



HAL
open science

Le méthotrexate chez le chien et le cheval : études pharmacocinétiques et perspectives cliniques

Antoine Rostang

► **To cite this version:**

Antoine Rostang. Le méthotrexate chez le chien et le cheval : études pharmacocinétiques et perspectives cliniques. Médecine vétérinaire et santé animale. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1016 . tel-02613744

HAL Id: tel-02613744

<https://theses.hal.science/tel-02613744>

Submitted on 20 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Spécialité de doctorat :

Soutenue publiquement le 23/01/2020, par :
Antoine ROSTANG

Le méthotrexate chez le chien et le cheval : études pharmacocinétiques et perspectives cliniques

Devant le jury composé de :

A préciser après la soutenance

CADIERGUES Marie-Christine

LACARELLE Bruno

STORCK Fanny

BOUSQUET-MELOU Alain

PAYEN GAY Léa

PIN Didier

PROUILLAC Caroline

BERNY Philippe

PU, ENVT

PUPH, AMU

PU, ENVA

PU, ENVT

PUPH, UCBL

PU, VAS

PU, VAS

PU, VAS

Présidente du jury

Rapporteuse

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Cette thèse a été préparée dans l'équipe **ICE - Interactions Cellules Environnement**, dirigée par le Professeur Samuel BUFF, unité de recherche de VetAgro Sup, située au 1 Avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile.

Titre : Le méthotrexate chez le chien et le cheval : études pharmacocinétiques et perspectives cliniques

Mots clés : méthotrexate, chien, cheval, pharmacocinétique, tolérance, clairance, biodisponibilité, dermatite atopique

Résumé : Le méthotrexate est très utilisé chez l'homme à faible dose hebdomadaire, comme immunomodulateur et anti-inflammatoire. En médecine canine ou équine, il pourrait représenter une alternative intéressante pour traiter les maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité. C'est pourquoi notre étude a pour principal objectif d'évaluer sa tolérance chez le chien et le cheval, et de déterminer un schéma posologique adapté à chaque espèce, par une approche pharmacocinétique. Nos résultats montrent que la tolérance du méthotrexate chez l'animal est bonne. Chez le chien, on note des effets secondaires peu graves (anorexie voire vomissements ou diarrhée) et des élévations intermittentes des enzymes hépatiques. Chez le cheval, les seuls effets secondaires enregistrés concernent les enzymes hépatiques, avec des élévations réversibles à l'arrêt du traitement. La biodisponibilité par voie orale est beaucoup plus faible que par voie sous-cutanée, et inférieure à 1% chez le cheval. La clairance de la molécule chez le chien est légèrement supérieure à l'homme. Chez le cheval, une clairance et un métabolisme réduit conduisent à recommander une diminution des doses. Nous proposons 0,2 mg/kg/semaine, ce qui devra être confirmé par des essais cliniques. Notre second objectif est d'évaluer l'efficacité du méthotrexate pour le traitement de la dermatite atopique du chien, au travers de la mise en place d'un essai clinique de phase III en double aveugle. Le recrutement des animaux est toujours en cours. Toutefois, les premiers résultats obtenus sur 6 chiens sont satisfaisants en terme de réponse clinique, à une posologie oscillant entre 0,25 et 0,5 mg/kg/semaine par voie sous-cutanée.

Title: Methotrexate in dogs and horses: pharmacokinetic studies and clinical perspectives.

Key words: methotrexate, dog, horse, pharmacokinetic, tolerance, clearance, bioavailability, atopic dermatitis

Abstract: Methotrexate is widely used in humans at low doses, once weekly, as an immunomodulating and anti-inflammatory drug. This drug may be an interesting therapeutic alternative for the management of autoimmune or hypersensitivity diseases in pets or horses. The main objective of our study is to evaluate its tolerance in dogs and horses, and to study its pharmacokinetic characteristics to determine an appropriate dosing regimen for each species. Our results show that methotrexate is well tolerated in animals. In dogs, mild adverse effects (anorexia or even vomiting or diarrhea) and intermittent elevations of liver enzymes are observed. In horses, the only adverse effects reported are elevations in liver enzymes, reversible upon discontinuation of treatment. Oral bioavailability is much lower than subcutaneous bioavailability, and less than 1 % in horses. The methotrexate clearance in dogs is slightly higher than in humans. In horses, reduced clearance and metabolism lead to a recommendation for lower doses. We suggest 0.2 mg/kg/week, which will have to be confirmed by clinical trials. Our second objective is to evaluate the efficacy of methotrexate in the treatment of atopic dermatitis in dogs in a double-blind Phase III clinical trial. Animal recruitment is still ongoing. The first results obtained on 6 dogs, however, are satisfactory in terms of clinical response to a dosage ranging from 0.25 to 0.5 mg/kg/week subcutaneously.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres du jury :

- **Mme Caroline PROUILLAC**, qui a dirigé ce travail, m'a accompagné dans la découverte de la recherche scientifique (et de la recherche de fonds), a relu avec bienveillance mes différents écrits (en urgence) et m'a accordé sa confiance. Sincères remerciements, professeur.
- **M. Philippe BERNY**, qui m'a accueilli à l'ENVL (ici, j'ai le droit) et a co-dirigé ce travail. Merci pour tes conseils avisés.
- **M. Didier PIN**, qui a participé à ma découverte des subtilités de la dermatologie vétérinaire et des essais cliniques et a toujours répondu avec bienveillance à toutes mes nombreuses sollicitations. Merci.
- **Mme Marie-Christine CADIERGUES**, **M. LACARELLE Bruno** et **Mme STORCK Fanny**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Sincères remerciements.
- **Mme PAYEN GAY Léa** et **M. BOUSQUET-MELOU Alain**, qui ont accepté d'examiner ce travail en tant que membre du jury. Sincères remerciements.
- **Mme PONCE Frédérique**, **M. GUITTON Jérôme** et **M. DAVID Laurent**, qui ont suivi mon travail en tant que membres du comité de suivi de thèse. Merci pour vos précieux conseils au cours ces deux années de doctorat.

Je tiens également à remercier toutes celles et tous ceux qui ont contribué à ce travail :

- **Mme DESJARDINS Isabelle**, pour son accompagnement, sa disponibilité et sa bonne humeur, malgré un planning toujours trop plein. Merci beaucoup.
- **Mme MARGUIN-BONNET Michèle**, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa redoutable efficacité pour gérer les difficultés administratives. Merci également de brillamment m'épauler pour la gestion de l'essai clinique en cours, avec efficacité et bienveillance.
- **M. MAACHE Mimoun**, pour sa gentillesse et sa rigueur indispensable à la poursuite de l'essai clinique. Merci pour tout Mimoun.

- **Mlle PANZUTI Pauline**, pour son recrutement redoutablement efficace dans le cadre de l'essai clinique, sa bonne humeur et son grand professionnalisme. Merci
- **Mme MOSCA Marion**, pour son aide dans la recherche de fonds et son accompagnement bienveillant quant à la mise en place de l'essai clinique. Merci
- **Mme ESPANA Bernadette**, pour sa patience face à mes exigences toujours renouvelées, et ses conseils avisés sur les voies complexes de l'analytique.
- **M. JEANNIN Morgan et Mme LUISSIEZ Coralie**, pour leur travail sur la récolte des données précliniques chez le chien et nos échanges enthousiastes.
- **Toute l'équipe du laboratoire de toxicologie** pour leur accueil chaleureux et leur grande disponibilité.
- **Tous les centres cliniques et les dermatologues spécialisés** qui ont accepté de recruter gracieusement pour nous, sincères remerciements.
- **L'équipe de techniciennes de la Clinéquine**, pour leur aide indispensable à la réalisation des études sur le cheval. Merci beaucoup.
- **Toute l'équipe d'ONIRIS, mes collègues de BioEpar et de l'unité de pharmacologie et toxicologie**, pour le temps qu'ils m'ont dégagé afin d'assurer la rédaction de ce manuscrit, ainsi que leurs conseils avisés. Merci à tous.

-

A Cyrielle, qui m'a soutenu dans cette folle aventure

A mon fils Gabriel

A ma fille Elise

A ma fille Clarisse

Sommaire

Table des illustrations	14
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	15
Table des annexes	16
Avant-propos	17
Introduction	19
1 Synthèse bibliographique	21
1.1 Historique	23
1.2 Propriétés physico-chimiques	24
1.3 Pharmacocinétique :	25
1.3.1 Absorption	25
1.3.2 Distribution	28
1.3.3 Métabolisation	34
1.3.4 Élimination	42
1.4 Pharmacodynamie	43
1.4.1 Cytostatique sélectif de la phase S de la réplication cellulaire	44
1.4.2 Action anti-inflammatoire : un mécanisme discuté	48
1.4.3 Effet immunosuppresseur et apoptotique	50
1.4.4 Autres effets	51
1.4.5 Pharmaco-génomique	52
1.4.6 Résistance au méthotrexate	53
1.5 Tolérance	53

1.5.1	Cytotoxicité	53
1.5.2	Effets secondaires	55
1.5.3	Complémentation en acide folique ou folinique	58
2	Contexte et objectifs	61
2.1	Contexte	63
2.1.1	Pharmacopée disponible chez l'animal.....	64
2.1.2	Le traitement de la dermatite atopique du chien.....	70
2.1.3	Dermatoses auto-immunes chez le cheval	72
2.2	Objectifs du travail de thèse	73
2.2.1	Objectif N°1 : études précliniques chez le chien sain	73
2.2.2	Objectif N°2 : étude clinique de phase III chez le chien souffrant de dermatite atopique modérée à sévère	74
2.2.3	Objectif N°3 : études précliniques chez le cheval sain.....	74
3	Etude de la tolérance et de la pharmacocinétique du méthotrexate chez le chien Beagle sain	77
3.1	Contexte de l'étude.....	79
3.2	Objectifs	79
3.3	Publication N°1	80
3.4	Résultats - Discussion	92
4	Perspectives cliniques – Mise en place d'un essai clinique de phase III pour le traitement de la dermatite atopique canine	95
4.1	Contexte de l'étude.....	97
4.2	Objectif.....	99
4.3	Matériel et méthode	99
4.3.1	<i>Choix des critères d'inclusion.....</i>	99
4.3.2	<i>Choix des marqueurs de suivi</i>	100

4.3.3	<i>Question principale</i>	102
4.3.4	<i>Questions secondaires</i>	103
4.3.5	<i>Détermination du schéma posologique chez le chien</i>	105
4.3.6	<i>Protocole d'étude</i>	109
4.3.7	<i>Méthodes analytiques</i>	111
4.3.8	<i>Ethique et bien-être animal</i>	111
4.4	Résultats préliminaires et discussion	112
4.4.1	Inclusions.....	112
4.4.2	Tolérance et schéma posologique du méthotrexate.....	112
4.4.3	Efficacité clinique du méthotrexate pour le traitement de la dermatite atopique canine.....	115
4.4.4	Pharmacologie du méthotrexate chez le chien.....	120
4.5	Perspectives	121
5	Etude de la pharmacocinétique du méthotrexate dans l'espèce équine	123
5.1	Contexte de l'étude.....	125
5.2	Objectifs.....	125
5.3	Publication N°2.....	126
5.4	Résultats - Discussion.....	150
5.5	Perspectives cliniques.....	152
	Conclusions et perspectives	153
	Références bibliographiques	155
	Annexe 1 : Protocole d'étude clinique	176
	Annexe 2 : Document d'information standard	217

Table des illustrations

Figure 1 : Structures chimiques comparées de l'acide folique et du méthotrexate	24
Figure 2 : Transport des folates et du méthotrexate au travers des entérocytes de la portion proximale de l'intestin grêle	26
Figure 3 : Voies d'entrée des folates et du méthotrexate	30
Figure 4 : Distribution et métabolisme intracellulaire du méthotrexate	33
Figure 5 : Mode d'action cytostatique du méthotrexate.....	45
Figure 6 : Mode d'action anti-inflammatoire du méthotrexate	49
Figure 7 : Evolution des scores CADESI-04 au cours du temps pour les animaux sous méthotrexate	116
Figure 8 : Evolution des scores de prurit au cours du temps pour les animaux sous méthotrexate	117
Figure 9 : Evolution des scores CADESI-04 au cours du temps pour les animaux sous ciclosporine	118
Figure 10 : Evolution des scores de prurit au cours du temps pour les animaux sous ciclosporine	119

Liste des tableaux

Tableau 1 : Traitements systémiques utilisés pour la gestion de la dermatite atopique de l'homme	98
Tableau 2 : Schémas posologiques testés chez l'homme pour le traitement de la dermatite atopique modérée à sévère avec du méthotrexate	107
Tableau 3 : Concentrations de méthotrexate intra-érythrocytaire sous forme mono- ou polyglutamates (nmol/g de globules rouges) mesurées au cours de l'essai clinique	121

Liste des abréviations

5-CH₃-THF : 5 méthyl-tétrahydrofolate	DAMPA : acide diamino-2,4-N-10-méthylptéroïque
5-CHO-THF : leucovorine	DE-Study : dose-escalation study
5,10=CH-THF : 5,10-méthényl-tétrahydrofolate	DHF : dihydrofolate
5,10-CH₂-THF : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate	DHFR : dihydrofolate réductase
7OH-MTX : 7 hydroxy-méthotrexate	dTMP : thymidine monophosphate
ADA : adénosine désaminase	dUMP : monophosphate de désoxyuridine
ADN : acide désoxyribonucléique	EMA : european medicines agency
AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide	F-AICAR : formyl-AICAR
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens	FDA : Food and Drug administration
ALAT : alanine amino-transférase	FTHF-CL : 5-formyltétrahydrofolate cyclo-ligase
AMP : adénosine monophosphate	FPGS : folyl-polyglutamate synthase
ASC : aire sous la courbe	FR : récepteurs aux folates
BCRP : breast cancer resistance protein	GGH : γ -glutamyl-hydrolase
B-Study : bioavailability study	GGT : gamma glutamyl-transpeptidase
	GLDH : glutamate déshydrogénase
	GR : globules rouges

IL : interleukine	NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
INF : interféron	NFS : numération de la formule sanguine
IM : voie intramusculaire	NK : natural killer
IMP : inosine monophosphate	PAL : phosphatases alcalines
IV : voie intraveineuse	PCFT : proton coupled folate transporter
JAK : janus kinase	PNN : polynucléaires neutrophiles
kd : constante de dissociation	RCP : résumé des caractéristiques du produit
Ki : constante d'inhibition	RFC : reduced folate carrier
LOQ : limit of quantification	SHMT : sérine hydroxy-méthyl transférase
MAPK : mitogen-activated protein kinases	SC : sous-cutané
MFS : major facilitator superfamily of transporters	SLC : solute carrier
MRP : multidrug resistance protein	THF : tétrahydrofolate
MTHF-D : méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase	TNF : facteur de nécrose tumorale
MTHFR : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase	TS : thymidylate synthase
MTX : méthotrexate	Vmax : vitesse maximale
MTX-PG : méthotrexate polyglutamates	VSS : volume de distribution à l'équilibre (<i>steady state</i>)

Table des annexes

Annexe 1 : Protocole d'étude clinique.....	176
Annexe 2 : Document d'information standard.....	217

Avant-propos

Ce travail de thèse est issu d'un projet débuté plusieurs années avant mon arrivée par le Pr Didier Pin. Son objectif était double. Le premier était de proposer une alternative thérapeutique lorsque les traitements conventionnels immunomodulateurs ne permettaient pas d'obtenir des résultats cliniques satisfaisants. Le second était de trouver une prise en charge thérapeutique raisonnable d'un point de vue économique, lorsque les ressources financières des propriétaires étaient limitées. Ainsi, au sein du service de dermatologie de VetAgro Sup, le méthotrexate a été proposé dès les années 2010 en pratique clinique, dans certaines situations particulières. Cette molécule jusqu'alors très peu utilisée en médecine vétérinaire était déjà largement employée chez l'homme pour le traitement du psoriasis ou de l'arthrite rhumatoïde. Son utilisation pour traiter d'autres maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité était à son début. Les résultats cliniques obtenus ont été encourageants, principalement sur des chiens souffrant de dermatite atopique, mais également sur quelques équidés souffrant de lupus érythémateux. Ces premiers résultats ont été précurseurs au développement d'études formalisées, pour confirmer les premières observations cliniques et affiner le schéma posologique à utiliser.

Introduction

Le méthotrexate (MTX) est un analogue de l'acide folique. Dès les années 1960, son usage à faible dose chez l'homme pour le traitement du psoriasis récalcitrant aux autres thérapeutiques a ouvert la voie à son utilisation comme anti-inflammatoire et immunomodulateur. Chez l'animal, pour autant, cette molécule est restée peu utilisée, un autre antimétabolite lui étant généralement préféré, l'azathioprine. Toutefois, le regain d'intérêt récent en médecine humaine pour le MTX a également suscité de l'intérêt quant à son utilisation chez l'animal, d'autant que les molécules immunomodulatrices sont peu nombreuses en médecine vétérinaire. Le MTX existe aujourd'hui sous plusieurs formes galéniques, disponibles en pharmacie sur prescription. Son second intérêt est son coût peu élevé pour le propriétaire, notamment pour des animaux de grande taille, facilitant ainsi l'observance des traitements de très longue durée.

Les données bibliographiques concernant le MTX utilisé à faible dose chez l'homme, ses propriétés pharmacologiques ainsi que des données de tolérance seront présentées dans la première partie de ce document. Cette partie fondamentale permettra au lecteur de mieux appréhender les parties suivantes relatives à nos travaux de recherche. La seconde partie introduit le questionnement scientifique ayant dirigé l'élaboration de l'étude expérimentale. Nos travaux ont eu pour premier objectif de déterminer et comprendre la pharmacocinétique du MTX chez le chien et le cheval, afin de proposer un schéma posologique adapté à ces deux espèces. Les résultats de ces études sont présentés en **partie III** pour le chien, et en **partie V** pour le cheval. Le second objectif de nos travaux a été la mise en place d'un essai de phase III sur des chiens souffrant de dermatite atopique modérée à sévère. Cet essai clinique est détaillé en **partie IV**.

PARTIE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse des connaissances sur la
pharmacologie du MTX, utilisé à faible dose,
chez l'homme

1.1 Historique

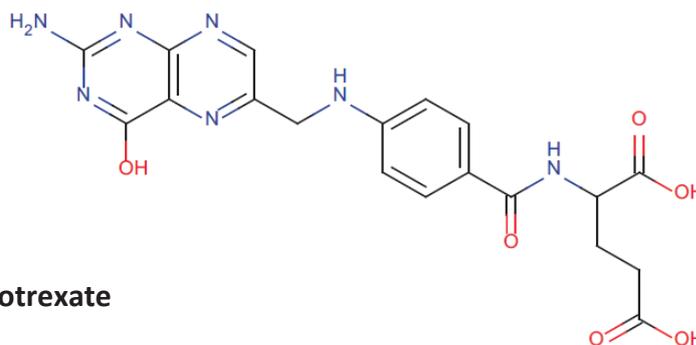
Le MTX a été synthétisé pour la première fois en 1946 (Angier *et al.*, 1946). Dès les années 1950, il est employé pour **ses propriétés cytostatiques** en cancérologie (Olsen, 1991). Aujourd’hui, cet usage est encore très répandu en oncologie, notamment pour traiter les leucémies aiguës lymphoblastiques (Krivit *et al.*, 1966), les lymphomes malins non hodgkiniens (Minard-Colin *et al.*, 2015) ou les ostéosarcomes (Ferrari *et al.*, 2015).

Cette molécule a été utilisée pour ses **propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires**, d’abord dans le traitement du psoriasis récalcitrant aux autres thérapeutiques dans les années 1960, puis pour traiter l’arthrite rhumatoïde dans les années 1980. Cet usage est lié au développement d’un **schéma posologique original**, basé sur une administration hebdomadaire à faible dose. Ce schéma de traitement a permis de limiter fortement les effets secondaires associés aux traitements quotidiens. Depuis, d’autres indications pour des maladies auto-immunes ou à médiation immune ont été proposées (liste non exhaustive) : les spondylarthropathies (Creemers *et al.*, 1995), les myopathies inflammatoires idiopathiques juvéniles (Huber, 2018), le psoriasis vulgaire, sévère et généralisé (Menting *et al.*, 2016 ; Haustein, *et al.*, 2000 ; Nast *et al.*, 2015), la dermatite atopique (Dvorakova *et al.*, 2017 ; Goujon *et al.*, 2018), le lupus érythémateux (Sakthiswary *et al.*, 2014), l’artérite à cellules géantes (Watelet *et al.*, 2017), la granulomatose de Wegener (Puéchal *et al.*, 2016) ou la maladie de Crohn (Djurić *et al.*, 2018). Ainsi, le méthotrexate se révélant efficace, bien toléré et peu coûteux, son utilisation s’est fortement développée, aussi bien en monothérapie qu’en association avec d’autres molécules d’intérêt.

1.2 Propriétés physico-chimiques

Le MTX, ou acide 4-amino-N10-méthyl-ptéroyl glutamique, est un analogue de l'acide folique. C'est un acide faible, peu liposoluble, d'un poids moléculaire de 454 daltons. La molécule est chargée négativement à pH neutre (Grim *et al.*, 2003). Le MTX contient une **fonction glutamate** (MTX ou MTX-PG₁) sur laquelle peuvent se greffer des groupes glutamates supplémentaires, au sein de certaines populations cellulaires, donnant des **formes polyglutamates** (MTX-PG₂ à 7) : cf. **figure N°1**.

Acide folique



Méthotrexate

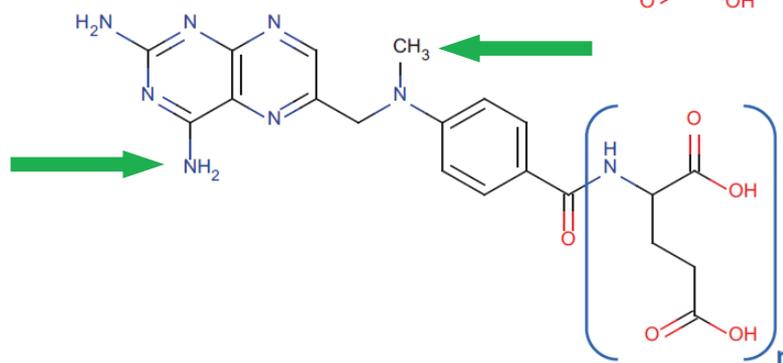


Figure 1. Structures chimiques comparées de l'acide folique et du méthotrexate

Les différences sont indiquées par des flèches vertes. Le groupement glutamate est indiqué entre parenthèses sur la molécule du méthotrexate. Jusqu'à 6 groupes glutamates supplémentaires peuvent être ajoutés suite à la polyglutamatation intracellulaire. Ceci est également le cas pour l'acide folique ; d'après den Boer (2014).

1.3 Pharmacocinétique :

Il n'existe pratiquement aucune information concernant l'usage du méthotrexate, chez le chien ou le cheval, dans la littérature. Toutes les données disponibles sont issues de travaux chez les animaux de laboratoire (rongeurs principalement) ou chez l'Homme. Sauf précision, toutes les données présentées dans cette revue bibliographique sur la pharmacocinétique du MTX proviennent d'études chez l'Homme ou *in vitro*. De même, seules les spécificités pharmacocinétiques du MTX, administré **à faible dose**, avec un **schéma d'administration hebdomadaire**, ont été étudiées.

