



Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone chez l'humain et la souris en traitement de l'insuffisance surrénale relative survenant pendant le choc septique

Mégane Ribot

► To cite this version:

Mégane Ribot. Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone chez l'humain et la souris en traitement de l'insuffisance surrénale relative survenant pendant le choc septique. Pharmacologie. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2015. Français. NNT : 2015VERS005V . tel-01240303

HAL Id: tel-01240303

<https://theses.hal.science/tel-01240303>

Submitted on 9 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT QUENTIN EN YVELINES

Discipline : Pharmacologie

Melle Mégane RIBOT

ETUDE PHARMACOCINETIQUE/PHARMACODYNAMIQUE DE LA FLUDROCORTISONE CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS EN TRAITEMENT DE L'INSUFFISANCE SURRENALE RELATIVE SURVENANT DANS LE CHOC SEPTIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 13 janvier 2015

Devant le jury composé de :

Professeur Jean-Claude ALVAREZ

Directeur de thèse

Professeur Bruno LAVIOLLE

Examineur

Docteur Stanislas GRASSIN-DELYLE

Examineur

Professeur Karim ASEHNOUNE

Rapporteur

Professeur Antoine COQUEREL

Rapporteur

Ecole doctorale : Des génomes aux organismes (GAO) – ED 423
Unité de recherche : Laboratoire d'étude de la réponse neuroendocrine au sepsis (LARENES)

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Claude ALVAREZ,
Qui a accepté d'être mon directeur de thèse et m'a accueillie dans son laboratoire.
Je le remercie pour son écoute et ses enseignements, ainsi que pour toute l'aide qu'il m'a apportée.

A Monsieur le Professeur Djillali ANNANE,
qui m'a accueillie au sein de son unité de recherche. Son perfectionnisme et ses critiques riches d'enseignement m'ont toujours remis dans la bonne voie quand je commençais à m'éparpiller. Je le remercie du temps qu'il a pu m'accorder tout au long de ma thèse.

A Messieurs les Professeurs Karim ASEHNOUNE et Antoine COQUEREL,
qui ont accepté de faire partie de mon jury en la qualité de rapporteurs. Je vous remercie de l'intérêt que vous apporterez à mon travail et du temps que vous y consacrerez. Soyez assurés de mon respect et de ma gratitude.

A Messieurs le Professeur Bruno LAVIOLLE et Docteur Stanislas GRASSIN-DELYLE,
qui ont accepté de participer à mon jury. Soyez assurés de mes sincères remerciements pour le temps consacré et le jugement que vous apporterez à ce travail.

A Monsieur le Docteur Andrea POLITO,
qui m'a appris beaucoup, soutenue à chaque moment de doute, aidée à chaque étape de cette thèse et compris à chaque aléa. Il a été pour moi un maître, un ami, un confident et un frère. Sans lui, ce travail n'aurait pas été celui qu'il est aujourd'hui. N'oublie pas que dans les moments où tout va mal, rien ne vaut un ami, du chocolat et un Candy Up à la fraise (évidemment).

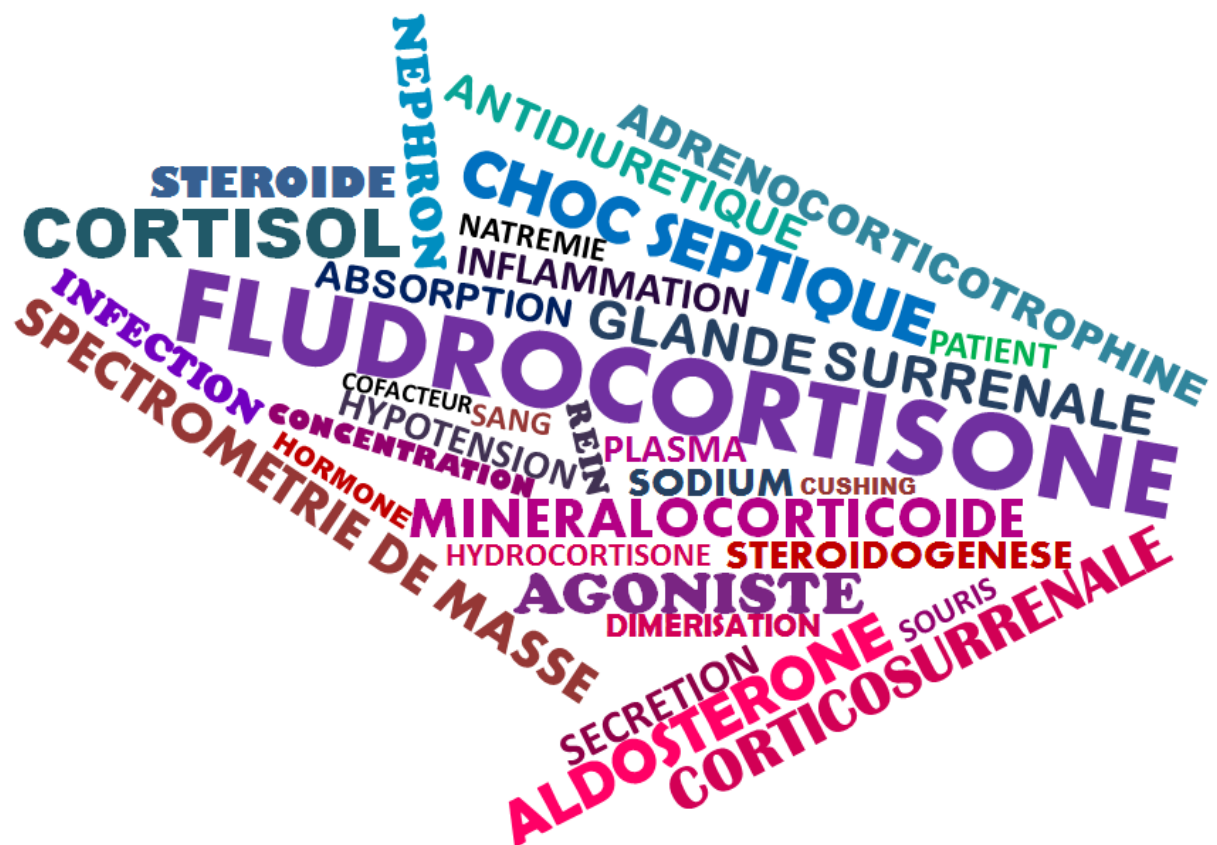
A tout le laboratoire de toxicologie,
Tata Jacqueline et Super Maryline, qui m'ont accueillies dans leur bureau, soutenues dans les mauvais moments de la thèse, et beaucoup écoutées quand j'avais besoin de me confier,
Lady Adeline et Dame Charlotte, qui m'ont accepté dans leur bureau l'autre partie de ma thèse, qui ont pris le temps de me donner leurs avis à chaque fois que je le leur ai demandé tout en gardant leur bonne humeur, et qui m'ont supportée dans l'écriture de ma thèse,
Marjorie, Jollyanna, Isabelle, Céline, Amélie sans oublier Maryline et Coralie, qui m'ont prêtées leurs paillasse et aidées avec les machines, souvent en râlant mais toujours avec efficacité,
et le reste de l'équipe sans qui le laboratoire ne tournerait pas.

A ma maman qui est une super maman et à Pitch, qui m'ont soutenue moralement et financièrement tout le temps où j'étais sans revenu sans jamais râler,
Et à mes frères et leur famille, qui maintiennent une bonne ambiance familiale et qui me permettent de m'épanouir dans mes études sans me soucier d'autres choses.

A mes amis, qui seront toujours là pour moi comme je serai toujours là pour eux.

A John, qui m'a soutenue dans mes moments de doutes, rassurée et aidée à avoir confiance en moi et qui, en plus de tout ça, m'apprend à avoir une conduite irréprochable.

A Wenjui, qui me couvre de son amour, même séparés de 10 000 km, efface mes doutes au fur et à mesure qu'ils arrivent et me comprend dans toutes mes bizarreries.



ABBREVIATIONS

ACTH : Hormone adrenocorticotrophine

ARNm : ARN messenger

AP-1 : Protéine d'activation 1

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

AVP : Vasopressine

CL/F : Clairance apparente

CLP : Caecal Ligation Puncture

CRH : Corticolibérine

ESI : Ionisation par electrospray

F : biodisponibilité apparente

FSH : Hormone de stimulation des follicules

GH : Hormone de croissance

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GR : Récepteur Glucocorticoïde

GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes

HHS : Axe hypothalamo-hypophysaire

HSD : Hydroxystéroïde Déshydrogénase

HSP : Protéine de choc thermique

IGS II : Score de gravité

IL : Interleukine

INF : Interféron

ISR : Insuffisance Surrénale Relative

i.v. : Intraveineuse

LDQ : Limite de quantification

LH : Hormone lutéinisante

LOQ : Limite inférieure de quantification

LPS : Lipopolysaccharide

MR : Récepteur minéralocorticoïde

MRE : Élément de réponse aux minéralocorticoïdes

NF-KB : Facteur nucléaire kappa-B

PRL : Prolactine

SIRS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

Tlag : Délai d'absorption

TNF : Tumor Necrosis Factor

TSH : Hormone de stimulation de la thyroïde

Vd/F : Volume de distribution apparent

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
A. Le choc septique	5
1. Epidémiologie	5
2. Les causes du choc septique	5
3. Les acteurs et les cellules mises en jeu	5
4. Du SIRS au choc septique	9
B. Axe hypothalamo-hypophysaire et glandes surrénales	9
1. Description des fonctions de l'axe HHS	9
a. Hypothalamus et hypophyse	9
b. Les glandes surrénales	11
i. Description des glandes surrénales	11
ii. Fonction des hormones sécrétées par les glandes surrénales	11
2. Cas de l'ISR	13
a. Diagnostic	13
i. Chez l'humain	13
ii. Chez la souris	13
b. Traitement	14
C. La fludrocortisone	17
1. Description	17
a. Structure	17
b. Pharmacologie	18
2. Mode d'action – Activation du récepteur minéralocorticoïde	18
a. Gène codant pour le récepteur minéralocorticoïde	18
b. Fonction du récepteur minéralocorticoïde	20
3. Utilisation de la fludrocortisone	22
a. Pratiques usuelles	22
b. Controverse	23
D. Méthode analytique	24
1. Chromatographie liquide	26

2. Spectrométrie de masse.....	26
a. Ionisation des molécules.....	26
i. Ionisation par <i>electrospray</i>	26
ii. Ionisation chimique à pression atmosphérique.....	28
b. Identification des analytes.....	30
3. Méthodes de dosage de la fludrocortisone plasmatique.....	30
PROJET DE THESE.....	33
PRESENTATION DES RESULTATS.....	35
a. Publication numéro 1.....	35

Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration

Mégane Ribot, Andrea Polito, Stanislas Grassin-Delyle, Djillali Annane, Jean-Claude Alvarez

b. Publication numéro 2.....	42
------------------------------	----

Population pharmacokinetic modeling of 50 µg oral fludrocortisone in septic shock patients

Andrea Polito, Mégane Ribot, Noureddine Hamitouche, Angelo Polito, Bruno Laviolle, Jean-Claude Alvarez, Djillali Annane

c. Publication numéro 3.....	65
------------------------------	----

Population pharmacokinetic/pharmacodynamics modeling of 50 µg oral fludrocortisone and 50 mg iv hydrocortisone, alone administration or in combination, in healthy volunteers.

Noureddine Hamitouche, Mégane Ribot, Andrea Polito, Djillali Annane, Jean-Claude Alvarez, Eric Bellissant, Bruno Laviolle

d. Publication numéro 4.....	93
------------------------------	----

Tissue and plasma pharmacokinetics and distribution of fludrocortisone in two models of sepsis

Mégane RIBOT, Nouredine Hamitouche, Angelo POLITO, Djillali ANNANE, Bruno Laviolle, Jean-Claude ALVAREZ, Andrea POLITO

DISCUSSION.....	105
------------------------	------------

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	113
--	------------

BIBLIOGRAPHIE.....	114
---------------------------	------------

INTRODUCTION

Le choc septique est défini par une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat en présence d'une réponse inflammatoire systémique suite à une infection (*Dellinger et al. 2008*). Il est responsable de 10 % des admissions en réanimation et son incidence croît chaque année dans les pays industrialisés. A ce jour et malgré des progrès thérapeutiques constants, la mortalité liée au sepsis varie entre 40 % pour le sepsis sévère (*C. M. Martin et al. 2009*) et 60 % dans les cas les plus graves de choc septique (*Annane et al. 2003*).

Parmi les différents facteurs impliqués dans la survenue du choc septique, l'altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est associée à un mauvais pronostic et l'introduction d'une opothérapie substitutive s'est montrée efficace dans l'amélioration de la survie (*Annane D et al. 2002*). L'opothérapie consiste en l'utilisation de cortisol et de fludrocortisone à de faibles concentrations. Dans le choc, la glande surrénale joue vraisemblablement un rôle fondamental. En effet, l'incidence de l'insuffisance surrénale est d'environ 50 % au cours du choc septique et se manifeste par une cortisolémie (basale et/ou stimulée par adrénocorticotrophine (ACTH)), non adaptée à l'intensité du stress (*Annane D et al. 2000*).

Mais ce traitement est encore aujourd'hui controversé. En effet, les études sur cette pratique dans le cas des chocs septiques n'ont pas toutes montrées les mêmes résultats sur l'amélioration des patients (*Druce, Thorpe, et Wilton 2008a*), *Raurich et al. 2007a*), *Annane D et al. 2002*, *Otte et al. 2003*). De plus, aucune technique n'était assez sensible pour déterminer les concentrations plasmatiques de la fludrocortisone et donc aucune donnée pharmacocinétique n'était disponible pour appuyer ou contredire les données cliniques.

L'objectif de ma thèse est de faire une étude des relations pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone dans le cas des chocs septiques afin de déterminer l'impact de cette molécule dans l'hypotension persistante et la survie des patients traités. Pour cela, une étude de la cinétique de la fludrocortisone chez le volontaire sain et le patient septique permettra de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la molécule et de l'associer à une étude pharmacodynamique déjà publiée sur le volontaire sain (*B. Laviolle et al. 2010*). Enfin, une étude pharmacocinétique et de distribution de la fludrocortisone sera effectuée chez l'animal sain et sur deux modèles de choc.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

E. Le choc septique

1. Epidémiologie

Le choc septique est un sepsis combiné à une hypotension résistante malgré un remplissage vasculaire. Aux Etats-Unis, son coût annuel de prise en charge est de 16,7 milliards de dollars (*Hodgin et Moss 2008*). En France, il est estimé à 6,3 % des admissions en réanimation avec une mortalité de 56 % (*Brun-Buisson et al. 1995*).

Une étude internationale a montré que la fréquence des chocs septiques est en moyenne de 8,2 % des admissions de réanimation. Cette fréquence est passée de 7,0 % en 1993 à 9,7 % en 2000 et ceci ne cesse d'augmenter. En cause, les infections pulmonaires sont les plus retrouvées ainsi que les bactéries multi-résistantes. Bien que la mortalité des patients en choc septique reste très élevée (*Annane et al. 2003*), la mortalité de ces patients a diminué de 62,1 % en 1993 à 55,9 % en 2000.

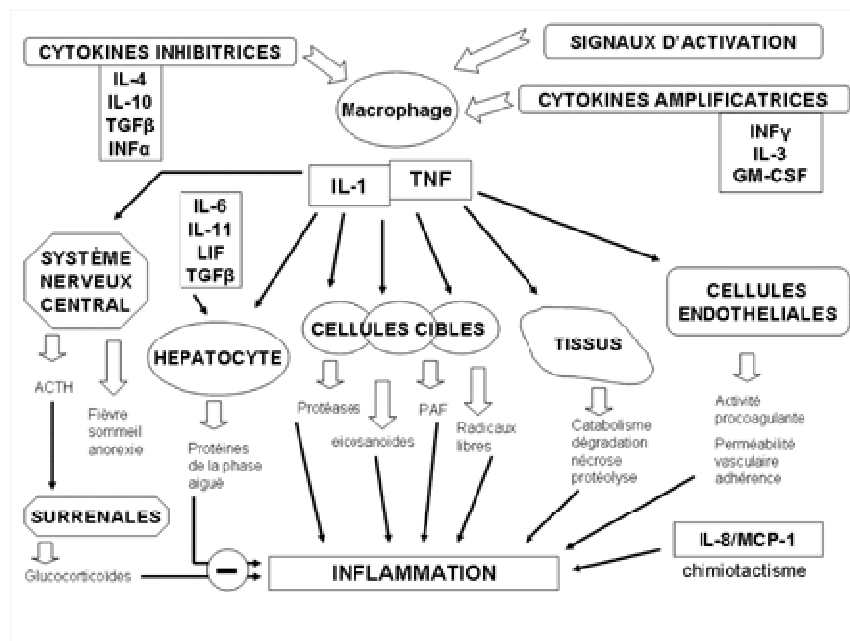
2. Les causes du choc septique

Plusieurs facteurs favorisent la survenue d'un choc septique tels que l'âge, les antécédents médicaux, le nombre de défaillances d'organes, la sévérité de la pathologie, le site et le germe responsable de l'infection (*Brun-Buisson et al. 1995*), les facteurs génétiques (*Sørensen et al. 1988*) ou iatrogéniques (*Brun-Buisson et al. 1995, Alberti et al. 2002, G. S. Martin et al. 2003*), ou encore une altération de la fonction endocrine (*Annane et Bellissant 2000*).

Les causes d'un choc septique ne sont pas encore bien définies et peuvent impliquer des dommages anatomiques, des processus inflammatoires et des interférences médicamenteuses avec les hormones métaboliques au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou de la glande surrénalienne. L'axe hypothalamo-hypophysosurrénalien est un facteur majeur d'emballlement de la réponse immunitaire dans les stades critiques de maladies tel que le choc septique (*Polito et al. 2010*).

3. Les acteurs et les cellules mises en jeu

La réponse inflammatoire peut résulter de la présence dans le sang de micro-organismes ou d'endotoxines dans le cas des bactéries à gram négatif. Cette réponse consiste en une



interaction cellulaire entre agents pathogènes et cellules immunologiques telles que les macrophages, granulocytes neutrophiles ou encore lymphocytes B. Ces cellules induisent, *via* une interaction avec un lymphocyte T, une cascade humorale, cellulaire et cytokinique. Ce sont ces cytokines inflammatoires et en particulier le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) et l'interleukine-1 qui sont libérées au cours du choc septique. Celui-ci est caractérisé par une chute de la pression artérielle et une mauvaise oxygénation périphérique. Une accumulation de ces dérèglements peut se révéler létale dans 30 % à 70 % des cas pour le patient selon les publications (Annane, Bellissant, et Cavaillon 2005, Hotchkiss et Karl 2003).

L'interleukine-1 (IL-1) et le TNF provoquent la production par les cellules immunitaires, de médiateurs lipidiques, enzymes protéolytiques, radicaux libres responsables des effets délétères sur l'organisme. De plus, l'interféron- γ (IFN- γ), l'IL-3 ou encore le *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) amplifient leur production et donc la réponse inflammatoire. L'IL-6 induit la production des protéines de la phase aiguë du Complément par les hépatocytes. Des cytokines anti-inflammatoires sont également produites : IL-4, 10 ou 13 mais la réponse immunitaire est tellement forte durant le choc septique qu'elles ne sont plus en mesure de freiner la réaction. Les glucocorticoïdes, comme le cortisol, sont aussi en mesure de réduire la réponse immunitaire. Ils sont produits *via* la production de ACTH par l'hypophyse après stimulation de celle-ci par les granulocytes basophiles sur la voie neuroendocrinienne (Allary et Annane 2005) (Figure 1).

Du fait de cette grande quantité de cytokines libérées, il y a une distribution modifiée du sang, certains tissus étant moins irrigués et d'autres excessivement. En plus de ce dérèglement, les bactéries produisent des endotoxines ou autres substances qui provoquent des dysfonctionnements de l'organisme spécifiques tels que les facteurs lytiques ou hémolytiques, activations de protéases intracellulaires, interférence de transduction des signaux intracellulaire, ou larges comme la nécrose tissulaire.

Le choc septique se caractérise par une défaillance multiple d'organes toujours accompagnée d'une insuffisance cardio-circulatoire qui nécessite un traitement par des molécules à action vasoconstrictive comme les catécholamines afin d'assurer une pression correcte de perfusion des organes. D'autres défaillances peuvent s'installer au cours du choc septique, notamment respiratoire, rénale, métabolique et endocrinienne.

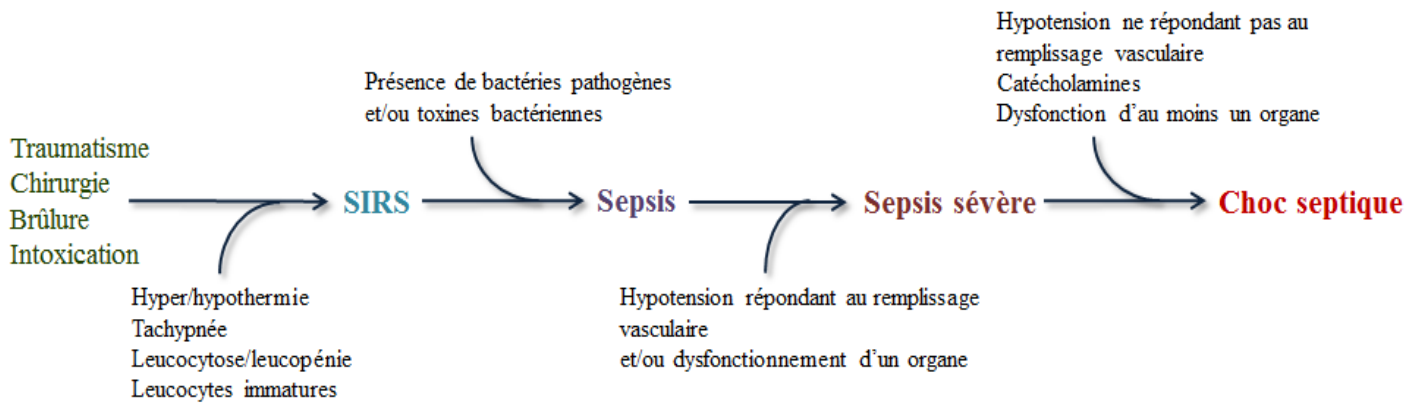


Figure 2 : Définition d'un choc septique

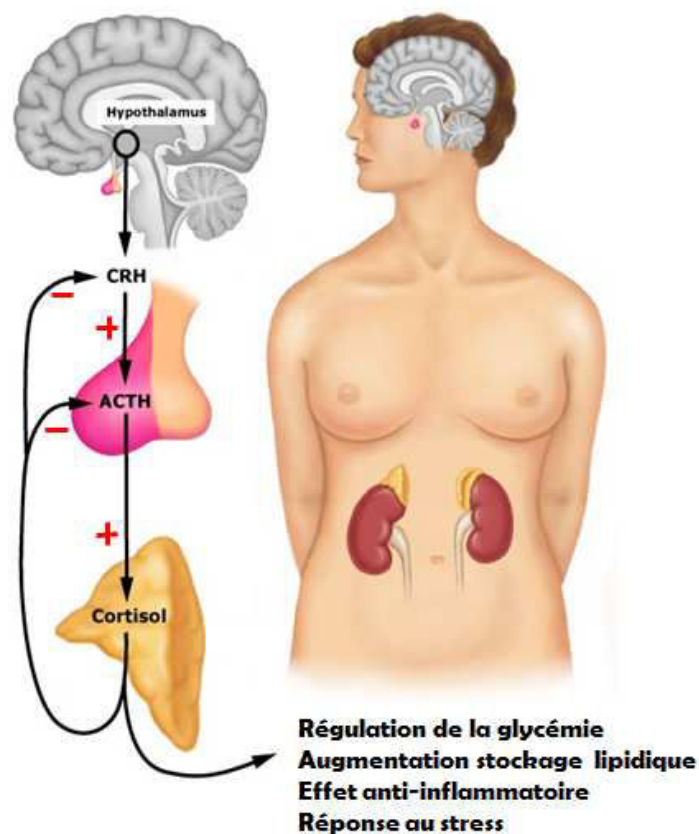


Figure 3 : Schéma d'activation des glandes surrénales

4. Du SIRS au choc septique

La réponse inflammatoire systémique d'un organisme est nommée selon sa gravité. Suite à une agression (traumatisme, chirurgie, brûlure, intoxication), la première réponse induite par l'organisme est un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Il est caractérisé par la présence d'hyper- ou hypothermie, tachypnée, leucocytose ou leucopénie, ou encore présence de formes leucocytaires immatures. Lorsqu'il y a présence de bactéries pathogènes ou de produits toxiques bactériens dans le sang provoquant une réponse inflammatoire systémique, on parle alors de sepsis. Le sepsis sévère est un sepsis associé à une hypotension répondant au remplissage vasculaire et/ou dysfonction d'un organe. Enfin le choc septique est un sepsis sévère associé à une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire, avec nécessité d'utilisation de drogues vasoactives telles que les catécholamines, et associé au dysfonctionnement d'au moins un organe (Figure 2).

L'évolution de sepsis en choc septique est déterminée par le contrôle de la réponse inflammatoire induit par les systèmes immunitaire et neuroendocrinien. Une défaillance de l'un d'eux contribue irrémédiablement vers les formes les plus graves du sepsis et diminue le pronostic vital du patient, celui-ci étant défini par le nombre de SIRS et la gravité des défaillances d'organes.

La septicémie représente 2 % des causes d'hospitalisation, parmi celles-ci 9 % évoluent en sepsis sévère et 3 % en choc septique. Le choc septique nécessite une prise en charge en réanimation où il représente 10 % des admissions.

F. Axe hypothalamo-hypophysaire et glandes surrénales

1. Description des fonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire

a. Hypothalamus et hypophyse

L'axe hypothalamo-hypophysaire (HHS) est composé de l'hypothalamus et de l'hypophyse qui elle-même se différencie en neurohypophyse et adénohypophyse. L'hypothalamus a pour rôle de coordonner l'activité de l'hypophyse *via* des messagers hormonaux tels que la vasopressine (AVP) et la corticolibérine (CRH) capable de stimuler la libération d'ACTH au niveau hypophysaire (Figure 3). L'hypophyse est responsable de la production de différentes hormones : l'hormone de croissance (GH), la prolactine (PRL), l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSH), l'hormone stimulant les follicules (FSH), l'hormone lutéinisante (LH) et

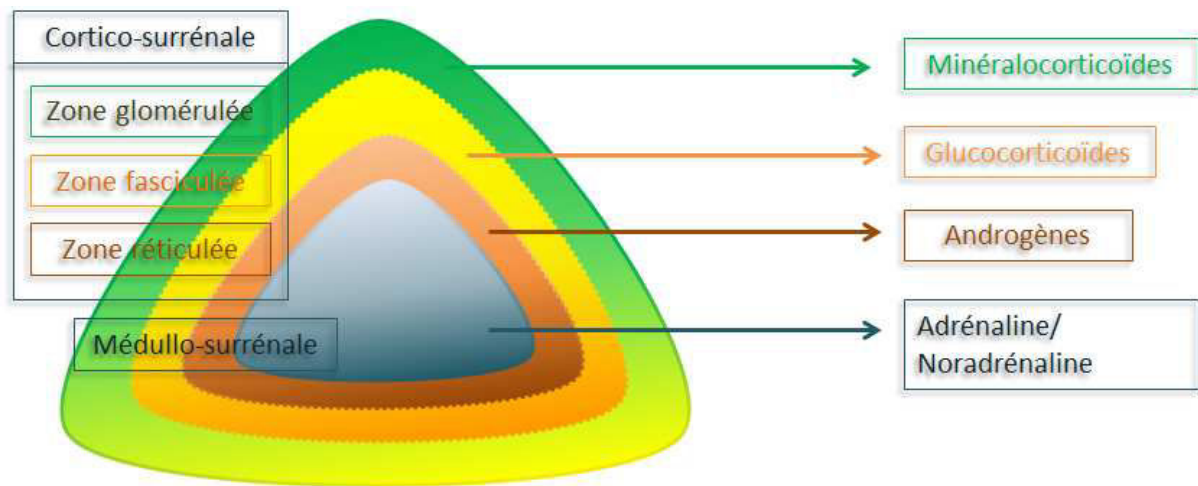


Figure 4 : Schéma de la production d'hormones par la glande corticosurrénale : le nom des différentes zones de la glande corticosurrénale est inscrit à gauche de la figure. Les différentes hormones produites par chacune de ces zones sont présentées à droite

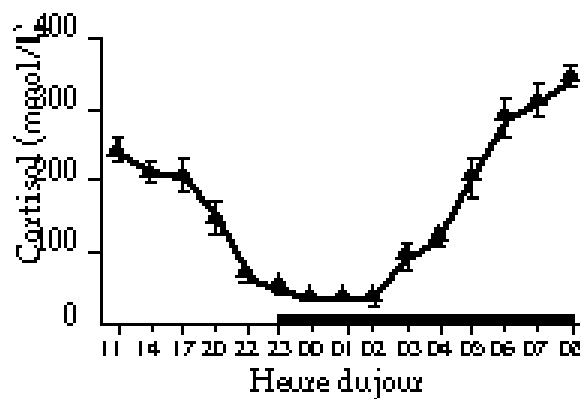


Figure 5 : Concentrations de cortisol plasmatique suivant le cycle circadien : le trait épais en abscisse correspond à la stabilisation puis synthèse de cortisol (Touitou *et al.* 1984)

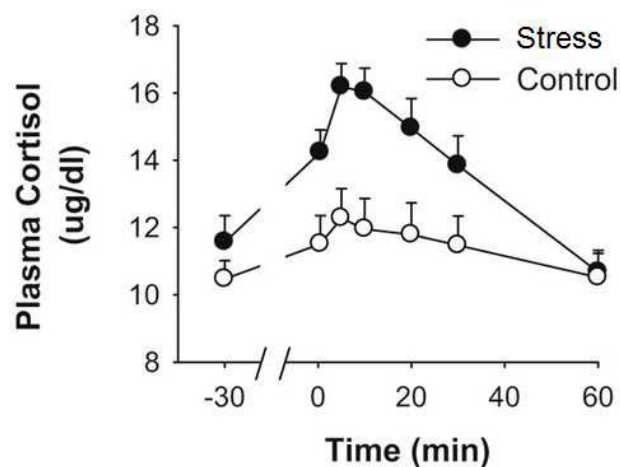


Figure 6 : Concentrations de cortisol plasmatique après un stress : les points noirs correspondent à la concentration plasmatique après stimulation du stress, les points blancs représentent la courbe contrôle sans stress (Childs *et de Wit* 2009)

les dérivés de la proopiomélanocortine, qui est la molécule précurseur de l'ACTH. L'ACTH est l'hormone stimulant la production de cortisol au niveau surrénalien (Figure 3).

b. Les glandes surrénales

i. Description des glandes surrénales

Les glandes surrénales se trouvent au-dessus des reins (Figure 3). Chaque glande se divise en deux parties fonctionnelles présentées en figure 4 : située au niveau de la partie interne, la médullo-surrénale (en bleue) synthétise les catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline (deux hormones ayant une action vaso-constrictive intense et permettant ainsi l'élévation de la tension artérielle) alors qu'en périphérie, la cortico-surrénale, composée de trois zones, synthétise trois familles de corticoïdes. Sur la figure 4, nous distinguons, de l'intérieur vers l'extérieur, la zone réticulée (en marron), la zone fasciculée (en orange) et la zone glomérulée (en vert), synthétisant respectivement les androgènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes.

ii. Fonction des hormones sécrétées par les glandes surrénales

L'aldostérone, régulée par le système rénine-angiotensine-aldostérone, possède une action minéralocorticoïde et régule le volume sanguin de l'organisme.

Le cortisol, régulé par l'ACTH, a quant à lui une action glucocorticoïde qui englobe les effets anti-inflammatoire, métabolisant et hyperglycémique. De manière normale, la quantité de cortisol produit suit le cycle circadien. La figure 5 représente la synthèse de cortisol basale chez un individu sain pendant 21 heures. Touitou et collaborateurs constatent que la concentration de cortisol varie dans la journée avec une diminution de 11 à 23 heures où la concentration est au plus bas jusqu'à 2 heures du matin puis une augmentation jusqu'à arriver à un pic maximal à 8 heures du matin (*Touitou et al. 1984*).

En période de stress, il y a activation de l'axe HHS qui se traduit par un pic de cortisol plasmatique (Figure 6). Dans le cas du choc septique, qui est une période de stress, seulement la moitié des patients répondent de manière adaptée en cortisol.

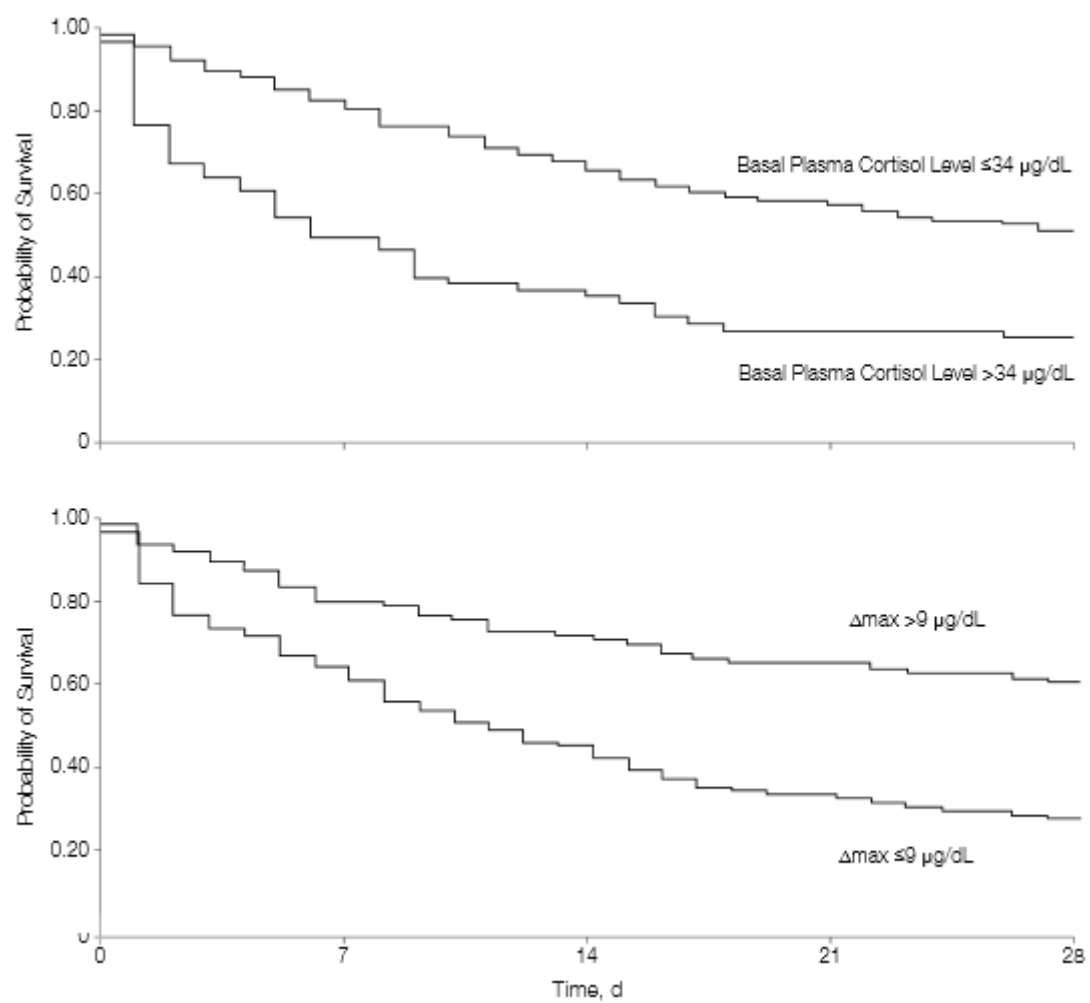


Figure 7 : Graphique des probabilités de survie des patients présentant une ISR (Annane D et al. 2000)

2. Cas de l'insuffisance surrénale relative

a. Diagnostic

i. Chez l'humain

Le choc septique s'associe dans la moitié des cas à une insuffisance surrénale relative (ISR). Cette insuffisance est appelée relative car la glande continue de produire du cortisol, mais de manière inadaptée.

