(3))\*\*2  
Pcov(4,4) = (CV\*Pmean(4))\*\*2  
Pcov(5,5) = (0.2\*Pmean(5))\*\*2  
Pcov(6,6) = (0.14\*Pmean(6))\*\*2  
Pcov(7,7) = (0.15\*Pmean(7))\*\*2  
Pcov(8,8) = (0.15\*Pmean(8))\*\*2  
Pcov(9,9) = (0.32\*Pmean(8))\*\*2  
Pcov(10,10) = (0.12\*Pmean(10))\*\*2  
Pcov(11,11) = (CV\*Pmean(11))\*\*2  
Pcov(12,12) = (CV\*Pmean(12))\*\*2  
Pcov(13,13) = (CV\*Pmean(13))\*\*2  
Pcov(14,14) = (0.15\*Pmean(14))\*\*2  
Pcov(15,15) = (0.15\*Pmean(15))\*\*2  
Pcov(16,16) = (0.15\*Pmean(16))\*\*2  
Pcov(17,17) = (0.25\*Pmean(17))\*\*2

Pcov(8,7) = -0.9\*(Pcov(8,8)\*Pcov(7,7))\*\*0.5  
Pcov(14,7) = 0.9\*(Pcov(14,14)\*Pcov(7,7))\*\*0.5  
Pcov(14,8) = -0.9\*(Pcov(14,14)\*Pcov(8,8))\*\*0.5  
Pcov(15,7) = 0.9\*(Pcov(15,15)\*Pcov(7,7))\*\*0.5  
Pcov(15,8) = -0.9\*(Pcov(15,15)\*Pcov(8,8))\*\*0.5  
Pcov(15,14) = 0.9\*(Pcov(15,15)\*Pcov(14,14))\*\*0.5

```
C-----C
C-----C
C
  Return
  End
C#####C
```

```
Subroutine SPARAM(PS,P,IC)
  Implicit None

  Include 'globals.inc'
  Real*8 PS(MaxNSECP), P(MaxNSP+MaxNDE), IC(MaxNDE)
```

```
CC
C-----C
C 7.  Enter Equations Defining Secondary Paramters      C
C      { e.g. PS(1) = P(1)*P(2) }                      C
C-----C
```

real\*8 Vdss,Vss,T2s,CO,T2p

Integer i,j,Ncomp  
real\*8 fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs,wfracpl

```

real*8 Kp(14),V(14),Q(14),fclear(14),RPS(14),wfrac(14),fw(14)
real*8 fac(14),Cvq(14),lfrac(14)
real*8 CLrp,CLhp
real*8 BW,Pfat,cor,Qi,CLi,Qh,Hstd,Poil,F
real*8 Bv(14),G(14),Kv(14)
real*8 k,Bmax,Ba,Kb
real*8 IR,CR
real*8 VL(14),VLi,KI(14),KL
real*8 CLdl,QL,facL,FA,MF,CYP,Qvar,nb

```

```

Common Ncomp
Common fup,fub,CLr,CLh,PSmus,Xmix,kh,kr,som,kabs,Vabs
Common Kp,V,Q,fclear,RPS,wfrac,fw
Common fac,Cvq,CLrp,CLhp
Common k,Bmax,Ba,Kb
Common IR,CR
Common CLdl,QL,facL,FA,MF,CYP,Qvar,nb

```

#### C Vdss plasmatique en L

```

Vdss = 0.0
Do i = 1,6
  Vdss = Vdss + kp(i)*V(i)*wfrac(i)
End do
Vdss = Vdss + KL*V(14)*0.8
PS(1) = Vdss

```

#### C Vdss sanguin en L/H

```

Vss = 0.0
Do i = 1,6
  Vss = Vss + V(i)
End do
Vss = Vss + V(14)
PS(2) = Vss

```

#### C Demi-vie terminale sanguine en H (approximation)

```

IF (CLh.GT.0.0) THEN
  T2s = 0.693*Vss/CLh
ELSE
  T2s = -1.0
ENDIF
PS(3) = T2s

```

#### C Débit cardiaque en L/H

```

CO = Q(1)
PS(4) = CO

```

#### C Fraction libre sanguine

PS(5) = fub

C Clairance libre  
PS(6) = CLdl

C Clairance hépatique sanguine  
PS(7) = CLh

C Clairance hépatique plasmatique  
PS(8) = CLh\*Kp(1)

C Demie vie terminale plasmatique en H  
IF (CLh.GT.0.0) THEN  
T2p = 0.693\*Vdss/(CLh\*Kp(1))  
ELSE  
T2p = -1.0  
ENDIF  
PS(9) = T2p

C  
C-----C  
C-----C  
C  
Return  
End

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Jamei M, Dickinson GL, Rostami-Hodjegan A. A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: A tale of 'bottom-up' vs 'top-down' recognition of covariates. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24(1):53-75.
2. Ohtani H, Barter Z, Minematsu T, Makuuchi M, Sawada Y, Rostami-Hodjegan A. Bottom-up modeling and simulation of tacrolimus clearance: prospective investigation of blood cell distribution, sex and CYP3A5 expression as covariates and assessment of study power. *Biopharm Drug Dispos*. 2011 Dec;32(9):498-506.
3. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, et al. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Mar;33(5):549-52.
4. Bernareggi A, Rowland M. Physiologic modeling of cyclosporin kinetics in rat and man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1991 Feb;19(1):21-50.
5. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Nov;287(2):457-68.
6. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Dose-dependent pharmacokinetics of cyclosporin A in rats: events in tissues. *Drug Metab Dispos*. 2000 May;28(5):582-9.
7. Tacrolimus. 2011 [updated 2011; cited 2011 January, the 26th]; Available from: <http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?>
8. Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):241-53.
9. Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation*. 2001 Sep 27;72(6):1056-61.
10. Fukudo M, Yano I, Fukatsu S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, et al. Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(13):1161-78.
11. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Lynch SV, Tett SE. Toward better outcomes with tacrolimus therapy: population pharmacokinetics and individualized dosage prediction in adult liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003 Feb;9(2):130-7.
12. Antignac M, Hulot JS, Boleslawski E, Hannoun L, Touitou Y, Farinotti R, et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in full liver transplant patients: modelling of the post-operative clearance. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005 Jul;61(5-6):409-16.
13. 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.
14. 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.
15. Agence de la biomédecine. Rapport annuel. Bilan des activités de l'Agence de la biomédecine 2010.; 2010.
16. Savidan E. Etude coût efficacité de l'adaptation bayésienne des posologies de cyclosporine en transplantation de moëlle osseuse pédiatrique [Th D Pharm]. Lyon: Université Claude Bernard; 2005.
17. Biccaccio C. Le livre de l'interne - hématologie. Flammarion ed. Paris; 1997.