1.3.1 Absorption

1.3.1.1 Voie orale

Par voie orale, le MTX est absorbé, essentiellement, au niveau de la **portion proximale du jéjunum** (Songsiridej *et al.*, 1990), via des transporteurs actifs spécifiques et saturables. La voie passive transmembranaire est mineure (Tian *et al.*, 2007). On a longtemps considéré le RFC1 (Reduced Folate Carrier) comme le principal transporteur à l'origine de l'absorption des folates et des antifolates au niveau digestif, à défaut de meilleur candidat. Toutefois, son implication est remise en cause aujourd'hui, notamment à cause de sa très faible activité à pH acide alors que le pH du microenvironnement de la portion apicale de la bordure en brosse des entérocytes jéjunaux est d'environ 6. Suite au travail sur un anti-folate de nouvelle génération, le pémétrexed, de nouveaux transporteurs des folates dont l'activité est maximale à pH acide ont été mis en évidence : les **PCFT (Proton-coupled Folate Transporter)**. Ces transporteurs peuvent prendre en charge, à la fois, les formes oxydées (acide folique) ou réduites (tétrahydrofolate ou THF) et des antifolates, comme le MTX (Zhao *et al.*, 2011). Ces transporteurs joueraient un rôle, principalement, au niveau du passage de l'épithélium apical des entérocytes de l'intestin grêle (Assaraf, 2006 ; Zhao *et al.*, 2011) : *cf. figure N°2*. La sulfasalazine étant un inhibiteur de ce transporteur, son utilisation, en association avec le MTX lors du traitement de l'arthrite rhumatoïde, réduit significativement la biodisponibilité de ce dernier (Urquhart *et al.*, 2010). De même, PCFT étant très sensible au pH du milieu, les antiacides, comme les inhibiteurs de la pompe à protons, vont

influencer son activité mais également réduire son niveau d'expression (Urquhart *et al.*, 2010).

Le passage, depuis les entérocytes vers le compartiment sanguin, au travers de la membrane basolatérale, serait lié à des transporteurs ABC utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour la translocation de molécules au travers des membranes biologiques. On retrouve principalement **MRP3** (Multidrug Resistance Protein, gène ABCC3) (Zhao *et al.*, 2011). Ces transporteurs ABC sont détaillés dans la [partie distribution](#).

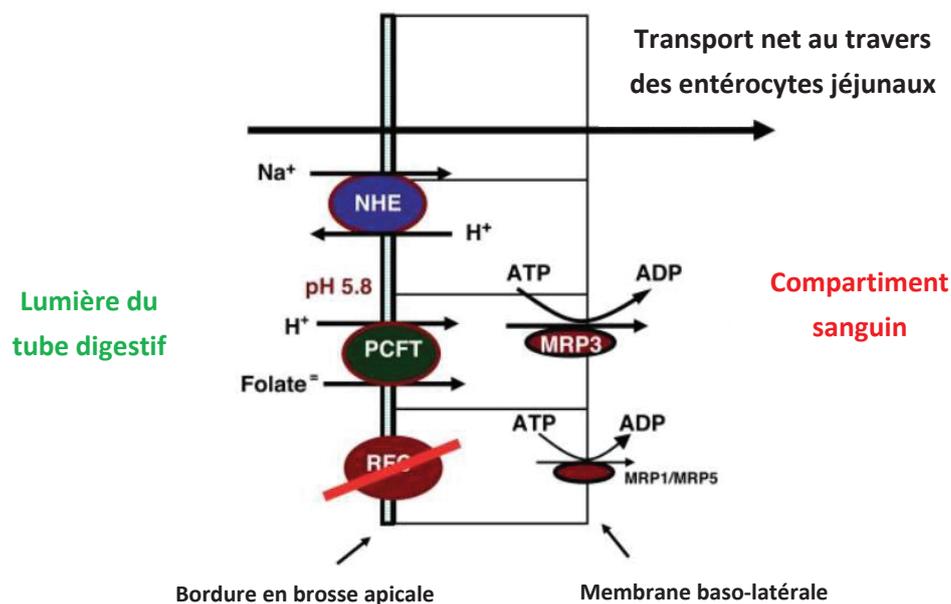


Figure 2. Transport des folates et du méthotrexate au travers des entérocytes de la portion proximale de l'intestin grêle

ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; MRP, Multidrug Resistance Protein ; NHE, Na⁺-H⁺ Exchanger ; PCFT, Proton-coupled Folate Transporter ; RFC, Reduced folate Carrier ; d'après Zhao *et al.*, 2011.

Parmi les sources de variabilité de l'absorption du MTX, l'influence de la prise alimentaire est controversée (Hamilton *et al.*, 1995 ; Oguey *et al.*, 1992 ; Godfrey *et al.*, 1998). Par contre, une atteinte des muqueuses intestinales, comme lors d'un syndrome de malabsorption intestinale, réduit l'absorption du MTX (Swierkot *et al.*, 2006). Une supplémentation orale en acide folique ou en acide folinique étant, habituellement, préconisée lors de prescription de MTX à faible dose, il est recommandé de décaler la prise

de 24h, par rapport à la prise du MTX, car ces molécules entrent en compétition au niveau des transporteurs.

La **biodisponibilité** moyenne mesurée chez l'Homme lors de l'utilisation de MTX à faible dose par voie orale varie de **30 à 90%** (Mathers *et al.*, 1993 ; van Roon *et al.*, 2010), ce qui traduit **une forte variabilité interindividuelle**. Plusieurs phénomènes permettent de l'expliquer :

- Tout d'abord, **l'absorption du MTX étant non linéaire**, par saturation des transporteurs actifs, on observe une forte variabilité de la biodisponibilité en fonction de la dose employée. Ainsi, à forte dose, en oncologie, la biodisponibilité moyenne est inversement proportionnelle à la dose employée (Songsiridej *et al.*, 1990) : la biodisponibilité moyenne observée pour des doses inférieures à 40 mg/m² est de 42% mais chute à 17% lors de l'utilisation de doses supérieures (Teresi *et al.*, 1987). Même lors de l'utilisation de faibles doses, on observe une chute de la biodisponibilité lorsque la dose augmente (Hamilton *et al.*, 1997). A 7,5 mg/semaine/individu, la voie orale est considérée comme équivalente à la voie injectable chez l'homme, avec une biodisponibilité proche de 100% (Hamilton *et al.*, 1997). A 15 mg/semaine/individu, la biodisponibilité moyenne est d'environ 70%. Au-delà, elle chute significativement (Schiff *et al.*, 2014). Lors de l'emploi d'un schéma posologique de 25 à 30 mg/semaine/individu, par voie orale (ce qui correspond aux doses les plus fortes qui sont habituellement utilisées lors de la prescription du MTX à faible dose), une division de la dose totale en plusieurs administrations espacées de 8h induit une augmentation de la biodisponibilité de près de 28% (Hoekstra *et al.*, 2006). Au-delà d'une dose de 15 mg/semaine/individu, l'aire sous la courbe (ASC), suite à une administration orale, atteint un plateau, ce qui n'est pas le cas de l'administration par voie sous-cutanée (Schiff *et al.*, 2014).
- La variabilité de la biodisponibilité enregistrée chez l'homme est également liée au fait que les posologies utilisées ne sont pas rapportées au poids du patient. Il s'agit d'une **dose unique** pour tous les adultes en mg/semaine.

- Il existe une forte **variabilité de l'effet de premier passage**, variabilité liée à l'existence de sous-populations à faible ou fort catabolisme : ceci contribue probablement à la variabilité mesurée de la biodisponibilité (Baggott *et al.*, 2009).
- Enfin, pour un certain nombre d'individus, la biodisponibilité est très éloignée de celle retrouvée dans la population générale, avec des écarts très différents au sein d'une même étude (van Roon *et al.*, 2010). L'origine de ces différences, ainsi que ses conséquences quant à la définition du schéma posologique, ne sont pas encore établies.

Contrairement à la variabilité interindividuelle, la **variabilité intra-individuelle est faible**. Les ASC de la concentration en fonction du temps mesurées entre 2 visites, espacées soit de 1 semaine (n=4) soit de 2 ans (n=6), ne varient que de 3 à 30% chez neuf patients sur dix recevant 15 mg MTX/semaine (Lebbe *et al.*, 1994). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre des solutions ou des comprimés (Jundt *et al.*, 1993).

1.3.1.2 Voie parentérale

Par voie injectable, que ce soit par voie intramusculaire ou sous-cutanée, la **biodisponibilité est considérée comme proche de 100%**. Il n'y a pas de différence statistiquement significative avec la voie IV (Boonchoong, 2003). L'ASC augmente sans atteindre de plateau lors d'une augmentation de la dose (Schiff *et al.*, 2014 ; Godfrey *et al.*, 1998).

1.3.2 Distribution

1.3.2.1 Distribution dans l'organisme

Le MTX sous sa forme native n'est que **partiellement lié à l'albumine** (35 à 50 %) alors que son métabolite (le 7 hydroxy-méthotrexate) est très fortement lié (91-95%) (Swierkot *et al.*, 2006). Le MTX **s'accumule dans le liquide interstitiel** qui sert de réservoir pour une redistribution vers le compartiment sanguin. Son usage doit, donc, être attentivement contrôlé en cas d'ascite ou d'épanchement pleural (Kremer, 2004 ; Swierkot *et al.*, 2006).

Les plus fortes concentrations en MTX sont atteintes dans les reins, le foie, la vessie, la rate, la peau et les cellules sanguines de la lignée rouge. Ainsi, à l'équilibre, pour des concentrations plasmatiques supérieures à 200 nmol/L, le rapport concentrations tissulaires sur concentrations plasmatiques est de 3 pour le foie ou le rein, de 1 pour le tractus digestif et de 0,15 pour les muscles (Boonchoong, 2003). Le MTX diffuse dans le liquide synovial où on le retrouve à des concentrations proches des concentrations plasmatiques. Ainsi, l'injection intra-articulaire ne présente pas d'avantage par rapport à la voie SC (Wiela-Hojenska *et al.*, 2004). Par contre, le MTX diffuse faiblement dans le système nerveux central, à cause de sa faible liposolubilité, avec un ratio des concentrations plasmatiques sur les concentrations dans le liquide cébrospinal de 30 :1 à l'équilibre lors d'administration sous forme de perfusion à forte dose.

Les concentrations plasmatiques de MTX sont généralement modélisées par un modèle tri-compartimental. La première phase, avec un déclin rapide des concentrations plasmatiques, correspond majoritairement à la distribution du MTX dans l'organisme, avec une demi-vie d'environ 0,75 h (Olsen, 1991 ; Mathers *et al.*, 1993). La seconde représente plutôt la clairance urinaire et biliaire de la molécule. Par voie IM, la demi-vie de cette portion de courbe est de 8,09 +/- 2,05 h (Edelman *et al.*, 1984). Le volume de distribution (Vss) varie de 0,59 à 1,16 L/kg (Boonchoong, 2003). A 24h, les concentrations sériques sont habituellement inférieures à 0,05 µmol/L. La dernière portion de la courbe n'est pas rapportée dans toutes les études, en lien avec la limite de détection de la méthode analytique et la durée de suivi des concentrations plasmatiques. Elle serait liée au recyclage entéro-hépatique voire au relargage depuis les formes intracellulaires. La pharmacocinétique du MTX est influencée par l'âge des patients, notamment avec un volume de distribution nettement augmenté chez le jeune et une excrétion urinaire plus rapide (Wang *et al.*, 1979).

1.3.2.2 Distribution intracellulaire

Le mode d'action du MTX étant intimement lié au métabolisme cellulaire, son entrée et son maintien dans la cellule sont indispensables à son action sur les enzymes cibles.

1.3.2.2.1 Voies d'influx

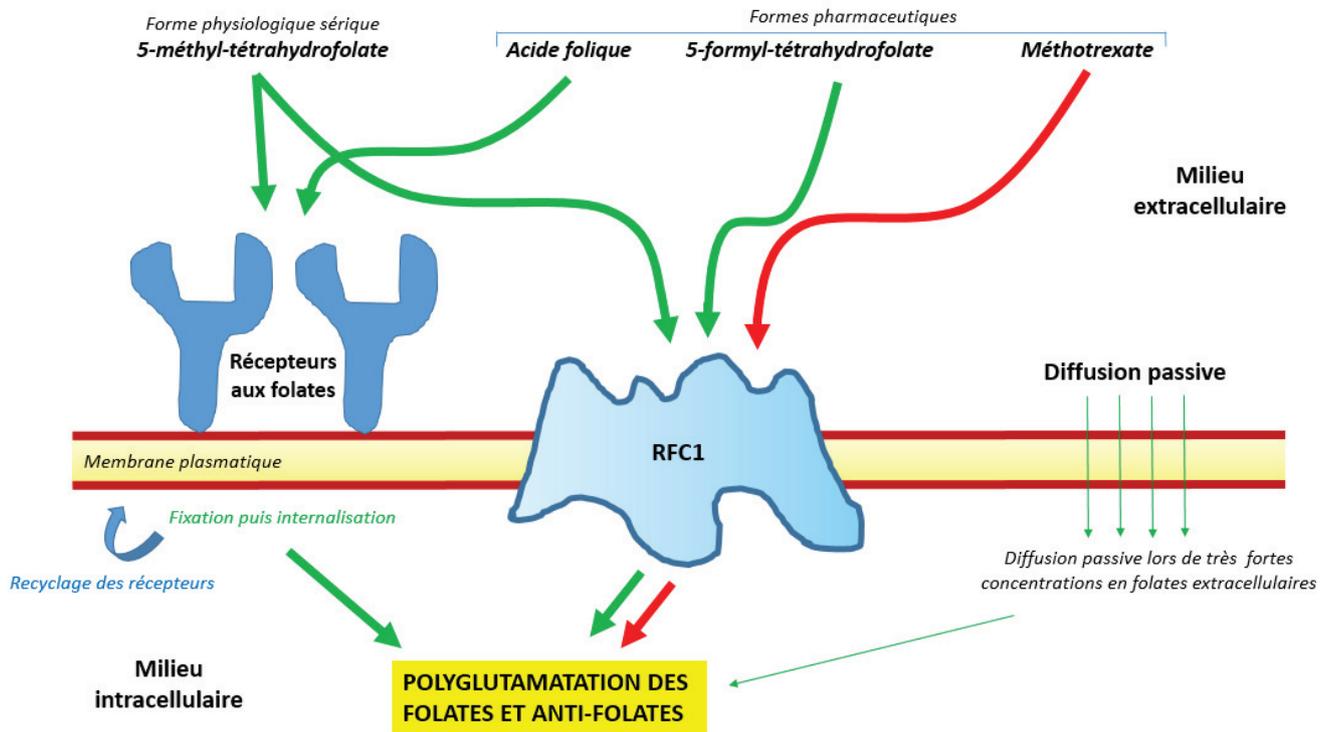


Figure 3. Voies d'entrée des folates et du méthotrexate

RFC1, reduced folate Carrier, adapté d'après Antony, 1992.

RFC (Reduced folate carrier)

Le MTX pénètre dans la cellule essentiellement via le **RFC1 (ou SLC19A1)**, une glycoprotéine transmembranaire membre de la famille des SLC (Solute Carrier) au sein des transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily of transporters) et que l'on retrouve à la surface de nombreuses cellules : ce transporteur représente une des voies majeures d'entrée des acides foliques réduits ou des antifolates dans la cellule (Antony, 1992 ; Goldman *et al.*, 1985) : cf. **figure 3**. Ainsi, le RFC facilite l'influx du MTX ou de folates réduits, par liaison et échange d'autres phosphates organiques, dont le monophosphate ou le pyrophosphate de thiamine (Assaraf, 2006). La capacité de ce transporteur à prendre en charge le MTX est similaire à sa capacité à prendre en charge les folates réduits (5-méthyl-tétrahydrofolate [forme physiologique] ou 5-formyl-tétrahydrofolate [forme pharmaceutique]) (Genestier *et al.*, 2000), alors que l'acide folique est peu concerné par ce transporteur (Goldman *et al.*,

1985). C'est, toutefois, un transporteur à faible capacité, en lien avec l'absence de site spécifique de liaison à un nucléotide (sans ATP-binding site). Ainsi, dans une modélisation du comportement du MTX dans les globules rouges, en pharmacocinétique de population, l'impact de l'entrée du MTX dans les cellule ($k_{in} = 5,91 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$) apparait marginal sur l'élimination de la molécule depuis le plasma ($k_{el} = 1,14 \text{ h}^{-1}$) (Korell *et al.*, 2013).

Un fonctionnement altéré de ces récepteurs RFC est associé à une réponse pharmacologique plus variable de la cellule au MTX, en lien avec une quantité réduite de molécules atteignant leurs cibles (Rothem *et al.*, 2003 ; Dervieux *et al.*, 2004). De même, plusieurs molécules ont démontré un effet inhibiteur sur la capacité d'influx du MTX via les RFC dans des cellules leucémiques murines L1210 *in vitro*. C'est notamment le cas des glucocorticoïdes, avec un effet dose-dépendant (Zager *et al.*, 1973).

Récepteurs aux folates (FR)

Une autre voie d'entrée dans la cellule implique la famille des **récepteurs au folate** (FR), une famille de glycoprotéines membranaires avec une haute affinité pour l'acide folique. Cette famille permet aux cellules d'intégrer l'acide folique sous forme oxydée dans des vésicules d'endocytose après fixation à un récepteur. Il existe plusieurs isoformes de ce récepteur (FR α , FR β , FR γ et FR δ). Toutefois, la distribution de ces récepteurs dans les tissus est plus limitée que pour le RFC. FR α est retrouvé principalement au niveau des membranes épithéliales, notamment au niveau des cellules rénales du tube contourné proximal, dans l'épithélium rétinien ou dans le plexus choroïde. FR β est exprimé dans le placenta, les tissus hématopoïétiques (rate, thymus, monocytes CD34 notamment) ou les macrophages activés. FR δ est notamment retrouvé dans les lymphocytes T régulateurs (Zhao *et al.*, 2011). Ces différents récepteurs ont **une faible affinité pour le MTX** ($K_{d_{\text{acide folique}}} = 0,1 \text{ nmol/L}$ versus $K_{d_{\text{MTX}}} > 100 \text{ nmol/L}$) (Assaraf, 2006). Les FR ne sont une source d'entrée significative du MTX dans les cellules que dans les tissus où ces récepteurs sont fortement surexprimés, en lien avec une forte activité métabolique, comme les tumeurs ou les macrophages dans la synovie (Genestier *et al.*, 2000) : cf. **figure 3**.

Les mesures du transport du MTX au cours des différentes phases de croissance des cellules leucémiques murines L1210 en culture ont révélé que la V_{max} pour l'influx dans les cellules L1210 à croissance exponentielle était trois fois plus élevée que la V_{max} pour l'influx

dans les cellules quiescentes. De plus, l'efflux en phase stationnaire est le double de celui mesuré dans les cellules en croissance rapide. Ces données permettent de comprendre la **sensibilité accrue au MTX des cellules en phase de croissance exponentielle**, par rapport aux cellules quiescentes (Chello *et al.*, 1980). Ainsi, les macrophages synoviaux activés sur-expriment FR, qui devient la principale source d'entrée du MTX lors de traitement d'arthrite rhumatoïde (Nakashima-Matsushita *et al.*, 1999). Par contre, par son action, le MTX réduit l'activité de la cellule, ce qui conduirait à une auto-réduction des capacités d'influx de la cellule (Kremer, 2004). A long terme, cela signifie que l'accumulation de MTX *in vitro* sous forme polyglutamates induit une réduction de sa capacité d'entrée dans la cellule. Ceci pourrait expliquer le plateau observé cliniquement lors de traitement de l'arthrite rhumatoïde avec du MTX à faible dose sur une longue période (Kremer, 2004).

Autres voies d'influx cellulaire

D'autres transporteurs, les **PCFT (Proton-Coupled Folate Transporter)**, sont exprimés dans différents tissus, notamment les entérocytes où ils permettent le passage de la membrane épithéliale apicale malgré les faibles pH de la lumière digestive (*cf.* **partie absorption**). Ils sont également exprimés dans le rein, le foie, le placenta ou la rate (*cf.* **partie élimination**).

Enfin, il n'y a que **très peu de passage transmembranaire du MTX**. Ce mode de diffusion passive est limité à la présence de très fortes concentrations extracellulaires (Olsen, 1991).

1.3.2.2.2 Voies d'efflux

L'efflux du MTX fait intervenir d'autres transporteurs qui appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (*cf.* **figure 4**). L'affinité de ces transporteurs pour le MTX est très inférieure à l'affinité mesurée pour le RFC (Kremer, 2004).

Parmi ces transporteurs, il y a :

- Les **transporteurs MRP 1 à 5** (Multidrug Resistance Protein, gène ABCC1 à 4) dont l'implication a été démontrée pour la première fois par Masuda *et al.* (1997). Le

transporteur MRP 5 a également une capacité d'efflux de la forme polyglutamates MTX-PG2 (cf. [partie métabolisation](#)) (Wielinga *et al.*, 2005). La surexpression de ce dernier transporteur peut conférer un très fort niveau de résistance aux antifolates (Assaraf, 2006).

- **Le transporteur BCRP** (Breast Cancer Resistance Protein, gène ABCG2) est une glycoprotéine membranaire capable de prendre en charge un grand nombre de molécules chargées positivement ou négativement. Ces transporteurs sont capables de transporter à la fois la forme MTX mais également les formes di et triglutamates (MTX-PG2 et MTX-PG3) (Volk *et al.*, 2003). Toutefois, l'affinité du MTX pour ces transporteurs est au moins 10 fois inférieure à son affinité pour l'enzyme permettant sa polyglutamation (Assaraf, 2006).

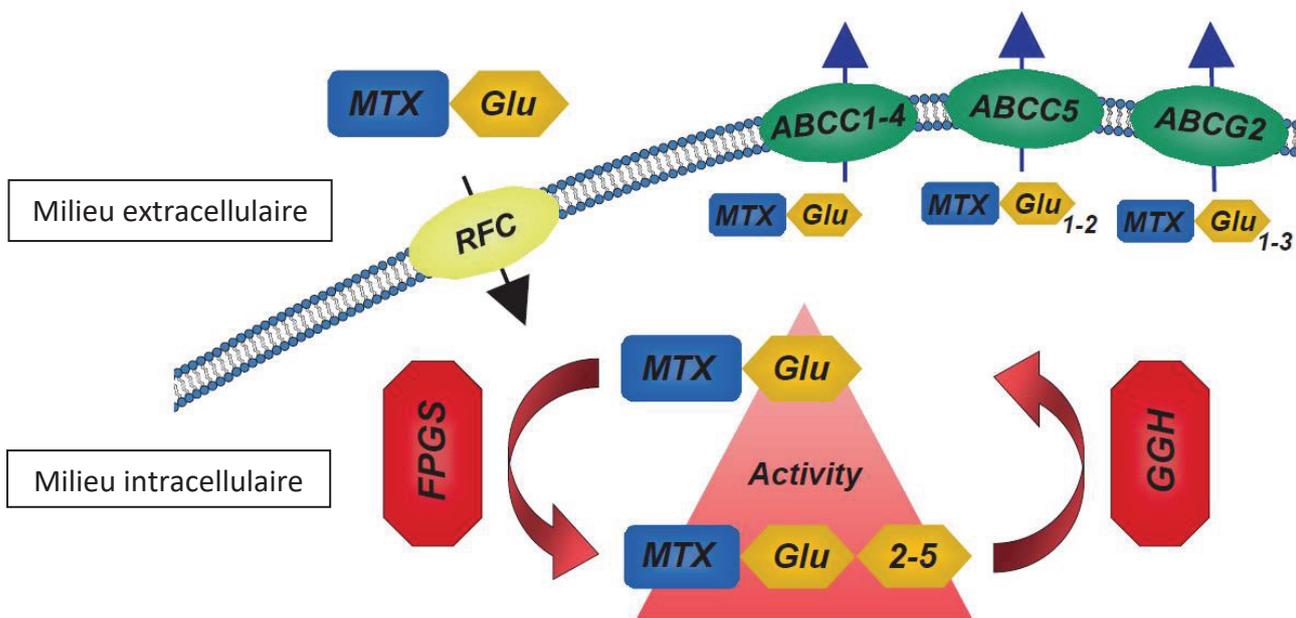


Figure 4. Distribution et métabolisme intracellulaire du méthotrexate

ABCC 1-5 - ABCG2, transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) ; FPGS, Foyl-polyglutamate synthase ; GGH, Gamma-glutamyl-hydrolase ; Glu, Groupement glutamate ; MTX, Méthotrexate ; RFC, Reduced Folate Carrier ; d'après den Boer (2014).