Récemment, une étude clinique a montré qu'il existait deux populations dans le choc septique dont la probabilité de survie était différente (*Annane D et al. 2000*). En effet, le plasma des patients en choc septique a été prélevé et la concentration de cortisol dosée. Ceci a permis de constater que les patients ayant une cortisolémie basale augmentée et supérieure à 34 µg/dL, avaient une probabilité de survie inférieure aux patients dont la cortisolémie basale étaient inférieure ou égale à 34 µg/dL. Un test à la corticotropine a ensuite été réalisé. Ce test consiste à faire la différence entre le cortisol basal et le cortisol après stimulation par une injection d'ACTH, l'hormone activant la production de cortisol par la glande surrénale. Sur ce principe deux populations se distinguaient par leurs différentes probabilités de survie. En effet, la population qui n'avait pas répondu de manière adaptée en cortisol ($\Delta \leq 9$ µg/dL) avait une probabilité de survie inférieure à ceux dont la réponse en cortisol était supérieure à 9 µg/dL (Figure 7).

ii. Chez la souris

La corticostérone est l'hormone glucocorticoïde majoritaire chez la souris adulte (*Missaghian et al. 2009*). Ceci peut être expliqué par l'absence de la 17 alpha-hydroxylase dans les glandes surrénales de souris (*Touitou, Auzéby, et Bogdan 1990*). Il est cependant admis qu'au cours du développement, il existe une expression transitoire chez la souris de cette enzyme. A l'âge adulte, les glandes surrénales contiennent les hydroxylases nécessaires à la production de corticostérone et d'aldostérone mais pas de cortisol (trop peu d'ARNm P450c17) (*Keeney, Jenkins, et Waterman 1995*). Le mécanisme à l'origine de cette absence est une hyperméthylation du promoteur CYP17, responsable de la transcription des ARNm P450c17, il y a donc une régulation épigénétique de ce gène chez la souris (*Košir et al. 2012*).

Dans ce cas, une ISR est mise en évidence par une réponse inappropriée en corticostérone plasmatique après injection d'ACTH synthétique par rapport à un animal sain.

b. Traitement

Les premiers essais de traitement de l'insuffisance surrénale datent des années 1980, alors que le concept de sepsis et choc septique n'étaient pas encore tout à fait établis. Le traitement consistait en l'injection des fortes doses de corticoïdes pendant peu de temps sur une courte période.

Dans une étude de 1976, l'effet de la méthylprednisolone sodium succinate (de la famille des glucocorticoïdes synthétiques) à la concentration de 30 mg/kg ou de dexaméthasone (de la famille des glucocorticoïdes synthétiques) à la concentration de 3 mg/kg donné une ou deux fois par jour, réduisait la mortalité des patients traités de 38,4 % à 10,5 % (*Schumer 1976*). De même en 1984, les résultats montraient que les patients traités par ces deux mêmes molécules diminuaient les effets du choc des patients et augmentaient la probabilité de survie de 31 % à 60 % (*C L Sprung et al. 1984*).

En revanche, en 1987 une équipe publie des résultats montrant une étude en double aveugle concernant l'utilisation de forte dose de méthylprednisolone sodium succinate ou de placebo sur 223 patients atteints de sepsis systémique. Le glucocorticoïde ou le placebo était administré en un bolus de 30 mg/kg en 15 minutes puis par infusion de 5 mg/kg pendant 9 heures. Dans ce cas, la mortalité des patients à 14 jours était similaire avec 22 % pour le groupe sous placebo et 21 % pour le groupe sous glucocorticoïde (*The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group » 1987*).

Dans une autre étude de 1987, l'équipe reprend ce qui avait été fait en 1976 par Schumer, et utilise le méthylprednisolone sodium succinate à la concentration de 30 mg/kg ou un placebo. Ce traitement était donné à des patients souffrant de syndrome septique et administré par infusion de 20 minutes toutes les 6 heures dès la deuxième heure après pose du diagnostic de sepsis. Malgré la précocité du traitement, l'équipe ne montre aucun avantage du glucocorticoïde par rapport au développement de détresse respiratoire chez l'adulte et même contrairement à ce qui était attendu, une augmentation de la mortalité des patients ayant une détresse respiratoire (*Bone et al. 1987*).

En 1985, une étude sur des patients atteints de défaillance respiratoire, démontre que l'utilisation de méthylprednisolone à la concentration de 30 mg/kg toutes les 6 heures et pendant 48 heures ne permet pas l'évitement de complication d'infection, et n'empêche pas l'apparition de syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte. Les stéroïdes sont alors associés, au contraire, à l'expansion de l'infection pulmonaire (*Weigelt et al. 1985*).

Ainsi l'utilisation de fortes doses de corticoïdes a par la suite été abandonnée, notamment avec l'arrivée du concept d'insuffisance surrénale relative, en faveur d'un traitement par faibles doses.

En 1991, un premier article parle d'insuffisance surrénale relative. Dans cet article est décrit la réponse en cortisol suite à un test à la corticotropine de patients en choc septique ayant survécu ou non. Pratiquement toutes les cortisolémies sont augmentées, cependant les patients ayant survécu correspondaient aux cortisolémies les plus fortes après stimulation. Les auteurs parlent alors d'insuffisance surrénalienne relative et proposent l'utilisation de doses physiologiques en cortisol en remplacement des fortes doses de glucocorticoïdes qui étaient très critiquées (*Rothwell, Udwadia, et Lawler 1991*).

Suite à cet article, en 1994, Briegel et collaborateurs testent un traitement par faibles doses d'hydrocortisone dans le cas de SIRS. Leurs résultats montrent que ce traitement atténue la réponse inflammatoire systémique. Ils proposent donc d'étudier les faibles doses d'hydrocortisone par une étude clinique randomisée pour clarifier son impact réel sur les patients en choc septique (*Briegel et al. 1994*).

De même en 2000, Annane et collaborateurs font alors apparaître un gain de survie à 28 jours chez les patients traités par hydrocortisone à faible dosage (*Annane D et al. 2000*). L'administration d'hydrocortisone devient alors une pratique standard dans le cas des chocs septiques avec insuffisance surrénale relative avec une administration de 50 mg par voie intraveineuse (i.v.) toutes les 6 heures.

Une étude réalisée sur des patients avec lésions cérébrales traumatiques induisant une insuffisance en corticostéroïdes a montré que l'hydrocortisone à faible dose associée à la fludrocortisone semblait améliorer le pronostic des patients présentant une lésion cérébrale traumatique (*Asehnoune et al. 2014*).

Tableau 1 : Comparaison des 5 molécules nouvellement synthétisées par rapport à leur effet sur la glycogénèse hépatique

	Activité au test de glycogénèse (ref = cortisone acétate, activité =1)
9 α -Chloro-17 α -hydroxycorticosterone acétate	$\approx 4.0 \pm 0.6$
9 α -Chlorohydrocortisone acétate	3.5 ± 0.4
9 α -Bromo-17 α -hydroxycorticosterone acétate	0.28 ± 0.04
9 α -Bromohydrocortisone acétate	0.54 ± 0.08
9 α -Iodo-17 α -hydroxycorticosterone acétate	≈ 0.1

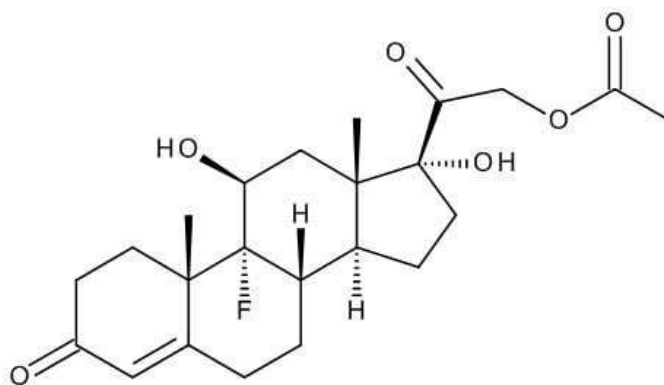


Figure 8 : Structure de la fluorohydroxycorticostérone acétate

G. La fludrocortisone

1. Description

a. Structure

C'est en 1953 que Fried et Sabo synthétisent les premiers dérivés halogénés de l'hydrocortisone dans le but d'améliorer les propriétés anti-inflammatoires des corticoïdes (*Fried et Sabo 1953*). Ils synthétisent donc 5 molécules, toutes dérivées de l'hydroxycorticostérone acétate, dont l'activité est mesurée par rapport à leur action sur la glycogénèse hépatique chez le rat (Tableau 1).

En 1954, à la suite de cette étude, l'hypothèse posée était que plus l'halogène ajouté est petit en termes d'encombrement stérique, plus l'activité est élevée. Fried et Sabo font donc cette fois la synthèse du dérivé de l'hydrocortisone acétate possédant en position 9 α le plus petit des halogènes : le fluor. Ils obtiennent la molécule suivante : 9 α -Fluoro-17 α -hydroxycorticostérone acétate, présentée en figure 8. Cette molécule montre une activité environ 10 fois supérieure à celle de la cortisone acétate (*Fried et Sabo 1954*).

Cette même année, Boland et Headley s'intéressent à l'activité glucocorticoïde de cette molécule et espèrent obtenir une activité anti-inflammatoire supérieure à l'hydrocortisone qui pourrait être utilisée dans le cas des arthrites rhumatoïdes (*Boland et Headley 1954*). Dans cette étude, cette molécule est administrée par voie orale à 13 patients, à des concentrations différentes et à différents intervalles de temps. Ils se rendent compte que cette molécule possède effectivement les propriétés glucocorticoïdes de sa molécule mère mais des effets indésirables importants apparaissent tels que la rétention d'eau provoquant œdèmes, prise de poids et hypertension. Cette molécule possède donc des propriétés minéralocorticoïdes que ne possède pas l'hydrocortisone à la même concentration. Le but est atteint, mais les effets indésirables sont trop importants pour l'utiliser en remplacement de l'hydrocortisone.

En 1955, West étudie alors les propriétés nouvellement découvertes du 9 α -Fluoro-hydroxycorticostérone acétate sur la fonction surrénale chez une patiente atteinte d'arthrite rhumatoïde. Il conclut alors que l'atome de fluor renforce le pouvoir bloquant de l'hydrocortisone sur l'inhibition de l'ACTH. La même année, Goldfien et collaborateurs comparèrent les effets glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes de la Fluorohydrocortisone et de la Chlorohydrocortisone et conclurent que la Fluorohydrocortisone a le meilleur potentiel thérapeutique (*Goldfien et al. 1955*). Thorn et collaborateurs la comparent également à

l'aldostérone, un minéralocorticoïde endogène, dans une étude publiée dans *Annals of the New York Academy of Sciences* (Thorn et al. 1955). Cope et Harrison la testent pour la première fois dans le syndrome de Cushing avec succès (Cope et Harrison 1955). Enfin, Garrod et collaborateurs utilisent pour la première fois la 9 alpha-fluorohydrocortisone associée à la cortisone dans le cas d'une patiente ayant subi une ablation des glandes surrénales suite à un cancer. Les concentrations données étaient de 0,5 mg de fluorohydrocortisone et de 50 mg de cortisone par jour (Garrod et al. 1955). Le nom de fluorohydrocortisone sera progressivement remplacé par fludrocortisone. Ce n'est que bien plus tard, en 2002 que cette molécule sera testée dans le cas des chocs septiques (Annane D et al. 2002). C'est dans ce contexte que toutes les expérimentations de ma thèse ont été réalisées.

b. Pharmacologie

La fludrocortisone est un minéralocorticoïde synthétique. Sa structure est semblable au cortisol avec, sur le carbone 9, un atome de fluor. Ceci lui permet une fixation sur le récepteur minéralocorticoïde de forte affinité ce qui lui confère un fort effet minéralocorticoïde. La fludrocortisone se fixe sur le récepteur de l'aldostérone, un minéralocorticoïde endogène, et possède donc les mêmes propriétés. Elle peut cependant se fixer sur le récepteur glucocorticoïde avec une faible affinité, et possède ainsi également un faible effet glucocorticoïde.

2. Activation – Mode d'action du récepteur minéralocorticoïde

a. Gène codant pour le récepteur minéralocorticoïde

Le gène du récepteur au minéralocorticoïde (MR) est localisé sur le chromosome 4 chez l'humain (Fan et al. 1989)(Morrison et al. 1990). Ce gène comprend environ 450 kb et est composé de 10 exons dont 8 codent pour une protéine (Morrison et al. 1990). L'expression de ce gène en ARN messager (ARNm) est contrôlée par deux promoteurs distincts P1 et P2 (Gomez-Sanchez et Gomez-Sanchez 2012)(Zennaro et al. 1995). Une fois ce gène transcrit, la protéine de 984 acides aminés possède la structure classique des récepteurs nucléaires comme présenté à la figure 9 : un grand domaine N-terminal (en bleu), un domaine en doigts de zinc



Figure 9 : Structure schématique du récepteur minéralocorticoïde, en bleu le domaine N-terminal, en vert le domaine de liaison à l'ADN, en blanc le domaine charnière et en violet le domaine de liaison au ligand

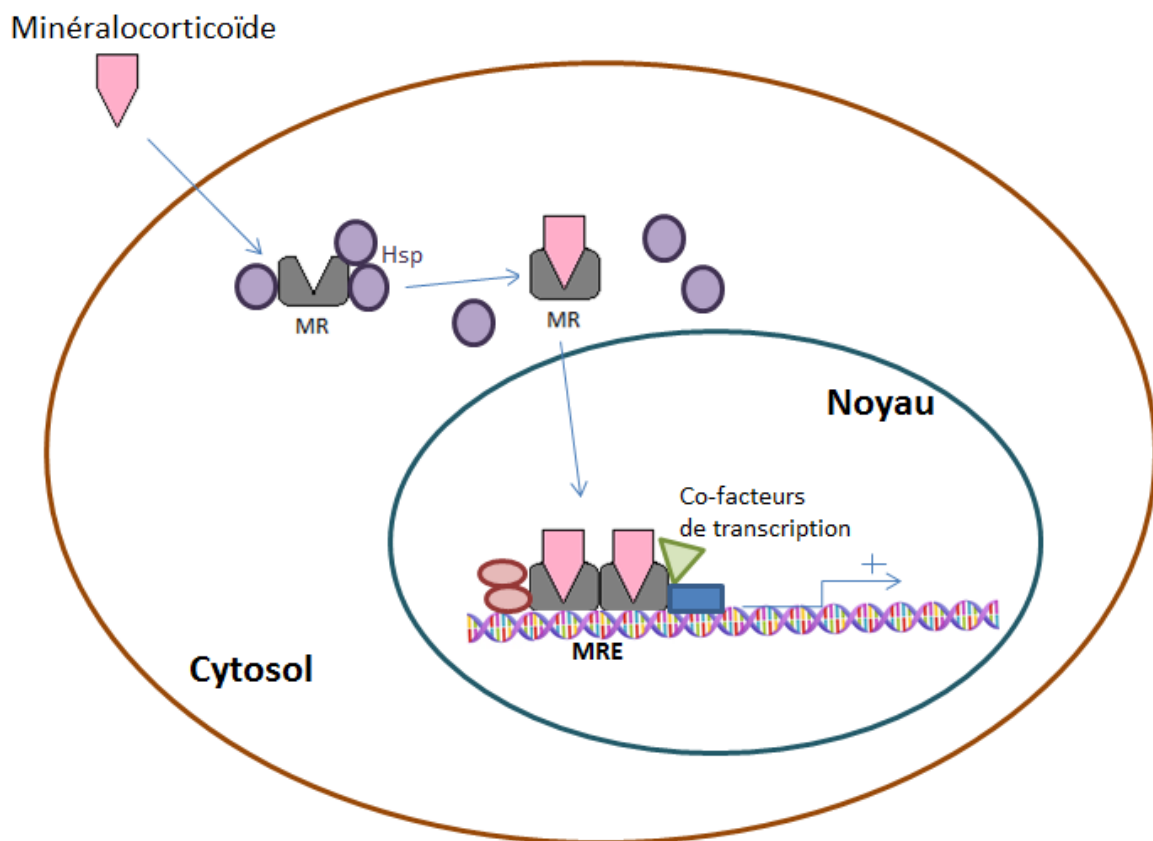


Figure 10 : Schéma du mécanisme d'activation du récepteur minéralocorticoïde ; en gris le récepteur minéralocorticoïde, en violet les protéines de choc thermique, en rose le ligand, en rouge, vert et bleu les co-facteurs de transcription.

classique de liaison à l'ADN (en vert), une région charnière (en blanc) et un domaine de liaison au ligand en C-terminal de la protéine (en violet) (*Mangelsdorf et al. 1995*).

Les récepteurs glucocorticoïde et minéralocorticoïde, dans leur forme inactive, sont cytosoliques (*Matulich et al. 1976*) comme présenté en figure 10. Quand le ligand est absent, le récepteur fait partie d'un complexe protéique contenant les protéines de choc thermique, comme les protéines HSP 70 et HSP 90 (en violet) (*Bergquist et al. 2013*). Ceci lui permet de conserver d'abord une conformation adéquate pour sa fixation du ligand et empêche son ubiquitinylation et donc son adressage au protéasome.

Lorsque le glucocorticoïde ou le minéralocorticoïde (en rose) se fixe, le récepteur se dissocie du complexe et transloque dans le noyau où il se dimérise pour se lier spécifiquement à des fragments d'ADN appelés GRE «*glucocorticoid response element*» ou MRE «*mineralocorticoid response element*». Une fois lié au GRE/MRE, il y a recrutement de co-facteurs transcriptionnels lançant la machinerie de transcription au niveau du gène cible (*De Bosscher, Vanden Berghe, et Haegeman 2000, Reichardt et al. 2001*). Il est également connu que les GR activés peuvent inhiber les facteurs de transcription pro-inflammatoire par interaction protéine-protéine, par exemple avec AP-1 ou NF- κ B (*Adcock et Caramori 2001, Webster et al. 2001*).

b. Fonction du récepteur minéralocorticoïde

Lorsque l'hormone, ou son analogue synthétique, se fixe sur le récepteur, le complexe devient facteur de transcription initialement connu pour son rôle de régulation du volume extracellulaire et pression sanguine par excrétion de Na/K au niveau de l'épithélium du néphron distal (*Farman et Bocchi 2000*). Les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes se fixent avec la même affinité sur les MR (*Jeffrey L. Arriza et al. 1988*)(*J L Arriza et al. 1987*). Etant donné la plus forte concentration de glucocorticoïdes dans le sang par rapport aux minéralocorticoïdes, un mécanisme existe afin que les glucocorticoïdes ne puissent pas se fixer de manière permanente sur les MR. En effet, l'enzyme 11 β -HSD 2 transforme les glucocorticoïdes (cortisol chez l'humain et corticostérone chez les rongeurs, représenté en violet sur la figure 11) en un métabolite de faible affinité pour le MR (en vert sur la figure 11) (*Pascual-Le Tallec et Lombès 2005*).

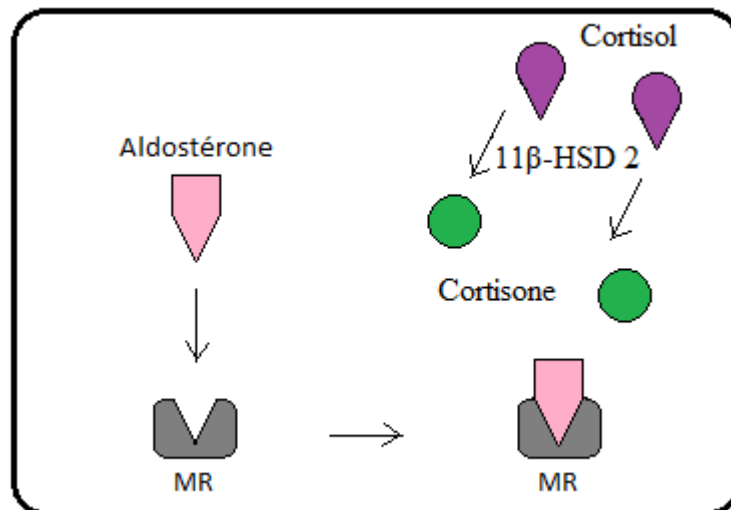


Fig 11 : Schéma du mécanisme de spécificité récepteur minéralocorticoïde-aldostérone *via* l'activité de la 11β-HSD 2 qui modifie le cortisol en métabolite de faible affinité pour le récepteur : la cortisone.

Un effet spécifique des minéralocorticoïdes est non seulement défini par leur présence mais également par l'activité de la 11 β -HSD 2, comme dans le néphron distal. En effet, la présence du complexe aldostérone-MR a été retrouvée dans les neurones, les adipocytes, les cardiomyocytes, dans les cellules vasculaires et dans la rétine (*Farman et Rafestin-Oblin 2001, Pascual-Le Tallec et Lombès 2005*). Une surexpression pathologique d'activation des MR induit par exemple des maladies cardiovasculaires, une mortalité par une insuffisance cardiaque et l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde (*Funder 2007*).

Le récepteur aux minéralocorticoïdes permet l'activation de plusieurs gènes mais principalement ceux impliqués dans la réabsorption de sodium au niveau du tube collecteur distal du rein. Pour cela, les gènes codants certaines sous-unités du canal épithélial et les gènes codants pour la pompe sodium-potassium sont activés. Grâce à ces deux mécanismes, il y a réabsorption de sodium de l'urine vers le plasma (*Viengchareun et al. 2007*). L'expression du canal épithélial est également régulée par la *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase*, qui est elle-même régulée par le couple récepteur minéralocorticoïde-ligand.

Au niveau des cellules endothéliales des gros vaisseaux, le MR active l'expression de gènes participant à la régulation de la pression artérielle. Le MR a également une action sur l'expression de gènes codants pour la production de collagène et d'élastine, et ce, même indépendamment de sa fixation à l'aldostérone, *via* l'activation du récepteur *Insulin-like growth factor 1* (IGF-I) (*Mitts et al. 2010*). Ce processus est valable dans la matrice extracellulaire et plus spécifiquement dans les fibroblastes cardiaques et rénaux (*Bunda et al. 2007, Dong Chen et al. 2013*).

Les MR possèdent également un effet anti-inflammatoire. En effet, dans un article de 2012, une étude a montré qu'après injection de lipopolysaccharide (LPS) dans les yeux de rats, il y avait une augmentation significative de l'inflammation chez les rats traités par spironolactone, un antagoniste des MR (*Pitt et al. 1999, Pitt et al. 2003*).

3. Utilisation de la fludrocortisone

a. Pratiques usuelles

La fludrocortisone est commercialisée en comprimé de fludrocortisone acétate. Mais cette molécule n'est pas retrouvée dans le sang, seule la fludrocortisone est circulante. Elle est administrée sous forme de comprimés de 50 μ g de fludrocortisone acétate journalier, *via* une sonde naso-gastrique ou avec un verre d'eau selon l'état du patient. L'utilisation de la sonde naso-gastrique est expliquée par le fait que les patients en choc septique sont intubés et

ventilés dans la plupart des cas et présentent un état de coma. La fludrocortisone est utilisée dans de nombreux cas tels que hyperaldostéronisme primaire, et les cas d'insuffisance surrénalienne totale ou relative. Lors de traitement des chocs, elle est couplée au cortisol, qui lui possède un fort effet glucocorticoïde. Elle est utilisée en premier lieu pour des maladies pour lesquelles il y a insuffisance surrénalienne chronique telles que la maladie d'Addison ou l'hyperplasie surrénale congénitale (*Padidela et Hindmarsh 2010*) mais également dans le traitement du choc septique (*Annane 2005*) où elle semble diminuer la mortalité.

b. Controverse

Dans une étude en 2002, Annane et collaborateurs montrèrent les effets d'un traitement substitutif en glucocorticoïde (cortisol) et en minéralocorticoïde (fludrocortisone), à faibles doses, dans le choc septique (*Annane D et al. 2002*). Cette étude décrivait les patients présentant l'insuffisance surrénale relative décrite deux ans plus tôt (*Annane D et al. 2000*) après prise ou non de ce traitement substitutif. Une fois encore les patients se divisent en deux populations : les répondeurs et les non-répondeurs au traitement. Les répondeurs retrouvaient alors une probabilité de survie égale à la population sans insuffisance surrénale relative contrairement aux non-répondeurs. Cette étude a permis de mettre en évidence que le traitement ne semblait pas être absorbé par tous les patients de la même manière. Il paraît donc évident que le traitement corticoïde à faibles doses a un effet bénéfique sur les patients en choc septique. En 2012, une étude est publiée démontrant un effet glucocorticoïde et minéralocorticoïde du traitement par hydrocortisone et fludrocortisone se caractérisant par une augmentation du glucose plasmatique et du cholestérol, une diminution de la natrémie et du sodium urinaire, ainsi qu'une amélioration de la fonction rénale, particulièrement chez les patients dits non-répondeurs au test à la corticotropine (Bruno Laviolle et al. 2012).

Cependant, certaines études remettent en question les bienfaits de la fludrocortisone en raison de son mode d'administration, à savoir en comprimés administrés par la sonde naso-gastrique des patients.

Dans un article de 2007, Raurich et collaborateurs, publient leurs travaux sur les faibles doses de stéroïdes dans le choc septique, qui n'affecteraient aucunement la réponse hémodynamique et n'amélioreraient pas non plus le taux de survie des patients. Dans cet article, les auteurs disent avoir suivi le protocole précédemment évoqué : une injection intraveineuse de 50 mg d'hydrocortisone toutes les 6 heures et un comprimé de fludrocortisone par jour donné par

sonde naso-gastrique ou avec un verre d'eau. Pourtant, les résultats de cette équipe ne montrent aucune amélioration des patients présentant un choc, ni de survie des patients traités par des doses faibles de stéroïdes comparés aux patients sans traitement stéroïde (*Raurich et al. 2007b*).

Un second article, publié en 2008, avance l'hypothèse que les bénéfices associés à l'utilisation de l'hydrocortisone dans le choc septique seraient expliqués par les effets des minéralocorticoïdes (*Druce, Thorpe, et Wilton 2008b*).

La capacité naturelle des corticostéroïdes à inverser un choc septique a été établi 60 ans plus tôt, bien avant la reconnaissance des effets glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes distinctement. En revanche, contrairement aux effets néfastes des glucocorticoïdes synthétiques avec peu ou pas d'action minéralocorticoïde, l'hydrocortisone augmente la résistance périphérique et l'amélioration des symptômes des patients en choc ainsi que leur survie. De plus, la fludrocortisone a la capacité d'augmenter la résistance périphérique ce qui suggère que les effets minéralocorticoïdes pourraient bien être la base de l'amélioration des résultats lorsque l'hydrocortisone est utilisée dans le choc septique. L'utilisation de fludrocortisone non seulement pour ses effets minéralocorticoïdes, plus puissant que ceux de l'hydrocortisone, mais aussi pour ses effets anti-inflammatoires, se traduit par une amélioration des résultats chez le patient.

Dans un article de 2003, Otte et collaborateurs montrèrent que la fludrocortisone avait le pouvoir d'inhiber l'axe HPA et la production de cortisol, d'ACTH et de 11-desoxycortisol (Otte et al. 2003a). Les récepteurs minéralocorticoïdes auraient donc un rôle important dans le rétrocontrôle négatif de l'axe, comme démontré dans l'article de Walker et collaborateurs en 2014 grâce à des patients dont les récepteurs minéralocorticoïdes sont haplo-insuffisants (*Walker et al. 2014*). Ces patients souffraient d'hypercortisolémie associée à des effets métaboliques nocifs incluant des taux très bas de HDL-cholestérol et d'adipocytes mais aucun effet sur le cœur et les vaisseaux. La fludrocortisone étant un agoniste des récepteurs minéralocorticoïdes, cette molécule pourrait reproduire de manière aiguë les effets de l'haplo-insuffisance des récepteurs minéralocorticoïdes.

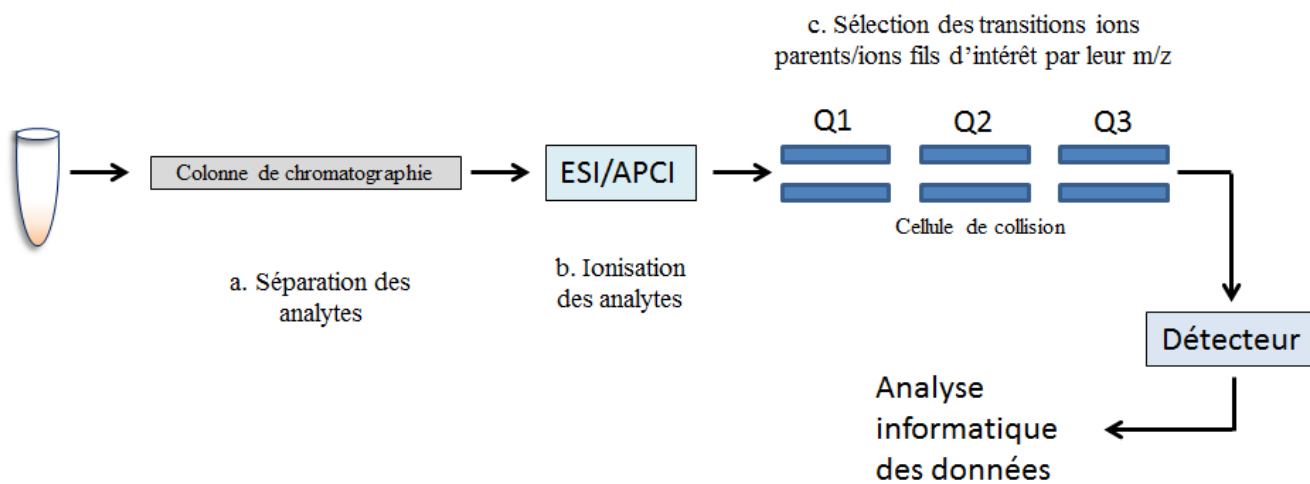


Figure 12 : Schéma du principe d'analyse par LC-MS/MS : l'échantillon subit 3 étapes pour l'analyse en spectrométrie de masse : a. la chromatographie, b. l'ionisation, c. identification par spectrométrie de masse

H. Méthode analytique

La méthode analytique permettant le dosage de la fludrocortisone se décompose en trois étapes : la chromatographie liquide qui permet la séparation des composés d'un mélange complexe, puis l'ionisation des molécules et enfin l'identification par spectrométrie de masse. (Figure 12)

1. Chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une technique de séparation de molécules dans un mélange complexe utilisant la différence d'affinité entre les molécules de la phase mobile et la phase stationnaire. Cette technique nécessite l'utilisation d'une colonne de chromatographie et d'une phase mobile constituée de tampon et d'un solvant organique selon un gradient isocratique (stable) ou croissant en solvant organique. Le choix du solvant se fait en fonction des interactions analytes d'intérêt-solvant. Selon la molécule, un solvant polaire sera plutôt utilisé comme l'eau, l'acétonitrile ou le méthanol, ou encore un mélange de solvants pour les molécules les plus hydrophobes. Les molécules ayant le plus d'affinité pour la phase mobile seront moins retenues par la phase stationnaire et auront un temps de rétention dans la colonne plus court. Cette technique de séparation des analytes est la plus utilisée dans le cas des dosages des hormones stéroïdiennes endogènes ou exogènes telle que la fludrocortisone.

2. Spectrométrie de masse

a. Ionisation des molécules

La spectrométrie de masse en tandem est une technique de détection extrêmement sensible qui permet l'identification de molécules grâce à l'étude de ses transitions ioniques. Les molécules sont séparées par chromatographie liquide puis sont ensuite ionisées. L'ionisation des molécules est nécessaire pour l'utilisation de la spectrométrie de masse car cette technique utilise des champs magnétiques pour leur identification. En effet, une molécule non chargée n'étant pas sensible aux potentiels, les molécules ne pourraient être ni sélectionnées ni expulsées des quadripôles.

L'ionisation des stéroïdes peut se faire de plusieurs façons possibles mais seules deux d'entre elles sont couramment utilisées : l'ionisation par *electrospray* (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

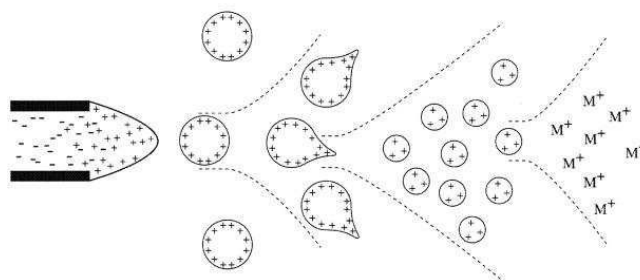


Figure 13 : Schéma du principe de l'ionisation par électrospray. (Ho et al. 2003)

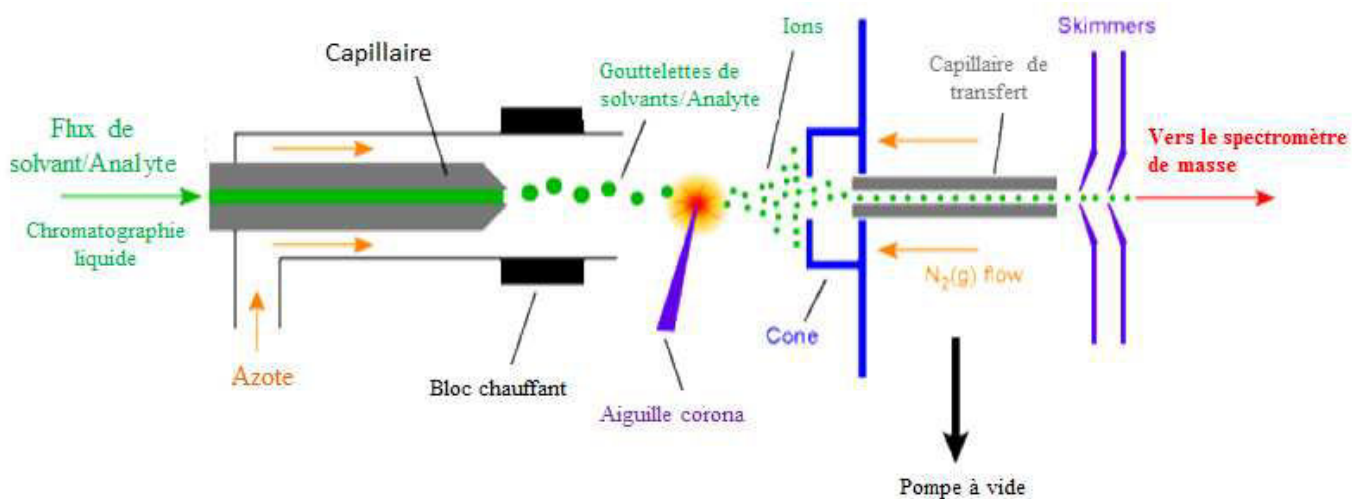


Figure 14 : Schéma de l'ionisation des molécules par APCI
(<http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>)

i. Ionisation par *electrospray*

Le principe de l'ESI repose sur la dispersion d'un brouillard de gouttelettes chargées puis élimination du solvant par évaporation afin de n'obtenir que des molécules fortement chargées (Figure 13). L'intensité du champ électrique au sein de la gouttelette chargée est telle que l'ion ne peut être éjecté avec le solvant (Ho et al, 2003). Un électrospray est produit en appliquant un fort champ électrique, à pression atmosphérique, à un liquide passant à travers un tube capillaire (75 μm) avec un faible débit (100 à 3000 nL/min).