18. Calmus Y. La ciclosporine et ses indications : de la théorie à la pratique. Reuil-Malmaison: Novartis; 1999.
19. Xie XS, Wan DM, Sun H, Sun L, Liu L, Jiang ZX. Peripheral blood stem cell transplantation for 53 patients with malignant hematologic diseases. *Ai Zheng*. 2007 Apr;26(4):403-6.
20. Remberger M, Ringden O. Similar outcome after unrelated allogeneic peripheral blood stem cell transplantation compared with bone marrow in children and adolescents. *Transplantation*. 2007 Aug 27;84(4):551-4.
21. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997 Aug 7;337(6):373-81.
22. Gluckman E, Rocha V, Chastang C. European results of unrelated cord blood transplants. Eurocord group. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Jun;21 Suppl 3:S87-91.
23. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26;321(17):1174-8.
24. Milpied N, BJD, Boudart D. Les greffes de moelle osseuse. Frison Roche; 1993.
25. Martin P. Individualisation des concentrations sanguines thérapeutiques de ciclosporine dans les greffes de moelle osseuse allogénique chez l'enfant [Th D Pharm]. Lyon: Université Claude bernard; 2000.
26. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295-304.
27. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen Av A, Bandini G, Devergie A, et al. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3877-86.
28. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Mar 24;330(12):827-38.
29. Michallet M, Michallet AS. Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement des hémopathies malignes. *Bulletin du Cancer*. 2001;88(9):908-26.
30. Rowlings PA, Przepiora D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(4):855-64.
31. Yee GC, Self SG, McGuire TR, Carlin J, Sanders JE, Deeg HJ. Serum cyclosporine concentration and risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1988 Jul 14;319(2):65-70.
32. Schmidt H, Ehniger G, Dopfer R, Blaurock M, Naumann R, Einsele H, et al. Correlation between low CSA plasma concentration and severity of acute GvHD in bone marrow transplantation. *Blut*. 1988 Sep;57(3):139-42.
33. Bandini G, Stocchi E, Ricci P, Rizzi S, Boschi S, Guardigli C, et al. Ciclosporin A: correlation of blood levels with acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 1987;78(1):6-12.
34. Ghalie R, Fitzsimmons WE, Weinstein A, Manson S, Kaizer H. Cyclosporine monitoring improves graft-versus-host disease prophylaxis after bone marrow transplantation. *Ann Pharmacother*. 1994 Mar;28(3):379-83.
35. Malard F, Szydlo RM, Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, et al. Impact of cyclosporine-A concentration on the incidence of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jan;16(1):28-34.



36. Kanda Y, Hyo R, Yamashita T, Fujimaki K, Oshima K, Onoda M, et al. Effect of blood cyclosporine concentration on the outcome of hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched sibling donor. *Am J Hematol*. 2006 Nov;81(11):838-44.
37. Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, et al. Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-versus-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Oct;32(8):777-84.
38. Willemze AJ, Press RR, Lankester AC, Egeler RM, den Hartigh J, Vossen JM. CsA exposure is associated with acute GVHD and relapse in children after SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun;45(6):1056-61.
39. Punnett A, Sung L, Price V, Das P, Diezi M, Doyle J, et al. Achievement of target cyclosporine concentrations as a predictor of severe acute graft versus host disease in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and receiving cyclosporine and methotrexate prophylaxis. *Ther Drug Monit*. 2007 Dec;29(6):750-7.
40. Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire PH, et al. Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-versus-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Nov;32(9):881-7.
41. Przepiora D, Shapiro S, Schwinghammer TL, Bloom EJ, Rosenfeld CS, Shadduck RK, et al. Cyclosporine and methylprednisolone after allogeneic marrow transplantation: association between low cyclosporine concentration and risk of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1991 Jun;7(6):461-5.
42. Byrne JL, Stainer C, Hyde H, Mifflin G, Haynes AP, Bessell EM, et al. Low incidence of acute graft-versus-host disease and recurrent leukaemia in patients undergoing allogeneic haemopoietic stem cell transplantation from sibling donors with methotrexate and dose-monitored cyclosporin A prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Sep;22(6):541-5.
43. Izumi N, Furukawa T, Sato N, Okazuka K, Tsukada N, Abe T, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: retrospective analysis of 73 patients who received cyclosporin A. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Nov;40(9):875-80.
44. Barrett AJ, Kendra JR, Lucas CF, Joss DV, Joshi R, Pendharkar P, et al. Cyclosporin A as prophylaxis against graft-versus-host disease in 36 patients. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982 Jul 17;285(6336):162-6.
45. Gratwohl A, Speck B, Wenk M, Forster I, Muller M, Osterwalder B, et al. Cyclosporine in human bone marrow transplantation. Serum concentration, graft-versus-host disease, and nephrotoxicity. *Transplantation*. 1983 Jul;36(1):40-4.
46. McGuire TR, Yee GC, Emerson S, Gmur DJ, Carlin J. Pharmacodynamic studies of cyclosporine in marrow transplant recipients. A comparison of three assay methods. *Transplantation*. 1992 Jun;53(6):1272-5.
47. Oshima K, Kanda Y, Nakasone H, Arai S, Nishimoto N, Sato H, et al. Decreased incidence of acute graft-versus-host disease by continuous infusion of cyclosporine with a higher target blood level. *Am J Hematol*. 2008 Mar;83(3):226-32.
48. Ghavamzadeh A, Irvani M, Ashouri A, Mousavi SA, Mahdavi N, Shamshiri A, et al. Peripheral blood versus bone marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation in children with class I and II beta thalassemia major. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Mar;14(3):301-8.
49. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5074-87.

50. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2001 Jan 18;344(3):175-81.
51. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol.* 2000 Feb;18(3):537-46.
52. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood.* 2000 Jun 15;95(12):3702-9.
53. Eapen M, Logan BR, Confer DL, Haagenson M, Wagner JE, Weisdorf DJ, et al. Peripheral blood grafts from unrelated donors are associated with increased acute and chronic graft-versus-host disease without improved survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Dec;13(12):1461-8.
54. Hahn T, McCarthy PL, Jr., Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5728-34.
55. Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, et al. Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet.* 2000 Apr 8;355(9211):1231-7.
56. Remberger M, Ringden O, Blau IW, Ottinger H, Kremens B, Kiehl MG, et al. No difference in graft-versus-host disease, relapse, and survival comparing peripheral stem cells to bone marrow using unrelated donors. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1739-45.
57. Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, Nagler A, Gluckman E, Clark P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998 May;21(10):995-1003.
58. Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, Zhang MJ, Klein JP, Rizzo JD, et al. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2006 Dec 15;108(13):4288-90.
59. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1397-400.
60. Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, Azevedo AM, Eid KA, Aranha FJ, et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Dec;22(12):1145-51.
61. Lee SJ, Kang BW, Moon JH, Chae YS, Kim JG, Jung JS, et al. Comparable analysis of outcomes for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in acute myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2012;127(2):81-9.
62. Hagglund H, Bostrom L, Ringden O, Nilsson B, Remberger M. Risk factors for acute graft-versus-host disease in 325 consecutive bone marrow recipients. *Transplant Proc.* 1994 Jun;26(3):1821-2.
63. Passweg JR, Zhang MJ, Rocha V, Kan F, Champlin RE, Isola LM, et al. Donor characteristics affecting graft failure, graft-versus-host disease, and survival after unrelated

- donor transplantation with reduced-intensity conditioning for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec;17(12):1869-73.
64. Defabianis P, Braida S, Guagnano R. 180-day screening study for predicting the risk factors for developing acute oral Graft-versus-Host disease in paediatric patients subjected to allogeneic haematopoietic stem cells transplantation. *Eur J Paediatr Dent*. 2011 Mar;11(1):31-4.
65. Arora M, Weisdorf DJ, Spellman SR, Haagenson MD, Klein JP, Hurley CK, et al. HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 1;27(10):1644-52.
66. Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296-307.
67. Jacobsohn DA, Arora M, Klein JP, Hassebroek A, Flowers ME, Cutler CS, et al. Risk factors associated with increased nonrelapse mortality and with poor overall survival in children with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4472-9.
68. Ochs LA, Miller WJ, Filipovich AH, Haake RJ, McGlave PB, Blazar BR, et al. Predictive factors for chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1994 Apr;13(4):455-60.
69. Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Oct;22(8):755-61.
70. Kozak I, Dwilewicz-Trojaczek J, Sieminska J, Gorska R. [Risk factors of graft-versus-host disease in patients after allogeneic stem cell transplantation]. *Wiad Lek*. 2011;64(3):164-9.
71. Storb R, Prentice RL, Thomas ED. Treatment of aplastic anemia by marrow transplantation from HLA identical siblings. Prognostic factors associated with graft versus host disease and survival. *J Clin Invest*. 1977 Apr;59(4):625-32.
72. Eisner MD, August CS. Impact of donor and recipient characteristics on the development of acute and chronic graft-versus-host disease following pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1995 May;15(5):663-8.
73. Locatelli F, Uderzo C, Dini G, Zecca M, Arcese W, Messina C, et al. Graft-versus-host disease in children: the AIEOP-BMT Group experience with cyclosporin A. *Bone Marrow Transplant*. 1993 Dec;12(6):627-33.
74. Gratama JW, Zwaan FE, Stijnen T, Weijers TF, Weiland HT, D'Amato J, et al. Herpesvirus immunity and acute graft-versus-host disease. *Lancet*. 1987 Feb 28;1(8531):471-4.
75. Alsultan A, Giller RH, Gao D, Bathurst J, Hild E, Gore L, et al. GVHD after unrelated cord blood transplant in children: characteristics, severity, risk factors and influence on outcome. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May;46(5):668-75.
76. Lee JW, Lee DH, Jang PS, Yi MS, Chung NG, Cho B, et al. Prognostic implications of the NIH consensus criteria in children with chronic graft-versus-host disease. *Yonsei Med J*. 2011 Sep;52(5):779-86.
77. Ringden O, Hassan Z, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Mattsson J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor induced acute and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2010 Nov 15;90(9):1022-9.
78. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004 Mar;10(3):178-85.

79. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):756-62.
80. Sorror ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood*. 2004 Aug 15;104(4):961-8.
81. Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S, Moriyama Y, Nagao T, Kodera Y, et al. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jul;28(2):181-5.
82. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2062-8.
83. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2303-14.
84. Arora M, Klein JP, Weisdorf DJ, Hassebroek A, Flowers ME, Cutler CS, et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6714-20.
85. Liver transplantation. *JAMA*. 1983 Dec 2;250(21):2961-4.
86. Torpy JM, Lynn C, Golub RM. JAMA patient page. Liver transplantation. *JAMA*. 2012 Jan 18;307(3):320.
87. Indication de la transplantation hépatique. Conférence de consensus, HAS; 2005 January, 19-20; Lyon. 2005.
88. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/bmcdd/articles/bmc085/sect2-fs.html>. [cited 2006 december, 7]; Available from: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/bmcdd/articles/bmc085/sect2-fs.html>.
89. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978 Dec 23-30;2(8104-5):1323-7.
90. 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.
91. van Hooff J, Van der Walt I, Kallmeyer J, Miller D, Dawood S, Moosa MR, et al. Pharmacokinetics in stable kidney transplant recipients after conversion from twice-daily to once-daily tacrolimus formulations. *Ther Drug Monit*. 2012 Feb;34(1):46-52.
92. 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.
93. Hougardy JM, de Jonge H, Kuypers D, Abramowicz D. The once-daily formulation of tacrolimus: a step forward in kidney transplantation? *Transplantation*. 2012 Feb 15;93(3):241-3.
94. Tacrolimus : confusions autour des formes galéniques. *La Revue Prescrire*. 2009;29(305):187.
95. VIDAL. NÉORAL® 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, capsule 100 mg/ml solution buvable [database on the Internet]. 2012 [cited 03/08/2012]. Available from: <http://www.vidalpro.net/medicaments/front/recherchemedic.asp?site=2&cartouche=17&id=24576&lib=NEORAL+50+mg+caps+molle+%3A+B%2F60&type=spe>.