1.3.3 Métabolisation

Il existe plusieurs voies de métabolisation du MTX dans l'organisme : la formation de **dérivés polyglutamates**, démontrée dans de nombreuses lignées cellulaires, la formation de **7-hydroxy-méthotrexate** au niveau hépatique et la formation **d'acide diamino-2,4-N-10-méthylptéroïque (DAMPA)** par la flore digestive.

1.3.3.1 Métabolisation intracellulaire

Toutes les cellules nucléées ont besoin de folates pour assurer leur métabolisme. Une fois absorbés par la cellule, **les folates sont polyglutamatisés**, via un système enzymatique présent à la fois dans le cytosol et dans les mitochondries. Empruntant la même voie métabolique, le **MTX est également polyglutamatisé** sous l'action d'une enzyme, la **folyl-polyglutamate synthase (FPGS)** qui catalyse l'ajout de groupes glutamates à l'extrémité du groupe folyl-glutamate voisin, en utilisant l'ATP comme source d'énergie (Genestier *et al.*, 2000). Ainsi, jusqu'à 6 groupements glutamates peuvent être ajoutés sur la molécule de MTX, donnant la forme MTX-PG7 (cf. **Figure 4**). La polyglutamation du MTX en longue chaîne se produit même lorsque le milieu extracellulaire est dépourvu en MTX (Chabner *et al.*, 1985). Une autre enzyme, la **γ -glutamyl-hydrolase (GGH)**, catalyse le retrait de groupements glutamates et le retour vers la forme parentale. La concentration intracellulaire en MTX, principalement sous forme polyglutamatisée, traduit donc un équilibre entre l'activité de ces deux enzymes.

L'action de ces deux enzymes serait plutôt de type **séquentielle**, par ajout ou retrait d'un seul glutamate à la fois (Korell *et al.*, 2013 ; Dalrymple *et al.*, 2008). Ainsi, *in vivo*, on détecte d'abord MTX-PG2 dès la première semaine de traitement, alors que MTX-PG3 n'est détecté en moyenne qu'après 3 semaines de traitement et que MTX-PG 4 et 5 ne le sont qu'après 7-8 semaines (Dalrymple *et al.*, 2008). Des études conduites *in vitro* ont établi que la conversion et l'accumulation du MTX en MTX-PG sont fonction de la concentration extracellulaire du MTX et surtout de son temps d'exposition. Ainsi, *in vitro*, la synthèse des MTX-PG nécessite une saturation préalable de la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme cible du MTX, car seul le MTX libre est un substrat pour FPGS, suivie de l'addition

séquentielle de groupements glutamates (Koizumi *et al.*, 1985). Dans des cellules exposées au MTX, les concentrations intracellulaires sous forme polyglutamatisée continuent d'augmenter plusieurs heures après atteinte de l'état d'équilibre du MTX de part et d'autre de la membrane cellulaire (atteinte en moins de 30 minutes), pour atteindre 30 à 40 fois la concentration parentale (Chabner *et al.*, 1985).

La polyglutamatation a plusieurs conséquences :

- Elle rend la molécule de MTX plus anionique, ce qui diminue sa capacité de passage transmembranaire et **augmente la demi-vie intracellulaire**.
- Les longues chaînes polyglutamates ne sont plus substrats des systèmes d'efflux actifs. La **rétenion intracellulaire est ainsi proportionnelle à la longueur de la chaîne polyglutamates**. Plus cette dernière s'allonge, moins le dérivé glutamate du MTX est capable de diffuser en dehors de la cellule. Ainsi, après disparition du MTX du milieu extracellulaire, alors que plus de 90% du MTX intracellulaire est éliminé en 1h, plus de 90% du MTX-PG2 en 6 h et plus de 90% du MTX-PG3 en 24h, la concentration en MTX-PG5 intracellulaire augmente (Jolivet *et al.*, 1983).
- Non seulement les formes polyglutamates sont actives sur les enzymes cibles du MTX, mais **leur affinité pour ces enzymes voire leur puissance sont augmentées**. C'est notamment le cas pour la thymidylate synthase (TS) (Allegra *et al.*, 1985), pour la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide transformylase (AICAR transformylase) (Allegra *et al.*, 1985) ou la dihydrofolate réductase (DHFR) (Jolivet *et al.*, 1983). Ainsi, un défaut de polyglutamatation pourrait être à l'origine de la résistance de certaines tumeurs au MTX (Genestier *et al.*, 2000).

Toutes les cellules nucléées sont *a priori* capables de stocker les folates, et donc le MTX, sous forme polyglutamates. Les lignées cellulaires pour lesquelles cette capacité métabolique a été réellement mesurée sont les hépatocytes (Kremer *et al.*, 1986), les cellules de la lignée blanche - tout particulièrement les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Koizumi *et al.*, 1985), les érythroblastes (Funk *et al.*, 2013), les fibroblastes (Rosenblatt *et al.*, 1983), les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999), les lymphocytes (Weigand *et al.*, 2000) ainsi que de

nombreuses lignées cancéreuses. Face à des réponses thérapeutiques parfois très différentes d'un individu à l'autre, suggérant l'existence de différentes sous-populations, la recherche clinique s'est surtout focalisée sur l'identification d'un biomarqueur permettant de personnaliser le schéma posologique. Paradoxalement, les lignées blanches se sont avérées de mauvais biomarqueurs (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999). La population cellulaire la plus étudiée reste les érythrocytes, plus faciles à obtenir, avec des prélèvements sanguins riches en cellules. Bien que les MTX-PG intra-érythrocytaires ne soient pas impliqués directement dans le mode d'action immunomodulateur du MTX, ils sont considérés comme un **marqueur de substitution pertinent** des globules blancs. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence un lien entre le niveau de MTX-PG intra-érythrocytaire et la réponse clinique (Dervieux *et al.*, 2004 ; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999 ; Dervieux *et al.*, 2010 ; Calasan *et al.*, 2015 ; de Rotte *et al.*, 2015 ; Takahashi *et al.*, 2017b ; Rahman *et al.*, 2014), malgré quelques études discordantes (Stamp *et al.*, 2010 ; Korell *et al.*, 2014).

La polyglutamatation intracellulaire est influencée par :

- Les **facteurs de croissance cellulaire** (insuline, dexaméthasone, œstrogènes) qui augmentent les capacités de polyglutamatation cellulaire. Par exemple, l'insuline inhibe l'action de la GGH intracellulaire (Galivan *et al.*, 1995 ; Stamp *et al.*, 2009), ce qui explique les risques accrus d'effets secondaires chez les patients diabétiques.
- Des **carences en acides aminés essentiels** qui induisent une réduction des capacités de polyglutamatation.
- **L'affinité de la FPGS** pour les différents substrats. Cette affinité décroît dans l'ordre suivant :
Di-hydro-folates (DHF) > Tétrahydro-folates (THF) > 5 méthyl-tétrahydrofolate (5 CH₃-THF) > leucovorine (5 CHO-THF) > MTX.
- **Une forte concentration intracellulaire en folates** d'origine alimentaire, qui entraîne une compétition, notamment sur la FPGS, à l'origine d'une diminution des capacités de polyglutamation du MTX. Dans ce cas, il est nécessaire d'augmenter les doses (Kremer, 2004).

- **Le taux d'activité métabolique cellulaire :**
 - ➔ une polyglutamatation plus intense est observée dans les **lignées cancéreuses** par rapport aux lignées cellulaires normales (Fabre *et al.*, 1984 ; Johnson *et al.*, 1988). Ainsi, la récupération sélective des cellules normales par rapport aux cellules malignes via l'utilisation de leucovorine est possible en raison de besoins réduits en folates. L'influence de l'inflammation sur la capacité de polyglutamatation n'est en revanche pas connue.
 - ➔ La polyglutamatation est plus intense dans les **lignées cellulaires immatures** par rapport aux lignées cellulaires matures. Ainsi, après exposition à de fortes doses de MTX *in vivo* pendant 24h, les formes immatures dans la moelle osseuse myéloïde ont absorbé et retenu le MTX dans une bien plus grande mesure que les cellules myéloïdes matures et les neutrophiles circulants. Deux jours après la perfusion, le MTX n'était plus détecté dans les neutrophiles circulants. Huit jours après, il y a de nouveau été détecté, c'est-à-dire après une période correspondant à la durée de maturation et de libération depuis la moelle osseuse (Schrøder, 1987). Dans un modèle de leucémie lymphoblastique ou myéloïde aiguë, *in vitro*, les lymphoblastes issus de la moelle osseuse ont accumulé 41 à 51 % de MTX-PG de plus que les lymphoblastes d'origine sanguine (Weigand *et al.*, 2000).
- **Les lignées cellulaires considérées**, avec une dynamique de polyglutamatation qui peut varier significativement.
 - ➔ *In vitro*, Korell *et al.* (2014) ont mis en évidence une accumulation intracellulaire plus rapide pour des cellules de la lignée blanche que pour la lignée rouge, avec à la fois une répartition différente des formes polyglutamates et des concentrations intracellulaires à l'équilibre plus faibles.
 - ➔ Les érythrocytes sont des cellules sans noyau, également considérées comme dépourvues de FPGS ou GGH, bien qu'il n'y ait jamais eu de

démonstration formelle (Schrøder *et al.*, 1988 ; Dalrymple *et al.*, 2008): leur statut correspond donc essentiellement à leur état nucléé avant le relargage dans la circulation générale (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999), du moins pour les formes MTX-PG 3-7 (Schrøder *et al.*, 1988). Ainsi, le temps de demi-vie des érythrocytes étant de 120 jours, la quantification des MTX-PG intra-érythrocytaire est une mesure qui reflète plutôt l'exposition sur les derniers mois (den Boer, 2014).

- **L'action du MTX** : le MTX va favoriser une expression plus importante de GGH par la cellule, ce qui participe à l'élimination accrue à la fois des folates et des anti-folates de la cellule (Kremer, 2004).
- L'existence d'un **polymorphisme nucléotidique sur GGH** qui participe à une modification de la répartition des formes polyglutamates au sein de la population (Dervieux *et al.*, 2004).
- **La voie d'administration** qui a également un effet sur la répartition des formes polyglutamates. Ainsi, on retrouve des formes longues chaînes en proportion plus importante après administration de MTX par voie SC versus administration par voie orale, et une modification de la répartition des formes polyglutamates après changement de voie d'administration (Becker *et al.*, 2010 ; Dervieux *et al.*, 2010).
- **L'âge des patients, la dose employée, la durée du traitement ou l'intégrité de la fonction rénale** seraient également des facteurs à l'origine de la variabilité de la polyglutamatation en arthrite rhumatoïde (Stamp *et al.*, 2009 ; Becker *et al.*, 2010 ; Dervieux *et al.*, 2010) bien que ces données n'aient pas été confirmées pour le traitement du psoriasis (Woolf *et al.*, 2012).

Lors de traitement MTX à faible dose, la **forme triglutamate (MTX-PG3) est la forme prédominante à l'équilibre** (environ 30 % des formes polyglutamatisées), et les formes MTX-PG 5-7 sont les moins fréquentes (environ 5 % des formes polyglutamatisées). Chez certains individus, ces formes très longues chaînes ne sont pas retrouvées du tout. La traduction clinique de leur absence n'est pas connue.

Le temps pour atteindre l'état d'équilibre des formes polyglutamatisées intra-érythrocytaires est **très variable d'un individu à l'autre** et **augmente avec la longueur de la**

chaîne polyglutamates. La durée moyenne d'atteinte de l'état d'équilibre pour MTX-PG3 dans les érythrocytes circulants est variable selon les auteurs : de 12 à 24 semaines pour le traitement du psoriasis (Woolf *et al.*, 2012), et de 24 à 41,2 semaines chez des patients traités pour arthrite rhumatoïde (Dalrymple *et al.*, 2008). Toutefois, d'autres auteurs rapportent des durées nettement inférieures, entre 6 et 8 semaines à dose fixe (Hornung *et al.*, 2008 ; Dervieux *et al.*, 2010 ; Egan *et al.*, 1999 ; Hendel *et al.*, 1984b). Une raison possible à de telles différences est le fait que les globules rouges circulants sont dépourvus de FPGS, et donc de la capacité à polyglutaminer le MTX. Sachant que les MTX-PG sont synthétisés exclusivement dans la moelle osseuse et que la durée de vie des érythrocytes est d'environ 17 semaines (London *et al.*, 1949), on pourrait s'attendre à une atteinte de l'état d'équilibre après au moins 17 semaines de traitement, le temps de renouveler tous les globules rouges circulants. En fait, le plus probable est que la grande majorité des MTX-PG sont synthétisés exclusivement dans les précurseurs érythroblastiques, en raison de leur taux de prolifération élevé et des besoins accrus en folates de ces cellules. Comme 0,83% des érythrocytes sont renouvelés quotidiennement (1/120) et que le MTX est administré sur une base hebdomadaire avec disparition rapide du plasma en 24h, il est probable que la libération des érythrocytes contenant du MTX soit pulsatile, plus probablement chaque semaine le septième jour après la prise du médicament, un temps correspondant à l'absorption du MTX dans les proérythroblastes, suivi de leur maturation et différenciation en réticulocytes libérés dans la circulation (Lin *et al.*, 2004 ; Dervieux *et al.*, 2010). Ainsi, Dervieux *et al.* (2010) estiment que la proportion d'érythrocytes circulants matures porteurs de MTX-PG est de 5 à 6 % à la septième semaine à l'état d'équilibre, compte tenu des taux de destruction des globules rouges.

Les concentrations en MTX et MTX-PGn **varient également selon les individus**, avec une concentration totale intra-érythrocytaire qui oscille entre 90,9 et 351,5 nmol/8.10¹² érythrocytes (den Boer, 2014). Les causes à l'origine de cette variabilité ne sont pas complètement établies : selon les auteurs, différents facteurs peuvent jouer un rôle : influence de l'âge, de la dose absorbée (dose employée et voie d'administration), de la fonction rénale, du volume corpusculaire moyen voire de la pharmacogénomique (den Boer, 2014 ; Korell *et al.*, 2014 ; Woolf *et al.*, 2012 ; Dervieux *et al.*, 2004).

A la disparition du MTX du milieu extracellulaire, les **différentes formes polyglutamates suivent des évolutions différentes** : les formes longues chaînes sont encore synthétisées à partir de formes intracellulaires moins longues alors que les plus courtes chaînes sont rapidement dé-polyglutamatisées et/ou ré-excrétées hors de la cellule. Les longues chaînes sont ainsi détectées bien plus longtemps après l'arrêt du traitement que les formes courtes chaînes (Dalrymple *et al.*, 2008). Concernant la durée pendant laquelle on retrouve des formes dérivées du MTX après arrêt de tout traitement, les résultats sont assez variables. Les données disponibles concernent essentiellement les érythrocytes. Le temps de demi-vie d'élimination du MTX intra-érythrocytaire oscille de 1 à 13 semaines selon les formes concernées (Dalrymple *et al.*, 2008 ; Schrøder *et al.*, 1988). Ce métabolisme original est à la base du schéma posologique hebdomadaire lors de l'utilisation du MTX à faible dose : les formes longues chaînes participent pleinement à l'effet rémanent observé entre deux administrations, d'autant que ce sont les formes les plus efficaces de la molécule sur ses enzymes cibles.

1.3.3.2 Le 7-hydroxy-méthotrexate

Une hydroxylation en 7^{ème} position sur le noyau ptérique du MTX par une aldéhyde oxydase hépatique engendre la formation du 7-hydroxy-méthotrexate (7OH-MTX). Chez l'Homme, **environ 10% du MTX est ainsi métabolisé par le foie** (Genestier *et al.*, 2000). Cette hydroxylation constitue la principale voie de métabolisation à visée d'élimination de la molécule, bien que l'élimination soit majoritairement urinaire sous une forme non modifiée. Au même titre que le MTX, le 7OH-MTX peut également être polyglutamatisé dans la cellule. **L'efficacité de ce métabolite sur la plupart des enzymes cibles est réduite** (Johns *et al.*, 1967 ; Baggott *et al.*, 1994 ; Genestier *et al.*, 2000). Ainsi, pour la DHFR, le K_i du 7OH-MTX est 100 à 500 fois supérieur au K_i du MTX, y compris lorsque l'on compare les formes intracellulaires polyglutamatisées (Drake *et al.*, 1987).

Une **augmentation de la formation de 7OH-MTX est associée à une augmentation de l'élimination du MTX** de l'individu (Baggott *et al.*, 2009). Le cochon d'inde et le lapin, chez qui l'activité de l'aldéhyde oxydase est très importante, se révèlent très peu sensibles aux effets secondaires du MTX alors que le rat et la souris, pour lesquels cette enzyme est

très peu active, tolèrent mal la molécule (Johns *et al.*, 1967). L'acide folique, régulièrement administrée en parallèle d'un traitement à base de MTX, est un inhibiteur compétitif de l'aldéhyde oxydase et donc de la formation de 7OH-MTX, action que n'a pas l'acide folinique (Baggott *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, d'un individu à l'autre, cette capacité de métabolisation peut varier de manière significative. Ainsi, pour des patients traités pour arthrite rhumatoïde, l'excrétion urinaire de 7OH-MTX sur 72 h varie de 0,94 à 13,2 %, avec une distribution bimodale des résultats enregistrés (Baggott *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés par une étude ultérieure, identifiant **au moins 2 phénotypes différents**, des individus avec un **catabolisme fort du MTX** et des individus avec un **catabolisme faible** (Baggott *et al.*, 2009). Ainsi, la réponse clinique s'avère meilleure pour les individus à catabolisme faible en arthrite rhumatoïde.

Le 7OH-MTX entre ainsi **en compétition** aussi bien avec le MTX qu'avec les folates (notamment les THF) pour l'entrée dans la cellule. Il a une affinité similaire au MTX ($K_{m_{7OH-MTX}} = 9 \mu\text{mol/L}$ versus $K_{m_{MTX}} = 5 \mu\text{mol/L}$) sur RFC (Goldman *et al.*, 1985). En réduisant l'afflux de MTX dans la cellule, ce catabolite réduit le taux d'association du MTX avec ses enzymes cibles alors que son affinité pour ces mêmes enzymes est réduite. Bien que le 7OH-MTX puisse également former des dérivés polyglutamates, et même à un niveau 2,7 fois plus élevé que le MTX à concentration comparable, aucune compétition directe entre la molécule mère et son catabolite au niveau de FPGS intracellulaire n'a été démontrée (G. Fabre *et al.*, 1984).

1.3.3.3 L'acide diamino-2,4-N10 – méthyl-ptéroïque

Il existe un dernier métabolite formé essentiellement par action de la flore bactérienne lors d'administration par voie orale, sous l'action d'une carboxypeptidase : **l'acide diamino-2,4-N10-méthyl-ptéroïque (DAMPA)**. Ce métabolite est rarement retrouvé dans le plasma ou l'urine (Boonchoong, 2003). Chez la souris, environ 5 % de la dose administrée par voie intrapéritonéale serait concernée par ce type de métabolisation (Genestier *et al.*, 2000). Ce métabolite, tout comme sa forme hydroxylée (7-hydroxy-DAMPA) est **peu efficace sur les enzymes cibles** du MTX (Valerino *et al.*, 1972).

1.3.4 Elimination

Le MTX est excrété **principalement par voie urinaire sous forme inchangée** (65-80%) (Bangert *et al.*, 2007). Une plus faible proportion est excrétée par voie biliaire (10-30%), avec un cycle entéro-hépatique, à l'origine d'une très faible élimination fécale (1-2% seulement) (Grim *et al.*, 2003 ; Nuernberg *et al.*, 1990). Le MTX peut être transporté vers la lumière du tubule rénal par le **système de transport actif des acides organiques**, situé dans les cellules du tube contourné proximal. Ce mécanisme peut être inhibé par compétition avec d'autres acides organiques comme l'aspirine, la phénylbutazone ou les sulfamides, et est totalement inhibé par le probénécide (Mathers *et al.*, 1993). Le MTX peut également subir une **réabsorption tubulaire active saturable**, à l'origine d'une élimination non linéaire lorsque les concentrations plasmatiques sont supérieures à 0,5-0,8 µg/mL (Hendel *et al.*, 1984a). Toutefois, **l'essentiel de l'élimination s'effectuant par filtration glomérulaire**, l'importance des systèmes actifs dans l'élimination globale reste limitée (Mathers *et al.*, 1993). De même, l'influence de la métabolisation intracellulaire sur les concentrations plasmatiques semble marginal (Korell *et al.*, 2014).

La clairance totale oscille majoritairement entre 4,8 et 7,8 L/h et la demi-vie d'élimination de 5 à 8 h (Bannwarth *et al.*, 1996). Toutefois, après une semaine de prélèvements, Seideman *et al.* (1993) ont calculé une demi-vie d'élimination de près de 55 h. Les auteurs rapportent toutefois que les données enregistrées au cours des premières 24h sont concordantes avec les données précitées, révélant une probable élimination en deux temps, le second étant plus probablement lié au recyclage entéro-hépatique voire au relargage depuis les formes intracellulaires (effet flip-flop ?) (Seideman *et al.*, 1993 ; Boonchoong, 2003). Une bonne corrélation a été mise en exergue entre la clairance totale, la clairance rénale et la clairance de la créatinine (Bressolle *et al.*, 1998), ce qu'a confirmé une méta-analyse à partir de 11 essais contrôlés, via la mise en évidence d'un risque majoré de toxicité hépatique ou pulmonaire lors d'une atteinte même modérée de la fonction rénale, en cas de clairance de la créatinine inférieure à 60 mL/min (Rheumatoid arthritis clinical trial archive group, 1995). Après 6 mois de traitement, on observe une baisse significative de la clairance du MTX (et de la créatinine) (Kremer *et al.*, 1995). Ce phénomène pourrait être lié à une augmentation de la concentration en adénosine plasmatique (liée à l'action du MTX) et à une activation des récepteurs A1 du parenchyme rénal, réduisant le flux sanguin au niveau

rénal (Grim *et al.*, 2003). Enfin, une étude de pharmacocinétique de population rapporte une diminution de la clairance du MTX chez les femmes par rapport aux hommes, y compris après correction via le poids et la clairance de la créatinine (Godfrey *et al.*, 1998). Les causes de cette observation sont inconnues. Toutefois, les femmes peuvent s'avérer plus sensibles aux effets secondaires du MTX que les hommes et des doses réduites devraient être prescrites préférentiellement.