Le champ électrique est obtenu en appliquant une différence de potentiel d'environ 3 à 6000 V entre ce capillaire et une contre-électrode. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, située à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette, combiné à l'évaporation progressive des solvants conduit à un point où les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des gouttelettes : les ions qui se trouvent à la surface de la gouttelette sont alors éjectés dans la phase gazeuse.

(« Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301 »)

ii. Ionisation chimique à pression atmosphérique

L'APCI est une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (Douglas et French 1981). Moins douce que l'ESI, elle peut conduire à la fragmentation des analytes car l'énergie apportée par l'aiguille corona entraîne un rapport d'énergie supérieur à celui observé en ESI. Cette source présente l'avantage de mieux ioniser les molécules peu polaires comme les lipides neutres tels que les stéroïdes, mais aussi d'être facilement couplée avec la chromatographie liquide du fait de la désolvatation des analytes qui en résulte. Contrairement à l'ESI, l'APCI conduit à la formation d'ions en phase gazeuse (voir Fig 14). Les solutés présents dans la phase mobile sont nébulisés à la sortie de la sonde APCI à l'aide d'un gaz (l'azote) chauffé à haute température (entre 300°C et 600°C). Une décharge est ensuite appliquée via une aiguille corona sur le soluté en phase gazeuse (Carroll et al. 1975). Il y a alors échange d'un électron avec l'azote conduisant à la formation d'analytes ionisés positivement ou négativement suivant les réactions suivantes (Colas 2006) :

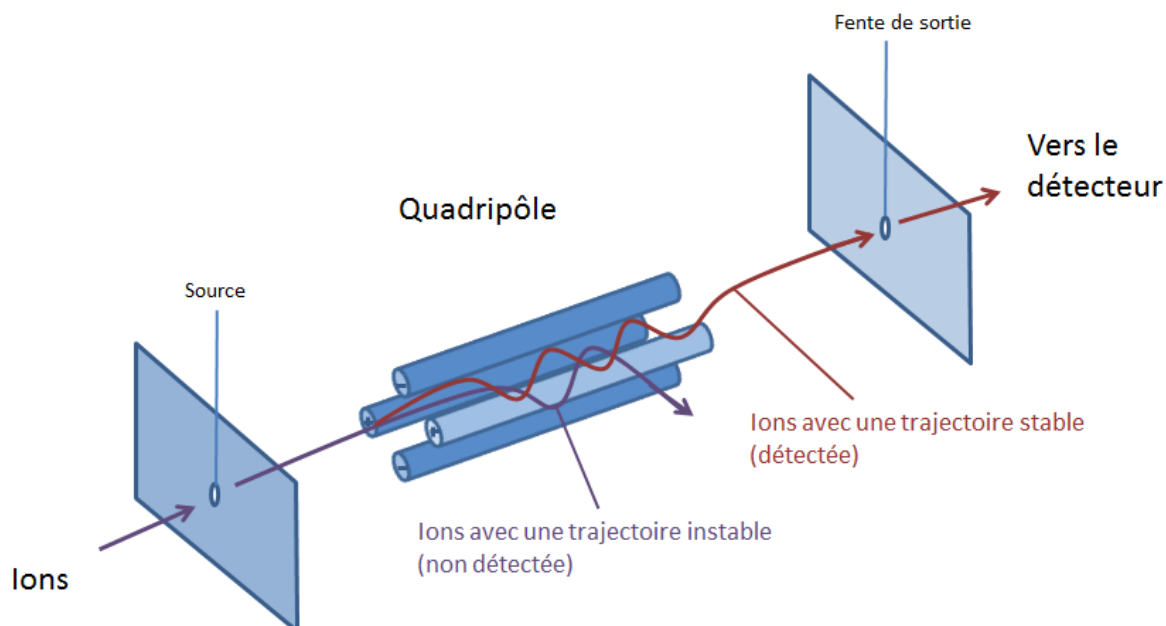


Figure 15 : Schéma montrant l'oscillation du champ électromagnétique d'un quadripôle

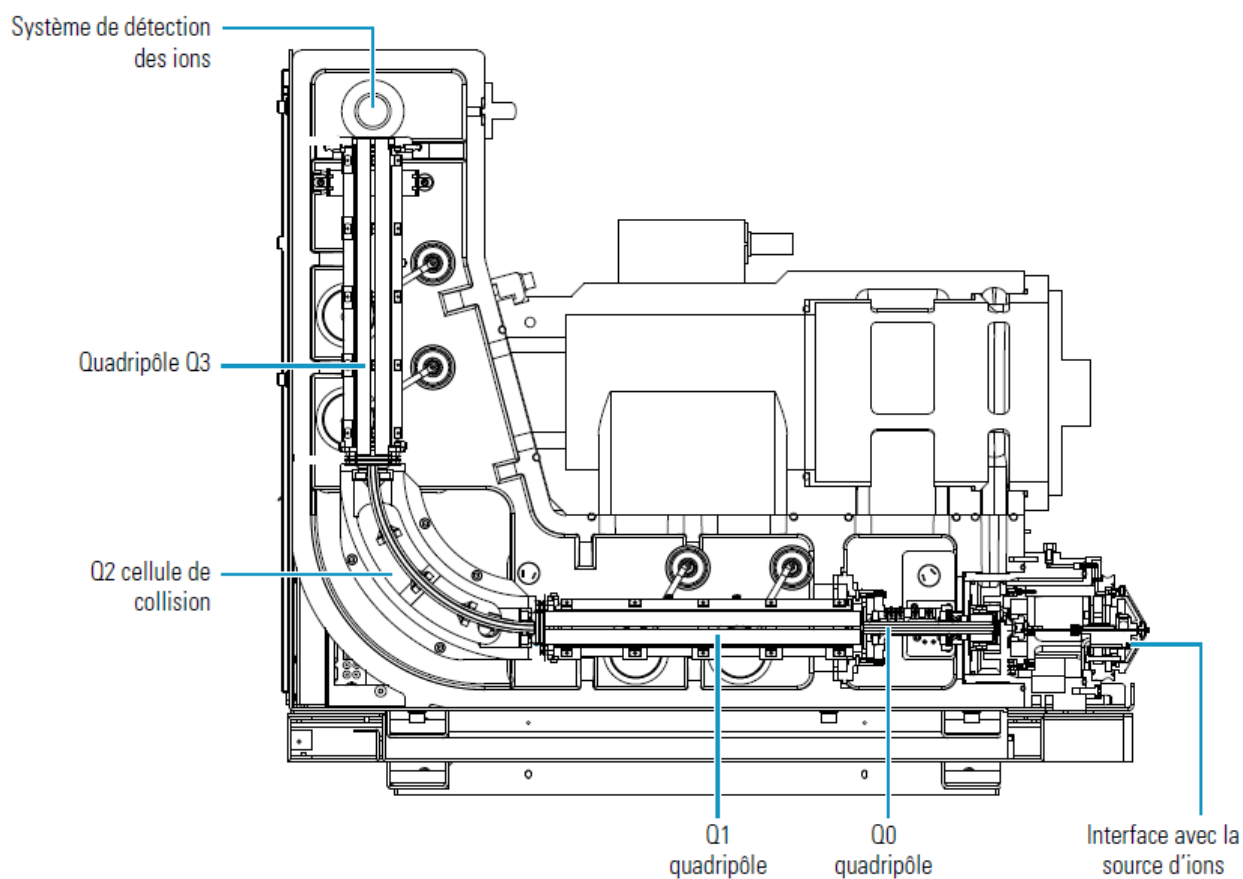
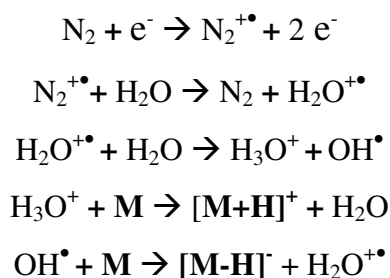


Figure 16 : Schéma représentant le fonctionnement d'un analyseur de masse triple quadripôles, avec Q1 le premier quadripôle, Q2 la cellule de collision, Q3 le deuxième quadripôle. Q0 est le focalisateur d'ions après l'interface avec la source (*Thermofinnigan.com*)



b. Identification des analytes

L'analyseur quadripôle est constitué de quatre barres métalliques cylindriques ou demi cylindriques, parallèles, disposées aux quatre angles d'un carré (Figure 15). Une tension ayant une composante continue et une composante alternative (radiofréquence) est appliquée ; les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels opposés et les électrodes opposées sont aux mêmes potentiels.

A l'intérieur du quadripôle, il se crée un champ électromagnétique. Pour une radiofréquence donnée, un ion oscillera entre les électrodes adjacentes de polarité opposée et suivra un parcours bien déterminé (en rouge sur la figure 15), les autres ions sortiront du champ (en violet). Il n'exerce aucune force longitudinale, de sorte qu'un ion poursuivra son trajet avec une vitesse constante. On fait varier, de manière linéaire, les tensions continues et alternatives appliquées aux électrodes en maintenant leur rapport constant. Cette variation permet de séparer les ions en fonction de leur masse et de leur charge. (*Hamon et coll.*)

La séparation des ions se fait selon le rapport m/z (m , étant la masse de l'ion parent et z , sa charge) en utilisant la stabilité de leurs trajectoires dans un champ électrique oscillant. Le système triple quadripôle consiste à sélectionner un ion selon son poids moléculaire protoné par un premier quadripôle (Q1), puis de le fragmenter dans une cellule de collision (Q2) par de l'argon, et enfin d'effectuer une deuxième sélection, par le second quadripôle (Q3), sur les fragments générés (Figure 16).

Ces transitions ion parent en ion fils sont propres à chaque molécule, ainsi que son temps de rétention dans la colonne de chromatographie. L'identification de chaque fragment d'analyte sur le système de détection du triple quadripôle, est donc basée sur ces trois éléments : le temps de rétention et deux transitions ions parents en ions fils (*de Hoffman et Stroobant*).

Tableau 2 : Récapitulatif des techniques publiées pour le dosage de la fludrocortisone. LDQ : Limite de Quantification ; Fludro : fludrocortisone, Fludro acétate : fludrocortisone acétate ; SPE : Extraction en phase solide ; ESI : Ionisation par electrospray, APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique, EI : Ionisation par impact d'électron

	Tang	Antignac	Amendola	Taylor	Shao	Chen
Date parution	2000	2000	2003	2004	2009	2011
Molécule d'intérêt	Fludro acétate	Fludro	Fludro	Fludro	Fludro acétate	Fludro acétate
Matrice	Urines	Urines	Urines	Urines Sérum Plasma	Tissus	Muscles
Extraction	Liquide/ Liquide	Liquide/ Liquide	SPE + Liquide/ Liquide + Dérivation	Précipitation + Liquide/ Liquide	Hydrolyse + SPE	Liquide/ Liquide Pressurisée
Chromatographie	Liquide	Liquide	Gazeuse	Liquide	Liquide	Liquide
Ionisation	APCI	ESI (-)	EI	ESI	ESI	ESI (-)
LDQ	Fludro acétate utilisée comme Etalon Interne	5 ng/mL	5 ng/mL	0,3 ng/mL	1 ng/g	0,5 ng/g

3. Méthodes de dosage de la fludrocortisone plasmatique

La première étape pour étudier la fludrocortisone est de mettre au point une technique de dosage de cette molécule. Plusieurs équipes ont mis au point des techniques de détection et de quantification résumées dans le Tableau 2. Les premiers articles ont été publiés en 2000 d'une part par Tang et collaborateurs, qui présentent une méthode de dosage de la fludrocortisone acétate dans les urines de singes rhésus par extraction liquide-liquide puis spectrométrie de masse en tandem (*Tang et al. 2000*). D'autre part, Antignac et collaborateurs, publient une méthode de quantification de la fludrocortisone dans les urines grâce à une extraction liquide-liquide puis spectrométrie de masse en tandem avec une limite inférieure de quantification à 5 ng/mL (*Antignac et al. 2000*). En 2003, Amendola et collaborateurs publient cette fois une méthode de dosage de la fludrocortisone dans les urines par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (*Amendola, Garribba, et Botrè 2003*). En 2004, Taylor et collaborateurs publient une méthode de dosage de la fludrocortisone dans les urines, le sérum et le plasma par chromatographie liquide puis spectrométrie de masse en tandem avec une limite de détection de 0,3 ng/mL (*Taylor, Grebe, et Singh 2004*). Cette méthode reste de loin la plus sensible publiée dans la littérature, cependant aucune application n'a ensuite été montrée. Puis, un article publié en 2009 par Shao *et al* montre une méthode de dosage de la fludrocortisone acétate dans les tissus avec une limite de quantification de 1 ng/mL (*Shao et al. 2009*). Enfin, en 2011, Chen *et al* publie une méthode de quantification de la fludrocortisone acétate dans les muscles par spectrométrie de masse en tandem (Dongmei Chen et al. 2011a).

Deux méthodes permettent de quantifier la fludrocortisone acétate, qui est la forme administrée, et seules trois méthodes permettent le dosage de la fludrocortisone qui est la molécule circulante et retrouvée dans le sang.

PROJET DE THESE

Le choc septique est défini par une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat en présence d'une réponse inflammatoire systémique suite à une infection (*Dellinger, et al 2008*). Il est responsable de 10 % des admissions en réanimation et son incidence croît chaque année dans les pays industrialisés. A ce jour, et malgré des progrès thérapeutiques constants, la mortalité liée au sepsis varie entre 30 % et 60 % dans les cas de choc septique (*Brun-Buisson C et al. 1995*).

Parmi les différents facteurs impliqués dans la survenue du choc septique, l'altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est associée à un mauvais pronostic et l'introduction d'une opothérapie substitutive s'est montrée efficace dans l'amélioration de la survie (*Annane D et al. 2002*). Au sein de cet axe, la glande surrénale joue vraisemblablement un rôle fondamental. En effet, l'incidence de l'insuffisance surrénale est d'environ 50% au cours du choc septique et se manifeste par une cortisolémie (basale et/ou stimulée par ACTH), non adaptée à l'intensité du stress (*Annane D et al. 2000*).

Les patients sont alors traités avec de l'hydrocortisone et de la fludrocortisone, mais ce traitement est encore très controversé. En effet, la littérature est abondante sur les études de l'effet du cortisol associé ou non à la fludrocortisone, montrant des résultats discordants.

Si les premières recherches portant sur les effets des corticoïdes au cours du choc septique datent du début des années 50, les contradictions et la difficulté de déterminer des cibles thérapeutiques expliquent que cette question reste encore aujourd'hui controversée.

La détection et quantification de la fludrocortisone sont nécessaires pour étudier la cinétique de cette molécule dans le plasma. En effet, il est pour le moment inexplicable que certains patients (60 %) souffrent d'une insuffisance surrénalienne ou encore que certains de ces mêmes patients répondent au traitement à la fludrocortisone et les autres non. Deux hypothèses sont avancées : cette réponse à la fludrocortisone ne vient-elle pas d'une différence d'absorption du composé par l'estomac ? La dose est-elle suffisante ?

Mon travail de thèse a donc pour objectif d'établir les caractéristiques des relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de la fludrocortisone dans le choc septique, répondant ainsi à la question d'une utilité de cette molécule dans le traitement de l'insuffisance surrénale relative et donc du bénéfice sur la survie des patients.

Pour obtenir ces données, la première étape était de mettre au point et de valider une méthode de dosage de la fludrocortisone dans le sang. Grâce à cette méthode par spectrométrie de masse en tandem très sensible, des cinétiques pourront être réalisées d'abord chez les volontaires sains, ceci permettra pour la première fois d'établir une étude pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone donnée à une faible dose (50 µg). Puis, chez les patients de réanimation, les données cliniques obtenues permettront d'avoir pour la première fois une étude pharmacodynamique de ce composé en relation avec leurs concentrations plasmatiques de fludrocortisone.

De plus, afin d'étudier la fludrocortisone dans son contexte d'administration, c'est-à-dire dans le choc septique en phase tardive d'inflammation, deux modèles murins de sepsis ont été utilisés. Un modèle de souris DL 100 qui reçoit une injection de LPS par voie intrapéritonéale induisant ainsi des phénomènes physiopathologiques analogues au sepsis chez l'humain (*Agelaki et al. 2002*). Un autre modèle a été utilisé où les souris sont ligaturées au niveau du cæcum puis perforées afin que du contenu intestinal se déverse en continu dans la cavité péritonéale, le modèle CLP (*Medina 2010*). Ce modèle se rapproche du choc septique humain par l'existence d'un foyer infectieux. Le rôle de ces modèles est de faciliter l'étude de la fludrocortisone dans son contexte d'administration en réanimation. Différents éléments ont été étudiés tels que la pharmacocinétique de cette molécule et sa distribution chez la souris.

PRESENTATION DES RESULTATS

A. Publication numéro 1

Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration

Mégane Ribot, Andrea Polito, Stanislas Grassin-Delyle, Djillali Annane, Jean-Claude Alvarez

Clinica Chimica Acta 420 (2013) 109–113

Introduction

Suite aux travaux du Pr Annane de 2002, démontrant une amélioration de la survie des patients après la prise d'hydrocortisone et de fludrocortisone à faible dosage, aucune étude n'a démontré de corrélation entre la concentration de la fludrocortisone plasmatique et son potentiel rôle dans la survie des patients (*Annane D et al. 2002*). Ceci laisse supposer d'une part, que malgré le faible dosage, la fludrocortisone joue un rôle dans la survie des patients et qu'elle est donc présente dans la circulation sanguine, d'autre part que les méthodes de quantification de la fludrocortisone n'étaient pas adaptées à ce dosage.

Afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone, il était nécessaire de la quantifier dans le plasma de manière sûre et reproductible avec une grande sensibilité. En effet, le comprimé de fludrocortisone acétate donné au patient est de 50 µg, ce qui est une dose faible. De plus, l'absorption gastrique des patients en choc septique est perturbée. L'hypothèse est donc que la fludrocortisone est très peu absorbée et la concentration de cette molécule dans le sang sera faible. Nous nous sommes donc inspirés des méthodes de dosages en spectrométrie de masse déjà publiées afin de mettre au point une technique assez sensible pour détecter et quantifier la fludrocortisone plasmatique.

Dans un premier temps, nous avons optimisé l'extraction et l'ionisation de cette molécule et de son étalon interne, la fludrocortisone-D2. Puis nous avons validé cette technique de dosage. Enfin, nous avons pu la mettre en pratique en détectant et quantifiant la molécule d'intérêt chez un patient de réanimation ayant reçu le comprimé de fludrocortisone acétate.



Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration

Mégane Ribot^a, Andrea Polito^b, Stanislas Grassin-Delyle^a, Djillali Annane^b, Jean-Claude Alvarez^{a,*}

^a Laboratoire de Pharmacologie–Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches et Université Versailles Saint-Quentin, France

^b Service de réanimation, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches et Université Versailles Saint-Quentin, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2012

Accepted 19 November 2012

Available online 7 December 2012

Keywords:

Fludrocortisone

Plasma

LC–MS/MS

Pharmacokinetic

Septic shock

ABSTRACT

Background: Fludrocortisone acetate is given at very low dosage (50 µg) to patients suffering from septic shock with controversial clinical results. However, it is not clear if absorption is effective in these patients. **Methods:** An analytical method based upon liquid chromatography coupled to triple quadrupole spectrometry detection with atmospheric pressure chemical ionization interface has been developed for the identification and quantification of fludrocortisone, the active molecule circulating in human plasma. A solid phase extraction of plasma was used after addition of fludrocortisone-D2 as internal standard. Compounds were separated on a C₁₈ column with a gradient of methanol–formate buffer. The ion transitions used to monitor analytes were m/z 381 → 239 and m/z 381 → 181 for fludrocortisone and m/z 383 → 239 and m/z 383 → 181 for fludrocortisone-D2. **Results:** Retention times were 4.0 min for both compounds. Calibration curves were linear for fludrocortisone in the 0.1–25 ng/ml range. The limits of detection and quantification were 0.05 ng/ml and 0.1 ng/ml, respectively. The intra- and inter-assay precisions were lower than 10.9% and the recovery was 101.8%. A slight matrix effect by about 10% was observed. Application of the method to a patient in septic shock treated with one 50-µg dose of fludrocortisone acetate has shown a maximal plasma concentration of 0.36 ng/ml obtained after 2 h. **Conclusion:** This method allows fludrocortisone pharmacokinetic/pharmacodynamic studies when given at low dosage in an intensive care unit in case of adrenal insufficiency during a septic shock.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fludrocortisone acetate is a synthetic mineralocorticoid from cortisone (Fig. 1), given to patients with chronic adrenal insufficiency like in congenital adrenal hyperplasia [1] or Addison disease [2]. Also, it has been successfully used in transient adrenal insufficiency like in septic shock [3]. Fludrocortisone acetate is hydrolyzed in human to fludrocortisone, the active molecule. Fludrocortisone (FD) is an aldosterone analog, which binds to its receptor, and leads to mineral corticoid action, like increased water and sodium retention and potassium elimination by kidneys. Some clinical studies have investigated the effect of FD acetate in septic shock, with controversial results [4,5]. One of these studies has clearly shown that fludrocortisone associated with hydrocortisone could decrease mortality in septic shock in many patients [4]. But these results were not statistically confirmed in a second study [5]. Indeed, FD acetate is not available in intravenous form, and is administered on tablet in a nasogastric tube of a septic patient. An

abnormal vascularization and a poor absorption from the stomach in the case of septic shock could explain the controversial results from the different studies. So, it was necessary to develop a quantitative measurement of FD in plasma of treated patients with low dosage to determine whether all the patients correctly absorbed FD. Different methods have been described for the analysis of glucocorticoids [6–12] with 3 including FD [6–8] but none allow sufficient limit of quantification, and have been followed by a clinical application. Moreover 2 of the 3 methods measure FD acetate and not the active form, while the FD acetate form is not found in blood [6,7]. The aim of the present study was to develop a method sensitive enough in order to measure plasma concentration after administration of an oral 50 µg-dose of FD.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Oasis® HLB 3 cm³ extraction cartridges were from Waters (Montigny, France). FD (FD) base was from Sigma Aldrich (St Quentin, France). Fludrocortisone-D2 (FD2), the internal standard solution was from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Hypersil Gold PFP column was from Thermo Scientific (Les Ulis, France). Methanol was from Prolabo

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie–Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104, Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches, France. Tel.: +33 1 47 10 79 38; fax: +33 1 47 10 79 23.

E-mail address: jean-claude.alvarez@rhc.aphp.fr (J.-C. Alvarez).

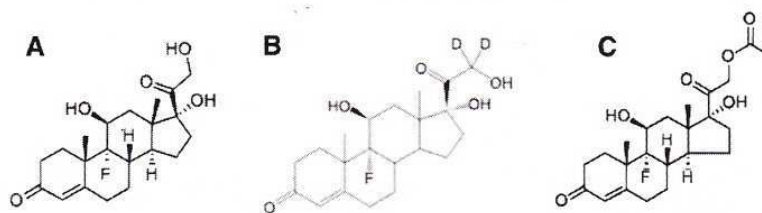


Fig. 1. Chemical structures of fludrocortisone (A), fludrocortisone-D2 (B) and fludrocortisone acetate (C).

(Fontenay sous bois, France). Formate buffer was prepared using ammonium formate and formic acid solution from Sigma. Ultra-pure water (18 M Ω) was obtained by ultrafiltration using a Direct-Q UV3 apparatus (Millipore Corp., Molsheim, France).

2.2. Working solutions, calibration standard, and quality controls

Stock solution of FD (1 g/l), and Internal Standard (IS) (100 mg/l) were prepared in methanol. Working solutions of FD for calibration standards (CS) were prepared at 4 concentrations (10, 1, 0.1 and 0.01 mg/l) by dilution of the stock solution in methanol. Working solution of fludrocortisone for quality control (QC) preparation was also prepared at the same concentrations by dilution in methanol of another 1 g/l stock solution prepared separately. Working solution of IS (0.1 mg/l) was obtained by dilution of stock solution in methanol. Calibration curves were prepared by spiking with appropriate volumes of the previously mentioned working solutions in blank plasma to produce the CS equivalent to 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 ng/ml. QC samples were also prepared in blank plasma at concentrations of 0.1, 0.3, 10.0 and 20.0 ng/ml. Blank human plasma samples were obtained from Etablissement Français du Sang (Le Chesnay, France). QCs samples were stored at -20°C .

2.3. Blood sample preparation

Exactly 1 ml of plasma was diluted in 2 ml of water, 50 μl of FD2 solution (FD2 at 0.1 mg/l) was added, and the entire solution was passed through Oasis $^{\text{®}}$ HLB 3 cm 3 extraction cartridges, previously conditioned with 3 ml of methanol and 3 ml of water. After washing with 3 ml of water with 50% of methanol and dried during 5 min, FD and its IS were eluted by 3 ml of dichloromethane. The eluent was evaporated to dryness under air. The residues were reconstituted in 50 μl of starting mobile phase and 20 μl was injected into the liquid chromatography (LC) system connected to the mass spectrometer.

2.4. Chromatographic and mass spectrometer conditions

Separation was performed in 1.9 μm , 100 mm $\times$ 2.1 mm LC Hypersil Gold PFP column. The mobile phase was: [A] 50% ammonium formate 2 mmol/l-formic acid 0.1% buffer and [B] 50% methanol and increased to 100% of [B] in 5 min. Analysis was performed on a mass spectrometer TSQ $^{\text{TM}}$ Vantage equipped with atmospheric pressure chemical ionization in positive mode. The method used was as follows: capillary temperature 300°C , vaporization temperature 100°C , gas pressure 30 bars. The ion transitions used to monitor the analytes were given in Table 1. The ThermoFisher Xcalibur software was used for system control. The LC Quan software was used for data acquisition and quantification. The protonated precursor molecular ions [MH^+] of FD (m/z 381.3) and IS (m/z 383.3) were fragmented by argon with collision energy of 29 V for both compounds. FD was identified by the presence of 2 ion transitions m/z 381.3 $\rightarrow$ 181.2 and m/z 381.3 $\rightarrow$ 239.3 (Table 1).

2.5. Validation of the method

2.5.1. Selectivity

To investigate whether endogenous matrix constituents interfered with the assay, drug-free matrix blank samples and zero samples were analyzed according to the described procedure. Assay selectivity was defined by evidence of non-interference at retention times and ion channels identical to that of FD and its IS in the blank samples.

2.5.2. Linearity

Calibration curves included a blank sample, a 0 sample, and 7 calibration standards over the following range: 0.1 ng/ml (lower limit of quantification (LLOQ)) to 25 ng/ml (upper limit of quantification (ULOQ)). Five calibration curves obtained over a period of two weeks were taken into account for linearity. Calibration curve was constructed by plotting the peak area ratio of FD to the internal standard (y) vs concentration (x). The acceptance criterion for each back-calculated concentration of calibration standards was set at 15% deviation. Concentration of analyte in the unknown samples was calculated from their peak area ratios and the calibration curve.

2.5.3. Lower limit of detection (LLOD) and quantification (LLOQ)

The LLOD is the lowest concentration of the compound that can be detected with a signal-to-noise ratio $>3:1$ for the 2 transitions. The LLOQ was defined as the lowest concentration with accuracy between 80% and 120% and a precision with a coefficient of variation (CV) of $\leq 20\%$ that was obtained over 6 measurements.

2.5.4. Accuracy and precision

The precision and accuracy of the developed method were determined by analysis of QC samples at 4 concentrations (0.1, 0.3, 10 and 20 ng/ml). This was carried out over 3 days. Each day, a calibration curve and 5 determinations of each QC level were analyzed. The values obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA), which separated the intra-day, and inter-day SDs and consequently the corresponding CV. The intra-day CV took into account the variability of the 5 replicates each day for 3 days and inter-day CV the variability of the days of analysis. The accuracy was determined by comparing the mean calculated concentration with the spiked target concentration of the QC samples. Accuracy within the range of 85–115% of the nominal values and a precision with a CV of $\pm 15\%$ were required, except for the LLOQ for which a range of 80–120% and a CV of $\pm 20\%$ were accepted for accuracy and precision, respectively.

Table 1
Chromatographic and spectrometric conditions of fludrocortisone and fludrocortisone-D2.

	Parent m/z	Daughter m/z	Collision energy (V)	Retention time (min)
Fludrocortisone	381.3	181.2 239.3	29 29	4.0
Fludrocortisone-D2	383.3	181.2 239.3	29 29	4.0

2.5.5. Recovery and matrix effect

Three procedures (A, B, and C) were performed on pooled blank serum at the concentrations of 10 ng/ml in order to evaluate matrix effect and method recovery: (A) FD and the IS were spiked in the mobile phase and directly injected; (B) FD and the IS were spiked afterwards in the blank matrix samples after the extraction step and injected; (C) FD and the IS were spiked in serum samples, the complete sample preparation procedure was carried through, and the samples were injected into the system. The mean chromatographic peaks obtained using the 3 procedures were compared. The ratio B/A, and C/B determined the matrix effect and the method recovery, respectively, and were calculated for both FD ($n=5$ for each concentration) and IS ($n=5$). Overall method recovery of the IS had to be $\pm 15\%$ of FD recovery.

2.5.6. Analyte plasma stability

Four plasma QC samples (0.1, 0.3, 10, 20 ng/ml) were analyzed in triplicate after 3 freeze and thaw cycles by complete thawing at room temperature and freezing at -20°C for 12–24 h. The short-term stabilities of FD plasma samples were also determined during storage for 24 h at room temperature (20°C), at 4°C and at -20°C . Long-term storage stability at -20°C was determined after 40 days. Subsequently, the FD concentrations were measured and compared with freshly prepared

samples. Analytes were considered stable in plasma at each concentration when the concentration differences between the freshly prepared and the stability testing samples were found to be not exceeding 15%. Stability of processed samples was assessed by re-injection of the 3 plasma QC levels ($n=5$) after conservation for 24 h in the autosampler (at 4°C) and comparison with the previously obtained values.

2.5.7. Application with a treated septic shock patient

A part of a clinical trial, a patient with septic shock was given 50 μg of FD on tablet, and plasma samples were collected before FD administration, then every 30 min from T0 to 6 h (T6), and every 1 h from T6 to T12. The samples were frozen and analyzed using the developed method.

3. Results

3.1. Method validation

3.1.1. Separation and specificity

Chromatograms of FD and FD2 transitions, obtained from 1 ml of drug-free plasma spiked with 3 ng/ml of FD and 5 ng/ml of IS were shown in Fig. 2A. The retention time of both compounds was 4.1 min.

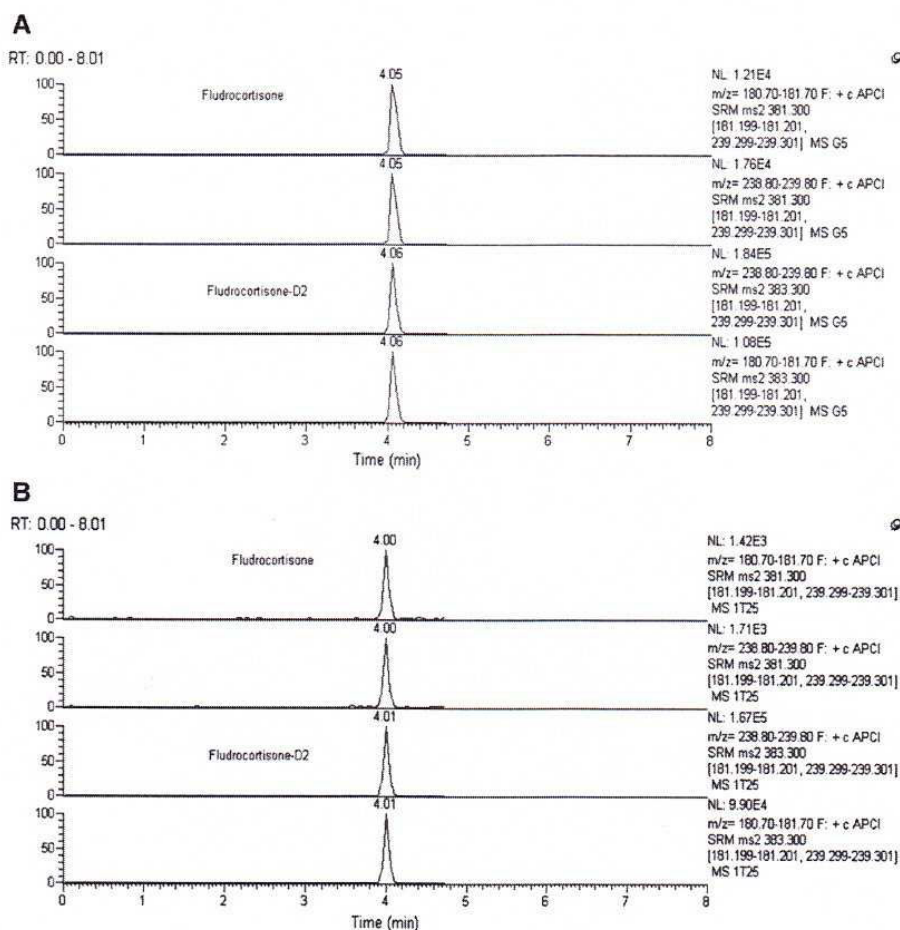


Fig. 2. A. Chromatogram of drug-free human plasma spiked with fludrocortisone and fludrocortisone-D2 at final concentrations of 3 and 5 ng/ml, respectively. B. Chromatograms obtained 4 h after administration of one 50 μg -oral dose of fludrocortisone acetate. Plasma concentration of fludrocortisone is 0.14 ng/ml. From the top to the bottom: chromatograms of the two transitions of FD and the two transitions of IS.

In drug-free plasma, no endogenous peak was observed in all blank plasma samples tested.

3.1.2. Linearity

A linear regression analysis with weighing ($1/x$), which was the best fitting model as determined by bias analysis, was used to determine slopes, intercepts and correlation coefficients. There is a reliable response in the range of 0.1 and 25 ng/ml for FD. From calibration curves a high correlation was observed between concentrations and peak-area ratios of FD and the corresponding IS. The equation was: $y = (0.0532/x) + 0.0255$.

3.1.3. LLOD & LLOQ

The LLOD was evaluated at 0.05 ng/ml and the LLOQ was 0.1 ng/ml for FD.

3.1.4. Accuracy and precision

Data of the 60 QC samples analyzed are presented Table 2. Intra- and inter-assay CVs were <10.9%. The bias of the method was <6.3%.