96. VIDAL. PROGRAF® Gélules [database on the Internet]. 2012 [cited 03/08/2012]. Available from: <http://www.vidalpro.net/medicaments/front/recherchemedic.asp?site=2&cartouche=17&id=41863&lib=PROGRAF+1+mg+g%E9I+%3A+Plq%2F50&type=spe>.
97. Locatelli A, Zecca, M., Rondelli, R. Graft versus host disease prophylaxis with low dose cyclosporin A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA - identical sibling bone marrow transplantation : results of a randomized trial. *Blood*. 2000;95(5):1572-9.
98. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992 Apr;13(4):136-42.
99. Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1993 Jun;24(6):472-95.
100. Drewe J, Meier R, Vonderscher J, Kiss D, Posanski U, Kissel T, et al. Enhancement of the oral absorption of cyclosporin in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1992 Jul;34(1):60-4.
101. Ducharme MP, Verret L, Brouillette D, Sirois G. Ability of a first-pass pharmacokinetic model to characterize cyclosporine blood concentrations after administrations of Sandimmune or Neoral formulations. *Ther Drug Monit*. 1998 Apr;20(2):165-71.
102. Kovarik JM, Mueller EA, Johnston A, Hitzengerger G, Kutz K. Bioequivalence of soft gelatin capsules and oral solution of a new cyclosporine formulation. *Pharmacotherapy*. 1993 Nov-Dec;13(6):613-7.
103. Vonderscher J, Meinzer A. Rationale for the development of Sandimmune Neoral. *Transplant Proc*. 1994 Oct;26(5):2925-7.
104. Friman S, Backman L. A new microemulsion formulation of cyclosporin: pharmacokinetic and clinical features. *Clin Pharmacokinet*. 1996 Mar;30(3):181-93.
105. Noble S, Markham A. Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs*. 1995 Nov;50(5):924-41.
106. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*. 1997 Sep;62(3):248-60.
107. Hu YF, Qiu W, Liu ZQ, Zhu LJ, Tu JH, Wang D, et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Nov;33(11):1093-8.
108. Urien S, Zini R, Lemaire M, Tillement JP. Assessment of cyclosporine A interactions with human plasma lipoproteins in vitro and in vivo in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;253(1):305-9.
109. Rosano TG. Effect of hematocrit on cyclosporine (cyclosporin A) in whole blood and plasma of renal-transplant patients. *Clin Chem*. 1985 Mar;31(3):410-2.
110. Follath F, Wenk M, Vozeh S, Thiel G, Brunner F, Loertscher R, et al. Intravenous cyclosporine kinetics in renal failure. *Clin Pharmacol Ther*. 1983;34(5):638-43.
111. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Carlson IH, Subramanian R. Concentrations of cyclosporin A and its metabolites in human tissues postmortem. *J Anal Toxicol*. 1991 May-Jun;15(3):110-5.
112. Venkataramanan R, Starsl T., Yang S. Biliary excretion of cyclosporine in liver transplant patients. *Transplantation proceedings*. 1985;17(Suppl. 2):286-9.
113. Yee GC, Lennon TP, Gmur DG, Carlin J, Schaffer RL, Kennedy MS, et al. Clinical pharmacology of cyclosporine in patients undergoing bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 1986 Dec;18(6 Suppl 5):153-9.

114. Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, McLeod H. CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2004 Oct;26(5):524-8.
115. Min DI, Ellingrod VL. Association of the CYP3A4\*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2003 Jun;25(3):305-9.
116. Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol.* 2003 Jun;43(6):555-64.
117. Wilhelm AJ, de Graaf P, Veldkamp AI, Janssen JJ, Huijgens PC, Swart EL. Population pharmacokinetics of ciclosporin in haematopoietic allogeneic stem cell transplantation with emphasis on limited sampling strategy. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Apr;73(4):553-63.
118. Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Thiesemann C, Strohmeyer S, Schottmann R, et al. Urinary excretion of ciclosporin and 17 of its metabolites in renal allograft recipients. *Pharmacology.* 1989;39(3):160-4.
119. VIDAL. ADVAGRAF Gélules LP [database on the Internet]. 2012 [cited 20/11/2012].
120. Jusko WJ, Piekoszewski W, Klintmalm GB, Shaefer MS, Hebert MF, Piergies AA, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1995 Mar;57(3):281-90.
121. Alloway RR, Johnson JA, Chaballa M, et al. Effect of gut metabolism on tacrolimus bioavailability in renal transplant recipients. [abstract] *astsoorg conference.* 1997.
122. Benet LZ. Impact of intraindividual variability of drugs on therapeutic outcomes: lessons from outside transplantation. *Transplant Proc.* 1998 Aug;30(5):1650-1.
123. 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.
124. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(11):813-51.
125. Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, Young D. Tacrolimus : review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies of educating patients and promoting adherence. *Progress in Transplantation.* 2009;19:277-84.
126. Hooks MA. Tacrolimus, a new immunosuppressant--a review of the literature. *Ann Pharmacother.* 1994 Apr;28(4):501-11.
127. Kelly PA, Burckart GJ, Venkataramanan R. Tacrolimus: a new immunosuppressive agent. *Am J Health Syst Pharm.* 1995 Jul 15;52(14):1521-35.
128. Masuda S, Uemoto S, Hashida T, Inomata Y, Tanaka K, Inui K. Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in a living-donor small bowel recipient. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Jul;68(1):98-103.
129. Satoh S, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Miura M, Inoue K, et al. Lack of tacrolimus circadian pharmacokinetics and CYP3A5 pharmacogenetics in the early and maintenance stages in Japanese renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Aug;66(2):207-14.
130. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jul;14(7):1889-96.
131. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and

- pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 Sep;74(3):245-54.
132. Sam WJ, Aw M, Quak SH, Lim SM, Charles BG, Chan SY, et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in Asian paediatric liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2000 Dec;50(6):531-41.
  133. Jain AB, Venkataramanan R, Cadoff E, Fung JJ, Todo S, Krajack A, et al. Effect of hepatic dysfunction and T tube clamping on FK 506 pharmacokinetics and trough concentrations. *Transplant Proc.* 1990 Feb;22(1):57-9.
  134. Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. *Am J Transplant.* 2005 Jun;5(6):1383-91.
  135. Maes BD, Lemahieu W, Kuypers D, Evenepoel P, Coosemans W, Pirenne J, et al. Differential effect of diarrhea on FK506 versus cyclosporine A trough levels and resultant prevention of allograft rejection in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2002 Nov;2(10):989-92.
  136. Asano T, Nishimoto K, Hayakawa M. Increased tacrolimus trough levels in association with severe diarrhea, a case report. *Transplant Proc.* 2004 Sep;36(7):2096-7.
  137. Maezono S, Sugimoto K, Sakamoto K, Ohmori M, Hishikawa S, Mizuta K, et al. Elevated blood concentrations of calcineurin inhibitors during diarrheal episode in pediatric liver transplant recipients: involvement of the suppression of intestinal cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Pediatr Transplant.* 2005 Jun;9(3):315-23.
  138. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2004 Mar;57(3):298-309.
  139. Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K. Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol.* 1994 Feb;46(2):113-7.
  140. Piekoszewski W, Jusko WJ. Plasma protein binding of tacrolimus in humans. *J Pharm Sci.* 1993 Mar;82(3):340-1.
  141. Zahir H, Nand RA, Brown KF, Tattam BN, McLachlan AJ. Validation of methods to study the distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2001 Jul-Aug;46(1):27-35.
  142. Wijnen RM, Ericzon BG, Tiebosch AT, Beysens AJ, Groth CG, Kootstra G. Toxicity of FK 506 in the cynomolgus monkey: noncorrelation with FK 506 serum levels. *Transplant Proc.* 1991 Dec;23(6):3101-4.
  143. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2003;63(12):1247-97.
  144. Hugues M, Debray D, Dorent D, Hiesse C, Samuel D. Tacrolimus (FK 506). *Le Point sur.* 1996;Dossier 1996, XVII(4).
  145. Moller 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.* 1999 Jun;27(6):633-6.
  146. Utecht KN, Hiles JJ, Kolesar J. Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 2006 Dec 1;63(23):2340-8.
  147. Karanam BV, Vincent SH, Newton DJ, Wang RW, Chiu SH. FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. *Drug Metab Dispos.* 1994 Sep-Oct;22(5):811-4.
  148. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(10):623-53.