La solubilité du MTX est directement liée au pH urinaire : le MTX précipite à des concentrations de l'ordre de 2 mmol/L à pH = 2, mais à pH =7, sa solubilité est 10 fois meilleure. Ainsi, une alcalinisation des urines, en ionisant le MTX dans le tubule, réduit sa réabsorption et favorise l'élimination de la molécule (Olsen, 1991). La très faible solubilité du 7OH-MTX en milieu acide, en comparaison avec le MTX, serait à l'origine d'une néphrotoxicité accrue chez les forts métaboliseurs (Widemann *et al.*, 2006).

1.4 Pharmacodynamie

La compréhension fine des mécanismes biologiques et immunologiques impliqués dans les affections à médiation immune ont permis le développement de thérapeutiques innovantes, telles que les inhibiteurs des Janus Kinases. Le MTX était, quant à lui, initialement destiné à concurrencer, par analogie de structure, les folates intracellulaires réduits et leurs cofacteurs, impliqués dans un grand nombre d'activités enzymatiques, avec des applications en oncologie. Rapidement, sans pour autant connaître en détail les mécanismes impliqués, le MTX a démontré son intérêt dans le traitement de maladies impliquant une prolifération rapide des cellules de l'épiderme (psoriasis) puis dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde.

En oncologie, Chabner et son équipe (1985) ont été les premiers à décrire le **MTX comme une prodrogue, dont la forme polyglutamatisée serait le vrai effecteur**. Les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs seraient quant à eux liés à une combinaison de différents mécanismes (Tian *et al.*, 2007). Les différents mécanismes d'action actuellement décrits du MTX sont présentés dans ce chapitre. Toutefois, certains mécanismes restent **encore mal compris** (Kremer, 2014).

1.4.1 Cytostatique sélectif de la phase S de la réplication cellulaire

L'effet cytostatique du MTX résulte de son action sur **la voie de synthèse *de novo* de la thymidine** (cf. **figure 5**). La réaction enzymatique clé dans ce processus est la méthylation du monophosphate de désoxyuridine (dUMP) en thymidine monophosphate (dTMP) sous l'action de la **thymidylate synthase (TS)**, avec comme cofacteur le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5,10-CH₂-THF) oxydé en dihydrofolate (DHF). Cette voie représente la seule source de thymidine intracellulaire *de novo*. Elle est essentielle à la synthèse de l'ADN. La régénération du 5,10-CH₂-THF s'effectue en deux temps : une réduction du DHF en THF sous l'action de la **dihydrofolate réductase (DHFR)** avec comme cofacteur NADPH + H⁺, puis une régénération du 5,10-CH₂-THF à partir du THF via la **sérine hydroxy-méthyl transférase (SHMT)** avec comme cofacteur la sérine et la libération de glycine.

L'acide folique, sous l'action de la DHFR, avec comme cofacteur NADPH + H⁺ fournit un apport en DHF.

L'acide folinique ou 5 formyl-tétrahydrofolate (5-CHO-THF) est un métabolite de l'acide folique transformé en 5,10-méthényl-tétrahydrofolate (5,10=CH-THF) sous l'action de la 5,10-méthényl-tétrahydrofolate synthétase encore appelée 5-formyltétrahydrofolate cyclo-ligase (FTHF-CL), puis en 5,10-CH₂-THF sous l'action de la méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase (MTHF-D) avec NADP⁺ comme cofacteur.

Les études concernant l'effet cytostatique du MTX sont toutes issues de travaux en oncologie, impliquant de ce fait de fortes doses de MTX. Il n'est pas clairement démontré que les interactions du MTX avec ces enzymes existent à faible dose avec une administration hebdomadaire. De plus, une complémentation en acide folique ou folinique est généralement associée, contrariant les effets cytostatiques du MTX.

1.4.1.1 Action sur la dihydrofolate réductase (DHFR)

Le MTX a une **action inhibitrice de la DHFR** : il en résulte un blocage de la régénération de THF à partir du DHF, lui-même résultant de la synthèse de dTMP. La raréfaction en THF dans la cellule entraîne un blocage de la synthèse des bases pyrimidiques et un arrêt de la multiplication cellulaire. L'action du MTX sur DHFR est compétitive avec le DHF. Ainsi, l'apport d'acide folique augmente le ratio de DHF, pouvant entraîner une levée de l'inhibition par le MTX et relancer la synthèse d'une quantité normale de THF. L'apport d'acide folinique, quant à lui, contourne ce système enzymatique en fournissant directement du THF (Genestier *et al.*, 2000).

Les formes polyglutamates de MTX présentent des constantes d'inhibition (K_i) proches du MTX (Chabner *et al.*, 1985 ; Drake *et al.*, 1987). Toutefois, l'élimination rapide du MTX plasmatique conduit à une disparition rapide de la forme parentale dans la cellule, et donc une dissociation rapide du MTX-PG₁ de la DHFR. A contrario, **la séquestration intracellulaire des MTX-PG₂₋₇ engendre une inhibition prolongée de DHFR**, ce qui en fait les réelles molécules effectrices (Jolivet *et al.*, 1983).

1.4.1.2 Action sur la thymidylate synthase (TS)

Le MTX a une action sur la **TS à la fois indirecte via la raréfaction en THF et directe comme inhibiteur**. La polyglutamatation augmente considérablement la puissance d'inhibition de la TS, avec **une affinité pour TS plus de 250 fois plus importante pour MTX-PG₅ versus MTX-PG₁**. A noter également que le MTX est un inhibiteur incompétitif de TS alors que ses métabolites intracellulaires sont des inhibiteurs non compétitifs (Chabner *et al.*, 1985 ; Genestier *et al.*, 2000).

1.4.1.3 Action sur la 5-aminoimidazole-4- carboxamide ribonucléotide transformylase (AICAR transformylase)

La 5-amino-imidazole-4-carboxamide ribonucléotide transformylase (AICAR transformylase) est une enzyme qui permet la formation de formyl-AICAR (F-AICAR) à partir

d'AICAR, qui dérive lui-même du ribose-5-phosphate, avec comme cofacteur le 10-formyl-THF. Le F-AICAR est indispensable à la synthèse de novo des bases puriques (cf. [figure 5](#)).

Le MTX a une **action inhibitrice directe et indirecte sur l'AICAR transformylase**. Comme action directe, ses **métabolites polyglutamates sont des inhibiteurs puissants** de cette enzyme, notamment le MTX-PG₅, près de 2 500 fois plus puissants que le MTX. Indirectement, l'accumulation de MTX-PG dans la cellule entraîne une forte déplétion en THF et de ce fait l'accumulation de DHF et de ses formes polyglutamates, elles-mêmes inhibitrices de l'AICAR transformylase. Ceci aboutit à **une accumulation d'AICAR** qui perturbe le recyclage de l'adénosine (Genestier *et al.*, 2000 ; Allegra *et al.*, 1985 ; Chabner *et al.*, 1985).

1.4.1.4 Autres enzymes

Parmi les autres enzymes impliquées dans l'action cytostatique du MTX, on retrouve :

- La **5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR)**. Cette enzyme intervient dans le métabolisme de l'homocystéine, un acide aminé qui constitue un intermédiaire important dans la fonction donneuse de méthyl de la méthionine et dans le métabolisme de la méthionine vers d'autres acides aminés soufrés comme la cystéine. Le 5-CH₃-THF va donner un groupe méthyl à l'homocystéine pour produire de la méthionine avec comme cofacteur la vitamine B12 (cf. [figure 5](#)). La méthionine est ensuite métabolisée en S-adenosyl-méthionine qui sert de donneur de groupe méthyl, contribuant à la production de polyamines et à la méthylation de l'ADN. Le 5,10-méthylène-THF est converti en 5-CH₃-THF par l'action de l'enzyme MTHFR.
- La **phospho-ribosyl-glycinamide formyl-transférase**, impliquée dans la biosynthèse des bases puriques. Les formes polyglutamates ont également une efficacité supérieure par rapport au MTX.
- L'**amido-phospho-ribosyl transférase ou phosphoribosyl pyrophosphate amidotransférase**, qui participe aux premières étapes de la biosynthèse des bases puriques.

1.4.2 Action anti-inflammatoire : un mécanisme discuté

Le mécanisme exact de l'activité anti-inflammatoire du MTX reste discuté, les principales hypothèses sont présentées dans la *figure 6*.

En tant que cytostatique sélectif de la phase S de la réplication cellulaire, l'utilisation du MTX dans les maladies inflammatoires semble pertinente, notamment sur des populations cellulaires, telles les lymphocytes T, dont le taux de renouvellement est élevé. Toutefois, cette **inhibition du renouvellement cellulaire** est également à l'origine de nombreux effets secondaires, comme une atteinte de la moelle osseuse ou une stomatite. L'utilisation généralisée d'acide folique ou d'acide folinique pour réduire ces effets secondaires n'est pas associée à une réduction de l'efficacité anti-inflammatoire de la molécule, ce qui pose question quant au mécanisme sous-jacent. A forte dose toutefois, l'acide folinique est en concurrence avec le MTX pour son entrée dans la cellule, via le RFC-1, et peut interférer avec son action anti-inflammatoire (Chan *et al.*, 2013).

La réduction de THF et de 5-CH₃-THF dans la cellule sous l'action du MTX entraîne **une réduction de la production de méthionine et de S-adénosyl-méthionine**, et finalement de polyamines (comme la spermine ou la spermidine) libérées dans le milieu extracellulaire, polyamines que l'on retrouve notamment dans la synovie ou l'urine chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Ces polyamines sont transformées par les cellules mononucléaires en produits toxiques, comme l'ammoniac ou le peroxyde d'hydrogène (Chan *et al.*, 2013). Ainsi, l'effet anti-inflammatoire du MTX pour les patients atteints d'arthrite rhumatoïde pourrait être, au moins en partie, lié à l'inhibition de la production de ces polyamines (Nesher *et al.*, 1996).

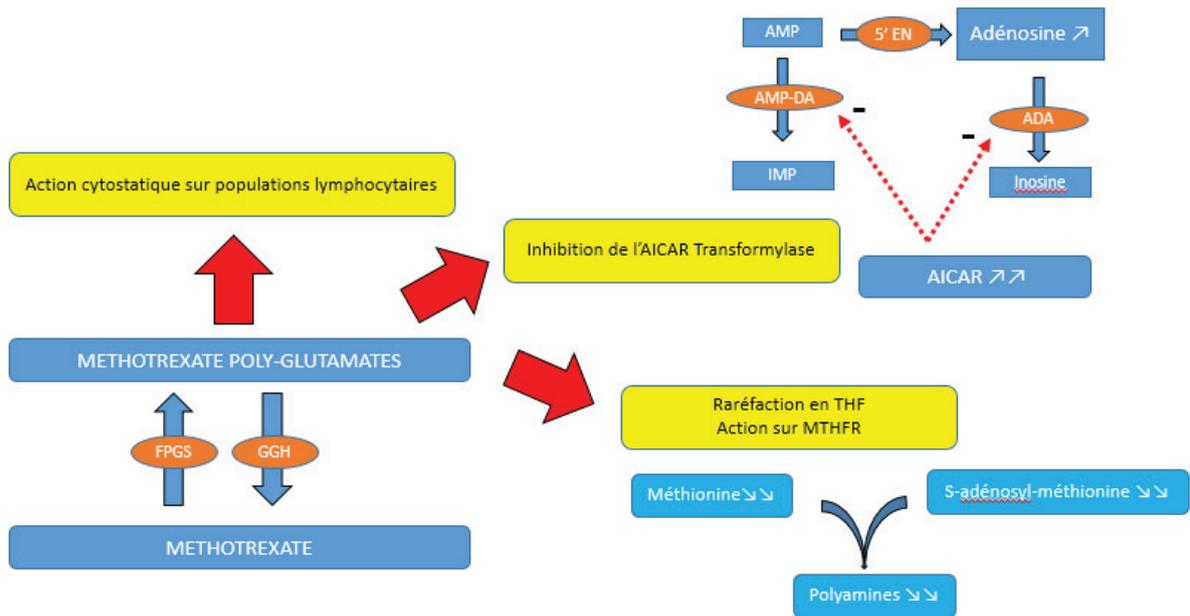


Figure 6. Mode d'action anti-inflammatoire du méthotrexate

5' EN : 5' ecto-nucléotidase ; ADA, Adénosine désaminase ; AICAR, 5-amino-imidazole-4-carboxamide ribonucléotide ; AMP, adénosine mono-phosphate ; AMP-DA, AMP désaminase ; FPGS, folyl-polyglutamate synthase ; GGH, γ -glutamyl-hydrolase ; IMP, inosine mono-phosphate ; MTHFR, 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase THF, tétrahydrofolate ; adapté d'après Chan *et al.*, 2013.

Le MTX, et surtout ses métabolites polyglutamatisés, inhibent l'AICAR transformylase. Cette inhibition entraîne **une accumulation d'AICAR et de ses métabolites**, qui sont **des inhibiteurs de l'adénosine désaminase (ADA)**, l'enzyme qui convertit l'adénosine en inosine, **et de l'AMP désaminase**, l'enzyme qui convertit l'adénosine monophosphate (AMP) en inosine monophosphate (IMP) (*cf. figure 5*) (Genestier *et al.*, 2000 ; Allegra *et al.*, 1985 ; Chabner *et al.*, 1985). En réduisant le catabolisme de l'adénosine et des nucléotides associés, les **taux d'adénosine intracellulaire augmentent** à la fois directement et indirectement, par déphosphorylation de l'AMP via la 5' ecto-nucléotidase. La libération locale d'adénosine après administration de MTX a été démontrée dans un modèle murin (Cronstein *et al.*, 1993). Dans ce modèle, l'effet anti-inflammatoire du MTX a été partiellement réduit par l'injection d'ADA (enzyme catabolisant l'adénosine) et complètement bloqué par un antagoniste spécifique du récepteur A2a de l'adénosine, la 3,7-diméthyl-1-propargyl-xanthine, alors que cet effet n'a pas été affecté par un antagoniste du récepteur A1 (la 8-cyclopentyl-dipropyl-xanthine). L'effet anti-inflammatoire, dans ce modèle, est donc lié à la **libération accrue d'adénosine au site enflammé**.

Il existe différents types de récepteurs cellulaires à l'adénosine, appartenant tous à la famille des protéines G. L'effet anti-inflammatoire du MTX lié à la fixation de l'adénosine extracellulaire se fait préférentiellement sur les **récepteurs A2a et A3**. Certains effets toxiques seraient liés à leur fixation sur les récepteurs A1 (cf. [partie tolérance](#)). La fixation de l'adénosine sur les récepteurs A2 inhibe la prolifération lymphocytaire et la production de TNF α , IL-8 et IL-12, et augmente la production d'IL-10 et d'IL-6. La fixation sur les récepteurs A3 inhibe la sécrétion de TNF α , IL12 et IFN γ (Cutolo *et al.*, 2001). Une réduction des IL-1, IL-4 et IL-13 est également rapportée. A noter que la caféine est un antagoniste non sélectif qui se lie à tous les récepteurs de l'adénosine connus. Dans un modèle d'arthrite chez le rat, la caféine a ainsi inversé les effets bénéfiques du traitement par le MTX. L'effet de la caféine *in vivo* sur des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de psoriasis et traité avec du MTX est contradictoire (Benito-Garcia *et al.*, 2006 ; Nesher *et al.*, 2003 ; Swanson *et al.*, 2007).

1.4.3 Effet immunosuppresseur et apoptotique

Les effets anti-métaboliques et cytostatiques du MTX laissent à penser qu'il pourrait également avoir **une activité immunosuppressive**. L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est étroitement régulée par l'expression coordonnée de gènes de survie et de mort. L'implication de fortes doses de MTX dans le mécanisme de mort cellulaire a été démontrée pour plusieurs lignées cellulaires dont les cellules ovariennes de hamster chinois, des lymphomes (CCFR-CEM et Jurkat-cells), des hépatomes ou des kératinocytes. A faible dose, *in vitro*, Genestier *et al.* (1998) ont démontré **un effet apoptotique par une voie indépendante de la voie impliquant CD95** (molécule également nommée Fas ou APO-1), sur des **lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés en phase S/G2**, mais non sur **les cellules inactivées**. L'effet peut être inhibé par l'adjonction d'acide folinique, et à très forte dose d'acide folinique (pour un ratio acide folinique/MTX>10). L'induction de l'apoptose par MTX a également été documentée dans un modèle d'activation des lymphocytes T par des super antigènes bactériens chez la souris (Genestier *et al.*, 2000). Il existerait en fait deux mécanismes distincts conduisant soit **à l'inhibition de la prolifération cellulaire**, soit **à l'apoptose des lymphocytes T activés**. Ces mécanismes sont encore assez mal compris. Ainsi, dans le cas d'une affection inflammatoire expérimentale de type hypersensibilité de

contact, l'effet anti-inflammatoire et immunosuppressive du MTX serait lié à son interférence avec l'expansion clonale des LT activés et leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques durant la phase de sensibilisation, alors que l'efficacité du MTX s'est révélée nulle lors de la phase de challenge seule (Quéméneur *et al.*, 2003). Des concentrations intermédiaires en MTX (50 µg/mL) peuvent induire une forte inhibition du recrutement de monocytes immatures ainsi qu'une apoptose des monocytes présents au site inflammatoire mais pas d'effet sur les macrophages synoviaux (Cutolo *et al.*, 2000 ; 2001).

En conclusion, il ne fait aucun doute que même à faible dose, le MTX a une activité immunosuppressive et apoptotique, mais cet effet est **limité à certaines populations cellulaires et dépend de la dose utilisée**. Ceci peut expliquer l'intérêt du MTX dans des modèles expérimentaux de greffe de moelle osseuse humaine, seul ou en association avec d'autres molécules (ciclosporine ou tacrolimus notamment) (Genestier *et al.*, 2000). Le mécanisme précis de cet effet apoptotique **n'est pas clairement établi**. Il impliquerait une action à la fois sur la TS, la DHFR et l'AICAR transformylase (Genestier *et al.*, 2000). L'impact de cet effet immunosuppresseur lors de l'utilisation *in vivo* est controversé : une réduction des populations lymphocytaires B et T (mais pas NK) est rapportée par certains auteurs après traitement de 8 patients sur 12 semaines (Wascher *et al.*, 1994) alors qu'après 36 semaines de traitement sur 26 patients, aucun effet immunosuppresseur significatif n'a été mesuré (Weinblatt *et al.*, 1988).

1.4.4 Autres effets

De nombreux **autres effets** ont été observés suite à l'utilisation de MTX, effets qui peuvent, ou non, être liés aux mécanismes précédemment décrits.

- Effet inhibiteur sur la production de prostaglandine E2 stimulée par l'IL-1 β par les synoviocytes rhumatoïdes humains cultivés, sans affecter l'expression des ARNm des cyclo-oxygénase (COX1 et 2) (Vergne *et al.*, 1998) ;
- Inhibition de la néovascularisation (Swierkot *et al.*, 2006) ;
- Réduction forte du chimiotactisme des neutrophiles ainsi que de leur capacité d'adhérence (Swierkot *et al.*, 2006) ;

- Au niveau synovial, inhibition de la prolifération des fibroblastes, réduction de l'expression des ICAM-1 (intracellular adhesion molecule - 1) et des VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule – 1), réduction du nombre de macrophages et de cellules inflammatoires, diminution de la production de métalloprotéinase (Swierkot *et al.*, 2006) ;
- réduction de la production de facteur rhumatoïde (IgM) (Swierkot *et al.*, 2006), ainsi qu'un effet plus variable sur IgG et IgA (Cipriani *et al.*, 2014) ;
- Effet protecteur sur les os en arthrite rhumatoïde par modulation des mécanismes d'ostéoclastogenèse mis en jeu (Revu *et al.*, 2013).

1.4.5 Pharmaco-génomique

La variabilité de la réponse au MTX est importante et multifactorielle, avec une probable implication du **polymorphisme nucléotidique sur différentes protéines clés**.

Les polymorphismes identifiés concernent :

- Les protéines d'influx (RFC-1) et d'efflux (ABCB₁₋₄)
- FPGS et GGH (enzymes qui assurent respectivement la polyglutamatation et l'hydrolyse des formes polyglutamatisées intracellulaires),
- La DHFR
- La TS
- L'AICAR transformylase
- La phospho-ribosyl-glycinamide formyl-transférase et la MTHFR, impliquée dans le cycle de la méthionine.

Une méta-analyse réalisée en 2015 a démontré qu'il existe au moins deux polymorphismes qui augmentent l'efficacité et la toxicité du MTX : dans le gène codant pour **RFC1** (G80A) et dans celui codant pour **MTHFR** (C677T). Pour les autres, il ne peut y avoir de conclusion définitive (Restrepo *et al.*, 2016). Ainsi, pour améliorer la prise en charge des patients, des indicateurs mixtes regroupant indice génomique et marqueurs biologiques (MTX-PG intra-érythrocytaires) sont proposés (Dervieux *et al.*, 2004). Chez l'animal, la

multiplicité des races sélectionnées pourra amener à déterminer des schémas posologiques différents au sein d'une même espèce.

1.4.6 Résistance au méthotrexate

La résistance au MTX est bien décrite chez les patients atteints de cancer et peut impliquer un grand nombre de mécanismes qui ne seront pas détaillés ici (Zhao *et al.*, 2003).

A ce jour, il n'y a **pas de résistance formellement décrite** au MTX dans des protocoles immunomodulateurs. Toutefois, cliniquement, on peut observer une augmentation de la DHFR dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PMBC) de certains patients traités à faible dose pour arthrite rhumatoïde, ainsi qu'une efficacité qui atteint un plateau après de longues périodes de traitement (Kremer, 2004 ; Rodenhuis *et al.*, 1987). L'origine précise de ces mécanismes reste inconnue et le lien avec une résistance hypothétique.

1.5 Tolérance

Il n'existe pratiquement aucune information concernant la tolérance du méthotrexate utilisé à faible dose, en administration hebdomadaire, chez le chien ou le cheval, dans la littérature. Sauf précision, toutes les données présentées dans cette revue bibliographique sur la tolérance du MTX proviennent d'études chez l'Homme. Comme en pharmacocinétique, seules les données concernant le MTX, administré à **faible dose**, avec un **schéma d'administration hebdomadaire**, ont été étudiées.

1.5.1 Cytotoxicité

Plus que la simple concentration plasmatique à laquelle est exposée une population cellulaire, le meilleur déterminant de la cytotoxicité du MTX serait **la durée de l'exposition à des concentrations supérieures à un niveau seuil**. Il est généralement admis que l'exposition d'une population cellulaire à des concentrations sériques supérieures à 0,05 $\mu\text{mol/L}$ pendant plus de 24h entraîne des effets cytotoxiques mesurables, bien qu'il existe des variations selon les populations cellulaires considérées (*cf. infra*) (Kremer, 2004). Chez

l'homme, des pics de concentration plasmatiques atteignant 0,3 à 0,8 $\mu\text{mol/L}$, voire un peu plus, sont habituels avec un traitement hebdomadaire à faible dose mais ces concentrations sont inférieures à 0,05 $\mu\text{mol/L}$ en 24h. Toutefois, **lorsque cette chute de la concentration plasmatique est ralentie**, qu'elle qu'en soit la cause, et que les concentrations restent supérieures à 0,05 $\mu\text{mol/L}$ après 24h, on peut **observer des effets cytotoxiques de la molécule pour certaines populations cellulaires à division rapide** (Pinedo *et al.*, 1977). Le MTX étant très majoritairement excrété par le rein, toute **atteinte de la fonction rénale** peut notamment avoir des conséquences néfastes pour l'individu traité. Outre l'insuffisance rénale, il ne faut pas négliger les **atteintes fonctionnelles** liées notamment **aux interactions médicamenteuses**, comme lors de traitement concomitant avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le probénécide, l'aspirine, l'hydroxychloroquine, des sulfamides ou la pénicilline G, qui réduisent l'excrétion du MTX (Kremer, 2004), alors que les céphalosporines l'augmentent (Iven *et al.*, 1990). Un autre déterminant de la cytotoxicité induite par le MTX est le **niveau de 5-CH₃-THF dans la circulation**, dont la présence en quantité limite fortement les effets du MTX. Les sources alimentaires et l'activité de la MTHFR déterminent sa concentration. L'existence de **variations géniques** de la MTHFR est corrélée avec la réponse au MTX (Restrepo *et al.*, 2016). Enfin, la capacité des individus à absorber (variabilité génique sur RFC-1) et métaboliser le MTX (forme 7-OH-MTX moins efficace sur les enzymes cibles) ont également un effet sur la toxicité cellulaire.