3.1.5. Recovery and matrix effect

After extraction, the recovery was 100% for FD and its IS (Table 3). There is a very slight matrix effect observed in plasma samples. FD and FD2 are less ionized in plasma (about 10–15%) than in mobile phase solution.

3.2. Application to clinical sample analysis

FD was correctly detected in patient samples as shown in Fig. 2B. The pharmacokinetic study showed a maximal plasma concentration (C_{max}) of 0.36 ng/ml at 2 h (T_{max} , Fig. 3). It seems that there were two different phases of elimination, the first between 2 and 4 h after administration and called $T_{1/2\alpha}$, and the second between 4 and 6 h called $T_{1/2\beta}$. $T_{1/2\alpha}$ was evaluated at 1.6 h and $T_{1/2\beta}$ at 4.1 h in our patient.

4. Discussion

We developed here a method in LC–MS/MS with atmospheric pressure chemical ionization that allows sensitive quantification of FD in plasma. The method described is a solid-phase extraction using Oasis® HLB cartridge, followed by liquid chromatography–mass spectrometry tandem (LC–MS/MS) analysis. This LC–MS/MS method allows analyzing very low plasmatic FD concentrations. An example of FD pharmacokinetic study obtained in a FD acetate 50- μ g treated patient in septic shock is reported.

Two of the 3 published methods for FD determination were intended for the assay of glucocorticoids in tissues, and allow the determination of FD acetate and not FD. These methods were not suitable for biological samples like plasma since FD acetate is totally hydrolyzed in FD and is not found in blood. Taylor et al. is the only one method that allows determination of FD in plasma [8]. In this method, the limit of quantification was not clearly defined, being between 0.3 and 0.7 ng/ml according to the authors. The pharmacokinetics of FD from our septic shock treated patient shows a maximum plasma concentration of 0.36 ng/ml. Our

Table 2

Intra-day and inter-day precision and accuracy of fludrocortisone at four levels of concentration (0.1, 0.3, 10, 20 ng/ml) in plasma.

	Concentrations (ng/ml)	Intra-assay		Inter-assay	
		Accuracy	Precision	Accuracy	Precision
Fludrocortisone	0.1	98–98.6%	7.2%	98.4%	0.8%
	0.3	99.3–100.9%	3.0%	100.1%	1.6%
	10	99.8–104.4%	5.4%	102.7%	5.4%
	20	93.7–103.3%	4.4%	98.5%	10.9%

Table 3

Recovery and matrix effect of plasma fludrocortisone at the concentration of 10 ng/ml.

	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Matrix effect (%)
Fludrocortisone	10	101.8	89.2
Fludrocortisone-D2	10	105.9	84.6

example demonstrated that the Taylor et al. method was not suitable for measurement of plasmatic FD in patients with low dosage-treatment as in the case of septic shock. In this method, the internal standard used was cortisol-D4. We used in our method the FD deuterated synthesized at our request and used only in our laboratory. In an LC/MS/MS method, the deuterated compound is always the most adapted internal standard notably when a matrix effect was observed. Here, even if the matrix effect was low, around 10–15%, the use of FD2 allows reducing the consequences of this effect.

A solid phase extraction with dichloromethane elution was employed for reason of effectiveness. Results of the extraction recoveries were perfect, with recovery about 100% for FD and FD2. These excellent recovery results and the low matrix effect were essential in order to decrease the limit of quantification of the method.

Linearity was validated between 0.1 and 25 ng/ml. This important dynamic range of the method, with a very low limit of quantification and a high upper limit of quantification, appeared to be sufficient for the determination of plasmatic FD concentration in treated patient with low dose of FD acetate but also in high-doses of FD acetate like in Addison disease treatment.

In the treated subject shown in this study, the C_{max} was 0.36 ng/ml. This concentration is reached in 2 h after taking treatment and one may wonder if this concentration is sufficient to obtain a mineralocorticoid effect in the patient. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship studies will be rapidly carried out in our hospital in order to answer this question. For the first time, we could evaluate half-lives of FD in a treated patient. It seems that there are two different phases of elimination, the first between 2 and 4 h after FD acetate administration, called $T_{1/2\alpha}$ and the second between 4 and 6 h called $T_{1/2\beta}$. The half-lives of both phases were evaluated at 1.6 h for $T_{1/2\alpha}$ and 4.1 h for $T_{1/2\beta}$ in our treated patient, with undetectable concentrations observed 6 h after oral administration.

One of the clinical studies has clearly shown that fludrocortisone associated with hydrocortisone could decrease mortality in septic shock in many patients [4]. But these results were not statistically confirmed in a second study [5]. Indeed, FD acetate is not available in intravenous form, and is administered on tablet in a nasogastric tube of a septic patient. An abnormal vascularization and a poor absorption from the stomach in the case of septic shock could explain

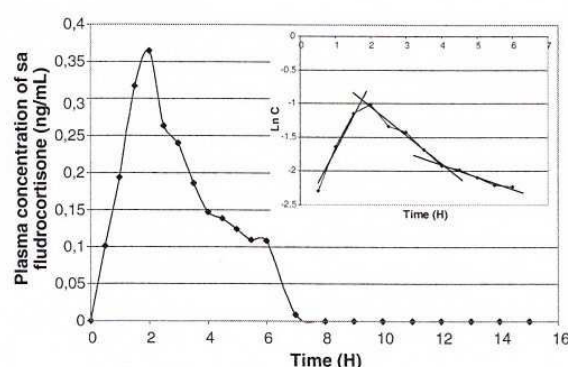


Fig. 3. Pharmacokinetics of fludrocortisone obtained in plasma of a treated patient with one 50 μ g-oral dose of fludrocortisone acetate. Two half-lives were calculated as $T_{1/2\alpha}$ between 2 and 4 h and $T_{1/2\beta}$ between 4 and 6 h.

the controversial results from the different studies. So, it was necessary to develop a quantitative measurement of FD in plasma of treated patients with low dosage to determine whether all the patients correctly absorbed FD.

References

- [1] Padidela R, Hindmarsh PC. Mineralocorticoid deficiency and treatment in congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol* 2010;2010:656925.
- [2] Oelkers W. Adrenal insufficiency. *New Eng J Med* 1996;335:1206–12.
- [3] Prigent H, Maxime V, Annane D. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care* 2004;8:243–52.
- [4] Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862–71.
- [5] Keh D, Goodman S, Sprung CL. Corticosteroid therapy in patients with severe sepsis and septic shock. *Semin Respir Crit Med* 2004;25:713–9.
- [6] Chen D, Tao Y, Liu Z, et al. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction for determination of glucocorticoid residues in edible tissues. *J Chromatogr B* 2011;879:174–80.
- [7] Shao B, Cui X, Yang Y, Zhang J, Wu Y. Validation of a solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the detection of 16 glucocorticoids in pig tissues. *J AOAC Int* 2009;92(2):604–11.
- [8] Taylor RL, Grebe SK, Singh RJ. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. *Clin Chem* 2004;50:2345–52.
- [9] Storbeck KH, Kolar NW, Stander M, Swart AC, Prevoo D, Swart P. The development of an ultra performance liquid chromatography-coupled atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry assay for seven adrenal steroids. *Anal Biochem* 2008;372:11–20.
- [10] Ionita IA, Fast DM, Akhlaghi F. Development of a sensitive and selective method for the quantitative analysis of cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human plasma. *J Chromatogr B* 2009;877:765–72.
- [11] Tang C, Kassahun K, McIntosh IS, Brunner J, Rodrigues AD. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and its application for estimating hepatic CYP3A induction. *J Chromatogr B* 2000;742:303–13.
- [12] Koal T, Schmiederer D, Pham Tuan H, Rohring C, Rauh M. Standardized LC–MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;129:129–38.

B. Publication numéro 2

Population pharmacokinetic modeling of 50 µg oral fludrocortisone in septic shock patients

Andrea Polito, Mégane Ribot, Nouredine Hamitouche, Angelo Polito, Bruno Laviolle, Jean-Claude Alvarez, Djillali Annane,

(Pas encore soumis à *Clinical Pharmacology & Therapeutics*)

Introduction

La méthode de dosage de la fludrocortisone étant applicable aux patients de réanimation, nous avons pu mettre au point un protocole pour établir des cinétiques de fludrocortisone chez le patient en choc septique avec insuffisance surrénale relative en collaboration avec le service de réanimation du Pr ANNANE. Cette étude avait pour but d'étudier les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone dans un contexte de choc septique, ce qui n'avait encore jamais été fait puisqu'aucune méthode n'était assez sensible pour la quantification de la fludrocortisone plasmatique donnée à faible dosage.

Nous avons donc effectué des prélèvements de sang toutes les 30 minutes pendant 24 heures chez l'ensemble des patients correspondants à nos critères et traités par une dose de 50 µg de fludrocortisone.

PHARMACOKINETIC OF FLUDROCORTISONE IN SEPTIC SHOCK

Andrea Polito¹, MD, PhD, Mégane Ribot², Noureddine Hamitouche³, Angelo Polito⁴, MD;
Bruno Laviolle³, MD, PhD ; Jean-Claude Alvarez², PharmD, PhD; Djillali Annane¹, MD, PhD

¹*Department of Intensive Care and Laboratory of Investigations on the Neuroendocrine Response to Sepsis EA4342, Raymond Poincaré Hospital (AP-HP), University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Garches, France*

²*Department of Pharmacology, Raymond Poincaré Hospital (AP-HP), University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Garches, France*

³*Department of Experimental and Clinical Pharmacology, University of Medicine, Rennes, France, INSERM 0203*

⁴*Department of Cardiology, Bambino Gesù Children's Hospital – Rome, Italy*

***Corresponding author:**

Andrea POLITO

Service de réanimation médicale

Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP

104, Boulevard R.Poincaré, 92380 Garches (France)

Tel: 33-1-47-10-77-82

Fax: 33-1-47-10-79-23

Email: andrea.polito@rpc.aphp.fr

KEY WORDS: Fludrocortisone, septic shock, pharmacokinetic model, absorption

ABSTRACT

Fludrocortisone is a synthetic mineralocorticoid given in the case of relative adrenal insufficiency during the septic shock. There are controversial results about the benefit of this molecule in septic shock patients. For the first time, the pharmacokinetic parameters of fludrocortisone in septic shock patients were studied and a population pharmacokinetic model was performed. The half-life of fludrocortisone is about 1.15 h with an absorption delay about 50 min. Also, 30 % of the population had undetectable fludrocortisone concentration, as predict by our model. The delay of absorption and apparent clearance are significantly correlated to SAPS II score, suggesting that in more severe patients intestinal and renal perfusion may be impaired. There is no biological difference shown between patients with detectable fludrocortisone and undetectable fludrocortisone. This suggests that the weak concentration of fludrocortisone is not enough to lead to biological effects in patients with septic shock.

INTRODUCTION

Hypotension and immunological response to host is typical of sepsis. Septic shock is frequently associated with adrenal insufficiency (1)(2)(3), or critical illness-related corticosteroid insufficiency (4). Corticosteroid replacement therapy improves prognosis in patients with catecholamine-resistant septic shock and adrenal insufficiency (1)(5). This beneficial effect is the consequence of anti-inflammatory and vascular action (2). Despite the first randomized, controlled, double-blinded trial tested the association of hydrocortisone (HC) and fludrocortisone (FC), it is well know that HC alone enhance vascular responsiveness to catecholamine (3)(6) and decreases time to shock reversal (7)(8)(9)(10). The interest of FC alone in septic shock has not been proven. Compared to HC, FC shows a higher mineralocorticoid activity. Septic shock is associated with increased sympathetic

nervous system activity and experimental studies indicate that inhibition of central sympathetic outflow reduce mortality in experimental endotoxaemia and sepsis (11). Fludrocortisone suppression of sympathetic nerve activity in humans may be related in part to factors other than increase in arterial pressure or plasma volume (12). Mineralocorticoids in healthy humans induce a fall in plasma norepinephrine (13)(14) and simultaneously response to norepinephrine is potentiated (15)(16)(17). Administration of septic shock doses of FC in healthy volunteers is not associated with hemodynamic effect and mineralocorticoid response is lower than HC (18). Recent studies support the concept that the mineralocorticoid receptor (MR) also has extrarenal actions (19)(20)(21)(22). The presence of functional MR in human vascular smooth muscle cells support the hypothesis that vascular tone contributes directly to the control of systemic blood pressure in pathological conditions (23).

The rationale for FC addition includes the potential benefits of enhanced volume retention and increase of vascular tone. However, use of FC is hampered by its formulation only as an enteral preparation, and the degree of absorption through the gastrointestinal tract of hypotensive patients on vasopressors remains uncertain (24)(25)(26).

FC plasmatic level has never been assessed and its pharmacokinetic and pharmacodynamic is not known. The aim of our study was to determine the fate of FC given orally in septic shock.

RESULTS

Patients Characteristics

The Table 1 and 2 describe the distribution of quantitative and categorical variables, respectively, between the two groups A (undetectable plasma concentrations) and B (detectable plasma concentrations). These two tables also show the p-values of statistical tests

comparing the two groups. Excepting a higher rate of sepsis in group A (43% in group A and 0% in group B, $p = 0.02$), no significant differences were found between the two groups.

Population PK Analysis

A comparison of the fit of each of the three structural mathematical models to the data is shown in Table 3. Evaluation of the objective function values (OFV) against a χ^2 distribution indicate that FC concentrations were best described by a one-compartmental model with first-order oral absorption with lag time and first-order elimination. This model was parameterized in terms of apparent clearance (CL/F; L/h), apparent volume of distribution (V/F; L) and first-order absorption rate constant (K_a ; h^{-1}) with lag time (Tlag; h). A combined model was selected to describe the residual variability (Table 3).

Of the variables tested, inclusion of IGSII was found to have a significant influence on Tlag ($\Delta OFV = -4$, $p=0.045$) and on CL/F ($\Delta OFV = -4.05$, $p<0.044$). Introducing into the model the effect of IGSII on the two parameters Tlag and CL/F simultaneously, allows still significantly decrease the OFV ($\Delta OFV = -4.6$, $p=0.03$). The effect of IGSII on the two parameters was retained in the final model.

Final PK parameter estimates, inter-individual variability, residual variability and covariate effects were presented in Table 4. All were reliably estimated, as reflected by the small RSEs from Fisher Information Matrix except for additive residual parameter (a). The mean population PK parameter estimations in our study were: Tlag, 0.64 h; CL/F, 40.6 L/h; V/F, 67.4 L, and K_a 0.55 h^{-1} . A large Inter-individual variability in the PK parameters was observed, particularly, on Tlag and V/F (91% for Tlag and 77% for V/F). The plasma half-life was estimated at 1.06 h ($IC_{95\%}$ [0.69 ; 1.76]) and the $AUC_{0-\infty}$ at 1.23 $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ ($IC_{95\%}$ [1.06 ; 1.46]).

The GOF plots of the final PK model with IGSII covariate are shown in Figure 1 and 2. The

model adequately described the observations as shown by the plots of observations versus population and individual predictions (Figure1). Moreover, the VPC and NPDE plots presented in Figure 2 indicate a good predictive performance of the model.

Pharmacodynamic of FC

Fludrocortisone plasma levels did not correlate with mean blood pressure, heart rate, sodium and potassium urinary levels (Figure 2). Significant associations were found between FC plasma levels and sodium plasma level at time point 9 ($p = 0.03$, $r = 0.74$) and between FC plasma levels and plasma potassium level at time point 5 ($p = 0.02$, $r = -0.58$). A trend toward a significant association was identified between FC and potassium plasma level at T 5.5 ($p = 0.06$, $r = -0.5$).

No patient-related factors were significantly associated with the ability of patients to absorb FC. In particular catecholamine's duration of infusion and dosage, SOFA, IGS II, patients weight and gastric residue did not correlate with the presence of FC in plasma after naso-gastric administration.

DISCUSSION

For the first time we developed a single-compartment model describing pharmacokinetic of fludrocortisone given enterally in septic shock patients. Plasmatic level of FC was very variable. The maximal concentration was reached around 3 hours after administration and the synthetic hormone was under the absolute threshold 10 hours after the administration. Estimated plasma half-life was 1.06 hour.

Septic shock may be associated with adrenal insufficiency and hormone replacement therapy may be beneficial. Administration of hydrocortisone improves survival and promotes recovery of the immune and cardiovascular systems (5)(2). Some studies have shown that

during sepsis mineralocorticoid activity may also be impaired resulting in hyperreninemic hypoaldosteronism (27). Addition of FC would provide benefit to acute stress improving fluid volume, vascular tone and anti-inflammatory activity (28). However one may argue that supraphysiologic dose of glucocorticoids act mineralocorticoid activity by aldosterone receptors (28)(29). Conversely, 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type II, upregulated during sepsis, inactivates cortisol to cortisone and prevents binding to the mineralocorticoid receptor (30).

Our study showed huge interindividual variability of pharmacokinetic parameters. The single-compartment model predicts a lack of absorption in 30% of patients. Indeed in 7 of 21 plasma, FC levels were undetectable. Fludrocortisone formulation is exclusively enteral, and the degree of absorption through the gastrointestinal tract of hypotensive patients on vasopressors remains uncertain (24)(26)(29). Positive blood culture was more likely to be associated to an undetectable concentration of FC. The synthetic hormone was found about 50 minutes after enteral administration. The maximal concentration was reached at 3 hours, and FC was undetectable at 10 hours. Short duration of FC in plasma may explain the lack of effectiveness in previous clinical trials on septic shock (5)(31).

Mineralocorticoid effect of FC was biological and not hemodynamic. Any correlation was found between plasmatic concentration and arterial pressure or cardiac frequency, while potassium decreased at 5 hours and sodium increased at 9 hours. These results are consistent with the findings of Laviolle et al., which showed sodium and potassium modification between 6 and 12 hours after FC administration (18). Most of the patient was oligo-anuric and the strength was too small to evaluate excretion of sodium. It is likely that maximal plasma concentrations of FC in our patients were too weak to account for hemodynamic effect. Hemodynamic and biological effects of FC were found in healthy volunteers at doses 30 times used in septic shock patients. Reduction of the administered dose “only” 3 times used

in septic shock patients did not modify systolic blood pressure but had mineralocorticoid effects on urinary sodium excretion (32). Moreover high doses of FC in septic children are associated to a significant reduction in amount and duration of vasopressor infusion (33). These results suggest that biological effect of FC appears earlier and modification of vascular tone needs higher dose administered.

Delay FC absorption and clearance is significantly correlated to SAPS II score, suggesting that in more severe patients intestinal and renal perfusion may be impaired. It is well known that microcirculatory alterations occur in sepsis and may play a role in development of organ dysfunction (34).

This work has some limitations. First, the purpose of our research was to evaluate absorption and elimination profile of FC given enterally, in septic shock. Although absorption of the synthetic hormone was variable between patients, our cohort was adequate to realize a pharmacokinetic study, but it was too small to describe pharmacodynamic of FC. For this reason it is not possible to certainty define the risk factors for non-absorption of the FC, and we can only describe associations in this small effective.

Second, we tested only one dose of FC given one time. We don't know if lengthen the administration of the synthetic hormone, or to test higher doses would be associated with beneficial hemodynamic effects, or better outcome.

Third, most of the patients were oligo-anuric and it was not possible to show potential changes in urinary sodium/potassium ratio and sodium excretion fraction with time.

In conclusion for the first time we described pharmacokinetic of FC given enterally, in septic shock patients. Absorption of 50 mcg of the synthetic hormone is variable and, in approximately 6 hours FC is not detected in plasma. This dose is associated with a mineralocorticoid biological effect. Hemodynamic effects of FC should be investigated on a

larger cohort and at different doses.

MATERIALS AND METHODS

Patients and settings

This was a prospective observational study that was conducted in an 18-bed medical and surgical intensive care unit (ICU) of an university teaching hospital (Raymond Poincaré Hospital, Garches, France). Patients admitted for septic shock (35) were enrolled at our institution from 2010 to 2012. Their characteristics are displayed in Tables 1. Patients with known endocrine disorders or any condition or treatment that may affect cortisol synthesis or metabolism (36)(37)(38) were excluded. The study protocol was approved by the local institutional review board, and informed consent was obtained from the patients' closest relatives.

Within the first three hours of septic shock onset, and prior to any corticotherapy, 50 mcg of FC were given orally, alone or with 50 mg of HC given intravenously each 6 hours. Blood samples (7 mL) were directly collected into a clean tube from an invasive device for continuous arterial pressure monitoring before steroids administration and each 30 minutes for 6 hours, and hourly for 18 hours. Serum was separated by centrifuging at 5000 rpm for 10 min and kept frozen at -80°C until analysis.

Blood sample analysis

FC were quantified in whole blood using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry detection and atmospheric pressure chemical ionization (39).

Data Analysis

Patients Characteristics

A comparative univariate analysis between Group A and B was conducted to examine whether the initial characteristics of patients could explain the undetectable concentrations (and therefore probably the absence of absorption of the drug) observed in group A. Wilcoxon test for quantitative variables and Fisher exact for categorical variables were used to compare the two groups. The statistical analysis was performed using R statistical software.

Population PK Analysis

The PK analysis of Fc was performed in patients of group B.

Nonlinear mixed effects modeling was used to analyze the PK data, using the Stochastic Approximation Expectation Maximization (SAEM) algorithm implemented in MONOLIX 4.3.0 software (LIXOFT, France). The version of program used takes into account censored data (below the limits of quantification BQL) for the estimation of maximum likelihood and structural parameters. BQL data are considered as left-censored observations, indeed in that case the data is not observed but we only know that it is below the LOQ. A simulation of the left-censored data in a right-truncated Gaussian distribution with integration below limit of quantification is realized to obtain probability of BQL.

The inter-individual variability (IIV) was described by exponential variance model:

$$\theta_i = \theta_{pop} \times \exp(\eta_i) \quad \eta \sim N(0, \omega_\theta)$$

where θ_i and θ_{pop} are individual and population parameters, respectively; η describes the inter-individual variability, which was assumed to be normally distributed around zero with a standard deviation ω_θ , by which the i th individual's parameter differed from the typical value (θ_{pop}). A diagonal variance-covariance matrix of parameters (Ω) was used.

Several error models (additive, proportional, and combined) were investigated to describe residual variability. Bayesian Information Criteria (BIC) was used for selecting the residual error model. For instance, the equation of the combined model can be written as following:

$$C_{ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \times \varepsilon_{prop,ij} + \varepsilon_{add,ij}$$

where C_{ij} represents the j th observed value of the dependent variables in individual i ; $C_{pred,ij}$ is the j th model predicted values of the dependent variables in individual i ; $\varepsilon_{prop,ij}$ and $\varepsilon_{add,ij}$ are the proportional and additive residual random errors, respectively.

In the first step, a basic population PK model without covariates was developed. For the structural PK model, one- and two-compartment models with first-order oral absorption with lag time and first-order elimination were compared. The likelihood ratio test (by evaluation of the likelihood ratio against a χ^2 distribution) was used to compare nested structural models and select the best one between them (p-value<0.05, corresponding to a drop in the objective function value (OFV) of 3.84 for a one-parameter difference between nested models).

From the basic model, seven covariates were studied and chosen for their impact on the PK parameters. These covariates were: age, gender, total body weight, IGSII score, serum protein, serum albumin and serum creatinine. A reduction of OFV by 3.84 (p<0.05) for forward inclusion and an increase of OFV by 6.64 (p<0.01) for backward elimination were the criteria for retaining a covariate in the model.

The parameter-covariate relationships were modeled multiplicatively as follow:

$$\text{For continuous covariates, } \theta_i = \theta_{pop} \times \left(\frac{Cov_i}{Median(Cov)} \right)^\beta \times \exp(\eta_i)$$

Where β is the covariate effect to be estimated, Cov_i is the value of the covariate in the subject i .

$$\text{For binary covariates, } \theta_i = \theta_{pop} \times \exp(\beta \cdot Cov_i) \times \exp(\eta_i)$$

where Cov_i takes a value of 0 or 1.

The elimination half-life time ($T_{1/2}$) and the area under the curve extrapolated from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$) of plasma concentrations of Fc were calculated from the following equations:

$$T_{1/2} = \ln(2) \times \frac{V/F}{CL/F}$$

$$AUC_{0-\infty} = \frac{Dose}{CL/F}$$

where V/F and CL/F are the population PK parameters estimated in the final model.

Goodness-of-fit (GOF) of the final model was evaluated using a graphic approach. By visual examination of visual predictive checks (VPC), plots of observed concentrations versus predicted ones and normalized prediction distribution error (NPDE) versus time. The simulated PK parameters were randomly sampled from their respective estimated distribution, and serum concentrations of FC were calculated based on the sampled PK parameter values and residual variability. A thousand simulations were performed, and the 80% confidence intervals (i.e., 10th and 90th percentiles) computed from the simulated PK profiles were derived for each statistic (i.e., the median and the 10th and the 90th percentiles) and compared with the median and the 10th and 90th percentiles of the observed PK profiles. The predictive performance of the final model was considered acceptable if the majority of original data points were contained inside the predicted confidence intervals, with no significant systematic deviation between simulated and observed data. NPDE was built from the percentile derived from VPC prediction. The plot of NPDE takes into account the full predictive distribution of each individual observation.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Goodness-of-fit plots for the final PK model with IGSII covariate: (a) Observations versus population predicted values. (b) Observations versus individual predicted values. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points. LOWESS smoothed curves are plotted as blue curves.

Figure 2. (a) Visual Predictive Check (VPC) and (b) Normalized Prediction Distribution Error (NPDE) versus time for the final PK model. VPC details: The shaded blue and pink areas represent 90% prediction intervals from the corresponding percentiles calculated from simulated data. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points.

Figure 1

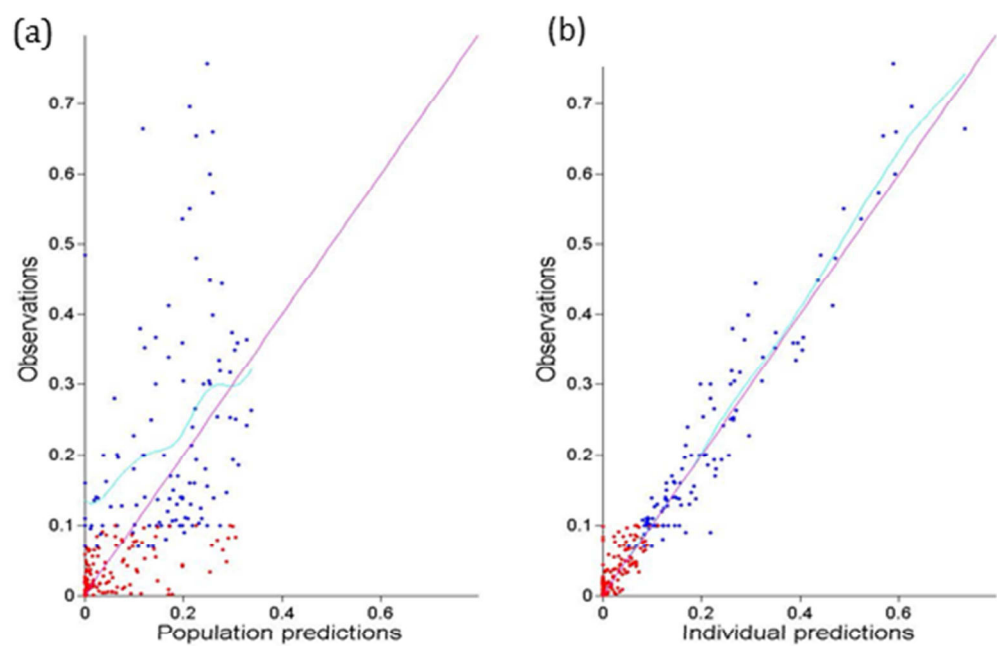


Figure 2

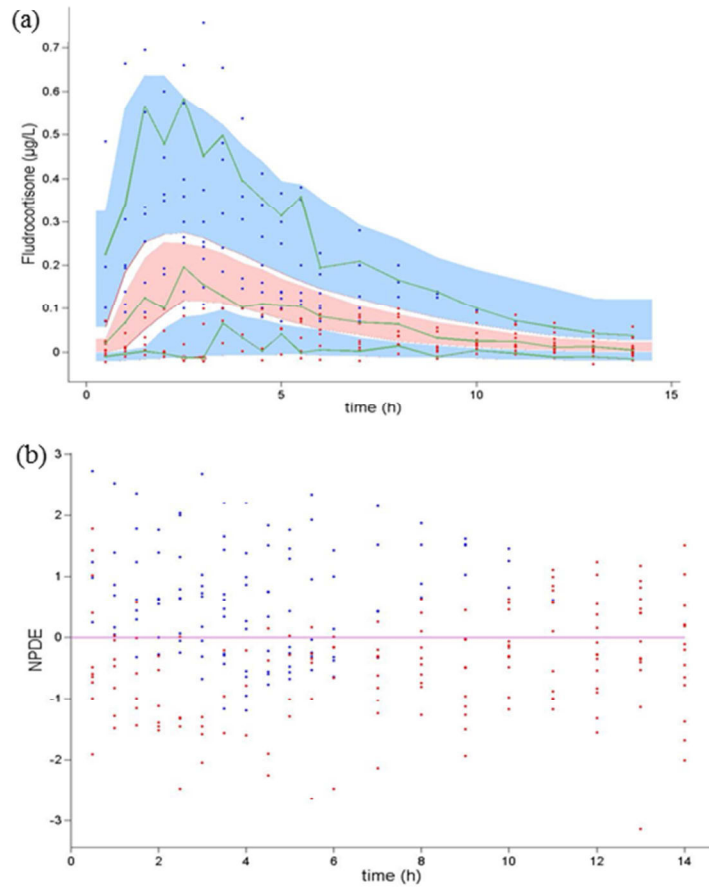


Table 1. Characteristics of the 21 ICU patients early in the PK study (Quantitative variables)

	Group	Mean	Median	Range	NA	p-value*
Age (years)	A	58	55	33 - 82	0	0.17
	B	66	65	41 - 93	0	
ALAT (IU/L)	A	449	34	24 - 2919	0	0.2
	B	1191	69	17 - 11830	0	
ASAT (IU/L)	A	599	39	17 - 3763	0	0.2
	B	2432	97	20 - 18060	0	
Albumin (g/L)	A	15.6	16.5	12 - 19	1	0.17
	B	18.9	18	15 - 26	4	
Bilirubin (µmol/L)	A	87.5	29	6 - 321	0	0.8
	B	34.9	17	6 - 111	0	
Cortisol (µg/L)	A	369	337	61 - 1026	2	0.4
	B	874	605	33 - 3292	2	
CPK (IU/L)	A	98.2	15	15 - 287	0	0.1
	B	1480	157	15 - 17680	0	
Creatinine (µmol/L)	A	92.5	114	44 - 128	0	0.4
	B	163	114	31 - 473	0	

	Group	Mean	Median	Range	NA	p-value*
Diuresis (mL/jr)	A	1420	800	0 - 4550	0	0.9
	B	1193	1205	0 - 3300	0	
HGB (g/dL)	A	7.4	7.2	6.2 - 9.7	0	0.06
	B	8.8	8.7	6.5 - 12.3	0	
SAPSII	A	44.5	42	24 - 71	0	0.3
	B	55.7	53	22 - 95	0	
Lactates (mmol/l)	A	3.1	2.2	1.1 - 9.8	0	≈1
	B	4.5	2	0.7 - 28.6	0	
Weight (Kg)	A	67.5	64	56 - 90	0	0.7
	B	70	71	28 - 96	0	
Proteinemia (g/L)	A	47	47	36 - 59	0	0.5
	B	50	52	34 - 68	0	
SOFA	A	11	11	9 - 13	0	0.7
	B	11.8	11	6 - 21	0	
Sufentanyl (mcg/h)	A	8.5	10	0 - 25	0	0.5
	B	12.3	10	0 - 35	0	
Urea (mmol/L)	A	8.7	7.8	2.3 - 21.4	0	0.4
	B	10.4	7.7	3.8 - 22.4	0	
Group A: Patients with undetectable FC plasma concentrations (total = 7 patients)						
Group B: Patients with detectable FC plasma concentrations (total = 14 patients)						
IU : International Unit						
NA : Missing data						
* p-value of Wilcoxon test						

Table 2. Characteristics of the 21 ICU patients early in the PK study (categorical variables)

		Groupe		p-value*
		A (n=7)	B (n=14)	
		n (%)	n (%)	
Gender	F	5 (71.4)	6 (42.9)	0.36
	M	2 (28.6)	8 (57.1)	
DIC		2 (28.6)	5 (35.7)	≈1
Sedation		3 (42.9)	11 (78.6)	0.15
Septicemia		3 (42.9)	0 (0.0)	0.02
Clostridium		0 (0.0)	1 (7.1)	≈1
Death in ICU		4 (57.1)	7 (50)	≈1
Intubation		5 (71.4)	11 (78.6)	≈1
Group A: Patients with undetectable FC plasma concentrations (total = 7 patients)				
Group B: Patients with detectable FC plasma concentrations (total = 14 patients)				
F: For Female and M: For Male				
DIC: Disseminated Intravascular Coagulation				

	Groupe		p-value*
	A (n=7)	B (n=14)	
	n (%)	n (%)	

ICU: Intensive care unit

* p-value of Fisher exact test

Table 3. List of structural PK Models with their Respective Objective Function Values

N°	Structural model	No. of parameters	Residual error	OFV	BIC	Reference Model	p-value*
(1)	1Cp	3	Additive	- 48.4	-	-	-
(2)	1Cp with Tlag	4	Additive	-198.8	-175.1	N°1	<10 ⁻⁴
(3)	2Cp with Tlag	6	Additive	-198.7	-	N°2	NS
(4)	1Cp with Tlag	4	Proportional	-	-133.2	N°2	-
(5)	1Cp with Tlag	4	Combined	-217.9	-197.9	N°2	-
(6)	1Cp with Tlag and cov IGSII [#]	6	Combined	-226.5	-	N°5	0.013

1Cp: One-compartmental model parameterized in terms of apparent clearance (CL/F; L/h), apparent volume of distribution (V/F; L) and first-order absorption rate constant (Ka; h⁻¹)

OFV: Objective Function Value (OFV = -2 x log-likelihood)

*p-value of likelihood ratio test according to χ^2 distribution between two nested models

For instance : (OFV_{model1} - OFV_{model2}) ~ χ^2 with n degree of freedom (n : difference in the number of parameters between the two models)

NS: no significant

BIC: Bayesian Information Criteria was used for selecting the residual error model

[#]Final model with effect of IGSII on Tlag and CL/F

Table 4. Parameter estimates from the final PK model

Parameters	Estimates	R.S.E (%)
Population parameters		
Tlag (h)	0.64	34
Ka (h⁻¹)	0.55	20
V/F (L)	67.4	30
CL/F (L/h)	40.6	16
Inter-individual variability		
Sd_Tlag (%)	92	28

Parameters	Estimates	R.S.E (%)
Sd_Ka (%)	39	39
Sd_V/F (%)	80	27
Sd_CL/F (%)	49	26
Covariate effect		
β_- (Tlag~IGSII)	0.035	40
β_- (CL/F~IGSII)	0.017	39
Residual error		
σ_{add}	0.011	73
σ_{prop}	0.17	30
$T_{1/2}$ (h)	1.06 IC ₉₅ [0.69 ; 1.76]	

$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.h.L}^{-1}$) 1.23 IC₉₅[1.06 ; 1.46]

Tlag: Lag time; Ka: Absorption rate constant; V/F: Apparent volume of distribution; CL/F: Apparent clearance; Sd: Standard deviation; IGSII: Covariate (Severity Index).