149. Xue L, Zhang H, Ma S, Rui JZ, Miao LY. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*. 2011;88(5-6):288-94.
150. Balci YI, Tavit B, Karabulut E, Kuskonmaz B, Kucukbayrak O, Akyol F, et al. Cyclosporine level at the second hour in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Exp Clin Transplant*. 2011 Oct;9(5):329-35.
151. Fitzsimmons WE, Bekersky I, Dressler D, Raye K, Hodosh E, Mekki Q. Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics. *Transplant Proc*. 1998 Jun;30(4):1359-64.
152. Mehta P, Beltz S, Kedar A, Graham-Pole J, Wingard JR. Increased clearance of tacrolimus in children: need for higher doses and earlier initiation prior to bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Dec;24(12):1323-7.
153. Shishido S, Asanuma H, Tajima E, Honda M, Nakai H. Pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):1066-8.
154. Przepiorka D, Blamble D, Hilsenbeck S, Danielson M, Krance R, Chan KW. Tacrolimus clearance is age-dependent within the pediatric population. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Sep;26(6):601-5.
155. Fukatsu S, Yano I, Igarashi T, Hashida T, Takayanagi K, Saito H, et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001 Sep;57(6-7):479-84.
156. Chow FS, Piekoszewski W, Jusko WJ. Effect of hematocrit and albumin concentration on hepatic clearance of tacrolimus (FK506) during rabbit liver perfusion. *Drug Metab Dispos*. 1997 May;25(5):610-6.
157. Machida M, Takahara S, Ishibashi M, Hayashi M, Sekihara T, Yamanaka H. Effect of temperature and hematocrit on plasma concentration of FK 506. *Transplant Proc*. 1991 Dec;23(6):2753-4.
158. Zhou H, Gao Y, Cheng XL, Li ZD. Population pharmacokinetics of cyclosporine A based on NONMEM in Chinese allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2012 Mar 25.
159. Shibata N, Hoshino N, Minouchi T, Yamaji A, Park K, Tomoyoshi T, et al. Relationship between area under the concentration versus time curve of cyclosporin A, creatinine clearance, hematocrit value, and other clinical factors in Japanese renal transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998 Apr;36(4):202-9.
160. Abu-Elmagd K, Fung JJ, Alessiani M, Jain A, Venkataramanan R, Warty VS, et al. The effect of graft function on FK506 plasma levels, dosages, and renal function, with particular reference to the liver. *Transplantation*. 1991 Jul;52(1):71-7.
161. Jain AB, Abu-Elmagd K, Abdallah H, Warty V, Fung J, Todo S, et al. Pharmacokinetics of FK506 in liver transplant recipients after continuous intravenous infusion. *J Clin Pharmacol*. 1993 Jul;33(7):606-11.
162. Winkler M, Ringe B, Rodeck B, Melter M, Stoll K, Baumann J, et al. The use of plasma levels for FK 506 dosing in liver-grafted patients. *Transpl Int*. 1994 Aug;7(5):329-33.
163. 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.
164. Kelly P, Kahan BD. Review: metabolism of immunosuppressant drugs. *Curr Drug Metab*. 2002 Jun;3(3):275-87.
165. Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*. 2002 Nov;12(8):605-11.



166. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):383-91.
167. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 May;75(5):422-33.
168. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Dec;76(6):545-56.
169. Kreutz R, Zurcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics.* 2004 Oct;14(10):665-71.
170. Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q, et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):178-81.
171. Loh PT, Lou HX, Zhao Y, Chin YM, Vathsala A. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2008 Jun;40(5):1690-5.
172. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics.* 2004 Mar;14(3):147-54.
173. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, 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.
174. Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, Zhong LJ, Liang HQ, Ma CL, et al. Association of MDR1, CYP3A4\*18B, and CYP3A5\*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Nov;64(11):1069-84.
175. 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 1;49(3):141-75.
176. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation.* 2005 Oct 15;80(7):977-84.
177. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003 Oct 27;76(8):1233-5.
178. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provot F, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Sep;26(9):3046-50.
179. Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M, et al. CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics.* 2004 Jul;14(7):471-8.
180. Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ, Zhang GL. Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther.* 2007 Oct;32(5):505-15.

181. Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 May;18(5):413-23.
182. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T, et al. Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Oct;80(4):331-45.
183. Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, et al. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Feb;81(2):228-34.
184. Benkali K, Rostaing L, Premaud A, Woillard JB, 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.
185. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2005 May;37(4):1730-2.
186. 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.
187. Zhao W, Elie V, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, Leroy V, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Dec;86(6):609-18.
188. 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.
189. Suzuki Y, Homma M, Doki K, Itagaki F, Kohda Y. Impact of CYP3A5 genetic polymorphism on pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Japanese subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Jul;66(1):154-5.
190. Haufroid V, Wallemaecq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddour DC, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2706-13.
191. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Aug;70(2):189-99.
192. Mai I, Stormer E, Goldammer M, John A, Kruger H, Budde K, et al. MDR1 haplotypes do not affect the steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2003 Oct;43(10):1101-7.
193. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem*. 2001 Jun;47(6):1048-52.
194. Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics*. 2003 Feb;13(2):89-95.