Les cellules les plus sensibles aux effets cytostatiques du MTX sont :

- Les **cellules épithéliales des muqueuses orales et gastro-intestinales**. La concentration seuil de MTX nécessaire à l'inhibition de la synthèse d'ADN pour l'épithélium digestif est de seulement 5 nmol/L (Chabner *et al.*, 1973), moitié de celle nécessaire pour les cellules de la moelle osseuse. Ceci serait lié à une persistance prolongée du MTX dans l'épithélium digestif par rapport à la moelle osseuse d'où il est plus rapidement éliminé, comme mis en évidence après administration SC *in vivo* chez la souris (Sirotnak *et al.*, 1980).
- Les **cellules de la moelle osseuse**, avec une concentration seuil de 10 nmol/L (Chabner *et al.*, 1973). La prévalence de la survenue de troubles hématologiques, incluant leucopénie, thrombocytopénie, anémie mégalo-blastique ou pancytopénie chez l'homme suite à un traitement à base de MTX faible dose chez

des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde est estimée à environ 3% à 5 % des cas (Weinblatt *et al.*, 1988 ; Salliot *et al.*, 2009). Une pancytopenie a été rapportée dans 1 à 1,4 % des patients traités avec du MTX faible dose (Gutierrez-Ureña *et al.*, 1996). Chez 46 patients pour lesquels une pancytopenie induite par le MTX a été observée, la dose moyenne de MTX était de 10 mg/semaine pour une durée moyenne de 11 mois de traitement (Ajmani *et al.*, 2017). Ceci souligne le fait qu'une pancytopenie peut survenir à tout moment au cours d'un traitement à base de MTX (Mathers *et al.*, 1993). Malheureusement, cette complication s'accompagne, généralement, d'une forte mortalité, qui varie de 17 à 44 %. Les signes d'appel sont une mucite, de la fièvre ou de la diarrhée principalement, voire un saignement des gencives ou un purpura (Ajmani *et al.*, 2017). Les facteurs de risque sont une diminution des capacités de clairance rénale, une hypoalbuminémie, un surdosage accidentel, un déficit en folates, une infection intercurrente voire l'utilisation concomitante d'autres médicaments, notamment AINS ou sulfamides (Ajmani *et al.*, 2017 ; Gutierrez-Ureña *et al.*, 1996).

- Les **cellules de la lignée germinale**. A forte dose, le MTX est fortement tératogène. Par précaution, il a été imposé une contraception lors d'utilisation de ce médicament à faible dose, aussi bien chez l'homme que chez la femme, bien que des patientes traitées pour arthrite rhumatoïde aient eu des grossesses normales (Mathers *et al.*, 1993).

1.5.2 Effets secondaires

Selon une méta-analyse, publiée en 2009, sur les effets secondaires associés au traitement par le MTX à faible dose chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, le taux d'arrêt de traitement lié à une intolérance à la molécule MTX oscille entre **10 et 37 % selon les études**, c'est-à-dire un taux inférieur à celui lié aux traitements à la sulfasalazine (17-52%), aux sels d'or (22-64%) ou à la D-pénicillamine (24-55%) mais supérieur à celui lié au traitement à l'hydroxychloroquine (10-14%), molécules également utilisées dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Salliot *et al.*, 2009). Ceci confirme des données plus anciennes (Mathers *et al.*, 1993). **Les cas de mortalité rapportés sont rares** et se

traduisent habituellement soit par une **pancytopénie** soit par une **pneumonie** (Mathers *et al.*, 1993).

Dans la méta-analyse précitée, 72,9% des patients ont eu au moins un effet secondaire (Salliot *et al.*, 2009). Les troubles les plus fréquents sont **des troubles gastro-intestinaux** (incluant stomatite, ulcère, douleur abdominale, saignement digestif, dyspepsie, nausée, vomissement, diarrhée, perte de poids et perte d'appétit) ou des **élévations des enzymes hépatiques** (ASAT, ALAT). Après un suivi de près de 13 ans, d'un nombre limité de patients, par l'équipe du Pr Kremer, il apparait que les principaux effets secondaires sont relevés **de manière constante au cours du temps**, avec une incidence similaire des troubles gastro-intestinaux, des événements neurologiques (céphalées, étourdissements, fatigue, vertiges, malaise) ou hématologiques (leucopénie). Seules les élévations des enzymes hépatiques sont devenues plus rares au-delà des 4 premières années de traitement (Kremer *et al.*, 1986 ; Kremer, 1988 ; Kremer *et al.*, 1992 ; Kremer, 1997). Des **variations mineures des paramètres hématologiques** sont également fréquemment rapportées, notamment une leucopénie, faible à modérée, voire une thrombocytopénie, et, beaucoup plus rarement, une anémie (Mathers *et al.*, 1993). Pour autant, **aucun lien** n'a été établi entre un traitement à base de MTX à faible dose et la survenue accrue de maladies infectieuses (Salliot *et al.*, 2009).

Parmi les effets secondaires moins fréquents mais plus graves figurent :

- **La fibrose pulmonaire.** Elle a été décrite initialement en oncologie, dès la fin des années 1960, d'abord chez l'enfant traité pour leucémie aiguë, puis chez l'adulte pour diverses tumeurs (Mathers *et al.*, 1993). A faible dose, cette toxicité concerne 0,5 à 7 % des patients selon les études considérées (Salliot *et al.*, 2009 ; Cipriani *et al.*, 2014). Il semble toutefois que l'incidence de cette complication soit plus importante dans le cas de polyarthrite rhumatoïde qu'en cas de psoriasis (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999). Il y a globalement deux types de pneumonies induites par le MTX : la première, aiguë, de survenue rapide (en quelques jours à quelques semaines), présente pour tableau clinique de la fièvre, une dyspnée et une toux sèche associées à de fortes concentrations en neutrophiles après lavage broncho-alvéolaire, une forte fibrose pulmonaire et une forte mortalité. La seconde s'exprime cliniquement de façon plus tardive, et est, généralement,

associée à une éosinophilie périphérique et cutanée et une faible mortalité (Cipriani *et al.*, 2014). L'imagerie révèle la présence d'un infiltrat inflammatoire interstitiel et une image de la base des poumons en « verre dépoli ». La pathogénie exacte du MTX dans cette toxicité n'est pas clairement établie. La voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), notamment la p38, est la voie actuellement suspectée, par action du MTX sur diverses cytokines (Kim *et al.*, 2009). Les facteurs de risque sont l'âge des patients, un diabète associé, une atteinte pleuropulmonaire, une hypoalbuminémie, le sexe masculin ou une vitesse de sédimentation élevée (Shidara *et al.*, 2010). Le traitement consiste en un arrêt définitif du MTX, l'utilisation de fortes doses de glucocorticoïdes et des soins de support. Une exploration fonctionnelle systématique de la fonction respiratoire ne permet pas de prévoir ces épisodes (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999).

- **La fibrose hépatique**, qui serait liée à un relargage local d'adénosine (Chan *et al.*, 2006). Une élévation transitoire des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT, SGOT) est fréquemment rapportée lors de traitement à base de MTX. Habituellement, on observe un retour aux valeurs usuelles avec et parfois même sans interruption du traitement (Mathers *et al.*, 1993). Toutefois, ces variations enzymatiques ne semblent pas avoir de lien avec l'existence d'une hépatotoxicité liée au MTX. Seule l'étude histologique après biopsie hépatique permet d'évaluer cette atteinte. Les premiers cas de fibrose hépatique et de cirrhose en cours de traitement ont été rapportés chez des sujets psoriasiques (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999). Pour des raisons indéterminées, le risque d'atteinte hépatique semble plus important dans cette population que pour les patients traités pour polyarthrite rhumatoïde (Whiting-O'Keefe *et al.*, 1991). Le risque augmente notamment avec la dose cumulée de MTX, la consommation d'alcool, l'âge du patient et l'obésité (Mathers *et al.*, 1993 ; Whiting-O'Keefe *et al.*, 1991). Pour cette raison, différents auteurs recommandent la réalisation régulière de biopsie, tous les 2 ans ou toutes les doses cumulées de 1,5 à 2 g (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999). Toutefois, l'impact médical et le coût de ces biopsies ne justifient pas cette systématisation pour d'autres auteurs, eu égard au faible risque encouru (Boffa *et al.*, 1995). D'autant que le lien entre le MTX utilisé à faible dose et la fibrose hépatique n'est pas clairement établi. La prévalence de la fibrose hépatique reste difficile à

définir : la méta-analyse de Cipriani *et al.* (2014) suggère que 3 % des patients développeraient une fibrose ou une cirrhose grave après environ 55 mois de traitement, surtout lorsque la consommation d'alcool dépasse les 100g hebdomadaire (soit 10 verres par semaine). Toutefois, l'absence d'une biopsie initiale limite la pertinence de nombre d'études incluses dans cette analyse. Ainsi, lorsqu'une biopsie de départ a été effectivement mise en place, aucune fibrose ou cirrhose hépatique n'a été mise en évidence après 2 à 7 ans de traitement en arthrite rhumatoïde (Kremer *et al.*, 1986 ; Tishler *et al.*, 1992).

- La **cancérogénicité du MTX à faible dose n'est pas établie**. Le risque accru de survenue de lymphome souvent évoqué pour les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et traité avec du MTX reste principalement lié à la maladie elle-même (Mathers *et al.*, 1993 ; Salliot *et al.*, 2009).
- La **néphrotoxicité** est liée soit à la précipitation du MTX, et surtout de ses principaux métabolites (7-hydroxy-MTX et DAMPA) dans les tubules rénaux, en lien avec une très faible solubilité en milieu acide (les métabolites sont six à dix fois moins solubles que la molécule mère), soit à une toxicité directe sur les tubules rénaux (Widemann *et al.*, 2006). Cette toxicité est très importante en oncologie, à forte dose, elle n'est qu'exceptionnellement rapportée à faible dose (Izzedine *et al.*, 2005 ; Fiehn, 2011).
- Une **ostéopathie**. Cette complication, très rare (quelques cas décrits seulement) se traduit par des douleurs tibiales importantes avec fracture radiologique et ostéoporose (Zonneveld *et al.*, 1996), nécessitant l'arrêt du traitement. Elle est liée à une réduction de l'activité ostéoblastique associée à une augmentation de l'activité ostéoclasique par le MTX, comme démontré chez le rat (May *et al.*, 1994).

1.5.3 Complémentation en acide folique ou folinique

L'adjonction d'acide folique ou d'acide folinique lors de traitement hebdomadaire de MTX à faible dose fait partie des recommandations habituelles chez l'Homme, avec pour objectif de réduire la toxicité du MTX sur les cellules sanguines, le tractus gastro-intestinal et le foie, en arthrite rhumatoïde (Smolen *et al.*, 2017) comme en psoriasis (Nast *et al.*, 2015). Toutefois, cette recommandation reste controversée.

Une méta-analyse a été conduite, en 2009, reprenant 6 études, pour un total de 648 patients traités pour arthrite rhumatoïde ou psoriasis, dont 257 patients non complémentés, 198 complémentés avec de l'acide folique et 193 avec de l'acide folinique. La supplémentation a réduit de façon significative (moyenne : - 35,8%, [- 0,467 ; - 0,248]) le risque d'élévation du taux d'enzymes hépatiques mais n'a eu aucun effet concernant les effets secondaires cutanéomuqueux et gastro-intestinaux. La faible incidence des effets secondaires hématologiques n'a pas permis d'évaluer une incidence satisfaisante. Il n'y aurait pas de différence entre acide folique et folinique (Prey *et al.*, 2009).

Dans une autre méta-analyse, conduite en 2013, reprenant également 6 études, dont 3 incluses dans la méta-analyse précédente, pour un total de 624 patients traités pour arthrite rhumatoïde, dont 239 patients non complémentés, 174 complémentés avec de l'acide folique et 211 complémentés avec de l'acide folinique, les conclusions diffèrent. Les patients supplémentés présentent une réduction relative de 26 % du risque d'effets secondaires gastro-intestinaux, tels que nausées, vomissements ou douleur abdominale, une réduction relative de 76,9% du risque d'élévation anormale des transaminases sériques et une réduction du taux d'arrêt de traitement toutes causes confondues. Là encore, aucune conclusion n'est permise sur les effets hématologiques. Enfin, l'adjonction ou non d'une supplémentation folique n'a pas d'effet statistiquement significatif sur l'efficacité du traitement à base de MTX (Shea *et al.*, 2013).

Une méta-analyse plus ancienne, conduite en 1998, dont seul l'abstract a été analysé, ce qui ne permet pas de vérifier les études retenues par rapport aux méta-analyses ci-dessus, a repris 7 études pour un total de 307 patients traités pour arthrite rhumatoïde, dont 160 patients non complémentés, 67 patients recevant de l'acide folique et 80 de l'acide folinique. Une réduction significative des effets secondaires gastro-intestinaux et buccaux a été observée pour l'acide folique (OR = 0,21 [0,10 – 0,44]), mais de manière non significative pour l'acide folinique (OR=0,58 [0,29 – 1,16]). Là encore, les effets secondaires hématologiques n'ont pas pu être évalués (Ortiz *et al.*, 1998).

En conclusion, l'intérêt d'une supplémentation en acide folique ou folinique semble confirmé pour prévenir le risque d'élévation des enzymes hépatiques. Concernant la réduction des effets indésirables gastro-intestinaux et oraux, la démonstration est moins concluante mais l'effet protecteur reste probable. Par contre, l'intérêt de cette

supplémentation quant à la prévention des risques graves associés au MTX (pancytopénie, fibrose pulmonaire ou hépatique, insuffisance rénale) est inconnu. Cependant, la supplémentation en folates peut retarder la réponse clinique durant la phase d'induction du traitement, même si le résultat à terme n'est pas modifié (Chládek *et al.*, 2008).

PARTIE II

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Quelle place pour le MTX comme immunomodulateur chez le chien ou le cheval ?

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au MTX, comme molécule anti-inflammatoire et immunomodulatrice, afin d'évaluer la pertinence de son utilisation chez l'animal, et notamment chez le chien ou le cheval. En effet, bien que la pharmacopée des immunodépresseurs soit développée en médecine humaine, très peu de molécules disposent d'une AMM en médecine vétérinaire, et lorsqu'elles existent, ces AMM concernent quasi-exclusivement l'espèce canine et ne permettent pas de répondre à toutes les situations, notamment lorsque le coût du traitement représente un frein important à la prise en charge de l'animal. Le **faible coût du MTX** (notamment pour les animaux de grande taille), l'existence de **formes galéniques injectables et orales** facilement disponibles, le **schéma posologique souple** (une administration hebdomadaire) ainsi que **l'efficacité et la bonne tolérance rapportées chez l'homme** sont autant d'arguments en faveur de son utilisation chez l'animal, en particulier chez le chien. Cette molécule présente, également, un fort potentiel chez le cheval, en raison de la quasi absence d'autre molécules que les glucocorticoïdes en traitement systémique.

2.1 Contexte

Lorsque la réponse immunitaire s'exprime de manière inappropriée et aboutit à une atteinte de certains organes, on parle de maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité. Une maladie auto-immune est caractérisée par une réponse immunitaire, humorale ou à médiation cellulaire, spécifique, contre des constituants normaux des tissus de l'organisme. On parle de maladie auto-immune primaire lorsqu'aucune cause sous-jacente ne peut être identifiée : l'origine de cette affection est liée à un dysfonctionnement ou un déséquilibre sous-jacent du système immunitaire. L'expression de maladie auto-immune secondaire est utilisée pour décrire les troubles à médiation immunitaire dans lesquels une raison sous-jacente à la réponse délétère du système immunitaire peut être identifiée (Catharine *et al.*, 2014a).

2.1.1 Pharmacopée disponible chez l'animal

Diverses molécules immunodépressives sont utilisées pour traiter les maladies inflammatoires chroniques et les maladies auto-immunes ou pour éviter le rejet du greffon lors de transplantation d'organes (encore rare chez l'animal, hors modèle expérimental). Le traitement permet une **régression des signes cliniques et biologiques**, et un **allongement de la survie ou de la qualité de vie de l'animal**. La pharmacopée des immunodépresseurs est en plein développement, avec de nouvelles familles thérapeutiques dont l'objectif est de **remplacer une immunosuppression globale par une immunodépression sélective** ayant pour cibles, quand celles-ci sont connues, les molécules ou les cellules impliquées (Chabanne, 2003). Les premiers traitements immunosuppresseurs utilisés ont été les glucocorticoïdes, des immunosuppresseurs non sélectifs. Depuis, de nombreuses autres molécules ont été testées. Toutefois, l'utilisation pratique de ces médicaments est limitée par **leur disponibilité, leur efficacité et leur coût**, mais également, par **les nombreux effets secondaires** qu'ils sont susceptibles d'induire, lors d'administrations répétées sur une longue période.

2.1.1.1 Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes ont des effets **anti-inflammatoires** et **immunosuppresseurs**, essentiellement sur **l'immunité cellulaire**, et, dans une moindre mesure, sur l'immunité humorale. Toutefois, leur effet sur le système immunitaire diffère selon l'espèce considérée, effet mesuré généralement par l'impact sur les populations lymphocytaires. Les rongeurs ou les êtres humains sont ainsi parmi les mammifères les plus sensibles aux effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes, notamment par comparaison avec les mammifères domestiques (Tizard, 2013).

L'effet des glucocorticoïdes s'exerce essentiellement par l'intermédiaire de récepteurs cytosoliques qui vont agir sur la transcription de l'ADN, par translocation dans le noyau de la cellule. En induisant une forte production d'I- κ B, à l'origine du blocage de la production de NF- κ B naturellement libéré lors d'une stimulation lymphocytaire, ou en bloquant la transcription d'AP-1, les glucocorticoïdes vont **inhiber la production de**

cytokines et la réponse lymphocytaire T, ce qui est à l'origine de leur effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur (Tizard, 2013 ; Barnes, 2006).

Les glucocorticoïdes ont différents effets sur les populations cellulaires (Tizard, 2013 ; Papich, 2009 ; Barnes, 2006 ; Ammersbach *et al.*, 2006 ; Whitley *et al.*, 2011):

- **Réduction de la production des différentes lignées blanches ;**
- **Perturbation de la diapédèse**, avec notamment une lymphopénie liée à une séquestration lymphatique (surtout lymphocytes T CD4+) ou une neutrophilie en raison de la réduction à la fois de la capacité d'adhésion à l'endothélium vasculaire et de diapédèse des polynucléaires neutrophiles (PNN) vers les tissus enflammés ;
- Perturbation de l'activité des globules blancs (réduction des capacités de **chimiotactisme, de phagocytose, de reconnaissance du non-soi ou de présentation d'antigène**), majoritairement liée à l'inhibition de la sensibilité aux lymphokines. Il existe toutefois des différences spécifiques : chez le cheval, les capacités de phagocytose des neutrophiles ne sont pas affectées par les glucocorticoïdes ;
- **Réduction de la production des médiateurs de l'inflammation**, notamment les interleukines (IL) 1, 2, 6 et l'interféron γ (INF γ) ;
- **Induction de l'apoptose** de certaines populations lymphocytaires ;
- **Action anti-inflammatoire** liée à une réduction de la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes, à une diminution de la perméabilité vasculaire et des capacités de vasodilatation ainsi qu'à **une stabilisation de la membrane cellulaire** des granulocytes et des mastocytes ;
- Une réduction des capacités de prolifération capillaire et fibroblastique perturbe les **capacités de cicatrisation**.

Les glucocorticoïdes sont souvent utilisés pour la gestion des maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité chez l'animal, en raison de leur efficacité, de leur coût modeste et de leur rapidité d'action. Cette dernière serait liée à la réduction rapide de la capacité de phagocytose des macrophages, leur effet à long-terme serait plutôt lié à l'action contre l'immunité cellulaire (Whitley *et al.*, 2011). Les posologies à employer pour bénéficier rapidement de l'effet immunomodulateur sont, habituellement, supérieures aux doses anti-inflammatoires, bien que la distinction entre effet anti-inflammatoire et effet immunomodulateur soit discutée (Desfontis, 2010). Une fois l'effet biologique obtenu, la

posologie est progressivement réduite, notamment à cause du risque de syndrome de Cushing iatrogène ou de la sensibilité accrue de l'animal aux infections intercurrentes. A long terme, la gestion des effets secondaires est source de grandes difficultés et, souvent, à l'origine de l'arrêt du traitement (Ferguson *et al.*, 2018 ; Chabanne, 2003).

2.1.1.2 Ciclosporine et apparentés

La ciclosporine, décapeptide d'origine fongique, est le chef de file d'une famille dont l'effet immunodépresseur est lié à une **action ciblée de blocage de la prolifération des lymphocytes activés**, principalement les **lymphocytes T-CD4+**, sans atteinte ni des lymphocytes T mémoires ni de l'hématopoïèse. Cette famille exerce **une action réversible à l'arrêt du traitement**, liée à l'inhibition de récepteurs cytosoliques de la famille des immunophilines, impliqués dans les voies de transduction des signaux d'activation des lymphocytes T, comme la calcineurine qui bloque la sécrétion de l'IL-2 et de l'INF- γ . La ciclosporine a peu d'effet sur l'immunité à médiation humorale. On trouve dans cette famille le tacrolimus, le pimécrolimus ou le sirolimus, bien que l'utilisation de ces molécules soit encore expérimentale en santé animale, avec une tolérance médiocre par voie systémique (Tizard, 2013 ; Papich, 2009).

Par voie systémique, la ciclosporine ne dispose d'une AMM en médecine vétérinaire que chez le chien pour le traitement de la **dermatite atopique**, et chez le chat pour la **dermatite allergique chronique**. Par voie oculaire, la ciclosporine dispose d'une AMM, uniquement chez le chien, pour le traitement de la **kératoconjonctivite sèche chronique idiopathique** et de la **kératite superficielle chronique**. D'autres usages sont décrits hors AMM chez le chien, comme le traitement des fistules périanales, de l'adénite sébacée, de la panniculite nodulaire stérile, de l'anémie hémolytique à médiation immune, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, du lupus érythémateux, de l'histiocytose cutanée systémique ou de la pelade. Pour le traitement du pemphigus foliacé ou de la polyarthrite à médiation immune, les résultats sont plus contrastés et nécessitent habituellement des posologies plus fortes (Forsythe *et al.*, 2014 ; Papich, 2009). Enfin, chez l'homme, et de manière plus anecdotique chez l'animal, la ciclosporine a permis le développement des techniques de transplantation en contrôlant le rejet de la greffe par le receveur.