REFERENCES

1. Annane D, Sébille V, Troché G, Raphaël J, Gajdos P, Bellissant E. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA*. 23 févr 2000;283(8):1038-45.
2. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *The Lancet*. 1 janv 2005;365(9453):63-78.
3. Annane D, Bellissant E, Sebille V, Lesieur O, Mathieu B, Raphael JC, et al. Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve. *Br J Clin Pharmacol*. déc 1998;46(6):589-97.
4. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. juin 2008;36(6):1937-49.
5. Annane D, Sébille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 21 août 2002;288(7):862-71.
6. Bellissant E, Annane D. Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. *Clin Pharmacol Ther*. sept 2000;68(3):293-303.
7. Bollaert PE, Charpentier C, Levy B, Debouverie M, Audibert G, Larcan A. Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Crit Care Med*. avr 1998;26(4):645-50.
8. Briegel J, Forst H, Haller M, Schelling G, Kilger E, Kuprat G, et al. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Crit Care Med*. avr 1999;27(4):723-32.
9. Keh D, Goodman S, Sprung CL. Corticosteroid therapy in patients with severe sepsis and septic shock. *Semin Respir Crit Care Med*. déc 2004;25(6):713-9.
10. Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Gräf K-J, Boenisch O, et al. Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med*. nov 2005;33(11):2457-64.
11. May CN, Calzavacca P, Ishikawa K, Langenberg C, Wan L, Ramchandra R, et al. Novel targets for sepsis-induced kidney injury: the glomerular arterioles and the sympathetic nervous system. *Exp Physiol*. nov 2012;97(11):1168-77.
12. Mion D, Rea RF, Anderson EA, Kahn D, Sinkey CA, Mark AL. Effects of fludrocortisone on sympathetic nerve activity in humans. *Hypertension*. janv 1994;23(1):123-30.
13. Distler A, Haller H, Harwig S, Kribben A, Lüdersdorf M, Thiede M, et al. Sympathetic tone and pressor response to noradrenaline during mineralocorticoid-induced blood pressure rise in man. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. déc 1985;3(4):S27-32.
14. Izzo JL, Horwitz D, Lawton WJ, Keiser HR. Fludrocortisone suppression of sympathetic nervous activity. *Clin Pharmacol Ther*. janv 1983;33(1):102-6.
15. Schmid PG, Eckstein JW, Abboud FM. Effect of 9-alpha-fluorohydrocortisone on forearm vascular responses to norepinephrine. *Circulation*. oct 1966;34(4):620-6.

16. Schmid PG, Eckstein JW, Abboud FM. Effect of 9-alpha-fluorohydrocortisone on forearm venous responses to norepinephrine and tyramine. *J Appl Physiol.* oct 1967;23(4):571-4.
17. Distler A, Philipp T, Lüth B, Wucherer G. Studies on the mechanism of mineralocorticoid-induced blood pressure increase in man. *Clin Sci Lond Engl* 1979. déc 1979;57 Suppl 5:303s - 305s.
18. Laviolle B, Le Maguet P, Verdier M-C, Massart C, Donal E, Lainé F, et al. Biological and Hemodynamic Effects of Low Doses of Fludrocortisone and Hydrocortisone, Alone or in Combination, in Healthy Volunteers With Hypoaldosteronism. *Clin Pharmacol Ther.* août 2010;88(2):183-90.
19. McCurley A, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 24 mars 2012;350(2):256-65.
20. Jaffe IZ, Newfell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE, et al. Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *J Clin Invest.* nov 2010;120(11):3891-900.
21. Levy DG, Rocha R, Funder JW. Distinguishing the antihypertensive and electrolyte effects of eplerenone. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2004;89(6):2736-40.
22. Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbili V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, et al. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juill 2010;24(7):2454-63.
23. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med.* sept 2012;18(9):1429-33.
24. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med.* 10 janv 2008;358(2):111-24.
25. Burry LD, Wax RS. Role of corticosteroids in septic shock. *Ann Pharmacother.* mars 2004;38(3):464-72.
26. Maxime V, Lesur O, Annane D. Adrenal insufficiency in septic shock. *Clin Chest Med.* mars 2009;30(1):17-27, vii.
27. Du Cheyron D, Lesage A, Daubin C, Ramakers M, Charbonneau P. Hyperreninemic hypoaldosteronism: a possible etiological factor of septic shock-induced acute renal failure. *Intensive Care Med.* oct 2003;29(10):1703-9.
28. Druce LA, Thorpe CM, Wilton A. Mineralocorticoid effects due to cortisol inactivation overload explain the beneficial use of hydrocortisone in septic shock. *Med Hypotheses.* 2008;70(1):56-60.
29. Burry LD, Wax RS. Role of corticosteroids in septic shock. *Ann Pharmacother.* mars 2004;38(3):464-72.
30. Venkatesh B, Cohen J, Hickman I, Nisbet J, Thomas P, Ward G, et al. Evidence of altered cortisol metabolism in critically ill patients: a prospective study. *Intensive Care Med.* oct 2007;33(10):1746-53.
31. COITSS Study Investigators, Annane D, Cariou A, Maxime V, Azoulay E, D'honneur G, et al. Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. *JAMA.* 27 janv 2010;303(4):341-8.
32. Whitworth JA, Saines D, Thatcher R. Differential blood pressure and metabolic effects of 9 alpha-fluorocortisol in man. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* juin 1983;10(3):351-4.

33. Hebbar KB, Stockwell JA, Fortenberry JD. Clinical effects of adding fludrocortisone to a hydrocortisone-based shock protocol in hypotensive critically ill children. *Intensive Care Med.* 1 mars 2011;37(3):518-24.
34. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent J-L. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence.* 1 janv 2014;5(1):73-9.
35. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* juin 1992;20(6):864-74.
36. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 18 mai 1995;332(20):1351-62.
37. Oelkers W. Adrenal Insufficiency. *N Engl J Med.* 1996;335(16):1206-12.
38. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med.* 30 oct 1997;337(18):1285-92.
39. Ribot M, Polito A, Grassin-Delyle S, Annane D, Alvarez J-C. Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration. *Clin Chim Acta.* mai 2013;420:109-13.

Conclusions

Il existe une grande variabilité des profils pharmacocinétiques observés chez les patients en choc septique. Cette étude a permis d'établir un modèle permettant la caractérisation pharmacocinétique de cette molécule pour la première fois. La demi-vie de la fludrocortisone a été estimée à 1,06 h ($IC_{95\%}$ [0.69 ; 1.76]) avec un délai d'absorption moyen de 0,64 h. De plus, la division des patients en deux populations, les absorbants et les non-absorbants la fludrocortisone n'ont pas permis de mettre en évidence des différences au niveau des paramètres dynamiques étudiés. Une corrélation significative a été observée entre le score IGS II et le délai d'absorption ainsi que la clairance. Il est également à noter que le modèle prédit que 30 % des patients auront des concentrations de fludrocortisone en dessous du seuil de quantification de la méthode de dosage. Cette proportion est parfaitement observée chez les patients testés.

C. Publication numéro 3

Population pharmacokinetic/pharmacodynamics modeling of 50 µg oral fludrocortisone and 50 mg iv hydrocortisone, alone administration or in combination, in healthy volunteers.

Nouredine Hamitouche, Mégane Ribot, Andrea Polito, Djillali Annane, Jean-Claude Alvarez, Eric Bellissant, Bruno Laviolle

(Pas encore soumis à *Clinical Pharmacology & Therapeutics*)

Introduction

En partenariat avec l'équipe du Pr BELLISSANT, nous avons pu également mettre en relation les données pharmacodynamiques qu'ils avaient publiées en 2010 avec de nouvelles données pharmacocinétiques chez des volontaires sains (B. Laviolle et al. 2010). Dans cette étude, il avait été montré une diminution significative du ratio Na/K dans les urines suite à une administration d'hydrocortisone et des résultats similaires pour la fludrocortisone malgré que les effets soient moins prononcés. L'effet des deux drogues données simultanément était additif. L'hydrocortisone induisait une augmentation du rythme cardiaque et diminuait la résistance vasculaire systémique. En revanche, la fludrocortisone ne semblait pas montrer d'effet hémodynamique. Grâce à la méthode nouvellement validée et publiée, la corrélation de la concentration plasmatique par rapport aux effets observés a pu être mise en évidence.

L'objectif de cette étude est d'étudier les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone et de l'hydrocortisone administrée ensemble ou séparément, puis, de développer un modèle pharmacocinétique/pharmacodynamique de population pour caractériser les effets des deux molécules sur le ratio Na/K urinaire.

Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of 50µg oral fludrocortisone and 50mg iv hydrocortisone, alone administration or in combination, in healthy volunteers.

Introduction

Corticosteroids are used as part of substitution therapy in the management of adrenocortical deficiency states (1), especially in patients with septic shock(2,3), and physiological replacement is best achieved with a combination of Hydrocortisone (HC) and the mineralocorticoid 9α-fludrocortisone (FC) (4). HC is the pharmaceutical name of the endogenous active steroid cortisol and is the most commonly used Glucocorticoid (GC) for cortisol replacement therapy (5). FC is a synthetic steroid with a potent mineralocorticoid action(6). The dose of HC and FC usually used in patients is respectively 50mg intravenously four times daily and 50µg orally once daily (7).

Most effects of corticosteroids are mediated by genomic mechanisms, which may delay the time of onset and peak effects by several hours (8). In a previous study, we showed that HC significantly decreased urinary sodium / potassium (Na / K) ratio, the FC had a similar but delayed and less severe effect, and the effect of the two drugs was additive. The HC significantly increased cardiac output, decreased systemic vascular resistance and increased slightly heart rate. FC had not however shown any hemodynamic effect (9).

Currently very few articles were published on the pharmacokinetics of FC. FC acetate is rapidly and completely absorbed after oral administration. Its oral bioavailability is almost 100% in healthy volunteers (10). After an oral dose of 100µg of free steroid, peak plasma concentrations of 1.2 to 1.7 µg/L are attained in 1½-2h (11). Protein binding of FC is 70-79% in blood, determined in vitro but somewhat lower in vivo (12).

The objective of this study was, firstly, to study the pharmacokinetics of FC and HC administered separately or in combination, and secondly, to develop a population PK-PD model that characterizes the effects of the two molecules on the urinary Na / K ratio. Indeed, the urinary Na/K ratio was an unreliable index of mineralocorticoid action (13).

Methods

Study design and bioassay

The PK and PK-PD study of FC and HC was simultaneously investigated in 12 healthy subjects with an average age of 24 ± 3 years and with an average body mass index of $23.0 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$.

This was a placebo-controlled, randomized, double-blind, cross-over, 4-periods study performed according to a 2×2 factorial design. Each period was separated from the next one by a washout interval of at least 14 days. Subjects received in a random order FC placebo + HC placebo, FC + HC placebo, FC placebo + HC or FC + HC. FC ($50 \mu\text{g}$) was administered orally and HC (50 mg) was injected intravenously as a bolus. All experiments were conducted in a quiet and temperature controlled (at $20 \pm 2^\circ\text{C}$) room.

All study periods were identical. Subjects arrived at the clinical investigation unit of the Inserm 1414 Clinical Investigation Centre of Rennes University Hospital at 06:45 am after an overnight fast and they were immediately placed in the supine position. At 07:30, an indwelling catheter with a heparinized lock was inserted into a forearm vein of the left arm for blood sampling. At 07:45, another catheter was inserted into a forearm vein of the right arm to allow intravenous infusion of 2000 ml of NaCl serum 0.9% during 2 h. Such an acute volume expansion has previously been shown to induce significant decrease of plasma renin activity and aldosterone in healthy males (14). At 08:00, they had a standardized breakfast. At the end of the saline infusion, baseline (T0) biological and hemodynamic measures were performed and followed by treatment administration. The same measures were repeated 1 h after treatment administration. Blood samples were taken immediately before drug administration and after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, and 24 hours. Samples were immediately centrifuged at 1000 g for 10 min and plasma was stored at -80°C until assay. Plasma FC and HC concentrations were measured by high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (15). The lower limit of quantification (LLOQ) was $0.1 \mu\text{g/L}$ for FC and $15 \mu\text{g/L}$ for HC.

Data Analysis

Nonlinear mixed effects modeling was used to analyze the PK and PD data, using the Stochastic Approximation Expectation Maximization (SAEM) algorithm implemented in Monolix program (16). The version of program used takes into account censored data (Below Quantification Limit BQL) for the estimation of maximum likelihood and structural parameters. BQL data are considered as left-censored observations, indeed in that case the data is not observed but we only know that it is below the LLOQ. A simulation of the left-

censored data in a right-truncated Gaussian distribution with integration below limit of quantification is realized to obtain probability of BQL (17).

The inter-individual variability (IIV) was described by exponential variance model:

$$\theta_i = \theta_{pop} \times \exp(\eta_i) \quad \eta \sim N(0, \omega_\theta) \quad (1)$$

where θ_i and θ_{pop} are individual and population parameters, respectively; η describes the inter-individual variability, which was assumed to be normally distributed around zero with a standard deviation ω_θ , by which the i th individual's parameter differed from the typical value (θ_{pop}). A diagonal variance-covariance matrix of parameters (Ω) was used.

Several error models (additive, proportional, and combined) were investigated to describe residual variability. Bayesian Information Criteria (BIC) was used for selecting the residual error model. For instance, the equation of the combined model can be written as following:

$$C_{ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \times \varepsilon_{prop,ij} + \varepsilon_{add,ij} \quad (2)$$

where C_{ij} represents the j th observed value of the dependent variables in individual i ; $C_{pred,ij}$ is the j th model predicted values of the dependent variables in individual i ; $\varepsilon_{prop,ij}$ and $\varepsilon_{add,ij}$ are the proportional and additive residual random errors, respectively.

PK model

For FC, one- and two-compartment structural models with first-order oral absorption and first-order elimination were compared. Similarly for HC, one- and two-compartment structural models with i.v. input and first-order elimination were compared. The likelihood ratio test (by evaluation of the likelihood ratio against a χ^2 distribution) was used to compare nested structural models and select the best one between them (p-value < 0.05, corresponding to a drop in the objective function value (OFV) of 3.84 for a one-parameter difference between nested models).

The elimination half-life time ($T_{1/2}$) and the area under the curve extrapolated from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$) of plasma concentrations of FC and HC were calculated from the following equations:

$$T_{1/2} = \ln(2) \times \frac{V_d}{CL} \quad (3)$$

$$AUC_{0-\infty} = \frac{Dose}{CL} \quad (4)$$

where V_d and CL are the population PK parameters estimated in the final model.

Inter-occasion variability

Considering between two consecutive administrations, a washout interval of at least 14 days was observed for each subject, we assumed that any administration has no effect on the PK or PD of the next administration. The inter-occasion variability on PK parameters is related only to experimental errors. It was estimated for each PK parameter and retained in the final model if it improved the adjustment criteria.

Effect of combination therapy on the PK

As both FC and HC treatments were each administered alone or in combination, we tested the effect of the covariate therapy (TRT) on the PK parameters of the two molecules. Covariate TRT take the value 1 if the molecule in question was administered alone and 2 when it was administered in combination with the other molecule as follow.

$$\theta_i = \theta_{pop} \times \exp(\eta_i) \times \exp(\beta) \quad \eta \sim N(0, \omega_\theta)$$

(5)

where β is the effect of the TRT covariate, it is 0 if the covariate takes the value 1 and 1 if the covariate takes the value 2.

PK-PD model

In this section we studied PK-PD relationship between plasma concentrations of administered corticosteroids (HC and FC) and the urinary (Na / K) ratio. In a previous study, we showed that HC significantly decreased urinary (Na/K) ratio, the FC had a similar but delayed and less severe effect, and the effect of the two drugs was additive (Laviolle & al., 2010).

In order to modelize only the specific effect of the two drugs (FC and HC), the effect of endogenous cortisol on the same pharmacodynamics response (urinary Na /k ratio), must be taken into account in the PK-PD model.

Cortisol Dynamics

Under normal physiological condition, endogenous cortisol concentration (C_{en}) in the blood follow a circadian-episodic profile which can be described by a turnover model with a first-order elimination rate constant (k_{out}), using the following differential equation:

$$\frac{dC_{en}}{dt} = R_C(t) - k_e \cdot C_{en} \quad (6)$$

where $R_C(t)$ is the cortisol release rate. k_e is the first-order elimination rate constant. Since exogenous HC and endogenous cortisol are chemically identical, we assumed that k_e is the same as that of the administered HC ($k_e = \frac{CL_{HC}}{V_d}$).

Two straight lines, of which one is a negative slope, that describe the modulation of the release rate ($R_C(t)$) from the maximum release rate (R_{max}) at t_{max} to the minimum release rate at t_{min} and one straight line describing the increase in release rate from t_{min} to t_{max} are sufficient to describe the profile. The $R_C(t)$ from time t_{max} to t_{min} is given by the following equation:

$$R_C(t) = \frac{R_{max} \cdot t}{V_d \cdot (t_{max} - t_{min} - 24)} - \frac{R_{max} \cdot t_{min}}{V_d \cdot (t_{max} - t_{min} - 24)} \quad (7)$$

where V_d is the cortisol volume of distribution assumed to be the same as that of the administered HC.

For the time between t_{min} and t_{max} , $R_C(t)$ increases linearly as follows:

$$R_C(t) = \frac{R_{max} \cdot t}{V_d \cdot (t_{max} - t_{min})} - \frac{R_{max} \cdot t_{min}}{V_d \cdot (t_{max} - t_{min})} \quad (8)$$

The values of t_{min} and t_{max} were fixed as described in the original derivation (18): $t_{min} = 10.45$ pm and $t_{max} = 4.45$ am. R_{max} was estimated in the model.

Since the concentrations of endogenous cortisol were not measured in our study, we predicted these concentrations and we estimated parameters of cortisol cycle indirectly from the achieved effects, especially during the placebo administration.

Cortisol suppression

The inhibitory effect of HC on cortisol secretion can be characterized by the following equation:

$$\frac{dC_{en}}{dt} = R_C(t) \cdot \left(1 - \frac{C_{HC}}{IC_{in,50} + C_{HC}}\right) - k_e \cdot C_{en} \quad (9)$$

where C_{HC} is the HC concentration and $IC_{in,50}$ is the concentration of HC that produces 50% of maximum inhibitory effect on cortisol secretion. The effect of FC on endogenous cortisol has not been taken into account in the PK-PD model. Indeed, content of the low dose (50 µg) and for the sake of parsimony of the model, we assumed that FC has a negligible suppressive effect on cortisol.

Drug interactions modeling

The equation of Greco (19) was in our view best suited to describe the pharmacodynamics interactions between FC and HC. The observations made in the previous study (Laviolle &

al., 2010) showed that this interaction was additive type ($\alpha = 0$ in the Greco formula). The endogenous cortisol was assumed to have the same pharmacodynamics effect that the administered HC. Greco equation in the case of an additive interaction is written as follows:

$$IN = 1 - I_{max} \times \frac{\left(\frac{C_f}{IC_{50,f}} + \frac{C_h + C_{en}}{IC_{50,h}} \right)^{hill}}{1 + \left(\frac{C_f}{IC_{50,f}} + \frac{C_h + C_{en}}{IC_{50,h}} \right)^{hill}} \quad (10)$$

where IN is the drug effect; I_{max} is the maximum inhibitory effect on response (urinary Na/K ratio); C_f , C_h and C_{en} are the total serum concentrations of corticosteroids, C_f for FC, C_h for HC and C_{en} for endogenous cortisol, respectively; IC_{50} represents the drug concentration producing 50% of I_{max} , $IC_{50,f}$ for FC and $IC_{50,h}$ for HC and endogenous cortisol; $hill$ is the Hill-factor characterizing the steepness of the concentration-effect relationship. FC and HC concentrations were fixed to 0 when the placebo data were analyzed. A delay between plasma concentrations and pharmacodynamics response was observed for both treatments. This phenomenon is characterized by a hysteresis loop which implies that the pharmacodynamics response cannot be related directly to plasma concentrations. In order to take account of this delay, an indirect pharmacodynamics response model was used. Indirect responses need time for their elaboration because of processes such as inhibition of factors controlling the measured effects (mediator). The response variable (R) is directly and immediately proportional to the concentration of a mediator (Figure I).

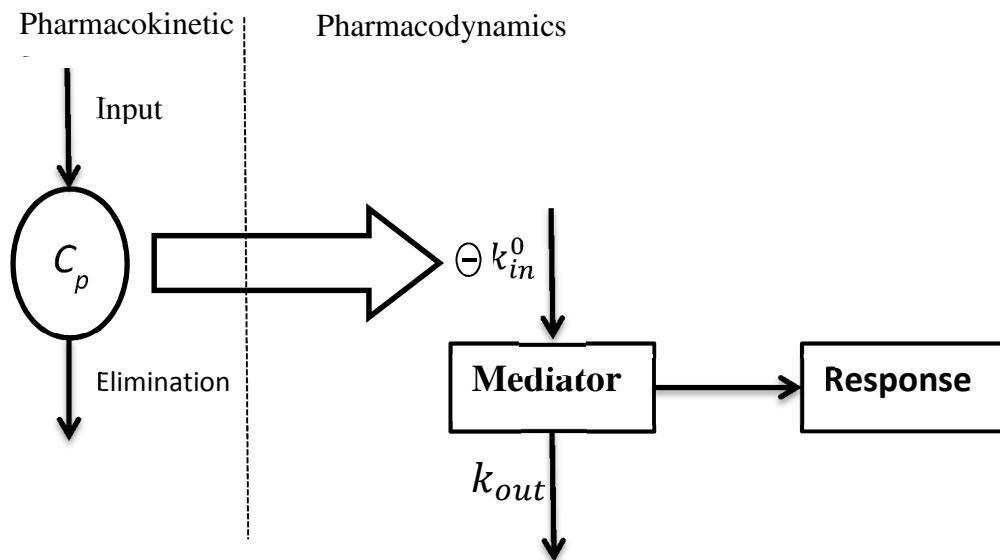


Figure I: Indirect response model. Indirect modulation of the response by inhibiting the production process (zero-order production rate constant k_{in}^0). k_{out} : First-order degradation rate constant. C_p : Plasma concentration of drug.

The rate of change of the response (R) over time with no drug present can be described as:

$$\frac{dR}{dt} = k_{in}^0 - k_{out} \times R \quad (11)$$

Where k_{in}^0 represents the apparent zero-order rate constant for production of the response; k_{out} defines the first-order rate constant for loss of the response; and R is assumed to be stationary with an initial value of $R_0 (=k_{in}^0/k_{out})$.

Drug can affect either k_{in}^0 or k_{out} . However, in our case we assumed that each of the drugs FC, HC and endogenous cortisol have an inhibitory effect only on k_{in}^0 according to:

$$\frac{dR}{dt} = k_{in}^0 \times IN - k_{out} \times R \quad (12)$$

Model validation

Goodness-of-fit (GOF) of final models was evaluated using a graphic approach. By visual examination of Visual Predictive Checks (VPC), plots of observed data versus predicted ones and Normalized Prediction Distribution Error (NPDE) versus time. The simulated PK or PD parameters were randomly sampled from their respective estimated distribution, and serum concentrations or PD responses were calculated based on the sampled parameter values and residual variability. A thousand simulations were performed, and the 80% confidence intervals (i.e., 10th and 90th percentiles) computed from the simulated PK or PD profiles were derived for each statistic (i.e., the median and the 10th and the 90th percentiles) and compared with the median and the 10th and 90th percentiles of the observed profiles. The predictive performance of the final model was considered acceptable if the majority of original data points were contained inside the predicted confidence intervals, with no significant systematic deviation between simulated and observed data. NPDE was built from the percentile derived from VPC prediction. The plot of NPDE takes into account the full predictive distribution of each individual observation.

Results

PK model

The comparison of the Objective Function Values (OFV) of different structural and residual models tested is described in Table I for FC and in Table II for HC. Evaluation of OFV against a χ^2 distribution indicates that FC concentrations were best described by a one-compartmental model with first-order oral absorption and first-order elimination. This model was parameterized in terms of apparent clearance (CL/F; L/h), apparent volume of distribution (V/F; L) and first-order absorption rate constant (Ka; h⁻¹). A proportional model was selected to describe the residual variability. Similarly for HC, a one-compartmental

model with bolus input and first-order elimination was selected. However, a combined residual error model was selected for this drug.

Final PK parameter estimates, inter-individual variability, inter-occasion variability and residual variability were presented in Table III for FC and in Table VI for HC. All were reliably estimated, as reflected by the small RSEs from Fisher Information Matrix. For FC, the mean population PK parameter estimations in our study were: CL/F, 40.8 L/h; V/F, 82.4 L, and Ka 0.43 h⁻¹. Since the variability of CL/F was very low, the inter-individual variability was not estimated and was taken as zero. However, the inter-occasion variability was estimated only on CL/F. For HC, the mean population PK parameter estimations were: CL, 30 L/h, and V 85.5 L. The inter-occasion variability was estimated on each of CL and V.

The plasma half-life was estimated at 1.4 h (IC_{95%} [0.8 ; 2.11]) for FC and 2.07 h (IC_{95%} [1.78 ; 2.4]) for HC. The AUC_{0-∞} was estimated at 1.22 µg.h.L⁻¹ (IC_{95%}[1.12 ; 1.34]) for FC and 1700.6 µg.h.L⁻¹ (IC_{95%}[1572.3 ; 1851.8]) for HC.

The TRT covariate was not included in our final model because no significant effect of this covariate on the PK parameters of the FC and HC was found.

PD model

The final PD parameter estimates are summarized in Table V. All were reliably estimated, as reflected also by the small RSEs from Fisher Information Matrix. The population mean of drug producing 50% maximal inhibition of urinary Na / K ratio (IC₅₀) was estimated at 0.078 µg/L for FC and 32 µg/L for HC. A large inter-individual variability of IC_{50,FC} was estimated (80%). The inter-individual variability of k_{in}^0 was not estimated and was taken as zero because it was very low. Several values of I_{max} and *hill* factor were investigated and 1 was for both parameters the value which provides a better fit for the model.

Concerning endogenous cortisol, the maximum release rate (R_{max}) was estimated at 1680 µg.L⁻¹.h⁻¹. A shift was found between the theoretical and the observed cycle of endogenous cortisol. This shift is represented in the PD model by a parameter (S) which was estimated at 3.18 h. In other words, t_{min} and t_{max} which defining the cycle are reduced by 3.18 h from the values used by Derendorf & al (18). The concentration of exogenous HC necessary to achieve 50% of maximum suppression of endogenous cortisol was estimated at 7.7 µg/L. Only proportional residual error was included in the final model given that the model did not improve by including additive residual error.

Model validation

Goodness-of-fit plots for each PK or PD final models are presented in Figures from 1 to 6. Models adequately described the observations as shown by the plots of observations versus population and individual predictions. Moreover, the VPC and NPDE plots presented in Figure 2, 4 and 6 indicate a good predictive performance of those models.

Discussion

In this study, the pharmacokinetics of FC and HC was studied after alone administration or in combination, in healthy volunteers. We found that FC concentrations were best described by a one-compartmental model with first-order oral absorption and first-order elimination. Similarly for HC, concentrations were best described by a one-compartmental model in accordance with previously published studies. An integrated PK/PD model of FC and HC was also developed to describe the relationship between plasma concentrations of FC and/or HC and urinary Na / k ratio inhibition. To our knowledge, this is the first study using a population approach to link FC and HC plasma concentrations to urinary Na / k ratio.

There is currently very little study on the pharmacokinetics of FC in humans. In the study by Vogt et al. (10), the PK parameters were estimated using a non-population approach and with a small number of included subjects (5 healthy volunteers). The plasma half-life was estimated to 0.5 h after intravenous administration of 100 µg of FC. In the study performed by Mitsky et al. (20), also using a non-population approach and radioimmunoassay for FC dosing, the plasma half-life was estimated to 3.6 h for different orally doses from 200 µg to 2 mg. In our study the PK of the FC was studied in 12 healthy volunteers after administration alone and in combination with HC. In addition, plasma concentrations were measured by a robust method in LC-MS/MS with atmospheric pressure chemical ionization recently developed by Ribot et al. (15) that allows detection and sensitive quantification of very low concentrations of corticosteroids in plasma. Finally, in our study the PK parameters were estimated using a population approach (Nonlinear mixed effects modeling).

Since no reference intravenous data were available, the PK model of FC was parameterized as apparent parameters. The apparent clearance was estimated to 40.8 L/h and the apparent volume of distribution to 82.4 L. The plasma half-life was estimated to 1.4 h.

However for HC, the PK has been widely described in the literature. Our results were in a good agreement with previously reported studies (21)(22)(23)(24). The clearance was estimated to 30 L/h and the volume of distribution to 85.5 L. The plasma half-life was estimated approximately to 2 h.

Concerning the TRT covariate (alone administration or in combination), our study showed no significant effect of this covariate on the pharmacokinetic parameters. In other words, the concomitant administration of FC and SC had not lead significant PK interaction between the two molecules.

An integrated mechanistic population PK/PD model was developed that describes evolution of urinary Na/K ratio in healthy volunteers treated with FC and HC. An interactive function was adapted to evaluate the joint effect of endogenous cortisol and exogenous corticosteroids (Eq. 10). Since endogenous cortisol concentrations were not assayed in this study, predictions of these concentrations indirectly from effects were performed (Eq. 6). Furthermore, this model takes into account also the suppressive effect of exogenous HC on the secretion of endogenous cortisol (Eq. 9). Finally, it was necessary to account for a signal transduction delay (Eq. 12) for inhibition of urinary Na/K ratio.

The total drug concentration producing 50% of maximal inhibition of urinary Na / K ratio was estimated to 0.078 $\mu\text{g/L}$ for FC and to 32 $\mu\text{g/L}$ for HC. The mineralocorticoid effect of FC was approximately 400 times greater than that of HC. This is in accordance with previously published studies. Indeed, with respect to mineralocorticoid potency, 20 mg of HC is supposed to be equivalent to 0.05 mg of FC (25)(26). Concerning endogenous cortisol, the maximum release rate of secretion (R_{max}) was estimated to 1972 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ by Rohatagi et al. (27). Our study showed a similar result to what has been reported ($R_{\text{max}} = 1680 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). The plasma concentration of HC producing 50% of maximal suppression of endogenous cortisol release rate ($IC_{in,50}$) was estimated in our study to 7.7 $\mu\text{g/L}$. This result is also in accordance with the value (5.52 $\mu\text{g/L}$) reported by Hong et al. (28). For the FC, we have assumed that its suppressive effect on endogenous cortisol was negligible since the administered dose was low. Indeed, with a dose of FC 10 times higher than ours (500 μg), Otte et al. (29) have shown that after oral administration, FC has decreased the concentration of endogenous cortisol by no more than 20 $\mu\text{g/L}$ after 5 h compared with placebo.

The cellular mechanism of FC action is that of mineralocorticoids; it acts on the epithelial cells of distal portions of the nephron, bowel and colon, penetrates by passive diffusion into the cytosol and binds an activated receptor; the complex that formed migrates to the nucleus and binds to mineralocorticoids response elements located on promoters of genes under control. This results in activation of protein synthesis amending cell permeability for sodium by increasing the expression of the epithelial Na^+ channel (ENaC) (30) and the Na^+ / K^+ ATPase pump (31) found respectively on the apical and basolateral membrane of the distal epithelial cells. This intracellular mechanism of action partly explains the delay observed between the level of plasma FC concentrations and the appearance of the effect. Analogue of aldosterone, FC reduced excretion of sodium and

increases excretion of potassium and H⁺ ion. HC has the same mechanism of mineralocorticoid action but with less important response than that induced by the FC at equal doses. Furthermore, exogenous corticosteroids can suppress the release of endogenous cortisol by negative feedback mechanism (32).

Our study showed that HC at 50 mg had a more rapid mineralocorticoid activity than FC at 50 µg, as demonstrated by more rapid decreases of urinary Na / K ratio when HC was administered. The difference in the kinetics of effects could possibly result from the difference routes of administration of the two treatments, the earlier effect being observed with the drug administered intravenously, the relay being taken by the drug administered orally.

There are limitations to this study. First, concentrations of endogenous cortisol were not measured, which forced us to estimate the R_{max} indirectly from responses (ratio Na / K urinary) obtained during placebo administration. However, in the study of Rohatgi et al. the parameters R_{max} , t_{max} and t_{min} that define precisely the cycle of cortisol have been estimated in a first step by modeling endogenous cortisol concentrations in the absence of treatment. Then to study the PK-PD relationship, these parameters have been fixed in the model to values previously estimated. Second, the effect of FC on endogenous cortisol has not been taken into account in the PK-PD model. Indeed, content of the low dose (50 µg) and for the sake of parsimony of the model, we assumed that FC has a negligible suppressive effect on cortisol. Finally, the infusion of 2 L of saline (NaCl 0.9%) 2 hours before administration of the treatment could have an effect on the parameters. In fact, the urinary excretion of Na⁺ is increased during the first hours after the end of infusion. This probably explains the peak of urinary Na /K ratio observed at T1 for the 4 treatments. However, this effect disappears very rapidly after T1.

Currently, another study on the FC is underway by our team. As part of this study, the FC is administered alone and with repeated doses in healthy volunteers. Several dose levels will be progressively tested (50, 100, 200 and 400 µg) that will determine if the kinetics of FC is linear. Furthermore, the concentrations of endogenous cortisol versus time in the plasma will be measured simultaneously with those of the FC. These measures will permit to better visualize the suppressive effect of FC on endogenous cortisol and to correctly estimate parameters related to this effect notably after heavy dose of FC. Finally, the volunteers included in this study do not receive infusion of saline (2 L of 0.9% NaCl), in contrast to what has been previously done. The results that will come out of this study will allow us to compare our model already built and to do external validation.

Conclusion

Our study allowed characterizing the pharmacokinetics of FC according to a population modeling approach, something that in our opinion has never been done before. FC is rapidly absorbed after oral administration. The peak of plasma concentrations was observed after 2 h. Its elimination is also fast. The plasma half-life was estimated at 1.4 h. The pharmacokinetics of HC administered intravenously alone or in combination with FC was also characterized using the same approach. The half-life of elimination was in the same order of magnitude as that of the FC (ie d. 2 h). A PK-PD model was then constructed, connecting the pharmacokinetics of the two molecules to the pharmacodynamics effect (ratio Na / K urinary). At equal doses, the mineralocorticoid effect of FC is clearly higher than that of the HC. Indeed, the IC_{50} which represents the plasma concentration of corticosteroid causing 50% of maximum mineralocorticoid effect, was estimated to be worth about 400 times lower for the FC (0.078 $\mu\text{g/L}$) compared to HC (32 $\mu\text{g/L}$).