195. Azarpira N, Aghdaie MH, Behzad-Behbahanie A, Geramizadeh B, Behzadi S, Malekhoseinie SA, et al. Association between cyclosporine concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 during the early stage after renal transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2006 Jun;4(1):416-9.
196. Lemahieu WP, Maes BD, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A4 and P-glycoprotein activity in healthy controls and transplant patients on cyclosporin vs. tacrolimus vs. sirolimus. *Am J Transplant*. 2004 Sep;4(9):1514-22.
197. Herweijer H, Sonneveld P, Baas F, Nooter K. Expression of *mdr1* and *mdr3* multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jul 4;82(13):1133-40.
198. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, et al. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation*. 2006 Sep 15;82(5):705-8.
199. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Apr;18(4):339-48.
200. Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, et al. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl*. 2006 May;12(5):775-80.
201. Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol*. 2004 Feb;44(2):135-40.
202. Macphee IA, 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.
203. Hashida T, Masuda S, Uemoto S, Saito H, Tanaka K, Inui K. Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 May;69(5):308-16.
204. Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther*. 2006 Oct;112(1):184-98.
205. Suppl. Interactions Médicamenteuses. *La Revue Prescrire*. 2011 December 2011;31(338):190.
206. Freeman DJ, Laupacis A, Keown PA, Stiller CR, Carruthers SG. Evaluation of cyclosporin-phenytoin interaction with observations on cyclosporin metabolites. *Br J Clin Pharmacol*. 1984 Dec;18(6):887-93.
207. Asberg A. Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs: implications for organ transplant recipients. *Drugs*. 2003;63(4):367-78.
208. Barbaro D, Orsini P, Pallini S, Piazza F, Pasquini C. Obesity in transplant patients: case report showing interference of orlistat with absorption of cyclosporine and review of literature. *Endocr Pract*. 2002 Mar-Apr;8(2):124-6.
209. Colman E, Fossler M. Reduction in blood cyclosporine concentrations by orlistat. *N Engl J Med*. 2000 Apr 13;342(15):1141-2.
210. Errasti P, Garcia I, Lavilla J, Ballester B, Manrique J, Purroy A. Reduction in blood cyclosporine concentration by orlistat in two renal transplant patients. *Transplant Proc*. 2002 Feb;34(1):137-9.
211. Evans S, Michael R, Wells H, Maclean D, Gordon I, Taylor J, et al. Drug interaction in a renal transplant patient: cyclosporin-Neoral and orlistat. *Am J Kidney Dis*. 2003 Feb;41(2):493-6.

212. Le Beller C, Bezie Y, Chabatte C, Guillemain R, Amrein C, Billaud EM. Co-administration of orlistat and cyclosporine in a heart transplant recipient. *Transplantation*. 2000 Nov 27;70(10):1541-2.
213. Nagele H, Petersen B, Bonacker U, Rodiger W. Effect of orlistat on blood cyclosporin concentration in an obese heart transplant patient. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999 Nov;55(9):667-9.
214. Schnetzler B, Kondo-Oestreicher M, Vala D, Khatchatourian G, Faidutti B. Orlistat decreases the plasma level of cyclosporine and may be responsible for the development of acute rejection episodes. *Transplantation*. 2000 Nov 27;70(10):1540-1.
215. Marquet P. *Suivi thérapeutique pharmacologique : pour l'adaptation de posologie des médicaments*. Elsevier, editor.; 2004.
216. Lake KD, Aaronson KD, Gorman LE, Pagani FD, Koelling TM. Effect of oral vitamin E and C therapy on calcineurin inhibitor levels in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Aug;24(8):990-4.
217. Park SI, Felipe CR, Pinheiro-Machado PG, Garcia R, Fernandes FB, Casarini DE, et al. Tacrolimus pharmacokinetic drug interactions: effect of prednisone, mycophenolic acid or sirolimus. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009 Feb;23(1):137-45.
218. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(11):741-62.
219. Shimada T, Terada A, Yokogawa K, Kaneko H, Nomura M, Kaji K, et al. Lowered blood concentration of tacrolimus and its recovery with changes in expression of CYP3A and P-glycoprotein after high-dose steroid therapy. *Transplantation*. 2002 Nov 27;74(10):1419-24.
220. Ptachcinski RJ, Carpenter BJ, Burckart GJ, Venkataramanan R, Rosenthal JT. Effect of erythromycin on cyclosporine levels. *N Engl J Med*. 1985 Nov 28;313(22):1416-7.
221. Spicer ST, Liddle C, Chapman JR, Barclay P, Nankivell BJ, Thomas P, et al. The mechanism of cyclosporine toxicity induced by clarithromycin. *Br J Clin Pharmacol*. 1997 Feb;43(2):194-6.
222. Shitrit D, Ollech JE, Ollech A, Bakal I, Saute M, Sahar G, et al. Itraconazole prophylaxis in lung transplant recipients receiving tacrolimus (FK 506): efficacy and drug interaction. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Dec;24(12):2148-52.
223. Kramer MR, Marshall SE, Denning DW, Keogh AM, Tucker RM, Galgiani JN, et al. Cyclosporine and itraconazole interaction in heart and lung transplant recipients. *Ann Intern Med*. 1990 Aug 15;113(4):327-9.
224. Canafax DM, Graves NM, Hilligoss DM, Carleton BC, Gardner MJ, Matas AJ. Interaction between cyclosporine and fluconazole in renal allograft recipients. *Transplantation*. 1991 May;51(5):1014-8.
225. Videla C, Vega J, Borja H. Hepatotoxicity associated with cyclosporine monitoring using C2 recommendations in adults renal recipients receiving ketoconazole. *Transplant Proc*. 2005 Apr;37(3):1574-6.
226. Hebert MF, Townsend RW, Austin S, Balan G, Blough DK, Buell D, et al. Concomitant cyclosporine and micafungin pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2005 Aug;45(8):954-60.
227. Page RL, 2nd, Klem PM, Rogers C. Potential elevation of tacrolimus trough concentrations with concomitant metronidazole therapy. *Ann Pharmacother*. 2005 Jun;39(6):1109-13.
228. Hebert MF, Blough DK, Townsend RW, Allison M, Buell D, Keirns J, et al. Concomitant tacrolimus and micafungin pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2005 Sep;45(9):1018-24.