Les **effets secondaires gastro-intestinaux sont fréquents**, avec, notamment, vomissements (en moyenne 26 %), diarrhées (en moyenne 15 %) ou anorexie (en moyenne 2%) selon une méta-analyse conduite chez le chien en 2014 (Nuttall *et al.*, 2014). Ils conduisent parfois à un arrêt définitif du traitement. Diverses stratégies ont été mises en œuvre pour limiter l'influence de ces effets secondaires : espacement des administrations, réduction des doses employées, administration avec le repas (qui réduirait les doses absorbées sans modification notable de la réponse clinique), traitement concomitant avec des anti-vomitifs (métoclopramide ou maropitant) voire congélation préalable des comprimés (Bachtel *et al.*, 2015 ; Papich, 2009). D'autres effets indésirables peuvent être observés, plus rarement (1 à 10 % des animaux traités selon le résumé des caractéristiques du produit (RCP)) : léthargie ou hyperactivité, anorexie, hyperplasie gingivale bénigne à modérée, papillomes ou modification du pelage, faiblesse musculaire, gonflement des pavillons auriculaires. La survenue d'un diabète sucré doit être attentivement surveillée chez les West Highland White Terrier selon le RCP des spécialités disponibles.

La ciclosporine, par son action inhibitrice de la glycoprotéine P et de certains cytochromes P-450, est également à l'origine de **nombreuses interactions médicamenteuses**. Son association avec d'autres molécules comme le kétoconazole pourrait permettre une réduction des doses employées, bien qu'il n'existe encore aucun schéma thérapeutique validé (Papich, 2009).

Le principal facteur limitant son usage en médecine vétérinaire est **son coût élevé** et **sa tolérance digestive médiocre**. La réponse clinique est, habituellement, plus lente que celle observée avec les glucocorticoïdes, nécessitant de **3 à 6 semaines de traitement**.

2.1.1.3 Les antimétabolites

On distingue dans cette catégorie deux sous-familles principales, les inhibiteurs du métabolisme des purines et des pyrimidines (ou antimétabolites) et les agents alkylants. Aucune molécule de cette famille ne dispose d'une AMM vétérinaire.

Parmi les antimétabolites, on trouve l'**azathioprine** et le **MTX**, ainsi que le mycophénolate mofétil, le léflunomide et le bréquinar. Ils agissent par **inhibition des voies**

de biosynthèse de novo des purines et des pyrimidines. L'azathioprine est la molécule la plus employée en médecine vétérinaire. Elle exerce une action essentiellement sur les **lymphocytes T, CD4+ ou CD8+, et, tout particulièrement, sur les *natural killers* (NK).** Son action sur les cellules hématopoïétiques est à l'origine de ses principaux effets secondaires : neutropénie, thrombocytopénie voire pancytopenie avec aplasie médullaire, mais aussi atteinte hépatique et pancréatique (Chabanne, 2003 ; Papich, 2009). Bien qu'il n'y ait pas d'AMM vétérinaire en France, l'azathioprine est souvent recommandée en association avec des glucocorticoïdes pour le traitement, en seconde intention, de maladies auto-immunes **chez le chien**, comme l'anémie hémolytique auto-immune, la thrombocytopénie auto-immune, la polyarthrite à médiation immune ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cette molécule est également recommandée, **chez le cheval**, pour le traitement des affections hémolytiques auto-immunes en seconde intention. Le délai d'amélioration clinique oscille, habituellement, **entre 4 et 8 semaines.** Chez le chat, un métabolisme hépatique réduit est à l'origine d'une neutrophilie et d'une thrombocytopénie sévères : cette molécule est de ce fait rarement employée chez cette espèce (Catharine *et al.*, 2014b). Chez l'homme, l'utilisation d'azathioprine semble augmenter le risque de développer une leuco-encéphalopathie multifocale progressive, une affection démyélinisante du système nerveux central, alors que le risque majoré de lymphome historiquement rapporté lors de traitement à base d'azathioprine chez des patients souffrant de la maladie de Crohn serait plutôt lié à la maladie elle-même (Flohr *et al.*, 2013 ; Schmedt *et al.*, 2012).

Au sein des agents alkylants, on trouve le **cyclophosphamide** et le **chlorambucil**. Ces molécules forment des liaisons covalentes au niveau de l'ADN qui peuvent conduire à la mort cellulaire. Elles agissent principalement sur les cellules en division. Leur action s'exerce majoritairement sur les lymphocytes B, mais également sur les lymphocytes T, CD4+ ou CD8+. Ils ont peu d'effet anti-inflammatoire. Le cyclophosphamide, réputé d'action plus rapide que l'azathioprine, est aujourd'hui moins employé pour les maladies auto-immunes, à cause du risque élevé d'effets secondaires potentiellement graves. Ainsi, il peut être responsable d'aplasie médullaire, d'alopécie, de troubles digestifs, de cystite hémorragique stérile et, à long terme, de transformation maligne. Le chlorambucil, mieux toléré mais réputé moins efficace, est parfois utilisé chez le chat (Chabanne, 2003 ; Papich, 2009).

2.1.1.4 Les inhibiteurs des Janus Kinases

Le tofacitinib et le baricitinib sont indiquées dans la gestion de l'arthrite rhumatoïde en médecine humaine. En médecine vétérinaire, l'**oclacitinib** est indiqué, chez le chien, pour le traitement du prurit associé aux dermatites allergiques, en particulier la **dermatite atopique**. L'oclacitinib est un **inhibiteur sélectif des Janus Kinase (JAK)** qui sont des enzymes clés dans la transduction du message porté par certaines cytokines. Son action inhibitrice s'exprime préférentiellement sur l'enzyme JAK-1, dans une moindre mesure sur JAK-2 (avec une sélectivité 1,8 fois inférieure) et sur JAK-3 (avec une sélectivité 9,9 fois inférieure). Cette sélectivité est d'autant plus importante que JAK-2 est fortement impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse, que de fortes doses d'oclacitinib pourraient perturber. L'oclacitinib inhibe l'IL-31, une cytokine fortement impliquée dans le prurit chez le chien, mais également les IL-2, IL-4, IL-6 et IL-13 qui peuvent être impliquées dans les phénomènes allergiques. **Son action est très rapide**. Les effets secondaires, **peu fréquents** (moins de 5 %), sont essentiellement digestifs (vomissements, diarrhées). Toutefois, une fréquence augmentée d'histiocytomes et d'infections cutanées est rapportée chez le chien lors d'utilisation prolongée (Gedon *et al.*, 2018). Cette molécule fait actuellement l'objet d'une **pharmacovigilance prolongée** par l'agence européenne du médicament (EMA), pour une évaluation plus fine du risque cancérogène, notamment. **Son coût important** peut être une limite sérieuse à son utilisation chez le chien. Peu de données sont disponibles quant à son usage chez d'autres espèces.

2.1.1.5 Autres thérapeutiques

En médecine vétérinaire, un **anticorps monoclonal** « caninisé », le **lokivetmab**, a pour cible l'**IL-31**, souvent à l'origine du prurit dans la dermatite atopique canine. Il est indiqué pour le traitement des manifestations cliniques de la dermatite atopique. Malgré un schéma posologique impliquant une seule injection mensuelle, ce traitement est **onéreux**. Le recul est faible sur l'intérêt de cette molécule lors de traitements de longue durée, notamment en ce qui concerne le risque de développement d'anticorps anti-lokivetmab (Gedon *et al.*, 2018). De plus, une partie des chiens **ne répond pas** au lokivetmab (Moyaert *et al.*, 2017 ; Souza *et al.*, 2018).

Hors AMM, d'autres molécules peuvent être occasionnellement employées. La vincristine peut être utilisée pour traiter la thrombocytopénie auto-immune. La pentoxifylline pour certaines affections cutanées comme la dermatomyosite ou le lupus érythémateux, sans réelle preuve d'efficacité, toutefois. Le danazol, molécule anti-gonadotrope ayant une activité androgénique et anabolisante modérée, réduirait l'affinité des anticorps pour les récepteurs FC. Son principal intérêt reste la potentialisation des effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes lors d'utilisation combinée, notamment pour le traitement de l'anémie hémolytique auto-immune ou de la thrombocytopénie auto-immune. Le dapsons, molécule utilisée pour traiter la lèpre humaine, présente également des propriétés immunomodulatrices qui ont parfois été utilisées chez le chien. Elle est actuellement classée comme molécule critique interdite d'usage en médecine vétérinaire. Enfin, la chrysothérapie n'a pas fait la preuve de son efficacité en médecine vétérinaire (Chabanne, 2003 ; Papich, 2009).

2.1.2 Le traitement de la dermatite atopique du chien

Chez le chien, bien que de nombreuses affections auto-immunes ou allergiques soient décrites, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la **dermatite atopique**. C'est une dermatose inflammatoire, chronique, d'étiologie complexe, associant des causes génétiques et environnementales. Cette maladie est très courante et affecterait près de 10% de la population canine, avec de fortes prédispositions raciales. Les races Bouledogue français, West Highland white terrier, Shiba Inu, Cocker spaniel, Boxer, Setter anglais, Labrador, Teckel et American Staffordshire bull terrier sont parmi les races les plus fréquemment atteintes. Cette affection représente la **deuxième cause de prurit chez le chien**, après la dermatite par allergie aux piqûres de puces. Chez les chiens atteints, la barrière cutanée est fragilisée et laisse passer de nombreuses molécules de l'environnement, irritants, toxiques, haptènes, protéines, qui stimulent l'immunité innée et l'immunité acquise et sont à l'origine des symptômes de la maladie. Le traitement est complexe, d'abord parce qu'il ne permet qu'un contrôle de la dermatose et non sa guérison, ensuite parce qu'il demande un engagement médical et financier important de la part des propriétaires sur le long terme. Ce diagnostic est donc, malheureusement, parfois suivi d'abandon ou d'euthanasie des animaux.

Le traitement principal de cette dermatose fait appel à **des soins locaux**. Ces soins sont très contraignants pour le propriétaire et ne sont pas toujours très rigoureusement suivis. Selon la gravité de la maladie, un traitement systémique peut s'avérer nécessaire. Les traitements disponibles, chez le chien, pour gérer cette affection sont nombreux : **les glucocorticoïdes, la ciclosporine, l'oclacitinib ou le lokivetmab**. Toutefois, ils possèdent, tous, plus ou moins, des inconvénients :

- Une impossibilité de maintenir certaines thérapeutiques **sur une longue durée, en raison d'effets secondaires graves** (glucocorticoïdes, bien que des questions se posent sur l'oclacitinib),
- Des **effets secondaires, notamment gastro-intestinaux**, à la sévérité variable, mais qui apparaissent en général rapidement après induction du traitement et sont la principale cause **d'abandon du protocole thérapeutique** par les propriétaires (ciclosporine),
- Une réponse au traitement parfois **décevante voire inexistante** (ciclosporine, oclacitinib ou lokivetmab),
- Un **coût de traitement prohibitif**, surtout pour les chiens de grande taille (ciclosporine, oclacitinib ou lokivetmab).

Le MTX a récemment démontré son intérêt chez l'homme pour le **traitement de la dermatite atopique** (El-Khalawany *et al.*, 2013 ; Goujon *et al.*, 2018 ; Dvorakova *et al.*, 2017 ; Gerbens *et al.*, 2018 ; Shah *et al.*, 2018 ; Rahman *et al.*, 2014). La dermatite atopique du chien est un **modèle parfait, cliniquement et immunologiquement**, de la dermatite atopique de l'homme (Marsella *et al.*, 2009). Ainsi, nous nous sommes interrogés sur l'opportunité d'utiliser le MTX chez le chien, en vue de proposer une nouvelle molécule, en alternative aux thérapeutiques existantes. En effet, les résultats publiés chez l'homme démontrent une **bonne efficacité** associée à une **bonne tolérance** du traitement. Le **coût très modeste** de cette molécule la rend particulièrement intéressante lorsque des contraintes financières s'opposent à une prise en charge efficace de l'animal par les thérapeutiques classiques.

2.1.3 Dermatoses auto-immunes chez le cheval

Chez le cheval, plusieurs maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité ont été identifiées. Dans cette catégorie, nous nous sommes particulièrement intéressés aux dermatoses les plus fréquentes, qui nécessitent la mise en place d'un traitement immunomodulateur systémique (Rashmir-Raven, 2018):

- la **dermatite estivale récidivante due aux piqûres d'insectes**, en particulier les *Culicoïdes*, qui se manifeste par des excoriations, des dépilations, une lichénification et parfois une urticaire, dans la région de l'encolure et de la queue principalement,
- une **urticaire chronique**, inductible ou spontanée, avec ou sans prurit
- le **pemphigus foliacé**, caractérisé par des pustules sous-cornées, puis des croûtes, des érosions, des zones d'alopecie annulaires et un squamosis. Ces lésions débutent à la face et au tronc avant de se généraliser. Prurit et douleur sont variables. Une **répercussion systémique** (abattement, amaigrissement, œdème déclive) est observée dans la moitié des cas.
- Le **lupus érythémateux cutané chronique**, qui se traduit par de l'érythème, du squamosis, une alopecie diffuse, des zones dépigmentées, ulcérées et squamo-croûteuses. Les lésions sont localisées à la tête, à l'encolure et au tronc ou généralisées. Une **forme systémique** a été décrite, qui se traduit par une dermatite exfoliative généralisée, associée à l'une ou plusieurs des anomalies suivantes : polyarthrite, anémie, thrombocytopénie, uvéite, abattement, perte de poids, fièvre, adénomégalie ou œdème déclive.

Les glucocorticoïdes restent **le traitement immunosuppresseur le plus employé en médecine équine** dans la gestion de ces affections. Cependant, ils sont responsables **d'effets secondaires importants**, principalement lors de traitements à long terme : fourbure, sensibilité accrue aux infections, exacerbation des troubles métaboliques chez les équidés en surpoids, fonte musculaire, polyuro-polydipsie et plus rarement hépatite, atteinte du métabolisme osseux ou hyperadrénocorticisme (Felippe, 2016 ; Leclere, 2017). L'utilisation de la ciclosporine est limitée au traitement par voie locale en ophtalmologie en raison de son **coût prohibitif**. L'**azathioprine** semble bien tolérée chez le cheval (White *et al.*, 2005), malgré un nombre limité de données. Toutefois son efficacité dans la gestion des dermatoses auto-immunes reste à démontrer, avec des résultats contradictoires

(Vandenabeele *et al.*, 2004 ; Winfield *et al.*, 2013). Parmi les autres molécules testées, qui ne sont plus toutes disponibles, on trouve les sels d'or, la dapsonne, le cyclophosphamide ou la vincristine, mais leur efficacité reste à démontrer et leur tolérance n'est pas toujours excellente, sans parler des contraintes d'utilisation liées à leur risque pour le manipulateur humain (molécules CMR – cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction humaine) (Felippe, 2016). En conclusion, il n'existe pas de traitement immunomodulateur efficace, bien toléré, peu onéreux et disponible en médecine équine autre que les glucocorticoïdes. C'est une des principales raisons qui peut conduire à l'euthanasie des chevaux qui présentent une des affections précitées. Le **MTX** pourrait être une alternative intéressante, sous réserve de déterminer un schéma posologique adapté et de vérifier son efficacité.

2.2 Objectifs du travail de thèse

2.2.1 Objectif N°1 : études précliniques chez le chien sain

Des études précliniques ont été conduites afin d'évaluer la tolérance du médicament chez le chien et de déterminer un schéma posologique adapté à cette espèce, à partir d'une approche pharmacocinétique. Deux études ont été réalisées. Les résultats sont présentés en **partie III**.

Une première étude de tolérance, à dose croissante de MTX, a été conduite, en station expérimentale, avec euthanasie et autopsie des animaux en fin d'expérimentation. Cette étude a permis d'évaluer les effets secondaires de la molécule, chez le chien, après 20 semaines de traitement et de récolter quelques données de pharmacologie.

Une étude de pharmacocinétique, sur 6 chiens, en plan croisé, a permis de déterminer les principales grandeurs pharmacocinétiques du MTX par voie IV, SC ou orale.

Les résultats obtenus lors des essais précliniques, conformes à ce qui était attendu, ont permis de proposer un schéma posologique à tester *in vivo*. Ainsi, un essai clinique de phase III a pu être construit, financé et lancé en mars 2018.

2.2.2 Objectif N°2 : étude clinique de phase III chez le chien souffrant de dermatite atopique modérée à sévère

L'objectif de cette deuxième partie du travail de thèse est d'évaluer l'efficacité du MTX dans le traitement de la dermatite atopique du chien modérée à sévère. Ainsi, un essai clinique multicentrique, randomisé, de non-infériorité par rapport au traitement de référence qu'est la ciclosporine, a été mis en place, en double aveugle. Le protocole de cet essai est présenté et justifié dans la **partie IV** de ce document.

Le recrutement moins rapide qu'espéré ne permet qu'une analyse partielle des résultats pour la rédaction de ce manuscrit, l'étude étant en cours pour une à deux années supplémentaires (un peu moins de la moitié des 60 chiens prévus ayant été inclus ce jour – un nombre plus important de centres cliniques est aujourd'hui mobilisé pour améliorer le recrutement). Toutefois, une analyse des données en cours d'étude, sur presque 1/3 de l'effectif final, est proposée en **partie IV**.

2.2.3 Objectif N°3 : études précliniques chez le cheval sain

Le MTX pourrait présenter un intérêt en médecine équine dans la gestion des maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité, notamment en dermatologie. **Des études précliniques ont été conduites afin d'évaluer la tolérance du médicament chez le cheval et de déterminer un schéma posologique adapté à cette espèce, à partir d'une approche pharmacocinétique.**

Comme pour le chien, nous avons réalisé deux études précliniques pour mieux appréhender le comportement du MTX chez le cheval. Les résultats sont présentés en **partie V**.

Une étude de biodisponibilité, en cross-over, impliquant 2 juments et 4 poneys, a permis de déterminer les **principales grandeurs pharmacocinétiques** du MTX chez le cheval

Une étude à plus long terme, durant 3 mois, a permis de **rechercher la présence de formes polyglutamates intracellulaires** et d'observer **la tolérance de cette molécule** chez le cheval, bien que le nombre d'animaux utilisés ait été faible.

Aucune étude de tolérance *sensu stricto* n'a été mise en place, pour des raisons de coût essentiellement. Il n'y a eu ni euthanasie, ni autopsie des animaux impliqués dans les essais. L'évaluation de la tolérance de la molécule a donc été **essentiellement clinique**, sur un nombre très limité d'animaux, au cours de ces deux essais.

RESULTATS

Etude de la tolérance et de la
pharmacocinétique du méthotrexate chez le
chien Beagle sain

3.1 Contexte de l'étude

Le MTX est largement employé, en médecine humaine, pour ses propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices, notamment pour le traitement de la dermatite atopique. Chez le chien, il n'existait que très peu de données sur lesquelles s'appuyer pour déterminer la tolérance de la molécule ou la posologie à utiliser, et aucune concernant une éventuelle efficacité dans le traitement de la dermatite atopique canine.

Un **essai ouvert a été conduit sur 10 chiens souffrant de dermatite atopique**, modérée à sévère, par l'équipe de dermatologues de VetAgro Sup, dans le cadre d'une thèse d'exercice vétérinaire. La posologie retenue dans cet essai, calquée sur la médecine humaine à défaut de données suffisantes, a été empiriquement fixée à 5 - 10 mg/semaine (en fonction de la réponse clinique), indépendamment du poids des animaux. Les **résultats encourageants sur le plan de la tolérance et de l'efficacité** ont poussé à poursuivre le travail autour de cette molécule (Pin *et al.*, 2012).

L'obtention de données précliniques solides semblait donc indispensable, en vue de mettre en place, à terme, un essai clinique de phase III, par comparaison avec le traitement de référence de la dermatite atopique, à savoir la ciclosporine.

3.2 Objectifs

La première étude présentée ici, appelée DE-Study (*dose-escalation study*), a été réalisée en station expérimentale, sur chiens sains. Elle avait pour principal objectif la **vérification de la tolérance de cette molécule dans l'espèce canine**, étape indispensable à son utilisation en clientèle sur animaux malades. Elle a également permis d'obtenir des **données de pharmacologie** permettant de mieux appréhender le comportement de la molécule chez le chien.

Un essai strict de pharmacocinétique, appelé B-Study (*Bioavailability Study*) a ensuite été mis en place afin **de déterminer les principales grandeurs pharmacocinétiques** chez le chien et de **comparer les différentes voies d'administration** du MTX.

3.3 Publication N°1

ROSTANG, Antoine, MOSCA, Marion, JEANNIN, Morgan, LUISSIEZ, Coralie, BERNY, Philippe, FOUREL, Isabelle, PIN, Didier et PROUILLAC, Caroline, 2018. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in healthy beagle dogs. In : *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 12 juin 2018. DOI 10.1111/jvp.12673.

Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in healthy beagle dogs

Antoine Rostang¹  | Marion Mosca² | Morgan Jeannin¹ | Coralie Luissiez¹ | Philippe Berny¹ | Isabelle Fourel³ | Didier Pin² | Caroline Prouillac¹

¹Interaction Cellule Environnement, Unité Pharmacologie et Toxicologie, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

²Interaction Cellule Environnement, Unité Dermatologique, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

³USC 1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Université Lyon, Marcy l'Etoile, France

Correspondence

Antoine Rostang, Unité de Pharmacie et Toxicologie, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France.

Email: antoine.rostang@vetagro-sup.fr

Abstract

Methotrexate may be an alternative to ciclosporin in the treatment of canine atopic dermatitis (cAD) as suggested by recent data. The aim of the study was to investigate both the tolerance and the pharmacokinetic behavior of methotrexate (MTX) in plasma, following intravenous (i.v.), subcutaneous (s.c.) or oral (OR) administration over several weeks. Six healthy dogs were given oral MTX once a week, respectively, per dog at 2.5 mg/1 week, 5 mg/4 weeks, 7.5 mg/3 weeks, 10 mg/6 weeks and 12.5 mg/5 weeks. No clinically relevant abnormalities of laboratory parameters were noticed. A high inter-individual variation of MTX plasma concentration was observed with a suspicion of saturation phenomenon in absorption. To compare with other routes of administration, six healthy beagle dogs followed a crossover design study at 7.5 mg per dog MTX. The absolute bioavailability was 93% for SC injection and 30% for the oral route. The inter-individual variability was quite low following SC administration compared to oral route. Just as in human, given the substantial variability of oral absorption, clinicians cannot assume consistent oral bioavailability of MTX. Therefore, they may consider switching dogs to the SC route in case of absence of clinical response with a weekly oral dose.

1 | INTRODUCTION

Canine atopic dermatitis (cAD) is a chronic allergic skin disease, affecting up to 10% of the canine population. This is one of the most prevalent skin diseases in dogs. Pathogenesis is associated with complex interactions between environmental factors, genetic predisposition, defective skin barrier, and immunological response (Majewska et al., 2016). The treatment can be tricky for various reasons. First, it is a long-lasting treatment, as the disease cannot be cured. Moreover, it requires a considerable financial and medical commitment from the owner, sometimes leading to abandon or euthanasia. As a matter of fact, topical therapies are effective for a majority of patients with mild or moderate disease, thus constituting a mainstay in the treatment of cAD. Systemic therapy becomes essential in moderate to severe disease conditions. To date, the International Committee on Allergic Diseases of Animals, through systematic reviews, has confirmed the

efficacy of oral glucocorticoids, ciclosporin, and oclacitinib associated with topical treatments (Olivry et al., 2015).