Table I. List of structural PK Models with their Respective Objective Function Values for FC

N°	Structural model	No. of parameters	Residual error	OFV	BIC	Reference Model	p-value*
(1)	1Cp	3	Additive	-279.4	-265.4	-	-
(2)	2Cp	5	Additive	-278.6	-256.6	N°1	NS
(3)	1Cp	3	Proportional	-311	-297	N°1	-
(4)	1Cp	3	Combined	-310.6	-294.6	N°3	-

1Cp: One-compartmental model parameterized in terms of apparent clearance (CL/F; L/h), apparent volume of distribution (V/F; L) and first-order absorption rate constant (Ka; h⁻¹)
 OFV: Objective Function Value (OFV = -2 x log-likelihood)
 *p-value of likelihood ratio test according to χ^2 distribution between two nested models
 For instance : $(OFV_{model1} - OFV_{model2}) \sim \chi^2$ with n degree of freedom (n : difference in the number of parameters between the two models)
 NS: the χ^2 test was not significant
 BIC: Bayesian Information Criteria was used for selecting the residual error model

Table II. List of structural PK Models with their Respective Objective Function Values for HC

N°	Structural model	No. of parameters	Residual error	OFV	BIC	Reference Model	p-value*
(1)	1Cp	2	Additive	2149	2159	-	-
(2)	2Cp	4	Additive	2149	2167	N°1	NS
(3)	1Cp	2	Proportional	2182	2192	N°1	-
(4)	1Cp	2	Combined	2105	2117	N°3	-

1Cp: One-compartmental model parameterized in terms of clearance (CL; L/h), volume of distribution (V; L).
 OFV: Objective Function Value (OFV = -2 x log-likelihood)
 *p-value of likelihood ratio test according to χ^2 distribution between two nested models
 For instance : $(OFV_{model1} - OFV_{model2}) \sim \chi^2$ with n degree of freedom (n : difference in the number of parameters between the two models)
 NS: the χ^2 test was not significant
 BIC: Bayesian Information Criteria was used for selecting the residual error model

Table III. Parameter Estimates from the Final PK model for FC

Parameter	Estimate	RSE %	IC 95%
Fixed effects			
K_a (h^{-1})	0.43	37	
V/F (L)	82.4	38	
CL/F (L/h)	40.8	9	
Interindividual variability			
ω_{K_a} (%)	17	0	
$\omega_{V/F}$ (%)	25	5	
$\omega_{CL/F}$ (%)	0 fixed	-	
Inter-occasion variability			
$\gamma_{CL/F}$ (%)	37	8	
Residual parameter			
σ_{prop}	0.34	3	
$T_{1/2}$ (h)	1.4	-	[0.8 ; 2.11]
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$)	1.22	-	[1.12 ; 1.34]
σ_{prop} : Variance parameter of proportional residual model			
$C_{ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \times \varepsilon_{prop,ij} \quad \varepsilon \sim N(0, \sigma_{prop})$.			
$T_{1/2}$: Time to plasma half-life. $AUC_{0-\infty}$: Area under the plasma concentration curve of FC from t_0 to t_{∞} .			

Table VI. Parameter Estimates from the Final PK model for Hydrocortisone

Parameter	Estimate	RSE %	IC 95%
Fixed effects			
V (L)	85.5	7	
CL (L.h ⁻¹)	30	8	
Interindividual variability			
ω_V (%)	15	53	
ω_{CL} (%)	21	34	
Inter-occasion variability			
γ_V (%)	22	26	
γ_{CL} (%)	21	25	
Residual parameter			
σ_{add}	20	7	
σ_{prop}	0.04	14	
T_{1/2} (h)	2.07	-	[1.78 ; 2.4]
AUC_{0-∞} (μg.h.L⁻¹)	1700.6	-	[1572.3 ; 1851.8]
σ_{add} et σ_{prop} : Variance parameters of Combined residual model $C_{ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \times \varepsilon_{prop,ij} + \varepsilon_{add,ij}$ $\varepsilon_{add} \sim N(0, \sigma_{add})$ and $\varepsilon_{prop} \sim N(0, \sigma_{prop})$ T _{1/2} : Time to plasma half-life. AUC _{0-∞} : Area under the plasma concentration curve of HC from t ₀ to t _∞ .			

Table V. Parameter Estimates from the Final PD model

Parameters	Estimates	RSE%
Fixed effects		
IC _{50, FC} (μg/L)	0.078	29
IC _{50, HC} (μg/L)	32	17
R _{max} (μg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1680	7
k _{in} ⁰	3.5	2
K _{out}	0.38	7
IC _{in,50} (μg/L)	7.7	19
S (h)	3.18	1
I _{max}	1 fixed	-
Hill	1 fixed	-
Interindividual variability		
ω _{IC_{50, FC}} (%)	80	32
ω _{IC_{50, HC}} (%)	36	36
ω _{K_{in}} (%)	0 fixed	-
ω _{K_{out}} (%)	12	43
Residual parameter		
σ _{prop}	0.4	4
IC₅₀: represents the drug concentration producing 50% of maximum inhibition (<i>I_{max}</i>). <i>k_{in}⁰</i>: represents the apparent zero-order rate constant for production of the response. <i>k_{out}</i>: defines the first-order rate constant for loss of the response. Hill: is the Hill-factor. <i>R_{max}</i>: is the maximum release rate of endogenous cortisol. IC_{in, 50}: is the concentration of exogenous HC necessary to achieve 50% of maximum suppression of endogenous cortisol. D: is time shift between observed cortisol cycle and theoretical cycle. σ_{prop}: Variance parameter of proportional residual model $C_{ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \times \varepsilon_{prop,ij} \quad \varepsilon \sim N(0, \sigma_{prop})$.		

Legends to Figures

Figure 1. Goodness-of-fit plots for the final PK model of FC: (a) Observations versus population predicted values. (b) Observations versus individual predicted values. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points. LOWESS smoothed curves are plotted as blue curves.

Figure 2. (a) Visual Predictive Check (VPC) and (b) Normalized Prediction Distribution Error (NPDE) versus time for the final PK model of Fc. VPC details: The shaded blue and pink areas represent 90% prediction intervals from the corresponding percentiles calculated from simulated data. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points.

Figure 3. Goodness-of-fit plots for the final PK model of HC: (a) Observations versus population predicted values. (b) Observations versus individual predicted values. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points. LOWESS smoothed curves are plotted as blue curves.

Figure 4. (a) Visual Predictive Check (VPC) and (b) Normalized Prediction Distribution Error (NPDE) versus time for the final PK model of Hc. VPC details: The shaded blue and pink areas represent 90% prediction intervals from the corresponding percentiles calculated from simulated data. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points.

Figure 5. Goodness-of-fit plots for the final PD model: (a) Observations versus population predicted values. (b) Observations versus individual predicted values. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points. LOWESS smoothed curves are plotted as blue curves.

Figure 6. (a) Visual Predictive Check (VPC) according to the different treatments and (b) Normalized Prediction Distribution Error (NPDE) versus time for the final PD model. VPC details: The shaded blue and pink areas represent 90% prediction intervals from the corresponding percentiles calculated from simulated data. Observations are plotted as blue points and BQL data as red points.

Figure 1.

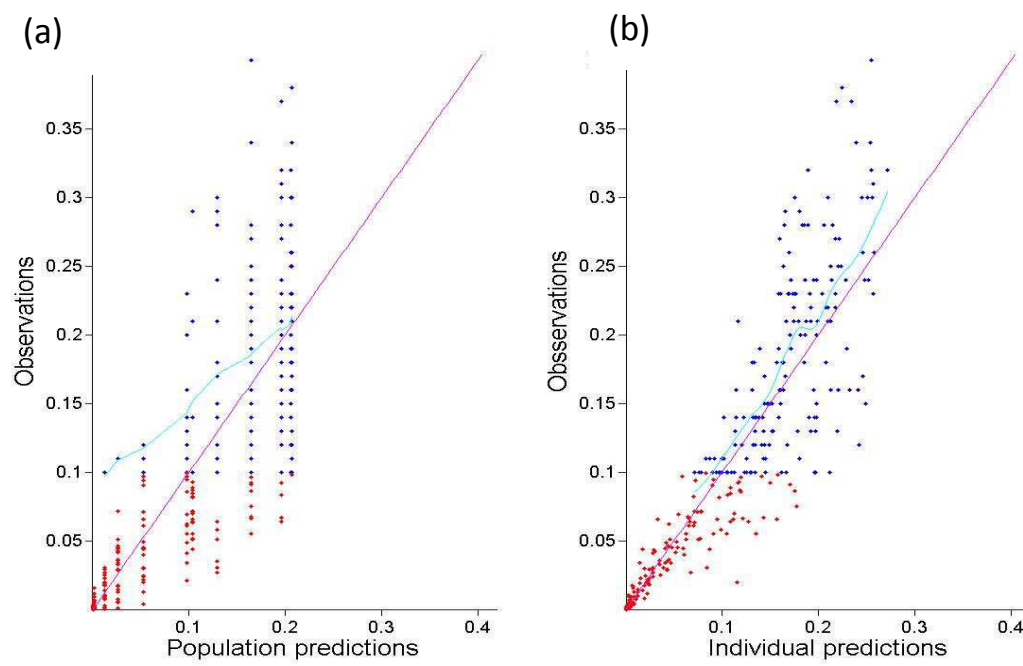


Figure 2.

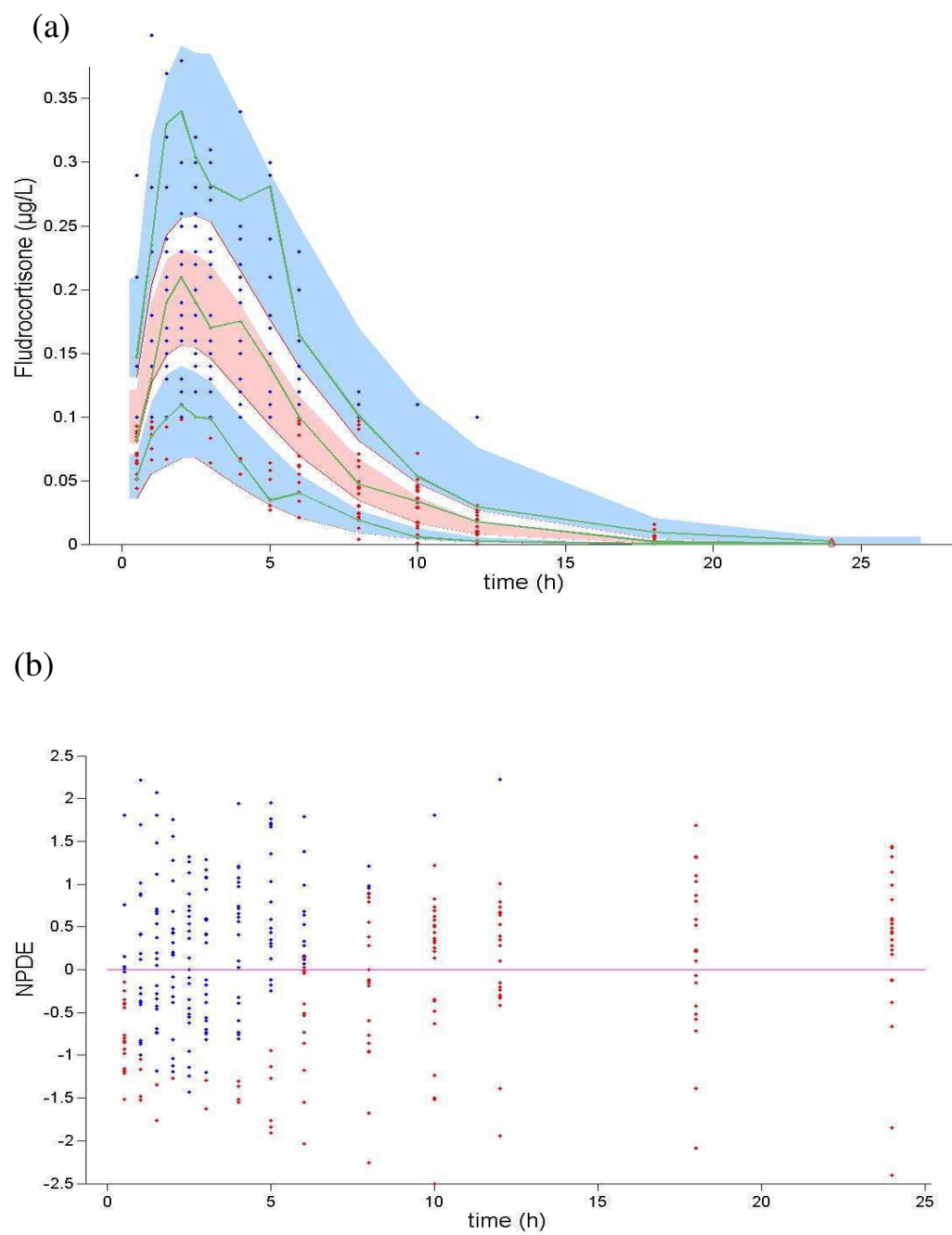


Figure 3.

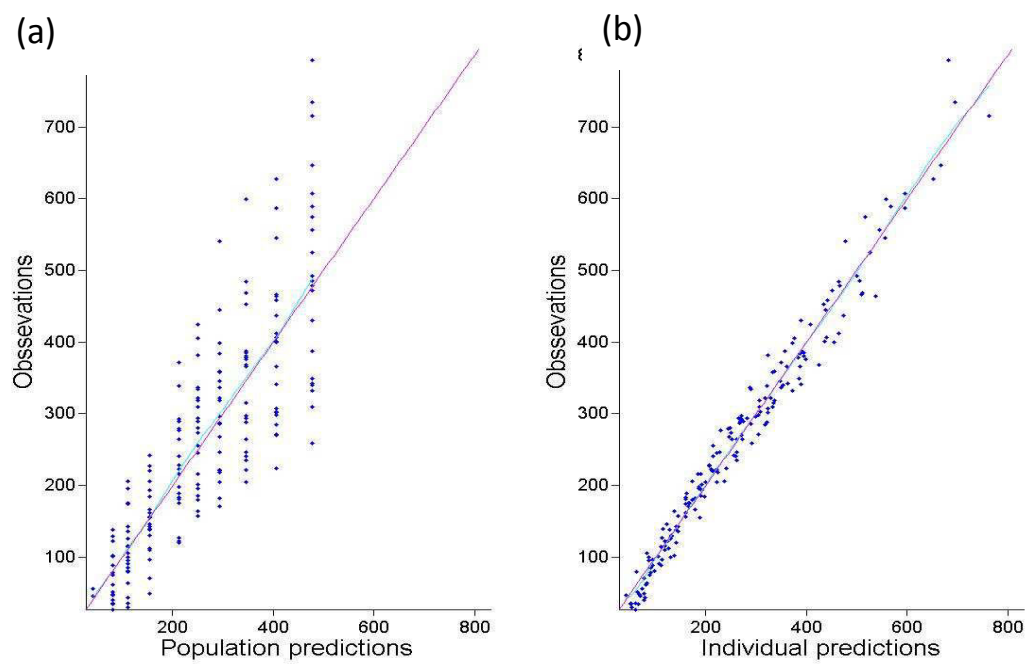


Figure 4.

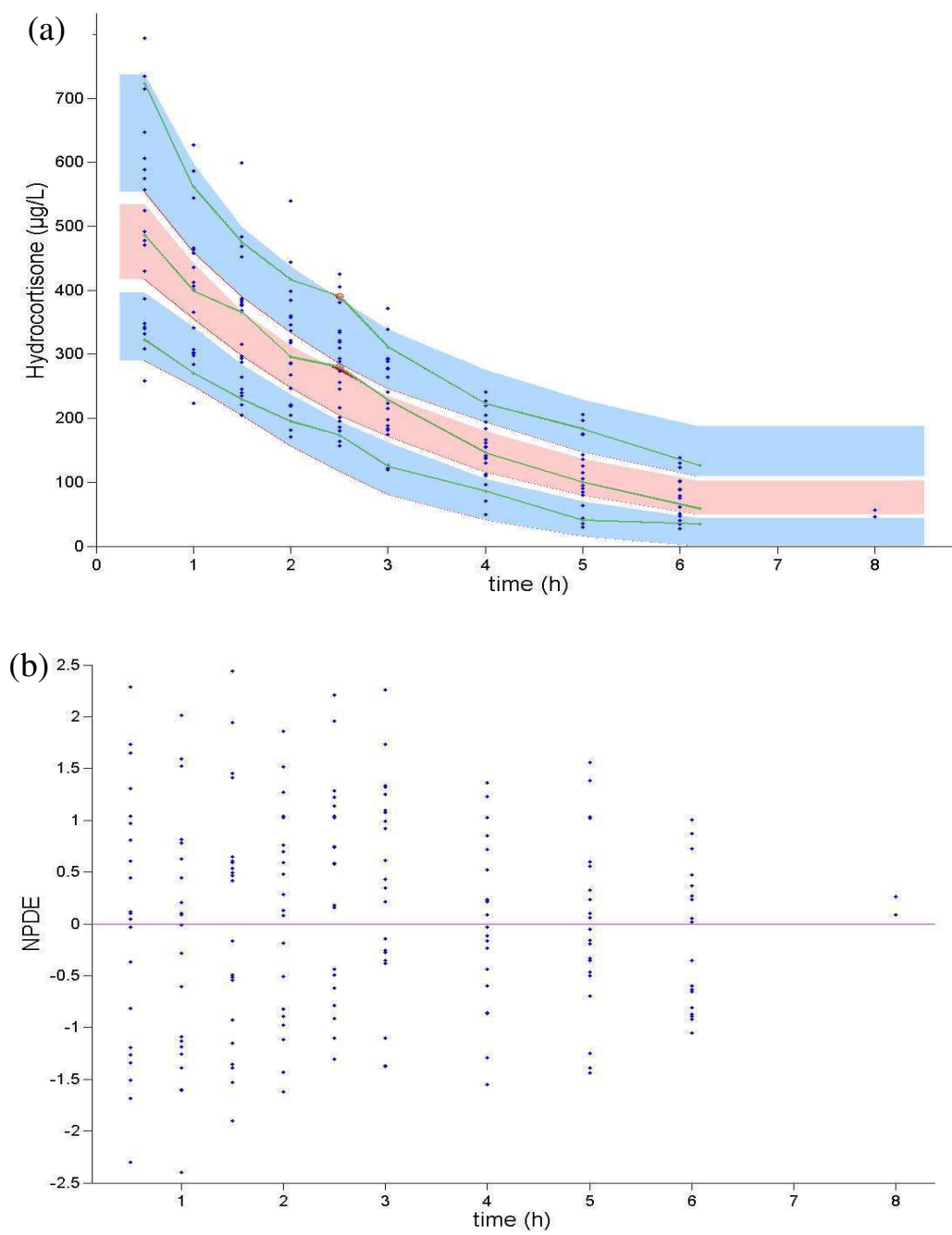


Figure 5.

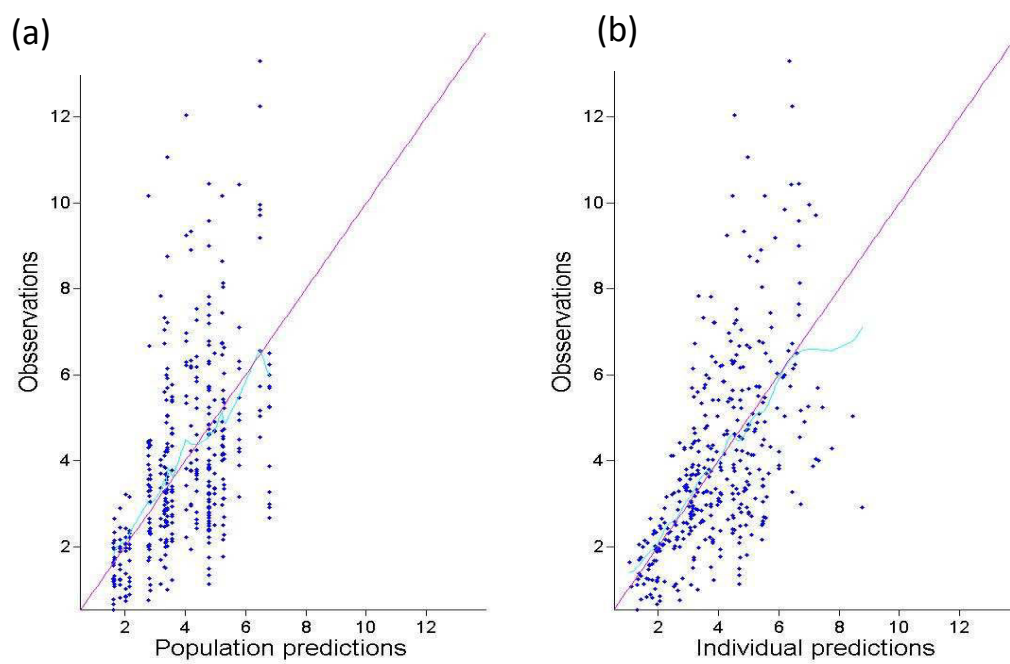
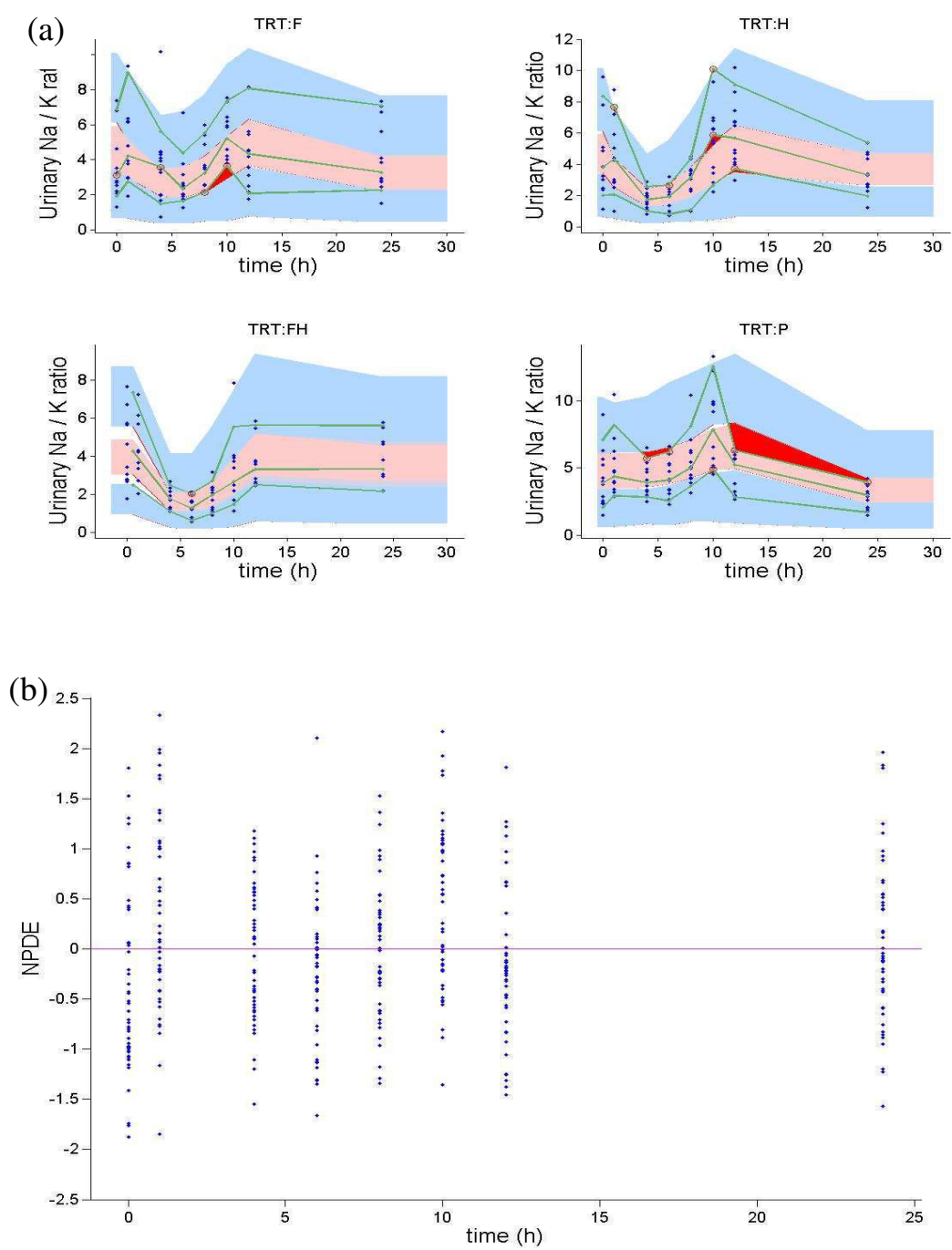


Figure 6.



References

1. Reznik Y. [Treatment of adrenal deficiency: To what issues? By which therapeutic means?]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 2014 Apr;43(4 Pt 1):438–43.
2. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2004 Aug 28;329(7464):480.
3. Annane D, Bellissant E, Bollaert P-E, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA J Am Med Assoc*. 2009 Jun 10;301(22):2362–75.
4. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert P-E, François B, Korach J-M, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA J Am Med Assoc*. 2002 Aug 21;288(7):862–71.
5. Filipsson H, Monson JP, Koltowska-Häggström M, Mattsson A, Johannsson G. The impact of glucocorticoid replacement regimens on metabolic outcome and comorbidity in hypopituitary patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):3954–61.
6. Whitworth JA, Butkus A, Coghlan JP, Denton DA, Mills EH, Spence CD, et al. 9- α -Fluorocortisol-induced hypertension: a review. *J Hypertens*. 1986 Apr;4(2):133–9.
7. Laviolle B, Annane D, Fougere C, Bellissant E. Gluco- and mineralocorticoid biological effects of a 7-day treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone in septic shock. *Intensive Care Med*. 2012 Aug;38(8):1306–14.
8. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000 Jul;55(7):603–13.
9. Laviolle B, Le Maguet P, Verdier M-C, Massart C, Donal E, Lainé F, et al. Biological and Hemodynamic Effects of Low Doses of Fludrocortisone and Hydrocortisone, Alone or in Combination, in Healthy Volunteers With Hypoaldosteronism. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Aug;88(2):183–90.
10. Vogt W, Fischer I, Ebenroth S, Appel S, Knedel M, Lucker PW, et al. [Pharmacokinetics of 9 -fluorhydrocortisone]. *Arzneimittelforschung*. 1971 Aug;21(8):Suppl:1133–43.
11. Pharmaceutical Codex 11th Edn. Pharmaceutical Society of Great Britain. London: Pharmaceutical Press. 1979;363.
12. Wenzl H, Garbe A, Nowak H. [Studies on pharmacokinetics of 9 -fluorhydrocortisone in the rat, guinea pig and dog]. *Arzneimittelforschung*. 1971 Aug;21(8):Suppl:1115–22.
13. Campen TJ, Vaughn DA, Fanestil DD. Mineralo- and glucocorticoid effects on renal excretion of electrolytes. *Pflug Arch Eur J Physiol*. 1983 Oct;399(2):93–101.
14. Horký K, Srámková J, Gregorová I, Dvůráková J. Humoral and renal response to acute volume loading in patients with essential hypertension. *Exp Clin Endocrinol*. 1990 Aug;95(3):361–8.
15. Ribot M, Polito A, Grassin-Delye S, Annane D, Alvarez J-C. Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2013 May;420:109–13.
16. Chan PLS, Jacqmin P, Lavielle M, McFadyen L, Weatherley B. The use of the SAEM algorithm in MONOLIX software for estimation of population pharmacokinetic-pharmacodynamic-viral dynamics parameters of maraviroc in asymptomatic HIV subjects. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2011 Feb;38(1):41–61.
17. Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001 Oct;28(5):481–504.
18. Derendorf H, Hochhaus G, Meibohm B, Möllmann H, Barth J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Apr;101(4 Pt 2):S440–6.
19. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev*. 1995 Jun 1;47(2):331–85.

20. Mitsky VP, Workman RJ, Nicholson WE, Vernikos J, Robertson RM, Robertson D. A sensitive radioimmunoassay for fludrocortisone in human plasma. *Steroids*. 1994 Sep;59(9):555–8.
21. Tromm A, Möllmann H, Barth J, Hochhaus G, Krieg M, Bigalke C, et al. Pharmacokinetics and rectal bioavailability of hydrocortisone acetate after single and multiple administration in healthy subjects and patients. *J Clin Pharmacol*. 2001 May;41(5):536–41.
22. Simon N, Castinetti F, Ouliac F, Lesavre N, Brue T, Oliver C. Pharmacokinetic evidence for suboptimal treatment of adrenal insufficiency with currently available hydrocortisone tablets. *Clin Pharmacokinet*. 2010 Jul;49(7):455–63.
23. Derendorf H, Möllmann H, Barth J, Möllmann C, Tunn S, Krieg M. Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of Hydrocortisone. *J Clin Pharmacol*. 1991 May 1;31(5):473–6.
24. Toothaker RD, Craig WA, Welling PG. Effect of dose size on the pharmacokinetics of oral hydrocortisone suspension. *J Pharm Sci*. 1982 Oct;71(10):1182–5.
25. Arlt W, Allolio B. Adrenal insufficiency. *Lancet*. 2003 May 31;361(9372):1881–93.
26. Oelkers W, Diederich S, Bähr V. Diagnosis and therapy surveillance in Addison's disease: rapid adrenocorticotropin (ACTH) test and measurement of plasma ACTH, renin activity, and aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Jul;75(1):259–64.
27. Rohatagi S, Bye A, Mackie AE, Derendorf H. Mathematical modeling of cortisol circadian rhythm and cortisol suppression. *Eur J Pharm Sci*. 1996 Nov;4(6):341–50.
28. Hong Y, Mager DE, Blum RA, Jusko WJ. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of systemic corticosteroid inhibition of whole blood lymphocytes: modeling interoccasion pharmacodynamic variability. *Pharm Res*. 2007 Jun;24(6):1088–97.
29. Otte C, Jahn H, Yassouridis A, Arlt J, Stober N, Maass P, et al. The mineralocorticoid receptor agonist, fludrocortisone, inhibits pituitary-adrenal activity in humans after pre-treatment with metyrapone. *Life Sci*. 2003 Aug 22;73(14):1835–45.
30. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994 Feb 3;367(6462):463–7.
31. Horisberger JD, Lemas V, Kraehenbühl JP, Rossier BC. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:565–84.
32. Kong AN, Ludwig EA, Slaughter RL, DiStefano PM, DeMasi J, Middleton E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic modeling of direct suppression effects of methylprednisolone on serum cortisol and blood histamine in human subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1989 Dec;46(6):616–28.

Conclusions

Il existe une grande variabilité des profils pharmacocinétiques observés chez les volontaires sains. La fludrocortisone a été décrite par un modèle mono-compartimental avec une élimination d'ordre 1. L'hydrocortisone a également été décrite par un modèle mono-compartimental. La demi-vie de la fludrocortisone a été estimée à 1,4 h (IC_{95%} [0.8 ; 2.11]) et celle de l'hydrocortisone a été estimée à 2,07 h. Les deux molécules ont montré un effet sur le ratio Na/K urinaire.

D. Publication numéro 4

Pharmacokinetic study of fludrocortisone in two models of septic mice

Mégane Ribot, Andrea Polito, Nouredine Hamitouche, Angelo Polito, Bruno Laviolle,
Djillali Annane, Jean-Claude Alvarez

(En cours d'écriture)

Introduction

Afin de compléter les données pharmacocinétiques/pharmacodynamiques établies chez l'humain, nous avons étudié la pharmacocinétique de la fludrocortisone chez la souris septique et saine à une dose plus élevée. Dans un article publié en juin 2014, une équipe a pu mettre en évidence que l'injection de fludrocortisone et d'hydrocortisone augmentait la pression sanguine et la réponse contractile des artères à la phényléphrine (Bruno Laviolle et al. 2014). L'importance de ces effets étant reliée à la dose de fludrocortisone et d'hydrocortisone administrée. Plus la dose était forte, plus l'effet était important. Le but de cette étude était d'établir des paramètres pharmacocinétiques dans un contexte sain et septique chez l'animal.

Tissue and plasma pharmacokinetics and distribution of fludrocortisone in two models of sepsis

**Mégane RIBOT¹, Nouredine Hamitouche², Angelo POLITO³, Djillali ANNANE⁴,
Bruno Laviolle², Jean-Claude ALVAREZ¹, Andrea POLITO⁴**

¹*Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R.Poincaré, 92380 Garches et Université Versailles Saint-Quentin (France).*

²*Department of Experimental and Clinical Pharmacology, University of Medicine, Rennes, France, INSERM 0203*

³ *Department of Cardiology, Bambino Gesù Children’s Hospital – Rome, Italy*

⁴*Service de réanimation, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R.Poincaré, 92380 Garches et Université Versailles Saint-Quentin (France).*

*Corresponding author :

Dr Andrea POLITO

Service de Réanimation

Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP

104, Boulevard R.Poincaré, 92380 Garches (France)

Tel: 33-1-47-10-77-82

email : andrea.polito@rpc.aphp.fr

1. Introduction

Fludrocortisone acetate is a synthetic mineralocorticoid given for related adrenocortical insufficiency in septic shock. This drug is given at low dosage (50 µg) to the intensive care patients (1). Even if the fludrocortisone acetate role is well known, the pharmacokinetics parameters of this molecule in mice are still incomplete. The aim of this present study is to determine tissue and plasma pharmacokinetics and distribution of fludrocortisone in two models of sepsis. The first model is an endotoxinemic model with LPS injection and the second is caecal and ligation puncture.

2. Material & methods

Chemicals and reagents

Oasis[®] HLB 1cc extraction cartridges were purchased from Waters (Montigny, France). Fludrocortisone (FC) base was purchased from Sigma Aldrich (St Quentin, France). Fludrocortisone-D2 (FD2), the internal standard solution was purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Hypersil Gold PFP column was obtained from Thermo Scientific (Les Ulis, France). Methanol was obtained from Prolabo (Fontenay sous bois, France). Formate buffer was prepared using ammonium formate and formic acid solution from Sigma. The water used is obtained from Millipore Direct-Q[®]. For i.v administration, fludrocortisone was diluted with glucose 5% solution to concentration of 2.5 µg/mL.

Animals

Male Swiss mice (18-20 g) were obtained from Janvier Labs (Le Genest St Isle, France). They were kept in an environmentally controlled breeding room for a week before starting the experiments and fed with standard laboratory food and water. Animal welfare and experimental procedures were strictly in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals and the ethical behaviour (directive 2010/63/UE).

Septic model

The LPS model was obtained by a single intraperitoneal injection of LPS (Sigma, Lipopolysaccharides from Escherichia coli 055:B5 purified by phenol extraction, ref L2880) at 75 mg/kg was performed in mice.

In the model CLP, sepsis was induced by caecal and ligation puncture as described previously (2)(3). Briefly, mice were anesthetized with xylazine (4.5 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) and after laparotomy, the cecum was ligated with a 3-0 silk tie and punctured with a 20-gauge needle at one site, followed by expression of a small amount of fecal material into the peritoneal cavity. After surgery, 1 ml of 0.9% saline was injected subcutaneously. No antibiotics were used, and mice were food-deprived but had free access to water postoperatively.

Procedure

Control and septic mice were injected at a single dose of 0.25 µg/mL of FC by tail vein. In septic mice, the administration of FC was performed 20 hours after LPS and CLP.

Résultats

Animals were euthanized by cervical dislocation at 0.5, 2, 15, 30, 60, 120 and 180 min and the blood sample was collected and centrifuged immediately at 14000 rpm for 10min. Heart, liver, brain, lung, kidney, spleen and brain samples were obtained and frozen at -80°C. Then the tissues were weight and homogenized in water (1 mg/mL).

Sample processing

Exactly 200 μ L of plasma was diluted in 800 μ L of water, 50 μ L of FD2 (FD2 at 0.1 mg/L) were added, and the entire solution was passed through Oasis[®] HLB 1cc extraction cartridges, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. After washing with 1 mL of water with 50 % of methanol and dried during 5 min, FC and its IS were eluted by 1 mL of dichloromethane. The eluent was evaporated to dryness under air. The residues were reconstituted in 50 μ L of starting mobile phase and 20 μ L was injected into Liquid Chromatography (LC) system connected to the mass spectrometer.