229. Kagaya H, Miura M, Satoh S, Inoue K, Saito M, Inoue T, et al. No pharmacokinetic interactions between mycophenolic acid and tacrolimus in renal transplant recipients. *J Clin Pharm Ther.* 2008 Apr;33(2):193-201.
230. Lamoureux F, Picard N, Boussera B, Sauvage FL, Marquet P. Sirolimus and everolimus intestinal absorption and interaction with calcineurin inhibitors: a differential effect between cyclosporine and tacrolimus. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011 Aug;26(4):463-72.
231. Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, et al. Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Arch Intern Med.* 2003 Mar 10;163(5):553-64.
232. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)<sup>1</sup> in organ transplantation. *Drugs.* 2001;61(13):1957-2016.
233. Hermann M, Asberg A, Christensen H, Holdaas H, Hartmann A, Reubsæet JL. Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Oct;76(4):388-91.
234. Omar MA, Wilson JP. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother.* 2002 Feb;36(2):288-95.
235. Lemahieu WP, Hermann M, Asberg A, Verbeke K, Holdaas H, Vanrenterghem Y, et al. Combined therapy with atorvastatin and calcineurin inhibitors: no interactions with tacrolimus. *Am J Transplant.* 2005 Sep;5(9):2236-43.
236. Rebello S, Compain S, Feng A, Hariry S, Dieterich HA, Jarugula V. Effect of cyclosporine on the pharmacokinetics of aliskiren in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.* 2011 Nov;51(11):1549-60.
237. Schmitt U, Abou El-Ela A, Guo LJ, Glavinas H, Krajcsi P, Baron JM, et al. Cyclosporine A (CsA) affects the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the atypical antipsychotic amisulpride probably via inhibition of P-glycoprotein (P-gp). *J Neural Transm.* 2006 Jul;113(7):787-801.
238. Filler G, Zimmering M, Mai I. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil are influenced by concomitant immunosuppression. *Pediatr Nephrol.* 2000 Feb;14(2):100-4.
239. Hubner GI, Eismann R, Sziegoleit W. Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 1999 Oct;21(5):536-9.
240. Pou L, Brunet M, Cantarell C, Vidal E, Oppenheimer F, Monforte V, et al. Mycophenolic acid plasma concentrations: influence of comedication. *Ther Drug Monit.* 2001 Feb;23(1):35-8.
241. Zucker K, Tsaroucha A, Olson L, Esquenazi V, Tzakis A, Miller J. Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther Drug Monit.* 1999 Feb;21(1):35-43.
242. de Mare-Bredemeijer EL, Metselaar HJ. Optimization of the use of Calcineurin inhibitors in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012 Feb;26(1):85-95.
243. Citterio F. Evolution of the therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc.* 2004 Mar;36(2 Suppl):420S-5S.
244. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT<sub>X</sub>) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation.* 2001 Dec 27;72(12):1934-9.
245. Barkholt L, Remberger M, Bodegard H, Ringden O, Bottiger Y. Cyclosporine A (CsA) 2-h concentrations vary between patients without correlation to graft-versus-host

- disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Oct;40(7):683-9.
246. Furukawa T, Kurasaki-Ida T, Masuko M, Tsukada N, Okazuka K, Sato N, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of cyclosporine A (CsA) to find the best single time point for the monitoring and adjusting of CsA dose using twice-daily 3-h intravenous infusions in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2010 Jul;92(1):144-51.
247. Kong DC, Shuttleworth P, Bailey M, Grigg A. CsA 2-h concentration correlates best with area under the concentration-time curve after allo-SCT compared with trough CsA. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jan;47(1):54-9.
248. Schrauder A, Saleh S, Sykora KW, Hoy H, Welte K, Boos J, et al. Pharmacokinetic monitoring of intravenous cyclosporine A in pediatric stem-cell transplant recipients. The trough level is not enough. *Pediatr Transplant*. 2009 Jun;13(4):444-50.
249. VIDAL. SANDIMMUN® 50 mg/ml solution injectable [database on the Internet]. 2012 [cited 25/09/2012].
250. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. 1979 May 10;300(19):1068-73.
251. Ringden O, Hermans J, Labopin M, Apperley J, Gorin NC, Gratwohl A. The highest leukaemia-free survival after allogeneic bone marrow transplantation is seen in patients with grade I acute graft-versus-host disease. Acute and Chronic Leukaemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leuk Lymphoma*. 1996 Dec;24(1-2):71-9.
252. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc*. 2004 Mar;36(2 Suppl):25S-32S.
253. Scholten EM, Cremers SC, Schoemaker RC, Rowshani AT, van Kan EJ, den Hartigh J, et al. AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2005 Jun;67(6):2440-7.
254. 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.
255. Woillard JB, de Winter BC, Kamar N, Marquet P, Rostaing L, Rousseau A. Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two tacrolimus formulations--twice daily Prograf and once daily Advagraf. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Mar;71(3):391-402.
256. USC\*PACK [computer program]. Version 10.7. Los Angeles. CA: Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California. School of Medicine: USC\*PACK P.C. Collection Clinical Research Programs. 1995.
257. Jelliffe RW, Schumitzky A, Van Guilder M, Liu M, Hu L, Maire P, et al. Individualizing drug dosage regimens: roles of population pharmacokinetic and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptive control. *Ther Drug Monit*. 1993 Oct;15(5):380-93.
258. Andersen ME. Toxicokinetic modeling and its applications in chemical risk assessment. *Toxicol Lett*. 2003 Feb 18;138(1-2):9-27.
259. Parrott N, Jones H, Paquereau N, Lave T. Application of full physiological models for pharmaceutical drug candidate selection and extrapolation of pharmacokinetics to man. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005 Mar;96(3):193-9.
260. Edginton AN, Theil FP, Schmitt W, Willmann S. Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Sep;4(9):1143-52.
261. Teorell. *Arch Intern Pharmacodyn*. 1937;57:205-40.

262. Bischoff, Brown. Chem Eng Prog Symp Ser. 1966;62:32-45.
263. Rowland M. Physiologic pharmacokinetic models: relevance, experience, and future trends. Drug Metab Rev. 1984;15(1-2):55-74.
264. Rowland M, Balant L, Peck C. Physiologically based pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002). Aaps J. 2004;6(1):56-67.
265. Gerlowski LE, Jain RK. Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications. J Pharm Sci. 1983 Oct;72(10):1103-27.
266. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats. J Pharmacokinet Biopharm. 1999 Dec;27(6):597-623.
267. Luecke RH, Pearce BA, Wosilait WD, Doerge DR, Slikker W, Jr., Young JF. Windows(R) based general PBPK/PD modeling software. Comput Biol Med. 2008 Sep;38(9):962-78.
268. Tod M, Lagneau F, Jullien V, Mimoz O. A physiological model to evaluate drug kinetics in patients with hemorrhagic shock followed by fluid resuscitation. Application to amoxicillin-clavulanate. Pharm Res. 2008 Jun;25(6):1431-9.
269. Zhou Q, Gallo JM. The pharmacokinetic/pharmacodynamic pipeline: translating anticancer drug pharmacology to the clinic. AAPS J. 2011 Mar;13(1):111-20.
270. Anderson BJ, Holford NH. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008;48:303-32.
271. Zhao P, Zhang L, Grillo JA, Liu Q, Bullock JM, Moon YJ, et al. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. Clin Pharmacol Ther. 2011 Feb;89(2):259-67.
272. Rostami-Hodjegan A, Tamai I, Pang KS. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling: It is here to stay! Biopharm Drug Dispos. 2012 Mar;33(2):47-50.
273. D'Argenio D, Schumitzky A. ADAPT II User's guide. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Ressource. Los Angeles; 1997.
274. Tomlin CJ, Axelrod JD. Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology. Nat Rev Genet. 2007 May;8(5):331-40.
275. Bruno R, Vivier N, Vergniol JC, De Phillips SL, Montay G, Sheiner LB. A population pharmacokinetic model for docetaxel (Taxotere): model building and validation. J Pharmacokinet Biopharm. 1996 Apr;24(2):153-72.
276. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. J Pharm Sci. 2005 Jun;94(6):1259-76.
277. Rodgers T, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. J Pharm Sci. 2006 Jun;95(6):1238-57.
278. Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. AAPS J. 2009 Jun;11(2):262-76.
279. Jamei M, Marciniak S, Feng K, Barnett A, Tucker G, Rostami-Hodjegan A. The Simcyp population-based ADME simulator. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009 Feb;5(2):211-23.
280. Johnson TN, Boussey K, Rowland-Yeo K, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. A semi-mechanistic model to predict the effects of liver cirrhosis on drug clearance. Clin Pharmacokinet. 2010 Mar;49(3):189-206.