Methotrexate (MTX) (4-amino-N10-methyl pteroylglutamic acid), is a folic acid analog synthesized by Smith, Cosulich, Hultquist, and Seeger (1948). MTX was first developed for the treatment of malignancies, where doses could be escalated up to 30 g/m², because of its cytolytic properties. The first report using a folic acid antagonist for nonmalignant disease was by Gubner, August, and Ginsberg (1951) in rheumatoid arthritis. However, efficacy of low-dose pulse MTX in rheumatoid arthritis treatment (around 10 mg/m²) was only proved in the late 1970s. Initially given daily, later on in weekly doses, both parenteral and oral MTX therapies were effective (Mathers & Russell, 1993). In 1971, Weinstein and Frost suggested dividing the weekly oral dose into three portions, 12 hr apart, to maximize the effect of MTX on the rapidly proliferating psoriatic epidermal cells and to minimize topical effects. At present,

in autoimmune diseases and allografts, low-dose MTX is usually employed in the range of 5–25 mg/week, given as a single dose or in a Weinstein schedule, although there is little high-quality evidence supporting the use of one regimen over the other (Menting, Dekker, Limpens, Hooft, & Spuls, 2016). At low-dose, this drug is approved in humans by the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of active rheumatoid arthritis, severe juvenile idiopathic arthritis, severe psoriatic arthritis or severe disabling psoriasis as a second line treatment. Based on the assessment of the quality of evidence using Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (Atkins et al., 2004), the European Academy of Dermatology and Venereology strongly recommends MTX for the induction and long-term treatment of psoriasis vulgaris, a T cell-mediated skin disorder (Nast et al., 2015). MTX is the most commonly dermatologist-prescribed oral immunosuppressive agent in human medicine, prednisolone excepted (Bangert & Costner, 2007). Several studies have shown that low-dose MTX is an effective and well-tolerated treatment for moderate-to-severe human atopic dermatitis (hAD; Goujon et al., 2006; Lyakhovitsky et al., 2010; Weatherhead, Wahie, Reynolds, & Meggitt, 2007). More recently, MTX has been compared to ciclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis in children: these two drugs can be considered as effective, relatively safe and well-tolerated therapies (El-Khalawany, Hassan, Shaaban, Ghonaim, & Eassa, 2013).

As a matter of fact, hAD is clinically and immunologically extremely similar to cAD (Marsella & Girolomoni, 2009). Thus, MTX may be considered as a cheaper alternative to ciclosporin in the treatment of cAD as it was already suggested by some clinicals and pharmacokinetic data, for which the trial protocol was based on empirical evidence (Pin et al., 2012). At present, there is a need to improve knowledge about dosage regimen in dogs. The aim of our study was therefore to investigate the pharmacokinetic behavior of MTX following intravenous, subcutaneous or oral administration over several weeks.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animals

Studies were conducted in compliance with the Veterinary International Committee for Harmonization guidance for good clinical practice. They took place in Biovivo, a Good Clinical Practice (GCP) accredited platform located in the veterinary campus of VetAgro Sup, the French Veterinary School of Lyon. According to Directive 2010/63/UE, all procedures used in this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of VetAgro Sup.

2.1.1 | Dose escalation study (DE-Study)

This was inherently a 20-week-long tolerance study, where some sparse pharmacokinetic data were collected.

Six healthy nonneutered male beagle dogs between 2.5 and 8.5 years old, weighing 10–13.5 kg were used in this study. After acclimatization, dogs were housed indoors in pairs in a temperature and humidity-controlled facility ($19 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity 35%–75%). The dogs were fed with commercial dog food once a day whereas water was provided ad libitum.

Dogs were suitable for inclusion in the study if they were considered healthy after a physical examination, a pulmonary x-ray (pulmonary fibrosis could be a side effect of methotrexate) and a clinical pathology assessment (hematology, clinical chemistry, urinary strip). All dogs were strictly monitored throughout the study.

All dogs were planned to be euthanized 3 weeks after the end of the study to conduct necropsy and histological study of lungs, kidneys, and liver. However, the two older dogs were finally euthanized just after the end of the study because of unexplained anorexia during the 2 last weeks of the study. The other four dogs were euthanized as planned 3 weeks after the end of the study.

2.1.2 | Bioavailability study (B-Study)

Six healthy 2-year-old male beagle dogs, weighing around 15 kg (± 1 kg) except one (8.5 kg) were used. Dogs were housed together in Biovivo's kennels with access to an outdoor park and were granted an acclimatization period. They were fed commercial dog food once a day and water was provided ad libitum. A clinical examination of all animals was made at least once daily. Dogs were monitored by regular veterinary clinical examinations, blood cell counts and classical clinical chemistry tests (ALP, ALT, Glycaemia, Creatinine, Urea, Albumin, Globulin) throughout the study period.

2.2 | Experimental procedure

2.2.1 | DE-Study

Every Tuesday during 20 weeks, dogs received an increasing oral dose of MTX (Novatrex[®] 2.5 mg, WYETH[®]). To reflect clinical practices, the treatment regimen chosen in this study was not selected on a body weight basis.

Each dog was given oral MTX once a week, respectively, at 2.5 mg per dog during 1 week (from 0.18 to 0.25 mg/kg), at 5 mg per dog during 4 weeks (0.35–0.55 mg/kg), at 7.5 mg per dog during 3 weeks (0.5–0.9 mg/kg), at 10 mg per dog during 6 weeks (0.7–1.2 mg/kg), at 12.5 mg per dog during 5 weeks (0.9–1.4 mg/kg; see Figure 1).

To evaluate tolerance, a visual inspection of all animals was prepared at least once a day, and a full clinical examination twice a week (heart and pulmonary auscultation, weighing, pulse-taking, body temperature monitoring, lymph nodes and abdomen palpations). In addition, every Monday for 20 weeks, hematological, urinary and biochemical tests were carried out.

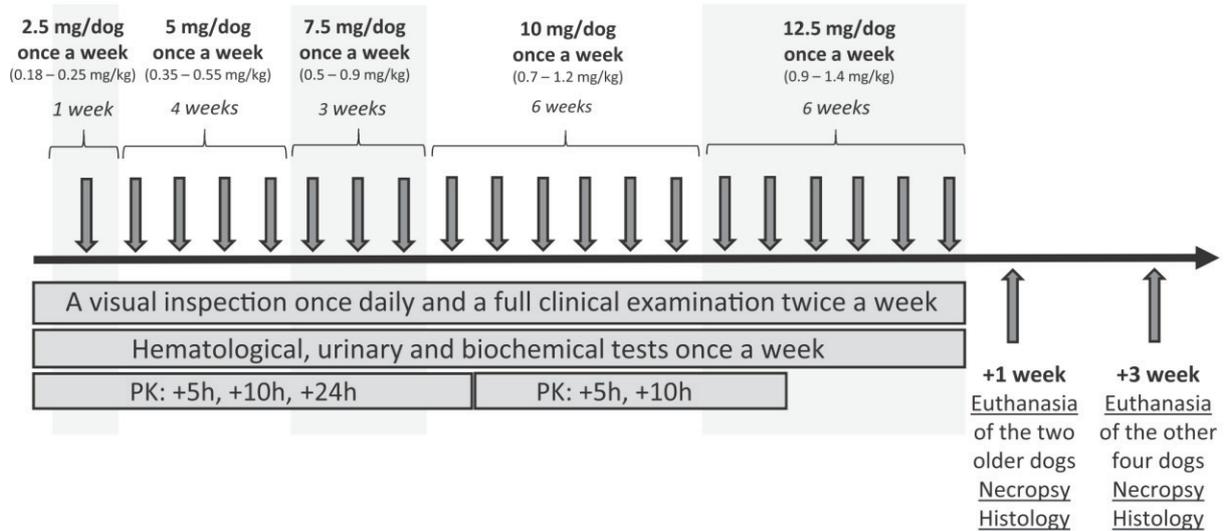


FIGURE 1 DE-Study design

To evaluate pharmacokinetics, from weeks 1 to weeks 9, blood samples were collected at 5, 10 and 24 hr after MTX administration. As described in human medicine by Lebbe, Beyeler, Gerber, and Reichen (1994), only three samples were taken to limit animal manipulation. Based on preliminary results, from weeks 10 to 16, blood samples were collected only at 5 and 10 hr after drug administration. No blood collection was made after week 16.

2.2.2 | B-Study

The study followed a 3×3 crossover design (Figure 2): each dog received MTX by three routes of administration on three distinctive 24 hr periods, separated by 1-week washout periods. Dogs were fasted overnight and throughout the 24 hr-testing period. Each dog received a total dose of 7.5 mg per dog of MTX, irrespective of its body weight, either intravenously (0.3 ml in the cephalic vein of LEDERTREXATE®—Biodim Laboratory® at 25 mg/ml), or subcutaneously (0.3 ml in the subcutaneous tissue between the scapulae of LEDERTREXATE®—Biodim Laboratory® at 25 mg/ml), or orally (three tablets of NOVATREX® 2.5 mg—Pfizer®). The corresponding dose, as well as the sequences employed for each subject, are presented in Table 1.

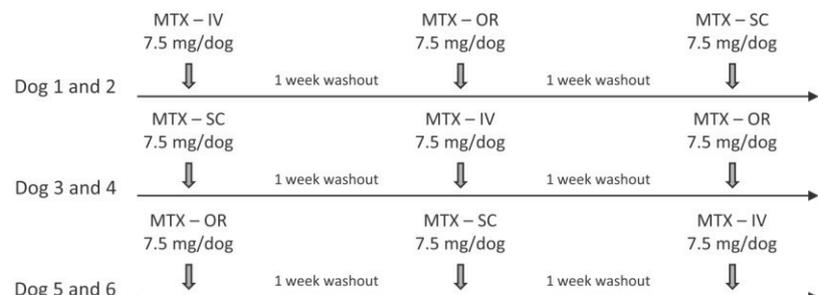
Blood samples were drawn in EDTA Vacutainer® plastic tubes at 0 min, 15 min, 30 min, 1 hr, 1.5 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 12 hr, 16 hr, 24 hr. Blood samples were immediately centrifuged. Plasma samples were stored at -20°C until analyzed.

2.3 | Sample analysis

The analytical techniques used for the quantification of MTX in blood were somewhat different between the DE-Study and the B-Study.

For the DE-Study, the quantification of MTX in plasma samples was performed with a liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry instrument (LC-ESI-Ion Trap MS) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) and adapted from Guo et al., 2007. For the precipitation of proteins, 200 μl of methanol were added to 50 μl of plasma, mixed together for 10 min and centrifuged at 2,300 g for 5 min. Two microliter of the supernatant was injected onto the LC-ESI-MS system. The column was a Gemini C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and the elution gradient was achieved with 10 mM ammonium formate aqueous solution containing 0.1% formic acid, and methanol at a flow rate of 0.25 ml/min. The positive mode and transition m/z 455 \rightarrow 308 was monitored

FIGURE 2 B-Study design



to detect and quantify MTX. The limit of quantification was determined at 10 ng/ml. Accuracy was better than 88% and precision was better than 17% for the three quality control levels.

For the B-Study, the quantification of MTX in plasma samples was performed with a liquid chromatography Acquity (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France), coupled with electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometer instrument (LC-ESI-MS/MS) Xevo-TQS-Micro from Waters (Saint-Quentin en Yvelines, France). For the precipitation of proteins, 1,000 μ l of methanol spiked with internal standard (MTX-D3) were added to 200 μ l of plasma, mixed together for 10 s and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. One microliter of the supernatant was injected onto the system. The column was an Acquity UPLC HSS C18 (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France) and the elution gradient was achieved with aqueous solution containing 0.1% formic acid, and acetonitrile containing 0.1% formic acid at a flow rate of 0.6 ml/min. Detection of compounds was performed in the positive mode at transitions m/z 455.07 > 308.03, 455.07 > 175.08, and 458.07 > 311.03 for MTX and MTX-D3, respectively. The limit of quantification was 5 ng/ml. Accuracy was better than 91% and precision was better than 13% for the three quality control levels.

2.4 | Pharmacokinetic analysis

For the dogs enrolled in the B-Study, the area under the C/t curve (AUC) in plasma was calculated by the linear-up log down trapezoidal rule with extrapolation to infinity using Phoenix[®] WinNonlin[®] 6.4. The extrapolated part of the curve (AUC_{inf_pred}) was estimated using Equation 1:

$$AUC_{inf_pred} = AUC_{last} + \frac{Clast_{pred}}{\lambda_z}, \quad (1)$$

where AUC_{last} is the AUC from the time of dosing to the last measurable concentration, $Clast_{pred}$ is the concentration at the final observation time, estimated using the linear regression performed to estimate λ_z , and λ_z is the first order rate constant associated with the terminal log-linear portion of the curve. The extrapolated part of the AUC was always <2% of the total area. The plasma clearance was calculated using Equation 2:

$$Cl = \frac{Dose_{IV}}{AUC_{inf_pred}}, \quad (2)$$

where Dose is the adjusted administrated dose (i.e., fixed dose divided by body weight).

The maximum concentration (C_{max}) and its occurring time (T_{max}) were obtained from the observed concentrations. The absolute bioavailability (F) after oral or SC administrations was calculated using the ratio of the AUC_{inf_pred} obtained after extravascular (AUC_{SC_OR}) and IV (AUC_{IV}) administrations of the same MTX dose:

$$F (\%) = \frac{AUC_{SC_OR}}{AUC_{IV}} \times 100. \quad (3)$$

The mean residence time extrapolated to infinity (MRT_{inf_pred}) was obtained using Equation 4:

$$MRT_{inf_pred} = \frac{AUMC_{inf_pred}}{AUC_{inf_pred}} = \frac{\left(AUMC_{last} + \frac{T_{last} \times Clast_{pred}}{\lambda_z} + \frac{Clast_{pred}}{\lambda_z^2} \right)}{AUC_{inf_pred}}, \quad (4)$$

Table 1 Pharmacokinetic raw data from the B-Study

DOG #	1	2	3	4
Sequence	IV - OR - SC	IV - OR - SC	SC - IV - OR	SC - IV - OR
Body Weight	15.4 \pm 0.1	14.2 \pm 0.2	13.1 \pm 0.5	15.1 \pm 0.1
Adjusted dosage (mg/kg)	0.49 \pm 0.01	0.53 \pm 0.01	0.57 \pm 0.02	0.5 \pm 0.01
AUC IV [ng hour mL ⁻¹] (% extrap)	3002.77 (0.16%)	3691.44 (1.56%)	3333.55 (0.75 %)	3986.3 (0.30 %)
C_{max} IV (ng/mL)	1549.2	1860.7	1309.3	1788.5
MRT IV $_{inf_pred}$ (hour)	2.53	3.26	5.06	2.92
$T_{1/2}$ (hour)	1.76	2.26	3.51	2.03
AUC SC [ng hour mL ⁻¹] (% extrap)	3130.30 (0.56%)	3963.16 (0.34%)	2880.83 (0.22%)	3402.41 (0.68%)
C_{max} SC (ng/mL)	852.8	1345.8	1248.1	1276.8
MRT SC $_{inf_pred}$ (hour)	4.06	3.44	2.78	3.15
T_{max} SC (hour)	0.5	0.5	0.5	0.5
$T_{1/2}$ (hour)	2.81	2.38	1.93	2.18
AUC OR [ng hour mL ⁻¹] (% extrap)	NA	827.27 (0.12%)	1595.98 (0.71%)	1693.38 (2.34%)
C_{max} OR (ng/mL)	NA	177.5	405.9	367.8
MRT OR $_{inf_pred}$ (hour)	NA	4.74	4.32	4.94
T_{max} OR (hour)	NA	1	1.5	1
$T_{1/2}$ (hour)	NA	3.29	2.99	3.42
F Relative OR/SC (%)	NA	21%	55%	50%

where $AUMC_{last}$ is the area under the moment curve from the time of dosing to the last measurable concentration, T_{last} is the time of last measurable concentration and $C_{last, pred}$ is the concentration at the final observation time estimated using the linear regression performed to estimate λ_z . The volume of distribution at steady-state (V_{ss}) was estimate using Equation 5:

$$V_{ss} = MRT_{inf, pred} \times Cl. \quad (5)$$

Mean Absorption Time (MAT) was calculated using Equation 6:

$$MAT_{OR, SC} = MRT_{inf, pred, OR, SC} - MRT_{inf, pred, IV}. \quad (6)$$

Knowing Equations 7 and 8, where Ka_1 is the uptake rate constant and Ka_2 is the rate constant reflecting the unabsorbed fraction, we calculated the $MAT_{(Ka1)}$, which represents the mean oral absorption time, thanks to Equation 9.

$$MAT_{OR} = \frac{1}{Ka_1 + Ka_2}, \quad (7)$$

$$F = \frac{Ka_1}{Ka_1 + Ka_2}, \quad (8)$$

$$MAT_{Ka_1} = \frac{MAT_{OR}}{F}. \quad (9)$$

Half-life ($T_{1/2}$) was calculated thanks to Equation 10:

$$T_{1/2} = \ln 2 \times MRT_{inf, pred}. \quad (10)$$

2.5 | Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the RStudio software (version 1.01.143). Because of the specific treatment regimen employed (not expressed on a body weight basis) and the small sample size, data were not considered to be normally distributed. As a consequence, we used the mean absolute deviation (MAD) in lieu of the standard deviation. MAD was calculated using Equation 11:

$$MAD = \frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N |x_i - \bar{x}|, \quad (11)$$

where x_i is the value observed and \bar{x} the mean.

A series of pairwise Spearman correlations (nonparametric) tests were conducted to examine the extent to which concentrations at several sampling times were correlated with AUC.

To examine the dose-concentration relationship in the DE-Study, a mixed linear regression model was employed. To graphically describe the nonlinear relationship between the dose administered and the concentrations measured, a loess algorithm fitting curve was employed. This algorithm is meant to represent the notion of locally weighted regression: a fitting technique that provides a generally smooth curve. The value of which at a particular location along the x-axis is determined only by the points in that vicinity. The method consequently makes no assumptions about the form of the relationship and allows the form to be discovered using the data themselves (Cleveland, 1979).

In our B-Study, AUC data were log-transformed prior to analysis. A series of stepwise multiple linear regression models were run and multiple two-way analysis of variance (ANOVA) tests were

5	6	Mean ± MAD for all dogs	Mean ± MAD without dog 6	MAD/mean for all dogs (%)	MAD/mean without dog 6 (%)
OR - SC - IV	OR - SC - IV				
16.35 ± 0.1	8.52 ± 0.1	13.79 ± 1.98	14.85 ± 0.94	14.36	6.37
0.46 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.57 ± 0.1	0.51 ± 0.03	17.98	6.27
4021.31 (1.07%)	6693.49 (0.19%)	4121.48 ± 857.34	3607.07 ± 351.13	20.80	9.73
1703.1	3445.5	1942.72 ± 500.9	1642.16 ± 170.33	25.78	10.37
3.51	2.57	3.31 ± 0.65	3.46 ± 0.66	19.68	19.19
2.43	1.78	2.29 ± 0.45	2.40 ± 0.46	19.64	19.13
3699.39 (0.69%)	5649.97 (0.07%)	3787.68 ± 679.26	3415.22 ± 332.85	17.93	9.75
977.5	2105.9	1301.15 ± 283.13	1140.20 ± 180.04	21.76	15.79
4.08	2.81	3.39 ± 0.47	3.50 ± 0.45	13.98	12.98
1	0.5	0.58 ± 0.14	0.60 ± 0.16	23.81	26.67
2.83	1.95	2.35 ± 0.33	2.43 ± 0.31	13.98	12.98
816.30 (0.84%)	1098.12 (0.89%)	1206.33 ± 350.78	1233.39 ± 411.45	29.08	33.36
185.8	215.2	270.44 ± 93.13	284.25 ± 102.6	34.44	36.09
5.02	5.47	4.90 ± 0.29	4.75 ± 0.23	6.01	4.73
2	2	1.50 ± 0.4	1.38 ± 0.38	26.67	27.27
3.48	3.79	3.39 ± 0.2	3.29 ± 0.16	6.01	4.73
22%	19%				

employed. Residuals were graphically checked. All statistical tests were two-tailed and deemed to be statistically significant at $\alpha \leq 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Tolerance of MTX in dogs

Methotrexate seems to be a well-tolerated drug in dogs. The majority of adverse effects observed are minor and it was never considered necessary to stop MTX administration in the six dogs during the 20 weeks-long DE-Study. Only decreased appetite (during 1 or 2 days after MTX administration), few episodes of diarrhea (three episodes, unrelated to MTX administration/dose) or mild cutaneous events (erythema and skin flakes on only one dog for 2 weeks) were observed. A significant weight loss for half of the dogs after 20 weeks (around 0.9 kg) was observed. Minor hematological effects were noticed such as decrease of monocytes, neutrophils, and leukocytes counts (within usual values except for one dog at the end of the DE-Study). Transient elevations in liver enzymes, particularly ALT, GGT or bilirubin, were observed. However, these biochemical blood parameters returned to normal spontaneously during the trial. There were no signs of kidney damage or no evident folic acid deficiency. Gross and microscopic necropsy evaluations were normal. The two older dogs of the DE-Study (8 years old) experienced significant anorexia during the 2 last weeks of the study, with a slight leukocytopenia for one of them. This dog also required repeated antibiotic administration from week 7 for diarrhea, depression, and hyperthermia. Despite numerous clinical, blood or ultrasound

tests, only a severe periodontal disease was diagnosed. This dog responded well to antibiotic treatment but suffered several relapses. An underlying infection was suspected and euthanasia at the end of the study was suggested, but gross and microscopic necropsy as well as blood tests remained normal (except for leukocytopenia). The second older dog had no clinical involvement until the last 2 weeks. Again, its anticipated euthanasia and necropsy as well as biological tests failed to establish a definitive conclusion about the etiology of anorexia.

A statistically significant decrease of leukocytes, although within a physiological interval, was measured under treatment during the B-study. This decrease of leukocytes spontaneously resolved 3 weeks after the end of the study.