Sodium, potassium, and serum albumin were performed using a Siemens EXL.

Instrumentations and chromatographic conditions

Method was previously developed and validated (4).

Data analysis

A nonlinear regression modeling was used to analyze the PK data, using Berkeley Madonna software (version 8.3.18; University of California, Berkeley, CA, USA). The curve fitting algorithm in Berkeley Madonna is to minimize the root mean square (RMS) between predicted and experimental values. The goodness-of-fit was assessed by system convergence, least RMS and visual inspection.

Two types of models were used to describe the evolution of FC concentrations over time. The first consisted in a two-compartmental empirical model which was used to model only the plasma concentrations of FC in the three groups of mice. The second is a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK) used to model the concentrations of FC in the group of healthy mice, simultaneously in plasma and in various organs.

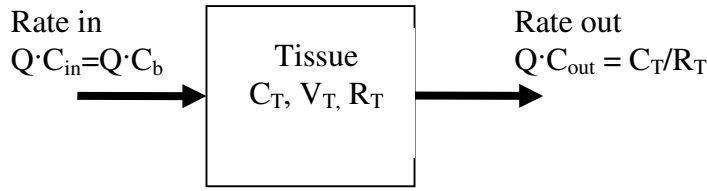
Two-compartmental model

The plasma concentration data in the three groups of mice were analysed by a two-compartment model with bolus i.v. input and first-order elimination (Fig. 1). The pharmacokinetic parameters, V_d (volume of distribution of central compartment), k_e (first-order elimination rate constant), k_{1-2} and k_{2-1} (the inter-compartmental distribution rates), AUC_{0-∞} (area under the concentration-time curve from zero to infinity) and $T_{1/2}$ (plasma elimination half-life) were calculated by the software.

PBPK model

A PBPK model was developed to describe the concentration-time profiles in different tissues. PBPK models are mathematical models derived from the anatomical and physiological structure of the organism studied (5). A perfusion rate-limited model was used to characterize the pharmacokinetics of drugs within the body in relation to blood flows, tissue volumes and partitioning coefficient. The whole body PBPK model was constructed as shown in Fig. 2. In

this model, the whole body of mice is composed of five tissue compartments and one blood compartment; a “rest-of-body” compartment is incorporated to represent all the unsampled tissues. For each individual organ, as the equation 1 shows, change in amount of drug in tissue is equal to the difference between rate in and rate out.



The mass-balance differential equations for well stirred organs (lung, heart, liver, spleen and kidney) were listed below:

$$V_{Tissue} \cdot \frac{dC_{Tissue}}{dt} = Q_{Tissue} \cdot \left(C_{Blood} - \frac{C_{Tissue}}{R_{Tissue}} \right) \quad (1)$$

where Q_{Tissue} represents organ blood flow rate, V_{Tissue} represents organ volume, C_{Blood} represents the input from arterial blood. For lung organ, the input is the output from blood: $Q_C \cdot C_{Blood}$ (Q_{Lung} is equal to the total cardiac output Q_C), and R_{Tissue} represents the partitioning coefficient.

The mass-balance differential equation in blood compartment was listed below:

$$V_{Blood} \cdot \frac{dC_{Blood}}{dt} = \sum \left(Q_{Tissue} \cdot \frac{C_{Tissue}}{R_{Tissue}} \right) - Q_C \cdot C_{Blood} - CL_T \cdot C_B \quad (2)$$

where V_B represents a total blood volume and Q_C the total cardiac output. CL_T represents the total body clearance of FC. All equations were solved simultaneously minimizing the root mean square (RMS) between predicted and experimental values.

Each physiological volumes and organ blood flow rates were obtained from the literature (6)(7) and listed in Table 1. However the partitioning coefficients since were specific to fludrocortisone they were estimated in the model. The mouse body weight (BW) was assumed to be 20 g.

3. Results and Discussion

Two-compartment model

The results showed that the plasma concentration-time curves of fludrocortisone fit into a non-linear regression modelling and are shown in Fig 1. The pharmacokinetics parameters are listed in Table 1 for all groups. The plasma concentration declined rapidly with a short half-life of 20.9 minutes for control mice, 35.4 minutes for LPS mice and 38.8 minutes for CLP mice. The difference of half-life in mice is significant between control mice and septic mice.

PBPK model

Concentrations of fludrocortisone determined at different time in various tissues of mice such as heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, were shown in Table 2. After intravenous injection

administration of fludrocortisone to mice, different levels of fludrocortisone were observed in most of tissues. All concentration-time curves of fludrocortisone in organs fit with PBPK model (Fig 2) and are shown in Fig 3. The most concentration of fludrocortisone were detected in liver, plasma and kidney, which suggested that fludrocortisone is metabolized in liver and is eliminated by kidney. Meanwhile, fludrocortisone was found in lowest concentrations in brain, heart, spleen and lung, which implied that the distribution of fludrocortisone was not depended on the blood flow or perfusion rate of the organ. The figure 4 shows the mean plasma and tissues concentration-time curve of fludrocortisone after i.v. administration of fludrocortisone in mice. The figure 5 shows the concentration of fludrocortisone in brain of all groups of mice. There is significant difference between the 3 groups of mice. This allows saying that the blood-brain barrier is altered by the systemic inflammation in mice model of sepsis. The sharing quotient (Q) is helpful to know the affinity of fludrocortisone with the different organs, compared to plasma. More the Q is big, more the affinity is high. These parameters allowed saying that fludrocortisone has good affinity with lung and liver but low affinity with spleen and heart (Table 2). The perfusion volume (V) suggests that Q is not link to the quantity of blood in all organs.

4. Conclusion

This report has evaluated the pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of fludrocortisone in mice. Following a single i.v. administration of fludrocortisone at 250 µg to mouse, the major distribution tissues of fludrocortisone was liver and kidney. The present in vivo pharmacokinetic and disposition studies of fludrocortisone in mice will provide helpful information for following study direction.

5. Bibliography

1. Annane D, Sébille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 21 août 2002;288(7):862-71.
2. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* Augusta Ga. déc 2005;24 Suppl 1:52-7.
3. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31-6.
4. Ribot M, Polito A, Grassin-Delyle S, Annane D, Alvarez J-C. Human plasma quantification of fludrocortisone using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry after low-dosage administration. *Clin Chim Acta*. mai 2013;420:109-13.
5. Nestorov I. Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. avr 2007;3(2):235-49.
6. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health*. août 1997;13(4):407-84.
7. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*. juill 1993;10(7):1093-5.
8. Wang P, Ba ZF, Burkhardt J, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage and resuscitation in the mouse: effects on cardiac output and organ blood flow. *Am J Physiol*. avr 1993;264(4 Pt 2):H1166-73.

6. Table & Figures

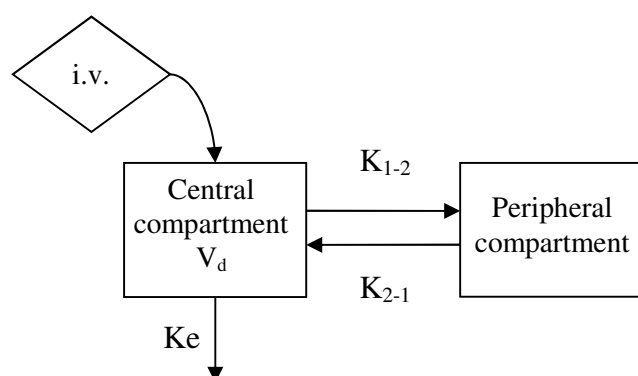


Figure 1. Schematic representation of the two-compartment model for fludrocortisone following an intravenous (i.v.) dose.

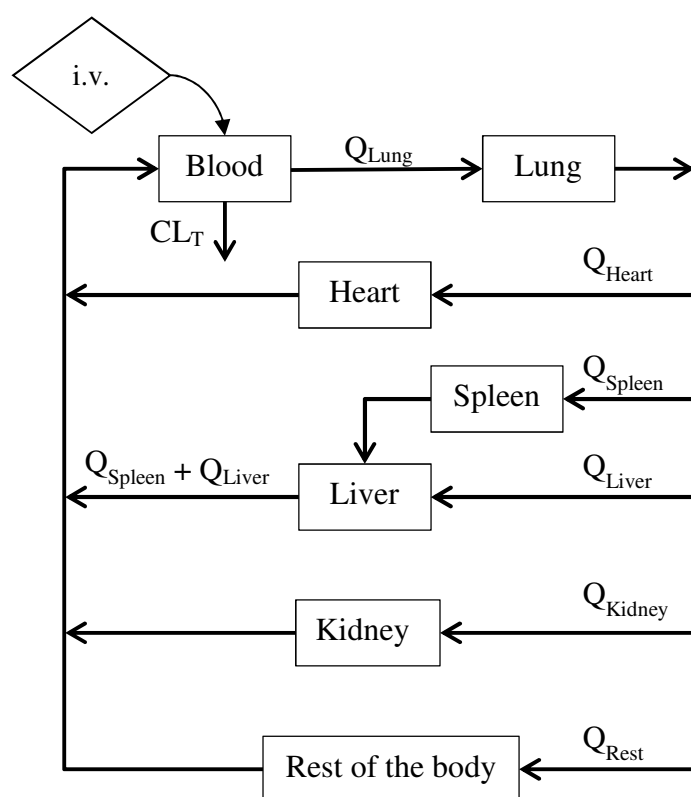


Figure 2. Schematic representation of whole body PBPK model for fludrocortisone following an intravenous (i.v.) dose. The whole body of the mouse is composed of five tissue compartments, one blood compartment and a “rest-of-body” compartment which was incorporated to represent all unsampled tissues.

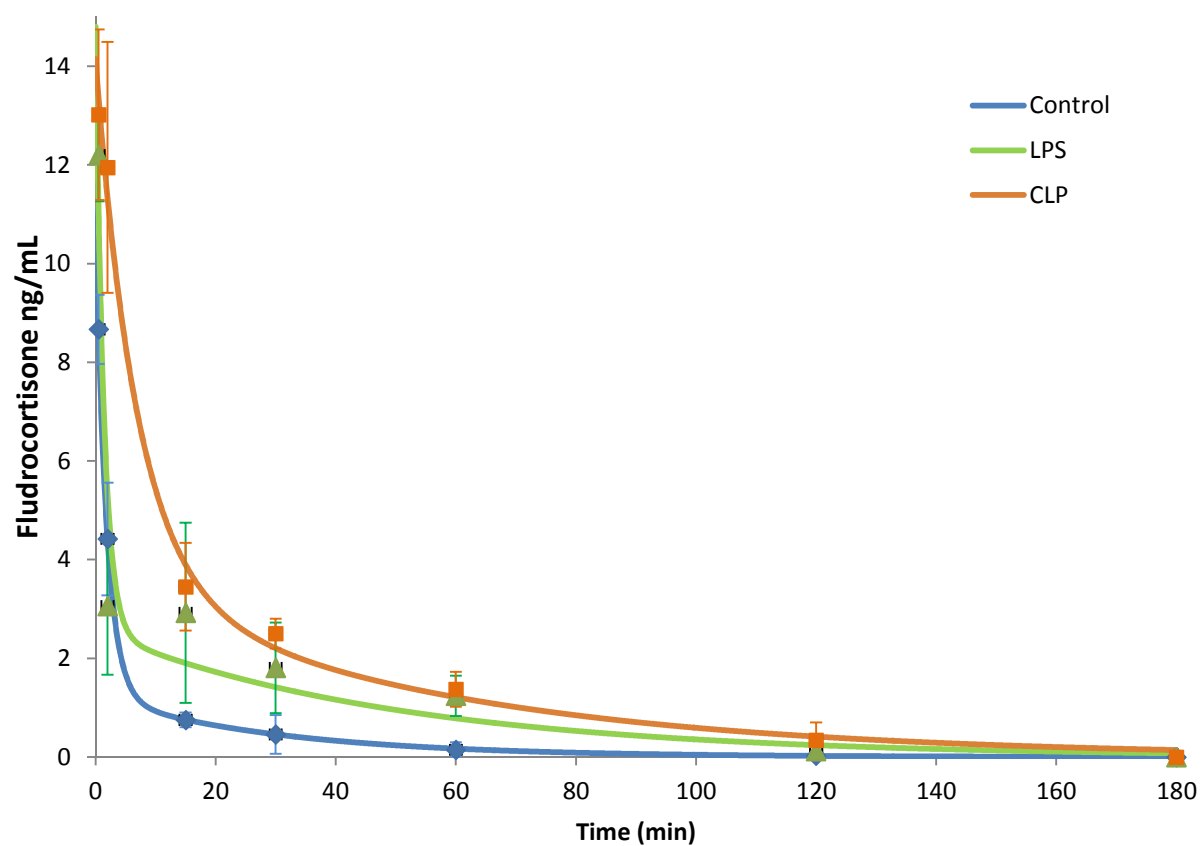


Figure 3 : Predicted concentration-time curve of fludrocortisone in plasma after i.v. administration of 0.25 µg in the three mice groups .

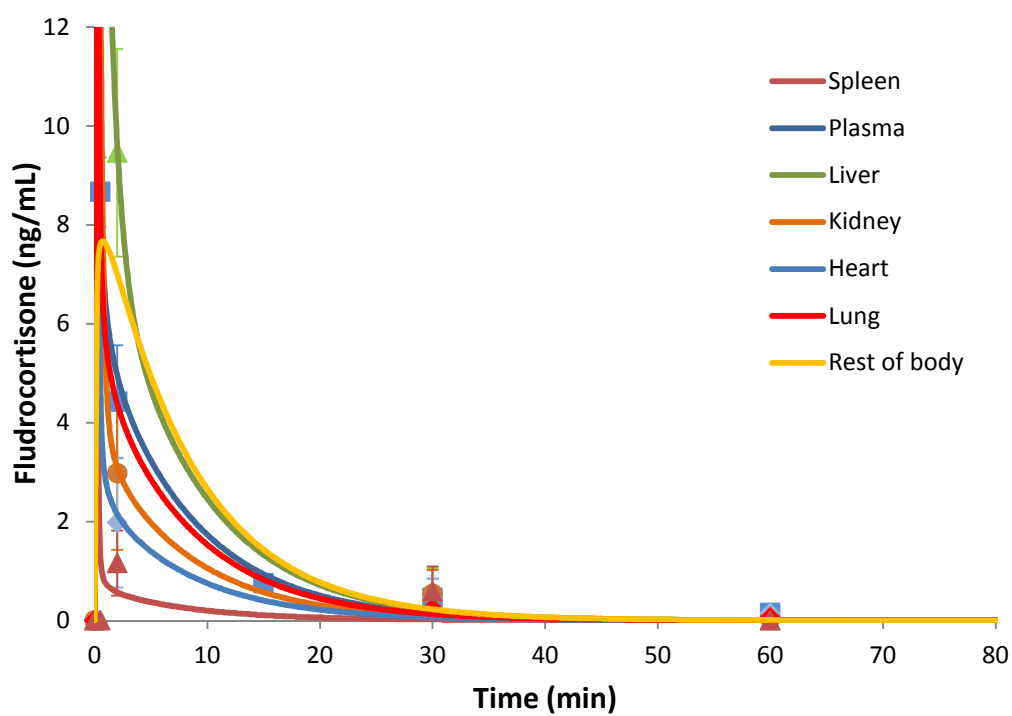


Figure 4 : Mean plasma and tissues concentration-time curve of fludrocortisone after i.v. administration of fludrocortisone in mice.

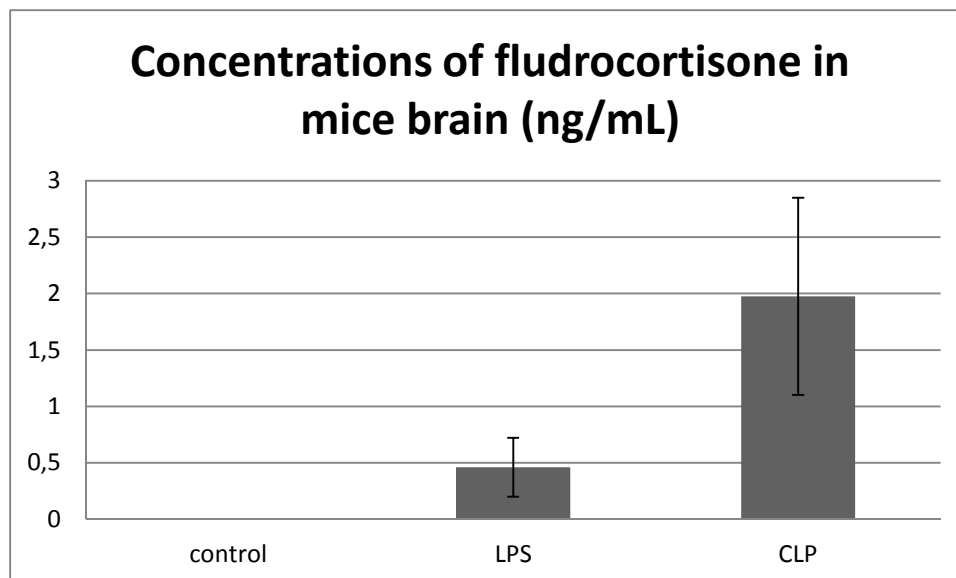


Figure 5 : Mean brain concentration of fludrocortisone after 2 min i.v. administration in mice

Table 1. Physiological parameters used in the whole body PBPK model in mice.

	Tissue volume (% of body weight)	Organ blood flow (% of cardiac output)
Blood	4.90	100
Lung	0.73	100
Liver	5.49	16.1
Heart	0.50	6.60
Kidney	1.67	9.10
Spleen	0.35	1.12 ^a
Rest of the body	^b	^c

Except specified, all values are from Brown et al. (6).
^aValues are from Davies et al. (7).
^b100 subtract sum of blood flow of liver, heart, kidney and spleen.
^cBody weight subtract sum of weight of blood, lung, liver, heart, kidney and spleen.
 Cardiac output = 51.36 mL/min/100 g body weight (8).

Table 2. Parameters estimates from the two-compartment model

Group	$T_{1/2}$ terminal (min)	K_{1-2} (mL/min)	K_{2-1} (mL/min)	V_d (mL)	K_e (min ⁻¹)	AUC _{0-∞} (ng×min/mL)
Control	20.9	0.29	0.09	22.6	0.2	54.1
LPS	35.4	0.5	0.14	16.9	0.1	144
CLP	38.8	0.06	0.05	17.7	0.05	262

K_{1-2} and K_{2-1} are the distribution rates between the two compartments central and peripheral.
 V_d is the distribution volume of the central compartment.
 K_e is first-order elimination rate constant from the central compartment.
 AUC_{0-∞} is area under the concentration-time curve from zero to infinity in plasma.

Table 3. Physiological parameter estimates from the PBPK model in healthy mice

Parameter	Notation	Units	Value
Tissue/blood partition coefficient			
Lung	R_{lung}	Unitless	0.88
Heart	R_{heart}	Unitless	0.42
Spleen	R_{spleen}	Unitless	0.11
Liver	R_{liver}	Unitless	1.28
Kidney	R_{kidney}	Unitless	0.6
Rest of body	R_{rest}	Unitless	1.04
Total body clearance	CL_T	mL/min	3.64

Conclusions

Deux modèles de souris ont été utilisés : un modèle endotoxinémique avec injection de lipopolysaccharide mimant l'inflammation systémique du choc septique, comme utilisée dans l'article de B. Laviolle ; et un modèle de ligature et ponction du cæcum permettant d'obtenir un foyer infectieux multipathogène qui se rapproche d'avantage des conditions d'un choc septique. Les résultats de cette étude montrent une différence significative entre les demi-vies de la fludrocortisone entre les différents groupes de souris : celle-ci étant allongée chez les souris malades. De plus, nous avons pu observer que les volumes de distributions étaient également différents chez les souris malades, montrant que ces groupes de souris étaient déshydratés. Enfin, la distribution semble différente entre les groupes de souris car des concentrations de fludrocortisone ont été retrouvées dans le cerveau des souris malades à 15 minutes contrairement aux souris saines. Ceci implique que la barrière hémato-encéphalique semble perturbée par l'inflammation systémique des souris et devient plus perméable.

DISCUSSION

Dans notre travail nous avons pu mettre au point la méthode de dosage de la fludrocortisone plasmatique après administration de cette molécule à faible dosage (50 µg). Il s'agit d'une technique très sensible, exacte et reproductible qui a permis deux applications chez le patient septique traité et le volontaire sain. Nous avons également complété les données par une étude pharmacocinétique de la fludrocortisone chez la souris septique et normale. Cette méthode de dosage de la fludrocortisone est la première publiée permettant une application chez ce type de patients.

Les méthodes publiées de 2000 à 2011 n'ont jamais été suivies d'une application chez le patient septique avec insuffisance surrénale relative pour l'étude de la pharmacocinétique de cette molécule dans ce contexte, ni même chez d'autres patients. Ceci peut être expliqué par plusieurs raisons. La première est le choix de la molécule d'intérêt pour la mise au point des techniques de dosage : dans deux techniques sur cinq, la molécule détectée et quantifiée est la fludrocortisone acétate (Chen et al. 2011, Shao et al. 2009). Cette molécule est la forme contenue dans le comprimé administré aux patients et non la forme circulante de cette molécule qui est la fludrocortisone base. La fludrocortisone acétate n'étant pas retrouvée dans le sang, le suivi de cette molécule en fonction du temps chez les patients est donc impossible. Cependant, au début de la mise au point de notre technique de dosage de la fludrocortisone, seule la poudre de fludrocortisone acétate était disponible, la fludrocortisone base n'étant retrouvée chez aucun fournisseur. Cette molécule ne pouvait être transformée en fludrocortisone base que par hydrolyse en milieu apolaire basique. Nous avons initialement synthétisé la fludrocortisone base par cette méthode, puis la poudre de fludrocortisone base est apparue sur le marché et a été utilisée pour la mise au point de la technique de dosage. La deuxième raison est la sensibilité des méthodes de dosage utilisées. En effet, la limite de quantification de ces méthodes est comprise entre 0,3 et 5 ng/mL (Antignac et al. 2000; Amendola, Garribba, et Botrè 2003; Taylor, Grebe, et Singh 2004; Shao et al. 2009; Chen et al. 2011). Or, la plupart des cinétiques de nos patients ont une concentration maximale à 0,3 ng/mL, voire inférieure. Il était donc impossible par ces méthodes de dosage de suivre des cinétiques de fludrocortisone chez les patients septiques traités. Grâce à notre méthode, nous avons pu mesurer des cinétiques chez les patients septiques traités montrant une phase d'absorption allant jusqu'à 2h puis une phase d'élimination en deux parties. Nous pouvons

donc conclure que cette méthode est parfaitement applicable à l'étude des relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de la fludrocortisone administrée à faible dosage dans le traitement de l'insuffisance surrénalienne survenant dans le choc septique.

Toutefois, notre méthode a une limite de quantification de 0,1 ng/mL pour la fludrocortisone. Bien que représentant la plus basse limite de quantification atteinte dans la littérature, une limite de quantification (LOQ) encore plus basse aurait probablement pu permettre de quantifier des concentrations qui sont pour le moment considérées comme non détectables, en particulier chez les patients considérés comme « non absorbants ». D'ailleurs, sur les sept patients ayant des concentrations inférieures à notre LOQ, quatre présentaient des concentrations situées entre notre limite de détection et cette LOQ.

Après avoir mis au point la méthode de quantification de la fludrocortisone et l'avoir validée, nous avons les outils nécessaires à l'étude pharmacocinétique/pharmacodynamique de cette molécule chez les patients septiques. Nous avons pu ainsi établir le suivi durant 12 heures des concentrations plasmatiques de cette molécule dans le sang de patients en choc septique et traités par une dose de fludrocortisone. Cette étude a permis d'établir les premières cinétiques de fludrocortisone chez le patient septique.

Dans un premier temps, nous avons étudié les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone donnée par voie entérale à des sujets ayant un choc septique. En effet, celle-ci est administrée sous forme de comprimé entier introduit par sonde nasogastrique. Cette étude a permis de modéliser la pharmacocinétique de cette molécule. Un délai d'absorption a pu être déterminé à 50 minutes après l'introduction du comprimé de fludrocortisone acétate. La concentration de fludrocortisone atteint un maximum à environ 3 h puis diminue jusqu'à une concentration indétectable à 6 h et une élimination complète théorique à 10 h. La demi-vie d'élimination retrouvée est rapide, de l'ordre d'une heure. Une précédente étude de Mitsky *et al* avait rapporté des paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone administrée à des posologies de 0,2 et 2 mg chez l'homme, soit 4 et 40 fois plus que dans notre étude. La demi-vie de la fludrocortisone était alors de 3,6 h et les pics de fludrocortisone étaient situés respectivement à 2,8 ng/mL et entre 17,6 et 24,5 ng/mL une heure après la prise de fludrocortisone. Cependant, les auteurs reconnaissaient que la méthode de dosage utilisée, par radioimmunochimie, avait un problème de spécificité. La fludrocortisone croisait avec le cortisol endogène, rendant le dosage impossible lorsque la concentration de celui-ci dépassait 200 ng/mL (Mitsky et al. 1994).

Le modèle pharmacocinétique retrouvée de la fludrocortisone montre une grande variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques chez les patients en choc septique. Les données cliniques et biologiques recueillies ne permettent pas d'expliquer cette variabilité ni l'absence d'absorption chez certains patients. Cependant, la modélisation pharmacocinétique prédit que 30 % des patients peuvent avoir des concentrations indétectables, ce qui correspond exactement au pourcentage de patients considérés comme « non absorbants » dans l'étude. Il a été montré que le délai d'absorption et la clairance apparente de la fludrocortisone sont significativement corrélés au score de gravité. Ceci suggère que l'état clinique du patient modifie la pharmacocinétique de la fludrocortisone, probablement par altération de la perfusion intestinale à l'origine d'une augmentation du délai d'absorption et rénale à l'origine d'une diminution de la clairance pendant le choc septique. Il avait été précédemment démontré que les altérations de la microcirculation survenant lors d'un choc septique semblaient jouer un rôle dans le développement des dysfonctionnements d'organes (De Backer et al. 2014).

L'analyse montre que le modèle décrit correctement les données expérimentales puisque la relation entre les concentrations observées et prédites ne montre pas de biais apparent. Les paramètres du modèle final sont bien estimés car pour tous les paramètres, l'erreur relative standard (RSE) est inférieure à 50 %, valeur maximale recherchée.

Nous avons inclus dans cette étude des patients par ailleurs inclus dans une autre étude clinique. Tous étaient en choc septique avec insuffisance surrénale relative. De ce fait, conformément aux pratiques du service de réanimation, ils ont reçu des doses d'hydrocortisone toutes les 6 heures indépendamment de la dose de fludrocortisone. Les temps d'administration de l'hydrocortisone étant très variable d'un patient à l'autre, certains étant à l'état d'équilibre alors que d'autres n'avaient eu qu'une seule administration voire même aucune administration, la modélisation de cette molécule s'est avérée impossible à la longue. Nous avons choisi de comparer les patients en fonction de leur absorption ou non de la fludrocortisone afin de mettre en évidence un éventuel effet minéralocorticoïde de la fludrocortisone. Le groupe de patients n'ayant pas absorbé représente donc un groupe que l'on peut considérer comme « contrôle ». La pression artérielle systolique, moyenne et la fréquence cardiaque ont été analysés ainsi que les concentrations de sodium et potassium plasmatiques et urinaires (résultats non présentés dans l'article). Cependant, aucune différence

n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes traduisant qu'à cette concentration la fludrocortisone ne semble pas avoir d'effet sur les paramètres biologiques et cliniques.

Certaines études ont montré des effets positifs de la fludrocortisone sur la survie des patients dans le cas des chocs septiques avec insuffisance surrénale, alors que d'autres n'ont pas retrouvés ces effets, laissant supposer par certains auteurs que l'absorption intestinale dans le choc septique pouvait être incertaine (Sprung et al. 2008; Maxime, Lesur, et Annane 2009; Burry et Wax 2004a). Nous avons montré ici que certains patients absorbaient très bien la fludrocortisone, d'autres absorbaient de manière moins efficace avec des concentrations plasmatiques plus basses, et enfin que d'autres présentaient des concentrations indétectables de cette molécule dans le plasma.

Cette variation d'absorption de la fludrocortisone par voie intestinale d'un patient à l'autre, pourrait être à l'origine de la controverse sur les bienfaits de cette molécule. De plus, la prise aiguë d'une faible dose de cette molécule ayant une demi-vie très courte pourrait expliquer le manque d'efficacité minéralocorticoïde retrouvé dans certaines études précédentes (Annane D et al. 2002, COITSS Study Investigators et al. 2010).

Cette étude comporte cependant certaines limites. Premièrement le nombre de patients inclus dans notre étude, qui est relativement faible. Nous avons inclus 30 patients présentant un choc septique avec une insuffisance surrénale relative dont le traitement inclus la fludrocortisone à faible dose. Les patients en choc septique ne représentent que 10 % de notre réanimation, et seuls 50 % d'entre eux présentent une insuffisance surrénale relative. Nous avons ensuite quantifié la fludrocortisone sur ces 30 patients. Seule une partie des patients ont absorbé la fludrocortisone, d'où l'établissement des paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone sur une vingtaine de patients seulement. De plus, le choc septique peut survenir à la suite d'infections diverses et entraîne donc des complications propres à chaque patient. Il est donc particulièrement difficile d'obtenir des caractéristiques homologues pour tous les patients inclus.

Les résultats obtenus ont permis de réaliser étude pharmacocinétique de la fludrocortisone mais les données hémodynamiques recueillies et analysées telles que le ratio Na/K urinaire, pression artérielle et moyenne, le pH et les bicarbonates qui auraient pu montrer une activité minéralocorticoïde de la molécule, n'ont pas pu mettre en évidence cet effet. Toutefois, la plupart des patients étaient oligoanuriques, dans ces conditions il était impossible de mettre en

évidence un effet sur le ratio Na/K urinaire qui est généralement l'effet le plus aisé à mettre en évidence, comme c'est le cas chez les volontaires sains.

Le seul facteur qui semble lié statistiquement à la non-absorption de la fludrocortisone, est la présence d'une hémoculture positive. La raison de cette association n'a pu être identifiée.

Un des buts de cette première étude était de déterminer si la fludrocortisone induisait l'effet minéralocorticoïde recherché chez les patients en choc septique. L'étude des relations pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone n'a pas permis de mettre en évidence cet effet, ni un effet bénéfique sur le pronostic chez le patient septique. Nous avons donc continué les investigations sur les effets de la fludrocortisone à faible dose chez le volontaire sain à partir du plasma conservé d'une étude précédemment publiée de l'équipe de Laviolle *et al* (B. Laviolle et al. 2010). Le but de l'étude était de pouvoir relier les effets précédemment observés à la concentration de fludrocortisone dans le plasma des volontaires sains. Dans l'article publié en 2010, les auteurs n'avaient montré aucun effet hémodynamique de la fludrocortisone à la concentration faible de 50 µg par jour. En revanche, une diminution des concentrations de sodium et potassium urinaire avait été observée suite à l'administration de fludrocortisone et hydrocortisone avec un effet additif des deux molécules. Il était donc intéressant de pouvoir relier ces résultats aux concentrations plasmatiques de fludrocortisone ou d'hydrocortisone chez des volontaires sains et non chez des patients.

Nous avons calculé les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone chez le volontaire sain. Le modèle choisi pour la description de la fludrocortisone est un modèle mono-compartmental avec une élimination d'ordre 1, le même que celui utilisé chez les patients en choc septique. Les paramètres pharmacocinétiques ont été estimés à 1,4 h pour la demi-vie de la fludrocortisone, avec une clairance apparente de 40,8 L/h et un volume de distribution de 82,4 L, ce qui montre que la fludrocortisone a une forte distribution dans les tissus de l'organisme. Concernant l'hydrocortisone, la demi-vie a été estimée à 2 h, avec une clairance apparente de 30 L/h et un volume de distribution de 85,5 L ce qui est conforme aux données de la littérature (Tromm et al. 2001, Simon et al. 2010, Derendorf et al. 1991, Toothaker, Craig, et Welling 1982). Les paramètres de modélisation ont permis de déterminer que la concentration en fludrocortisone produisant 50 % de l'effet maximal sur la modification du rapport Na/K urinaire est de 0,078 µg/L. Le seuil de quantification de la fludrocortisone est de 0,1 µg/L, les valeurs retrouvées chez les volontaires sains, supérieurs à

ce seuil, sont donc suffisantes pour obtenir un effet minéralocorticoïde. Concernant l'hydrocortisone, l'IC 50 est à 32 µg/L. Il y a donc un facteur 400 entre les deux molécules, en adéquation avec les données de la littérature (Arlt et Allolio 2003, Oelkers, Diederich, et Bähr 1992).

L'étude présente aussi des limites. D'abord, le cortisol endogène n'a pas pu être différencié de l'hydrocortisone exogène par la méthode de dosage utilisée. Nous avons donc estimé ces valeurs puis les avons fixées pour chaque période de l'étude. Nous avons également supposé que la fludrocortisone n'avait aucune incidence sur le cortisol endogène à la concentration donnée aux patients. En effet, il a été établi par Otte *et al*, que la dose minimale observée pour un effet inhibiteur du cortisol était d'environ 500 µg, soit dix fois supérieure à notre dose. Et dans ce cas, la diminution de cortisol endogène était faible, de l'ordre de 20 µg/L après 5 h (Otte et al. 2003). Enfin, afin d'être dans des conditions d'hypoaldostéronisme, les patients ont reçu une infusion de 2 L de sérum physiologique NaCl 0,9 % deux heures avant le début de l'étude. Cette infusion a pu perturber les paramètres établis du fait de l'augmentation de l'excrétion de Na⁺, présents à toutes les périodes, dans la première heure des tests. Ceci peut expliquer le pic observé du rapport Na/K à T1 après administration de fludrocortisone, hydrocortisone ou du placebo.

En comparant les deux études, on peut constater que les paramètres pharmacocinétiques retrouvés sont similaires pour la clairance apparente. En effet, elle a été estimée à 40,6 L/h chez les patients en choc septique et à 40,8 L/h chez les volontaires sains. De même il n'y a pas de modification de la demi-vie et des aires sous la courbe, égales respectivement à 1,06 h pour les patients en choc septique et 1,4 h pour les volontaires sains ; 1,23 µg.h.L⁻¹ pour les patients et 1,22 µg.h.L⁻¹ pour les volontaires sains. En revanche, on observe une légère baisse du volume de distribution apparent chez les patients septiques (67,4 L) en comparaison aux volontaires sains (82,4 L). Ceci pourrait être dû à l'infusion des 2 L de sérum physiologique qui pourrait avoir entraîné chez les volontaires sains une hémodilution suffisante pour modifier ce paramètre pharmacocinétique. On peut constater une augmentation de la vitesse d'absorption chez les patients en choc septique (0,55 h⁻¹) comparé aux volontaires sains (0,43 h⁻¹), probablement à l'origine des concentrations plus élevées souvent observées chez les patients septiques ayant absorbé correctement. Enfin, on peut observer que le pic de fludrocortisone est estimé à 2h après l'administration de fludrocortisone chez les volontaires

sains et de 3h chez les patients en choc avec un délai d'absorption qui a été déterminé à 50 min. Ces données sont parfaitement concordantes entre elles.