281. Ghobadi C, Johnson TN, Aarabi M, Almond LM, Allabi AC, Rowland-Yeo K, et al. Application of a systems approach to the bottom-up assessment of pharmacokinetics in obese patients: expected variations in clearance. *Clin Pharmacokinet*. 2011 Dec 1;50(12):809-22.
282. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A. Resurgence in the use of physiologically based pharmacokinetic models in pediatric clinical pharmacology: parallel shift in incorporating the knowledge of biological elements and increased applicability to drug development and clinical practice. *Paediatr Anaesth*. 2011 Mar;21(3):291-301.
283. Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruelisauer A, Niederberger W, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1994 Oct;22(5):327-65.
284. Kawai R, Lemaire M, editor. Role of blood cell uptake on cyclosporin pharmacokinetics. *Proceeding of the International Symposium on Blood Binding and Drug Transfer*; 1993.
285. Vickers AE, Fischer V, Connors S, Fisher RL, Baldeck JP, Maurer G, et al. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines. *Drug Metab Dispos*. 1992 Nov-Dec;20(6):802-9.
286. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*. 1997 Jul-Aug;13(4):407-84.
287. Bjorkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Jun;59(6):691-704.
288. Edginton AN, Schmitt W, Willmann S. Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(10):1013-34.
289. Niederberger W, Lemaire M, Maurer G, Nussbaumer K, Wagner O. Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. *Transplant proceeding*. 1983;15(suppl 1):2419-21.
290. Legg B, Gupta SK, Rowland M. A model to account for the variation in cyclosporin binding to plasma lipids in transplant patients. *Ther Drug Monit*. 1988;10(1):20-7.
291. National Cholesterol Education Program (NCEP): highlights of the report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 1992 Mar;89(3):495-501.
292. Girardet J-P. Management of children with hypercholesterolemia. *Pédiatrie*. 2006;13(1):104-10.
293. Caforio AL, Tona F, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Fortina AB, et al. C2 is superior to C0 as predictor of renal toxicity and rejection risk profile in stable heart transplant recipients. *Transpl Int*. 2005 Jan;18(1):116-24.
294. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(9):931-56.
295. Meille C, Iliadis A, Barbolosi D, Frances N, Freyer G. An interface model for dosage adjustment connects hematotoxicity to pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008 Dec;35(6):619-33.
296. Yang H, W.F. E. The binding of cyclosporin A to human plasma: an in vitro micordialysis study. *Pharm Res*. 1996;13(4):622-7.
297. Gelman A, Bois FY, Jiang J. Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior ditributions. *Journal of the American Statistical Association*. 1996;91:1400-12.



298. Nestorov I. Modelling and simulation of variability and uncertainty in toxicokinetics and pharmacokinetics. *Toxicology Letters*. 2001;120:411-20.
299. Bois FY. Applications of population approaches in toxicology. *Toxicology Letters*. 2001;120:385-94.
300. Nestorov I. Whole body pharmacokinetics models. *Clinical pharmacokinetics*. 2003;42:883-908.
301. Nestorov IA, Aarons LJ, Arundel PA, Rowland M. Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1998 Feb;26(1):21-46.
302. Pilari S, Huisinga W. Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2010 Aug;37(4):365-405.

## **TITRE : APPORT DES MODELES PBPK DANS L'OPTIMISATION THERAPEUTIQUE DES INHIBITEURS DES CALCINEURINES EN TRANSPLANTATION**

---

### **RESUME**

En transplantation d'organes solides ou en greffe de moelle osseuse, la ciclosporine et le tacrolimus ont prouvé leur efficacité. Ils sont cependant de maniement délicat du fait d'un intervalle thérapeutique étroit et d'une grande variabilité pharmacocinétique inter et intra-individuelle. Un suivi thérapeutique et une adaptation des posologies de ces médicaments sont nécessaires pour diminuer le risque de rejet et limiter leur toxicité.

Un modèle PBPK est construit à partir de considérations anatomiques, physiologiques et biochimiques. Il permet d'apporter des informations sur les cinétiques tissulaires et sur les répercussions des altérations physiologiques ou pathologiques.

Les modalités optimales d'administration de la ciclosporine en greffe de moelle osseuse pédiatrique, ainsi que les zones thérapeutiques à atteindre, font l'objet de débats. Un modèle PBPK-PD pour la ciclosporine construit à partir de données chez le rat puis extrapolé et validé chez l'homme a permis d'estimer l'exposition à la ciclosporine dans les organes cibles de la GVH, de comparer les modalités d'administration en perfusion intraveineuse, et de définir des concentrations cibles en fonction des indications.

L'adaptation posologique du tacrolimus en transplantation hépatique par la méthode Bayésienne reste relativement imprécise dans la période initiale après la greffe, parce que les facteurs de variabilité sont imparfaitement connus. Un modèle PBPK a été construit et évalué afin de rechercher les covariables pertinentes par une approche bottom-up : la fonction hépatique, l'hématocrite, le génotype du cytochrome P450 3A5 du donneur, la fraction libre et certaines comédications ont été retrouvées.

---

**MOTS-CLES :** médicaments immunosuppresseurs, modélisation PBPK, suivi thérapeutique

---

### **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

EMR 3738 Ciblage Thérapeutique en Oncologie

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux

Chemin du Grand Revoyet, BP12

69921 OULLINS Cedex