L'effet hémodynamique retrouvé chez les volontaires sains n'a pas été retrouvé chez les patients en choc septique. Durant le choc septique, l'absorption intestinale est perturbée (Burry et Wax 2004, Maxime, Lesur, et Annane 2009). Nous avons vu qu'il semblait y avoir deux populations caractérisées par leur absorption vis-à-vis de la fludrocortisone, et une plus grande variabilité d'absorption, pouvant expliquer ce phénomène. L'absence de mise en évidence de cet effet minéralocorticoïde chez les patients septiques peut également provenir des différentes hormones administrées conjointement chez ces patients notamment les catécholamines et les différents remplissages. En revanche, il a été démontré chez les volontaires sains que l'hydrocortisone ne modifiait en rien les paramètres pharmacocinétiques de la fludrocortisone, validant ainsi ceux de l'étude chez les patients en choc septique.

Les effets minéralocorticoïdes de la fludrocortisone n'étant visibles que chez les volontaires sains, nous avons choisi de continuer l'étude de cette molécule chez l'animal. Le but de cette étude était de comparer les paramètres pharmacocinétiques tels que la demi-vie et le volume de distribution de la fludrocortisone dans un contexte sain et dans deux modèles de sepsis mis au point au laboratoire. Nous avons également prélevé différents organes afin d'étudier la distribution de la molécule et son élimination dans les organes.

Grâce à des prélèvements de cœur, poumon, rate, rein, foie et cerveau à différents temps allant de 2 minutes à 3 heures, nous avons pu suivre la distribution de la fludrocortisone chez l'animal sain et septique grâce à deux modèles de choc : LPS et CLP. Nous avons pu observer qu'il existait une différence significative entre les animaux sains et malades concernant la demi-vie de la molécule. La demi-vie était allongée chez l'animal malade : 21 minutes chez les souris saines contre 35 minutes chez les souris malades ($p= 0.02$). Cette modification s'explique probablement par le fait que la demi-vie de la fludrocortisone dépend de la clairance et donc de la fonction rénale des souris. Les souris malades sont déshydratées et ont une inflammation systémique qui d'une part provoque une hypotension et d'autre part altère la fonction rénale, d'où une demi-vie allongée de la molécule. Nous n'avons pas constaté d'allongement de la demi-vie entre les patients en choc septique et les volontaires sains. Ceci pourrait traduire que les modèles de souris utilisés dans notre étude ont un « score de gravité » plus importants que celui des patients et démontre que les modèles animaux ne sont pas toujours le reflet réel de ce qui se passe chez l'humain. Le volume de distribution est

également diminué chez les souris malades en relation probablement avec la déshydratation des souris malades. Ce résultat est retrouvé également chez les patients septiques comparés aux volontaires sains.

On observe une modification de la distribution de la molécule dans les différents compartiments, notamment dans le cerveau où elle apparaît alors qu'elle est absente des cerveaux sains, en relation probablement avec une modification de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Cette observation correspond aux données de la littérature où le sepsis entraîne une modification de la barrière hémato-encéphalique qui devient alors plus perméable (Dal-Pizzol et al. 2013).

Il faut cependant noter qu'il existe des limites à cette étude. L'administration du comprimé de fludrocortisone chez le patient septique se fait par sonde nasogastrique. En revanche, nous avons choisi d'utiliser la voie intraveineuse pour administrer cette molécule chez la souris. Ainsi nous avons pu évaluer les paramètres de distribution et d'élimination. De plus, la quantité de fludrocortisone injectée était dix fois supérieure à la quantité donnée aux patients pour des raisons de sensibilité de la méthode. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'à une concentration inférieure les données soient différentes même si la plupart des molécules ont une pharmacocinétique linéaire et donc non modifiée par la dose administrée. Enfin, pour des raisons pratiques et d'éthique, les souris ont subi une anesthésie générale lors de l'injection et du sacrifice pour le prélèvement des organes. Il faut donc prendre en compte que l'anesthésie a pu modifier les paramètres étudiés bien que toutes les souris aient été traitées de la même manière.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La mise au point du dosage de la fludrocortisone dans le plasma humain nous a permis d'étudier pour la première fois la pharmacocinétique de cette molécule chez les volontaires sains et chez les patients en choc septique. Nous avons aussi défini les paramètres pharmacocinétiques de cette molécule, chez l'homme mais également chez la souris.

L'absence d'absorption chez 30 % des patients semble pouvoir expliquer la controverse sur les effets bénéfiques de cette molécule dans le choc septique. Nous avons objectivé un réel effet minéralocorticoïde uniquement chez les volontaires sains et non chez les patients en choc septiques.

Des études doses/effet semblent nécessaires afin de déterminer si 50 µg en dose unique est suffisante dans cette indication. Par ailleurs, compte tenu de la très faible demi-vie retrouvée, une administration chronique deux à trois fois par jour doit être évaluée afin d'objectiver un éventuel effet bénéfique en terme de survie des patients.

Enfin, nous n'avons pas étudié la biotransformation de la fludrocortisone, aucune donnée n'existe concernant la possibilité que la molécule soit éliminée sous forme inchangée ou après transformation en métabolite actif ou inactif.

BIBLIOGRAPHIE

- Adcock, Ian M., et Gaetano Caramori. 2001. « Cross-Talk between pro-Inflammatory Transcription Factors and Glucocorticoids ». *Immunology and Cell Biology* 79 (4): 376-84. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01025.x.
- Agelaki, Sofia, Christos Tsatsanis, Achille Gravanis, et Andrew N. Margioris. 2002. « Corticotropin-Releasing Hormone Augments Proinflammatory Cytokine Production from Macrophages In Vitro and in Lipopolysaccharide-Induced Endotoxin Shock in Mice ». *Infection and Immunity* 70 (11): 6068-74. doi:10.1128/IAI.70.11.6068-6074.2002.
- Alberti, Corinne, Christian Brun-Buisson, Hilmar Burchardi, Claudio Martin, Sergey Goodman, Antonio Artigas, Alberto Sicignano, et al. 2002. « Epidemiology of Sepsis and Infection in ICU Patients from an International Multicentre Cohort Study ». *Intensive Care Medicine* 28 (2): 108-21. doi:10.1007/s00134-001-1143-z.
- Allary, J, et D Annane. 2005. « Glucocorticoids and Sepsis ». *Minerva Anestesiologica* 71 (12): 759-68.
- Amendola, Luca, Flaminia Garribba, et Francesco Botrè. 2003. « Determination of endogenous and synthetic glucocorticoids in human urine by gas chromatography–mass spectrometry following microwave-assisted derivatization ». *Analytica Chimica Acta* 489 (2): 233-43. doi:10.1016/S0003-2670(03)00703-7.
- Annane, Djillali. 2005. « Glucocorticoids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock ». *Current Opinion in Critical Care* 11 (5): 449-53.
- Annane, Djillali, Philippe Aegerter, Marie Claude Jars-Guincestre, Bertrand Guidet, et CUB-Réa Network. 2003. « Current Epidemiology of Septic Shock: The CUB-Réa Network ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (2): 165-72. doi:10.1164/rccm.2201087.
- Annane, Djillali, et Eric Bellissant. 2000. « Prognostic Value of Cortisol Response in Septic Shock ». *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 284 (3): 308-9.
- Annane, Djillali, Eric Bellissant, et Jean-Marc Cavaillon. 2005. « Septic shock ». *The Lancet* 365 (9453): 63-78. doi:10.1016/S0140-6736(04)17667-8.
- Annane D, Sébille V, Charpentier C, et et al. 2002. « Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock ». *JAMA* 288 (7): 862-71. doi:10.1001/jama.288.7.862.
- Annane D, Sébille V, Troché G, Raphaël J, Gajdos P, et Bellissant E. 2000. « A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin ». *JAMA* 283 (8): 1038-45. doi:10.1001/jama.283.8.1038.
- Antignac, J. P., B. Le Bizec, F. Monteau, F. Poulain, et F. André. 2000. « Collision-Induced Dissociation of Corticosteroids in Electrospray Tandem Mass Spectrometry and Development of a Screening Method by High Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 14 (1): 33-39. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(20000115)14:1<33::AID-RCM829>3.0.CO;2-R.
- Arlt, Wiebke, et Bruno Allolio. 2003. « Adrenal Insufficiency ». *Lancet* 361 (9372): 1881-93. doi:10.1016/S0140-6736(03)13492-7.
- Arriza, Jeffrey L., Richard B. Simerly, Larry W. Swanson, et Ronald M. Evans. 1988. « The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response ». *Neuron* 1 (9): 887-900. doi:10.1016/0896-6273(88)90136-5.

- Arriza, J L, C Weinberger, G Cerelli, T M Glaser, B L Handelin, D E Housman, et R M Evans. 1987. « Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 237 (4812): 268-75.
- Asehnoune, Karim, Philippe Seguin, Jeremy Allary, Fanny Feuillet, Sigismond Lasocki, Fabrice Cook, Hervé Floch, et al. 2014. « Hydrocortisone and Fludrocortisone for Prevention of Hospital-Acquired Pneumonia in Patients with Severe Traumatic Brain Injury (Corti-TC): A Double-Blind, Multicentre Phase 3, Randomised Placebo-Controlled Trial ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 2 (9): 706-16. doi:10.1016/S2213-2600(14)70144-4.
- Bergquist, Maria, Merja Nurkkala, Christian Rylander, Erik Kristiansson, Göran Hedenstierna, et Catharina Lindholm. 2013. « Expression of the glucocorticoid receptor is decreased in experimental Staphylococcus aureus sepsis ». *Journal of Infection* 67 (6): 574-83. doi:10.1016/j.jinf.2013.07.028.
- Boland, Edward W., et Nathan E. Headley. 1954. « Preliminary Clinical Trials with 9-Alpha-Fluoro Hydrocortisone Acetate in Rheumatoid Arthritis * ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 13 (4): 291-96.
- Bone, R C, C J Fisher Jr, T P Clemmer, G J Slotman, et C A Metz. 1987. « Early Methylprednisolone Treatment for Septic Syndrome and the Adult Respiratory Distress Syndrome ». *Chest* 92 (6): 1032-36.
- Briegel, J., W. Kellermann, H. Forst, M. Haller, M. Bittl, G. E. Hoffmann, M. Büchler, W. Uhl, et K. Peter. 1994. « Low-Dose Hydrocortisone Infusion Attenuates the Systemic Inflammatory Response Syndrome. The Phospholipase A2 Study Group ». *The Clinical Investigator* 72 (10): 782-87.
- Brun-Buisson, C., F. Doyon, J. Carlet, P. Dellamonica, F. Gouin, A. Lepoutre, J. C. Mercier, G. Offenstadt, et B. Régnier. 1995. « Incidence, Risk Factors, and Outcome of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults. A Multicenter Prospective Study in Intensive Care Units. French ICU Group for Severe Sepsis ». *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 274 (12): 968-74.
- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et et al. 1995. « Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: A multicenter prospective study in intensive care units ». *JAMA* 274 (12): 968-74. doi:10.1001/jama.1995.03530120060042.
- Bunda, Severa, Peter Liu, Yanting Wang, Kela Liu, et Aleksander Hinek. 2007. « Aldosterone Induces Elastin Production in Cardiac Fibroblasts through Activation of Insulin-like Growth Factor-I Receptors in a Mineralocorticoid Receptor-Independent Manner ». *The American Journal of Pathology* 171 (3): 809-19. doi:10.2353/ajpath.2007.070101.
- Burry, Lisa D., et Randy S. Wax. 2004a. « Role of Corticosteroids in Septic Shock ». *The Annals of Pharmacotherapy* 38 (3): 464-72. doi:10.1345/aph.1C435.
- . 2004b. « Role of Corticosteroids in Septic Shock ». *The Annals of Pharmacotherapy* 38 (3): 464-72. doi:10.1345/aph.1C435.
- Carroll, D. I., I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegeler, et E. C. Horning. 1975. « Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system ». *Analytical Chemistry* 47 (14): 2369-73. doi:10.1021/ac60364a031.
- Cavaillon, Jean-Marc, J-P Mira, et B Vallet. 2004. *Inflammation locale et générale. Sepsis*. Paris : Masson.
- « Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301 ». In .

- Chen, Dong, Zhiyong Chen, Chanyoung Park, Michael Centrella, Thomas McCarthy, Li Chen, Ahmed Al-Omari, et Gilbert W Moeckel. 2013. « Aldosterone Stimulates Fibronectin Synthesis in Renal Fibroblasts through Mineralocorticoid Receptor-Dependent and Independent Mechanisms ». *Gene* 531 (1): 23-30. doi:10.1016/j.gene.2013.08.047.
- Chen, Dongmei, Yanfei Tao, Zhaoying Liu, Huahai Zhang, Zhenli Liu, Yulian Wang, Lingli Huang, et al. 2011a. « Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Pressurized Liquid Extraction for Determination of Glucocorticoid Residues in Edible Tissues ». *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (2): 174-80. doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.039.
- . 2011b. « Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Pressurized Liquid Extraction for Determination of Glucocorticoid Residues in Edible Tissues ». *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (2): 174-80. doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.039.
- Childs, Emma, et Harriet de Wit. 2009. « Hormonal, cardiovascular, and subjective responses to acute stress in smokers ». *Psychopharmacology* 203 (1): 1-12. doi:10.1007/s00213-008-1359-5.
- COITSS Study Investigators, Djillali Annane, Alain Cariou, Virginie Maxime, Elie Azoulay, Gilles D'honneur, Jean François Timsit, et al. 2010. « Corticosteroid Treatment and Intensive Insulin Therapy for Septic Shock in Adults: A Randomized Controlled Trial ». *JAMA* 303 (4): 341-48. doi:10.1001/jama.2010.2.
- Colas, C. 2006. « Développement de Méthodes Physico-Chimiques pour le contrôle de la médication par l'harpagophytum et l'eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine ».
- Cope, C. L., et R. J. Harrison. 1955. « Effect of 9 α -Fluorohydrocortisone on Adrenal Hyperfunction in Cushing's Syndrome ». *British Medical Journal* 2 (4937): 457-60.
- Dal-Pizzol, Felipe, Hugo Alberto Rojas, Emilia Marcelina dos Santos, Francieli Vuolo, Larissa Constantino, Gustavo Feier, Matheus Pasquali, et al. 2013. « Matrix Metalloproteinase-2 and Metalloproteinase-9 Activities Are Associated with Blood-Brain Barrier Dysfunction in an Animal Model of Severe Sepsis ». *Molecular Neurobiology* 48 (1): 62-70. doi:10.1007/s12035-013-8433-7.
- De Backer, Daniel, Diego Orbegoza Cortes, Katia Donadello, et Jean-Louis Vincent. 2014. « Pathophysiology of Microcirculatory Dysfunction and the Pathogenesis of Septic Shock ». *Virulence* 5 (1): 73-79. doi:10.4161/viru.26482.
- De Bosscher, K, W Vanden Berghe, et G Haegeman. 2000. « Mechanisms of Anti-Inflammatory Action and of Immunosuppression by Glucocorticoids: Negative Interference of Activated Glucocorticoid Receptor with Transcription Factors ». *Journal of Neuroimmunology* 109 (1): 16-22.
- De Hoffman, Edmond, et Vincent Stroobant. *Spectrométrie de masse, 3ème édition*. Dunod.
- Dellinger, R. Phillip, Mitchell M. Levy, Jean M. Carlet, Julian Bion, Margaret M. Parker, Roman Jaeschke, Konrad Reinhart, Derek C. Angus, Christian Brun-Buisson, Richard Beale, Thierry Calandra, Jean-Francois Dhainaut, Herwig Gerlach, Maurene Harvey, John J. Marini, John Marshall, Marco Ranieri, Graham Ramsay, Jonathan Sevransky, B. Taylor Thompson, Sean Townsend, Jeffrey S. Vender, Janice L. Zimmerman, Jean-Louis Vincent, et al. 2008. « Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2008 ». *Critical Care Medicine* 36 (1): 296-327. doi:10.1097/01.CCM.0000298158.12101.41.

- . 2008. « Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 ». *Intensive Care Medicine* 34 (1): 17-60. doi:10.1007/s00134-007-0934-2.
- Derendorf, H., H. Möllmann, J. Barth, C. Möllmann, S. Tunn, et M. Krieg. 1991. « Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of Hydrocortisone ». *Journal of Clinical Pharmacology* 31 (5): 473-76.
- Douglas, D. J., et J. B. French. 1981. « Elemental analysis with a microwave-induced plasma/quadrupole mass spectrometer system ». *Analytical Chemistry* 53 (1): 37-41. doi:10.1021/ac00224a011.
- Druce, L. A., C. M. Thorpe, et A. Wilton. 2008a. « Mineralocorticoid effects due to cortisol inactivation overload explain the beneficial use of hydrocortisone in septic shock ». *Medical Hypotheses* 70 (1): 56-60. doi:10.1016/j.mehy.2007.04.031.
- Druce, L. A., C. M. Thorpe, et A. Wilton. 2008b. « Mineralocorticoid Effects due to Cortisol Inactivation Overload Explain the Beneficial Use of Hydrocortisone in Septic Shock ». *Medical Hypotheses* 70 (1): 56-60. doi:10.1016/j.mehy.2007.04.031.
- Fan, Y S, R L Eddy, M G Byers, L L Haley, W M Henry, N J Nowak, et T B Shows. 1989. « The Human Mineralocorticoid Receptor Gene (MLR) Is Located on Chromosome 4 at q31.2 ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 52 (1-2): 83-84.
- Farman, Nicolette, et Brigitte Bocchi. 2000. « Mineralocorticoid Selectivity: Molecular and Cellular Aspects ». *Kidney International* 57 (4): 1364-69. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00976.x.
- Farman, Nicolette, et Marie-Edith Rafestin-Oblin. 2001. « Multiple Aspects of Mineralocorticoid Selectivity ». *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 280 (2): F181-92.
- Fried, Josef, et Emily F. Sabo. 1953. « Synthesis of 17 α -hydroxycorticosterone and its 9 α -halo derivatives from 11-epi-17 α -hydroxycorticosterone ». *Journal of the American Chemical Society* 75 (9): 2273-74. doi:10.1021/ja01105a527.
- . 1954. « 9 α -Fluoro Derivatives of Cortisone and Hydrocortisone ». *Journal of the American Chemical Society* 76 (5): 1455-56. doi:10.1021/ja01634a101.
- Funder, John W. 2007. « The Role of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors in Cardiovascular Disease ». *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions* 7 (3): 151-57.
- Garrod, O, J D Nabarro, G L Pawan, et G Walker. 1955. « Metabolic Effects of 9 Alpha-Fluorohydrocortisone and of Cortisone in Adrenal Insufficiency ». *Lancet* 269 (6886): 367-70.
- Goldfien, Alan, John C. Laidlaw, Najib Abu Haydar, Albert E. Renold, et George W. Thorn. 1955. « Fluorohydrocortisone and Chlorohydrocortisone, Highly Potent Derivatives of Compound F ». *New England Journal of Medicine* 252 (11): 415-21. doi:10.1056/NEJM195503172521101.
- Gomez-Sanchez, Celso E., et Elise P. Gomez-Sanchez. 2012. « The Protective Side of the Mineralocorticoid Receptor ». *Endocrinology* 153 (4): 1565-67. doi:10.1210/en.2011-2184.
- Hamon, M, et coll. *Abrégés de chimie analytique tome 3, méthodes spectrales et analyse organique*.
- Ho, CS, CWK Lam, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen, et HL Tai. 2003. « Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications ». *The Clinical Biochemist Reviews* 24 (1): 3-12.

- Hodgin, Katherine E., et Marc Moss. 2008. « The Epidemiology of Sepsis ». *Current Pharmaceutical Design* 14 (19): 1833-39.
- Hotchkiss, Richard S., et Irene E. Karl. 2003. « The Pathophysiology and Treatment of Sepsis ». *New England Journal of Medicine* 348 (2): 138-50. doi:10.1056/NEJMr021333.
- Keeney, D S, C M Jenkins, et M R Waterman. 1995. « Developmentally Regulated Expression of Adrenal 17 Alpha-Hydroxylase Cytochrome P450 in the Mouse Embryo ». *Endocrinology* 136 (11): 4872-79. doi:10.1210/endo.136.11.7588219.
- Košir, Rok, Ursula Prosenc Zmrzljak, Tanja Bele, Jure Acimovic, Martina Perse, Gregor Majdic, Cornelia Prehn, Jerzy Adamski, et Damjana Rozman. 2012. « Circadian Expression of Steroidogenic Cytochromes P450 in the Mouse Adrenal Gland – Involvement of cAMP-Responsive Element Modulator in Epigenetic Regulation of Cyp17a1 ». *FEBS Journal* 279 (9): 1584-93. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08317.x.
- Laviolle, B., P. Le Maguet, M.-C. Verdier, C. Massart, E. Donal, F. Lainé, A. Lavenu, D. Pape, et E. Bellissant. 2010. « Biological and Hemodynamic Effects of Low Doses of Fludrocortisone and Hydrocortisone, Alone or in Combination, in Healthy Volunteers With Hypoaldosteronism ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 88 (2): 183-90. doi:10.1038/clpt.2010.83.
- Laviolle, Bruno, Djillali Annane, Claire Fougere, et Eric Bellissant. 2012. « Gluco- and Mineralocorticoid Biological Effects of a 7-Day Treatment with Low Doses of Hydrocortisone and Fludrocortisone in Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 38 (8): 1306-14. doi:10.1007/s00134-012-2585-1.
- Laviolle, Bruno, Nicolas Nessler, Catherine Massart, et Eric Bellissant. 2014. « Fludrocortisone and Hydrocortisone, Alone or in Combination, on in Vivo Hemodynamics and in Vitro Vascular Reactivity in Normal and Endotoxemic Rats: A Randomized Factorial Design Study ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, janvier. doi:10.1097/FJC.0000000000000072.
- Mangelsdorf, D J, C Thummel, M Beato, P Herrlich, G Schütz, K Umesono, B Blumberg, et al. 1995. « The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade ». *Cell* 83 (6): 835-39.
- Martin, Claudio M., Fran Priestap, Harold Fisher, Robert A. Fowler, Daren K. Heyland, Sean P. Keenan, Christopher J. Longo, et al. 2009. « A Prospective, Observational Registry of Patients with Severe Sepsis: The Canadian Sepsis Treatment and Response Registry ». *Critical Care Medicine* 37 (1): 81-88. doi:10.1097/CCM.0b013e31819285f0.
- Martin, Greg S., David M. Mannino, Stephanie Eaton, et Marc Moss. 2003. « The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000 ». *The New England Journal of Medicine* 348 (16): 1546-54. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- Matulich, D T, B J Spindler, M Schambelan, et J D Baxter. 1976. « Mineralocorticoid Receptors in Human Kidney ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 43 (5): 1170-74. doi:10.1210/jcem-43-5-1170.
- Maxime, Virginie, Olivier Lesur, et Djillali Annane. 2009. « Adrenal Insufficiency in Septic Shock ». *Clinics in Chest Medicine* 30 (1): 17-27, vii. doi:10.1016/j.ccm.2008.10.003.
- Medina, Eva. 2010. « Murine Model of Polymicrobial Septic Peritonitis Using Cecal Ligation and Puncture (CLP) ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 602: 411-15. doi:10.1007/978-1-60761-058-8_23.
- Missaghian, Erika, Petra Kempná, Bernhard Dick, Andrea Hirsch, Rasoul Alikhani-Koupaei, Bernard Jégou, Primus E Mullis, Brigitte M Frey, et Christa E Flück. 2009. « Role of DNA Methylation in the Tissue-Specific Expression of the CYP17A1 Gene for

- Steroidogenesis in Rodents ». *The Journal of Endocrinology* 202 (1): 99-109. doi:10.1677/JOE-08-0353.
- Mitsky, Valery P., Robert J. Workman, Wendell E. Nicholson, Joan Vernikos, Rose M. Robertson, et David Robertson. 1994. « A sensitive radioimmunoassay for fludrocortisone in human plasma ». *Steroids* 59 (9): 555-58. doi:10.1016/0039-128X(94)90074-4.
- Mitts, Thomas F., Severa Bunda, Yanting Wang, et Aleksander Hinek. 2010. « Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor Antagonists Modulate Elastin and Collagen Deposition in Human Skin ». *Journal of Investigative Dermatology* 130 (10): 2396-2406. doi:10.1038/jid.2010.155.
- Morrison, N, S B Harrap, J L Arriza, E Boyd, et J M Connor. 1990. « Regional Chromosomal Assignment of the Human Mineralocorticoid Receptor Gene to 4q31.1 ». *Human Genetics* 85 (1): 130-32.
- Oelkers, W., S. Diederich, et V. Bähr. 1992. « Diagnosis and Therapy Surveillance in Addison's Disease: Rapid Adrenocorticotropin (ACTH) Test and Measurement of Plasma ACTH, Renin Activity, and Aldosterone ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75 (1): 259-64. doi:10.1210/jcem.75.1.1320051.
- Otte, Christian, Holger Jahn, Alexander Yassouridis, Josef Arlt, Nina Stober, Philip Maass, Klaus Wiedemann, et Michael Kellner. 2003a. « The mineralocorticoid receptor agonist, fludrocortisone, inhibits pituitary-adrenal activity in humans after pre-treatment with metyrapone ». *Life Sciences* 73 (14): 1835-45. doi:10.1016/S0024-3205(03)00513-7.
- . 2003b. « The Mineralocorticoid Receptor Agonist, Fludrocortisone, Inhibits Pituitary-Adrenal Activity in Humans after Pre-Treatment with Metyrapone ». *Life Sciences* 73 (14): 1835-45.
- Padidela, Raja, et Peter C. Hindmarsh. 2010. « Mineralocorticoid Deficiency and Treatment in Congenital Adrenal Hyperplasia ». *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2010. doi:10.1155/2010/656925.
- Pascual-Le Tallec, Laurent, et Marc Lombès. 2005. « The Mineralocorticoid Receptor: A Journey Exploring Its Diversity and Specificity of Action ». *Molecular Endocrinology* 19 (9): 2211-21. doi:10.1210/me.2005-0089.
- Pitt, Bertram, Willem Remme, Faiez Zannad, James Neaton, Felipe Martinez, Barbara Roniker, Richard Bittman, Steve Hurley, Jay Kleiman, et Marjorie Gatlin. 2003. « Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction ». *New England Journal of Medicine* 348 (14): 1309-21. doi:10.1056/NEJMoa030207.
- Pitt, Bertram, Faiez Zannad, Willem J. Remme, Robert Cody, Alain Castaigne, Alfonso Perez, Jolie Palensky, et Janet Wittes. 1999. « The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure ». *New England Journal of Medicine* 341 (10): 709-17. doi:10.1056/NEJM199909023411001.
- Polito, Andrea, Geoffroy Lorin de la Grandmaison, Arnaud Mansart, Estelle Louiset, Hervé Lefebvre, Tarek Sharshar, et Djillali Annane. 2010. « Human and Experimental Septic Shock Are Characterized by Depletion of Lipid Droplets in the Adrenals ». *Intensive Care Medicine* 36 (11): 1852-58. doi:10.1007/s00134-010-1987-1.
- Raurich, Joan M., Juan A. Llompарт-Pou, Jordi Ibáñez, Guillem Frontera, Olatz Pérez, Laura García, et José I. Ayestarán. 2007a. « Low-dose steroid therapy does not affect hemodynamic response in septic shock patients ». *Journal of Critical Care* 22 (4): 324-29. doi:10.1016/j.jcrc.2007.05.005.

- . 2007b. « Low-dose steroid therapy does not affect hemodynamic response in septic shock patients ». *Journal of Critical Care* 22 (4): 324-29. doi:10.1016/j.jcrc.2007.05.005.
- Reichardt, Holger M., Jan P. Tuckermann, Martin Gottlicher, Maja Vujic, Falk Weih, Peter Angel, Peter Herrlich, et Gunther Schutz. 2001. « Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor ». *The EMBO Journal* 20 (24): 7168-73. doi:10.1093/emboj/20.24.7168.
- Rothwell, P. M., Z. F. Udwadia, et P. G. Lawler. 1991. « Cortisol Response to Corticotropin and Survival in Septic Shock ». *Lancet* 337 (8741): 582-83.
- Schumer, W. 1976. « Steroids in the treatment of clinical septic shock. » *Annals of Surgery* 184 (3): 333-41.
- Shao, Bing, Xiaoliang Cui, Yi Yang, Jing Zhang, et Yongnin Wu. 2009. « Validation of a Solid-Phase Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometric Method for the Detection of 16 Glucocorticoids in Pig Tissues ». *Journal of AOAC International* 92 (2): 604-11.
- Simon, Nicolas, Frederic Castinetti, Floriane Ouliac, Nathalie Lesavre, Thierry Brue, et Charles Oliver. 2010. « Pharmacokinetic Evidence for Suboptimal Treatment of Adrenal Insufficiency with Currently Available Hydrocortisone Tablets ». *Clinical Pharmacokinetics* 49 (7): 455-63. doi:10.2165/11531290-000000000-00000.
- Sørensen, T. I., G. G. Nielsen, P. K. Andersen, et T. W. Teasdale. 1988. « Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees ». *The New England Journal of Medicine* 318 (12): 727-32. doi:10.1056/NEJM198803243181202.
- Sprung, Charles L., Djillali Annane, Didier Keh, Rui Moreno, Mervyn Singer, Klaus Freivogel, Yoram G. Weiss, et al. 2008. « Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock ». *The New England Journal of Medicine* 358 (2): 111-24. doi:10.1056/NEJMoa071366.
- Sprung, C L, P V Caralis, E H Marcial, M Pierce, M A Gelbard, W M Long, R C Duncan, M D Tendler, et M Karpf. 1984. « The Effects of High-Dose Corticosteroids in Patients with Septic Shock. A Prospective, Controlled Study ». *The New England Journal of Medicine* 311 (18): 1137-43. doi:10.1056/NEJM198411013111801.
- Tang, C, K Kassahun, I S McIntosh, J Brunner, et A D Rodrigues. 2000. « Simultaneous Determination of Urinary Free Cortisol and 6beta-Hydroxycortisol by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry and Its Application for Estimating Hepatic CYP3A Induction ». *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 742 (2): 303-13.
- Taylor, Robert L., Stefan K. Grebe, et Ravinder J. Singh. 2004. « Quantitative, Highly Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Detection of Synthetic Corticosteroids ». *Clinical Chemistry* 50 (12): 2345-52. doi:10.1373/clinchem.2004.033605.
- Thermofinnigan.com.
« http://sjsupport.thermofinnigan.com/techpubs/manuals/TSQ_series_Start.pdf?bcsi_scan_628cd39dca2568d2=0&bcsi_scan_filename=TSQ_series_Start.pdf ».
- The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. 1987. « Effect of High-Dose Glucocorticoid Therapy on Mortality in Patients with Clinical Signs of Systemic Sepsis. » *The New England Journal of Medicine* 317 (11): 659-65. doi:10.1056/NEJM198709103171102.
- Thorn, George W., Robert H. Sheppard, William I. Morse, William J. Reddy, Paul M. Beigelman, et Albert E. Renold. 1955. « Comparative Action of Aldosterone and 9-

- Alpha-Fluorohydrocortisone in Man ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 61 (2): 609-19. doi:10.1111/j.1749-6632.1955.tb42514.x.
- Toothaker, R. D., W. A. Craig, et P. G. Welling. 1982. « Effect of Dose Size on the Pharmacokinetics of Oral Hydrocortisone Suspension ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (10): 1182-85.
- Touitou, Y, A Auzéby, et A Bogdan. 1990. « Cortisol and Cortisone Production in Rat and Mouse Adrenal Incubations ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37 (2): 279-84.
- Touitou, Y, M Fèvre, A Bogdan, A Reinberg, J De Prins, H Beck, et C Touitou. 1984. « Patterns of Plasma Melatonin with Ageing and Mental Condition: Stability of Nyctohemeral Rhythms and Differences in Seasonal Variations ». *Acta Endocrinologica* 106 (2): 145-51.
- Tromm, A., H. Möllmann, J. Barth, G. Hochhaus, M. Krieg, C. Bigalke, A. Möllmann, et H. Derendorf. 2001. « Pharmacokinetics and Rectal Bioavailability of Hydrocortisone Acetate after Single and Multiple Administration in Healthy Subjects and Patients ». *Journal of Clinical Pharmacology* 41 (5): 536-41.
- Viengchareun, Say, Damien Le Menuet, Laetitia Martinerie, Mathilde Munier, Laurent Pascual-Le Tallec, et Marc Lombes. 2007. « The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology ». *Nuclear Receptor Signaling* 5 (novembre). doi:10.1621/nrs.05012.
- Walker, Brian R, Ruth Andrew, Brigitte Escoubet, et Maria-Christina Zennaro. 2014. « BRIEF REPORT: Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Adults with Mineralocorticoid Receptor Haploinsufficiency ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, avril, jc20141420. doi:10.1210/jc.2014-1420.
- Webster, Jeffrey C., Robert H. Oakley, Christine M. Jewell, et John A. Cidlowski. 2001. « Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative ? isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6865-70. doi:10.1073/pnas.121455098.
- Weigelt, J A, J F Norcross, K R Borman, et W H Snyder 3rd. 1985. « Early Steroid Therapy for Respiratory Failure ». *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 120 (5): 536-40.
- Zennaro, M C, M C Keightley, Y Kotelevtsev, G S Conway, F Soubrier, et P J Fuller. 1995. « Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (36): 21016-20.

RESUME

Le choc septique est défini par une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat en présence d'une réponse inflammatoire systémique suite à une infection. Il est responsable de 10 % des admissions en réanimation et malgré des progrès thérapeutiques constants, la mortalité liée au sepsis varie entre 30 % et 60 % dans les cas de choc septique. Dans 50 % des cas, le choc septique est associé à une insuffisance surrénale relative ce qui diminue la probabilité de survie des patients. L'introduction d'une opothérapie substitutive s'est montrée efficace dans l'amélioration de la survie. Les patients sont alors traités avec de l'hydrocortisone et de la fludrocortisone, mais ce traitement est encore très controversé. En effet, la littérature est abondante sur les études de l'effet du cortisol associé ou non à la fludrocortisone, montrant des résultats discordants. Pour la première fois, nous avons pu mettre au point et valider une technique de quantification de la fludrocortisone plasmatique après une prise de 50 µg. Cette technique a pu ensuite être utilisée pour l'obtention de l'étude pharmacocinétique/pharmacodynamique de la fludrocortisone chez le volontaire sain et le patient septique avec insuffisance surrénale relative. Enfin, nous avons étudié la distribution et l'élimination de cette molécule chez la souris saine et deux modèles de sepsis.

Les paramètres pharmacocinétiques montrent que la demi-vie de la fludrocortisone est d'environ 1 h, avec un délai d'absorption d'environ 50 minutes. Nos travaux ont permis de mettre en évidence qu'il existe deux populations de patients : les absorbants et les non-absorbants la fludrocortisone, qui représentent 30 % des patients testés, ce qui pourrait être à l'origine de la controverse sur les effets bénéfiques de cette molécule sur la survie des patients. Cependant nous n'avons pu mettre en évidence aucun effet hémodynamique de cette molécule sur les patients septiques. L'étude sur les souris montre que la demi-vie de la fludrocortisone est augmentée chez les souris septiques et sa distribution est modifiée.

MOTS CLES : Fludrocortisone, pharmacocinétique, choc septique, insuffisance surrénale relative