3.2 | DE-Study

Whatever the chosen dosage regimen, there was a rapid decrease between time 5 hr to time 10 hr and then a slighter decrease until 24 hr (data not shown). A very low plasma level of MTX was observed at 24 hr (the MTX plasma level was generally below LOQ). As the sampling schedule varied during the DE-study and as concentration at time 5 hr postadministration was shown to be the most strongly correlated to AUC, we focused our analysis on this time values. The individual plasma concentration vs. time (in weeks) curves at time 5 hr are shown in Figure 3, allowing to observe inter and intra-individual variability. A rather erratic variability of MTX plasma level for each dog was observed, unrelated to either time or dosage level, with different trends between dogs. Moreover, we observed

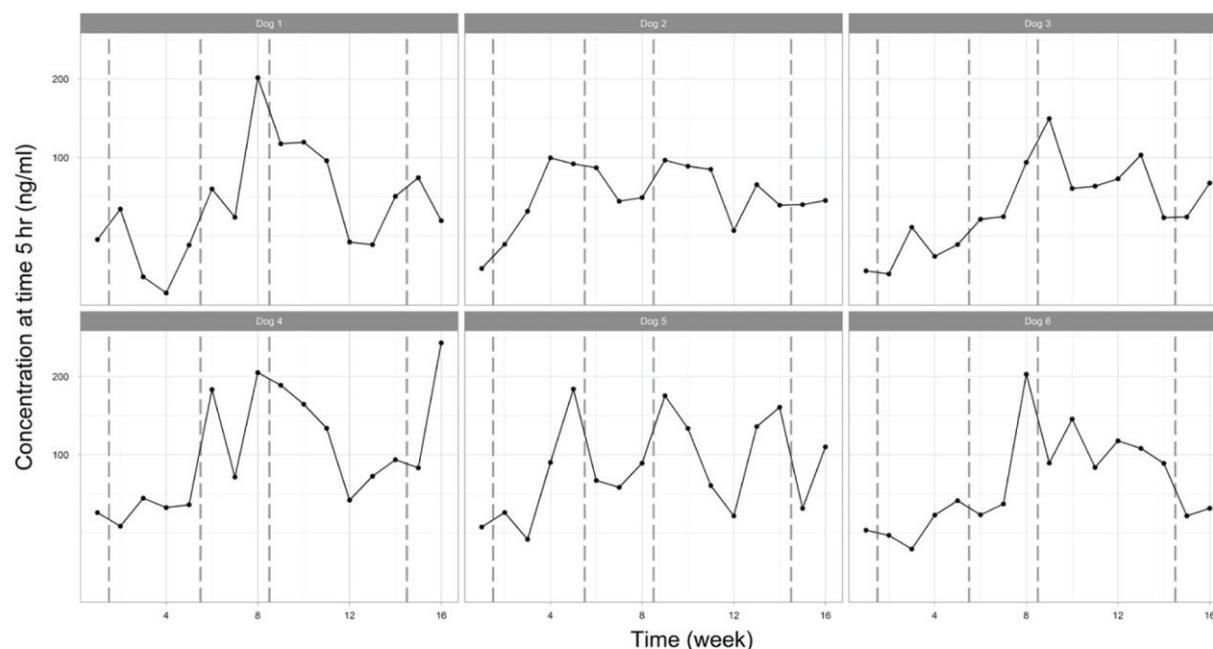


FIGURE 3 Methotrexate plasma concentration vs. time curves at time 5 hr in the DE-Study. Change in administered doses (from 2.5 to 12.5 mg/week) is materialized by the dots

more intra-individual variability, with wide discrepancies, up or down, with increasing study duration (including data not shown on the plot). Because inter-individual variability seems to be important, mean values need to be interpreted with caution.

The influence of animal body weight on these results was strong, as treatment regimen was not expressed on a body weight basis on one hand, and as the body weight of the dogs varied during the DE-Study on the other hand. To overcome this influence, we plotted individual MTX plasma concentration vs. adjusted dosage (i.e., fixed dose divided by body weight) at time 5 hr (Figure 4). A mixed linear regression model demonstrated nonlinearity in the dose-concentration relationship. In a graphic way, as seen thanks to the loess algorithm fitting curve, between 7.5 mg/dog per week (0.5–0.9 mg/kg) and 12.5 mg/dog per week (0.9–1.4 mg/kg), the mean MTX concentration measured vs. adjusted dosage employed plateaued. This could suggest a saturation phenomenon as demonstrated in human medicine, even if we do not have enough points to conclude whether absorption, elimination or both are modified in dogs.

3.3 | B-Study

Individual pharmacokinetic parameters are summarized in Table 1. Because of a cutaneous forelimb injury, dog 1 received antibiotics (amoxicillin and clavulanic acid at 20 mg/kg twice a day) and NSAID (meloxicam at 0.2 mg/kg, once). Amoxicillin is known to decrease the renal clearance of MTX, probably by competition with the common tubular secretion system (Ronchera et al., 1993). NSAIDs interfere with urinary excretion of MTX, secondary to NSAID-induced renal capillary constriction (Uwai, Suzuki, & Iwamoto, 2011). As a consequence, dog 1 oral route data were excluded from analysis.

The absolute bioavailability of MTX in dog was 93% by subcutaneous injection, and 30% by the oral route. To evaluate inter-individual variability, dog 6 was excluded, as he was significantly lighter than the other dogs. The Mean Absolute Deviation (MAD) of the AUC was

quite low with regards to the mean for IV (MAD/mean = 9.7%) and for SC MTX (MAD/mean = 9.7%). On the contrary, considering the oral route, a quite large inter-individual variability was observed, despite the elimination of dog 1 and dog 6, with a MAD/mean equal to 33%. The relative bioavailability between OR and SC routes varied from 16% (dog 6) to 48% (dog 3), with a mean at 30%.

The influence of adjusted dosage (fixed dose divided by body weight), of dogs (inter-individual variability), of carryover effects (sequence and period effect), of route of administration (IV, SC, or Oral) or of interactions between these factors was reviewed through two-way analysis of variance (ANOVA). A carryover effect was demonstrated (a true period effect) with no consequences on the conclusions (see Discussion).

The mean absorption time (MAT) after SC administration was 33 min. After oral administration, the $MAT_{(Ka1)}$, around 5.3 hr, highlighted an apparent quite slow process of oral MTX absorption regarding the overall process of MTX disappearance from its absorption site. The plasmatic clearance of MTX was equal to $2.35 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. After 24 hr, the plasma level of MTX was systematically below 7 ng/ml, that is, at a negligible level, whatever the route of administration. Using the physiological model defined by Oie and Tozer (1979) for man, with a percentage of MTX bound to plasma proteins fixed to 35% as in man (Herman, Veng-Pedersen, Hoffman, Koehnke, & Furst, 1989) and a V_{SS} equal to 0.47 L/kg, only 10% of MTX is in plasma, 31% in extracellular fluid and 59% in intracellular fluid, which highlights the extent of distribution of this drug.

As a conclusion of our bioavailability study, SC route of low-dose MTX displays a much greater bioavailability in dogs (close to 100%), and a much smaller inter-individual variability than the oral route.

4 | DISCUSSION

Animals used as study subjects are not supposed to be representative of the whole canine population. In agreement with GLP, a highly

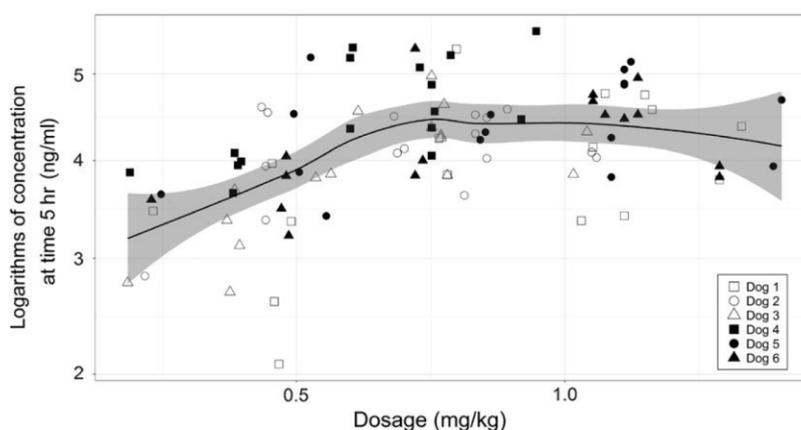


FIGURE 4 Individual methotrexate plasma concentration vs. adjusted dosage (i.e., fixed dose divided by body weight for each dog), at 5 hr obtained during the 15 week-DE-Study. A loess algorithm fitting curve is employed

homogenous population is often required. All dogs were of the same breed (beagle), the same sex (male) and the same age (2 years old) for our B-Study, but had different ages in the DE-Study. Aiming to reflect current clinical veterinary (and human) practices where the doses used are both rounded up to the available solid oral form (here 2.5 mg tablets) and given nonaccordingly to the body weight dosage, the treatment regimen chosen in our studies was not expressed on a body weight basis. The influence of food intake on pharmacokinetic parameters is not clear in humans. Hamilton and Kremer (1995) observed no significant effect of food on MTX absorption or bioavailability. In fed patients, a substantially slower absorption and a reduced bioavailability were observed in comparison with fasted patients, with a substantial interpatient variability, according to Godfrey, Sweeney, Miller, Hamilton, and Kremer (1998). Because there are no data available for dogs, our B-Study was conducted with fasted dogs.

Lebbe et al. (1994) demonstrated a close correlation between plasma concentrations 4–8 hr after oral MTX intake and AUC in human medicine. Some unpublished preliminary data showed the same correlation after oral MTX intake in dogs. The close correlation between plasma concentration measured between 4 hr ($r = 0.74$, $p = 0.045$) and 8 hr ($r = 0.90$, $p = 0.005$) in dogs and AUC calculated during our B-Study confirmed that AUC could be estimated by a single plasma sample analysis 4–8 hr after MTX administration. We could, therefore, consider that data obtained 5 hr after treatment in the DE-Study provided a good estimate of AUC.

As intra-individual variability in human is limited (Grim, Chládek, & Martínková, 2003; Lebbe et al., 1994), sampling in the B-Study was limited to one 24 hr series of measures per dog and per route of administration, in order to minimize the number of animals used and the number of manipulations per dog (Burden, Chapman, Sewell, & Robinson, 2015). There was a large difference in the average weight between dogs used, especially with one dog significantly lighter than the others (dog 6). All statistical or kinetic analyses were performed including or excluding this dog, without significant differences (for instance, difference in mean clearance calculated with or without dog 6 is only $0.03 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ [i.e., 1.28% of total clearance]). At last, except for the evaluation of inter-individual variability, results from dog 6 were never excluded from analysis.

The B-Study protocol followed a crossover design to limit the number of dogs employed (Burden et al., 2015). Inter-individual variability is known to be huge in humans (Dalrymple et al., 2008; Grim et al., 2003; Mathers & Russell, 1993) and in dogs (as seen in our DE-Study). To ensure a long enough washout period, as the half-life in dogs was not known before our B-study, a 1-week between-administration period was decided. Indeed, in human, the serum MTX level was considered insignificant after 24 hr and half-life was approximately 3–10 hr following low dose treatment (data from several marketing-authorization summaries of product characteristics). Similar results were obtained on dogs in our studies: the mean plasma concentration measured at 24 hr was under the LOQ in our DE-Study (as in our B-Study) and the half-life calculated from our B-Study was around 2–3 hr. A significant period effect

($F = 9.43$, $p = 0.01$) but no significant sequence effect ($F = 2.70$, $p = 0.13 > 0.05$) was highlighted through a two-way analysis of variance (ANOVA), although. This carryover effect remains unexplained to date. According to EMA guidelines (EMA, 2010), if a potential carryover effect can be demonstrated, the statistical analysis should be performed with the data from subjects for whom the predose concentration is less than 5 percent of the subject's C_{max} value in that period. The maximum percentage for predose concentration compared to the C_{max} for each dog during that period was 0.2%. Therefore, following this guideline, our data were analyzed as if no carryover effect had been detected.

Our two studies showed only minor adverse effects in dogs. This was confirmed by an open-label trial conducted at VetAgro Sup on dogs suffering from atopic dermatitis (Guinet, 2011) where only vomiting or nausea were observed the following day after oral administration of MTX, as well as skin infections (bacterial pyoderma or *Malassezia* infections, usually noted with atopic dermatitis). No gastro-intestinal side effects were observed after using SC low-dose MTX in our clinic for several years.

In humans, 65%–80% of the low-dose MTX is excreted by the kidneys, and 20%–35% in the bile. In renal elimination, glomerular filtration plays the major role, while tubular secretion and reabsorption are less important (Swierkot & Szechiński, 2006). In our study, the plasmatic clearance of MTX was $2.35 \pm 0.37 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. With a 2.5 mg/kg intravenous administration on 3 beagle dogs weighing around 12 kg, Lu, Jun, Dzimianski, Qiu, and McCall (1995) measured a plasmatic clearance of $2.59 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, which is very similar to our own results. Assuming that MTX is only cleared by the liver and kidneys (Lui, Lee, & Chiou, 1985; Nuernberg, Koehnke, Solsky, Hoffman, & Furst, 1990), with a maximal possible clearance equal to $50 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ for a dog (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004), the MTX clearance represents about 5% of the maximal capacities of the two major clearing organs, which is rather low for a drug.

Our B-Study revealed a quite low bioavailability of only 30% of low-dose MTX by the oral route in dogs. At the doses typically used for the treatment of rheumatoid arthritis in humans, the bioavailability generally approaches 70% (Tian & Cronstein, 2007), which is much greater than results obtained in dogs. In humans, Godfrey et al. (1998) observed a dose-dependent k_a (oral 1st order absorption rate constant) by the oral route, declining with increasing dose, suggesting the presence of a saturable absorption process. When comparing bioavailability of commonly prescribed doses of oral and SC MTX in humans, Schiff, Jaffe, and Freundlich (2014) demonstrated that there was no interest in increasing the oral MTX dose above 15 mg/week (i.e., around 0.25 mg/kg), whereas subcutaneous MTX exhibited a linear, dose-proportional increase in exposure with no plateau. The dosage chosen in our bioavailability study (i.e., 7.5 mg/week, around 0.51 mg/kg for dogs 1–5, 0.88 mg/kg for dog 6) is quite important in comparison with the doses used in human medicine and could explain this low bioavailability (saturation process occurring?). This saturable absorption process has been suspected in our DE-Study too (see Results), from a 7.5 mg/week dosage (i.e., around 0.68 mg/kg). Dog 6 which received an almost double dose of MTX in the B-study

(considering its low weight compared to other dogs) presented a far higher AUC by IV or SC route but a quite similar AUC by the oral route in comparison with other dogs, suggesting even then a saturable absorption process.

A huge inter-individual variability was observed in AUC or Cmax raw data by the oral route in the B-Study (Table 1). Our DE-Study shows highly variable AUC between dogs by the oral route too. Huge variations in bioavailability of oral MTX between individuals have been reported in human medicine too: Hendel, Hendel, Johnsen, and Gudmand-Høyer (1982) showed a bioavailability of oral MTX between 32% and 98% at 0.3 mg/kg. In a similar manner, a high coefficient of variation (76.6%) of the k_a (oral 1st order absorption rate constant) measured during a 36-months length study of 62 adults with rheumatoid arthritis was found (Godfrey et al., 1998). This inter-individual variability in human MTX pharmacokinetics may be partially explained by genetic variations in membrane transporter proteins with an affinity for MTX, especially in the gastrointestinal tract. MTX is absorbed through active transport mediated by the reduced folate carrier, and possibly also by a proton-coupled folate transporter at the apical membrane of enterocytes. Furthermore, the bioavailability of MTX after oral dosing may be affected by ABC transporters, which can reject MTX out of the enterocytes and back into the intestinal tract or into the blood (Mikkelsen et al., 2011). Mutations on genes coding for ABC transporters in dogs are common, especially for certain breeds, which might imply higher variability between dogs than the level observed in our studies. For each dosage regimen tested in the DE-Study, the mean absolute deviation (MAD) observed between dogs in comparison with MAD observed for each dog over time (reflecting intra-individual variability as well as study duration), are of the same order of magnitude. In human medicine, although a considerable inter-individual variability is reported, only low intra-individual variability in MTX pharmacokinetics (AUC) is described by Grim et al. (2003). The intra-individual differences of AUCs observed between two visits, at either 1 week or 6 months interval, reflect a 3%–30% change in nine of 10 patients, which is only a modest variability, especially compared to the inter-individual variability (five-fold range; Lebbe et al., 1994).

As in human medicine (Nast et al., 2015; Smolen et al., 2017), given the substantial variability in the rate and extent of absorption, clinicians cannot assume uniformity of oral MTX administration and may want to consider switching dogs to the parenteral route of administration when they have not responded ideally to a higher weekly oral dose or when the dose needed exceeds 0.68 mg/kg. Beyond the comparison of the routes of administration, the parenteral route of administration seems superior but could be technically difficult for several owners. There is a need for an adequate pharmacokinetic biomarker to help defining an optimal treatment regimen for cAD, especially when using the oral route, which suffers a great inter-individual variability. In humans, the plasma level of MTX may not be an adequate biomarker to assess the pharmacology (i.e., pharmacokinetics and pharmacodynamics) of low-dose MTX, especially for dosage adjustments (Wiela-Hojenska et al.,

2004; Lafforgue, et al., 1995). Moreover, there is a poor correlation between steady-state concentration of intracellular-MTX (which would allow efficacy) and low-dose employed (Hornung, et al., 2008; Korell et al., 2013). Only Hroch et al. (2008) described a strong correlation between AUC at week 1 and erythrocytes MTX-polyglutamates concentration at the steady-state. New biomarkers need to be investigated in a future study conducted in the treatment of cAD.

ACKNOWLEDGMENTS

Institute Claude Bourgelat for providing and hosting the dogs used in this study, the Laboratory of pharmacology and toxicology, university hospital, F-42055 Saint-Etienne—under the supervision of Dr T. BASSET, for its efficiency in analyzing the samples of our bioavailability study, Dr P. BELLI and Dr S. BELLUCO for their expertise in gross and microscopic necropsy evaluations, the biomedical laboratories of VetAgro Sup, under the supervision of Dr C. FOURNEL (hematology), or Dr F. GARNIER (biochemistry), for their efficiency in analyzing our samples, Dr E. VIDEMONT for her help in the tolerance study, Dr PL TOUTAIN for his valuable advices in analyzing the data.

CONFLICT OF INTEREST

None.

AUTHOR CONTRIBUTION

All the authors (AR, MM, MJ, CL, PB, IF, DP, CP) have read and approved the final manuscript.

ORCID

Antoine Rostang  <http://orcid.org/0000-0002-6930-6652>

REFERENCES

- Atkins, D., Best, D., Briss, P. A., Eccles, M., Falck-Ytter, Y., & Flottorp, S., ... GRADE Working Group (2004). Grading quality of evidence and strength of recommendations. *British Medical Journal (Clinical Research ed.)*, 328(7454), 1490. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7454.1490>
- Bangert, C. A., & Costner, M. I. (2007). Methotrexate in dermatology. *Dermatologic Therapy*, 20(4), 216–228. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00135.x>
- Burden, N., Chapman, K., Sewell, F., & Robinson, V. (2015). Pioneering better science through the 3Rs: An introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 54(2), 198–208.
- Cleveland, W. S. (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association*, 74(368), 829–836. <https://doi.org/10.1080/01621459.1979.10481038>
- Dalrymple, J. M., Stamp, L. K., O'Donnell, J. L., Chapman, P. T., Zhang, M., & Barclay, M. L. (2008). Pharmacokinetics of oral methotrexate in

- patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(11), 3299–3308. <https://doi.org/10.1002/art.24034>
- El-Khalawany, M. A., Hassan, H., Shaaban, D., Ghonaim, N., & Eassa, B. (2013). Methotrexate versus cyclosporine in the treatment of severe atopic dermatitis in children: A multicenter experience from Egypt. *European Journal of Pediatrics*, 172(3), 351–356. <https://doi.org/10.1007/s00431-012-1893-3>
- EMA (2010). Guideline on the investigation of bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/Corr 5.
- Godfrey, C., Sweeney, K., Miller, K., Hamilton, R., & Kremer, J. (1998). The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46(4), 369–376. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.t011-1-00790.x>
- Goujon, C., Bérard, F., Dahel, K., Guillot, I., Hennino, A., Nosbaum, A., ... Nicolas, J.-F. (2006). Methotrexate for the treatment of adult atopic dermatitis. *European Journal of Dermatology: EJD*, 16(2), 155–158.
- Grim, J., Chládek, J., & Martinková, J. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(2), 139–151. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342020-00003>
- Gubner, R., August, S., & Ginsberg, V. (1951). Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 221(2), 176–182. <https://doi.org/10.1097/00000441-195102000-00009>
- Guinet, C. (2011). *Utilisation du méthotrexate dans le traitement de la dermatite atopique du chien. Essai ouvert*. Thèse d'exercice vétérinaire, VetAgro Sup, Lyon.
- Guo, P., Wang, X., Liu, L., Belinsky, M. G., Kruh, G. D., & Gallo, J. M. (2007). Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(5), 1789–1795. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.034>
- Hamilton, R. A., & Kremer, J. M. (1995). The effects of food on methotrexate absorption. *The Journal of Rheumatology*, 22(4), 630–632.
- Hendel, L., Hendel, J., Johns, A., & Gudmand-Høyer, E. (1982). Intestinal function and methotrexate absorption in psoriatic patients. *Clinical and Experimental Dermatology*, 7(5), 491–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1982.tb02465.x>
- Herman, R. A., Veng-Pedersen, P., Hoffman, J., Koehnke, R., & Furst, D. E. (1989). Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(2), 165–171. <https://doi.org/10.1002/jps.2600780219>
- Hornung, N., Ellingsen, T., Attermann, J., Stengaard-Pedersen, K., & Poulsen, J. H. (2008). Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): Concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy. *Journal of Rheumatology*, 35(9), 1709–1715.
- Hroch, M., Chládek, J., Simkova, M., Vaneckova, J., Grim, J., & Martinkova, J. (2008). A pilot study of pharmacokinetically guided dosing of oral methotrexate in the initial phase of psoriasis treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 22(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02264.x>
- Korell, J., Stamp, L. K., Barclay, M. L., Dalrymple, J. M., Drake, J., Zhang, M., & Duffull, S. B. (2013). A population pharmacokinetic model for low-dose methotrexate and its polyglutamated metabolites in red blood cells. *Clinical Pharmacokinetics*, 52(6), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0052-y>
- Lafforgue, P., Monjanel-Mouterde, S., Durand, A., Catalin, J., & Acquaviva, P. C. (1995). Lack of correlation between pharmacokinetics of low dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 22(5), 844–849.
- Lebbe, C., Beyeler, C., Gerber, N. J., & Reichen, J. (1994). Intraindividual variability of the bioavailability of low dose methotrexate after oral administration in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(7), 475–477. <https://doi.org/10.1136/ard.53.7.475>
- Lu, G. W., Jun, H. W., Dzimianski, M. T., Qiu, H. C., & McCall, J. W. (1995). Pharmacokinetic studies of methotrexate in plasma and synovial fluid following i.v. bolus and topical routes of administration in dogs. *Pharmaceutical Research*, 12(10), 1474–1477. <https://doi.org/10.1023/A:1016231303689>
- Lui, C. Y., Lee, M. G., & Chiou, W. L. (1985). Clearance studies of methotrexate in dogs after multiple-rate infusion. *Cancer Research*, 45(4), 1545–1548.
- Lyakhovitsky, A., Barzilai, A., Heyman, R., Baum, S., Amichai, B., Solomon, M., ... Trau, H. (2010). Low-dose methotrexate treatment for moderate-to-severe atopic dermatitis in adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 24(1), 43–49. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03351.x>
- Majewska, A., Gajewska, M., Dembele, K., Maciejewski, H., Prostek, A., & Jank, M. (2016). Lymphocytic, cytokine and transcriptional profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0805-6>
- Marsella, R., & Girolomoni, G. (2009). Canine models of atopic dermatitis: A useful tool with untapped potential. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), 2351–2357. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.98>
- Mathers, D., & Russell, A. S. (1993). Methotrexate. In *Second-line agents in the treatment of rheumatic diseases* (vol. 36, pp. 431–432). New York, NY: Jonathan S. Dixon and Daniel E. Furst. Consulted at the address <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.1780360325/abstract>
- Menting, S. P., Dekker, P. M., Limpens, J., Hooft, L., & Spuls, P. I. (2016). Methotrexate dosing regimen for plaque-type psoriasis: A systematic review of the use of test-dose, start-dose, dosing scheme, dose adjustments, maximum dose and folic acid supplementation. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(1), 23–28. <https://doi.org/10.2340/00015555-2081>
- Mikkelsen, T. S., Thorn, C. F., Yang, J. J., Ulrich, C. M., French, D., Zaza, G., ... Altman, R. B. (2011). PharmGKB summary: Methotrexate pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(10), 679–686. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328343dd93>
- Nast, A., Gisondi, P., Ormerod, A. D., Saiag, P., Smith, C., Spuls, P. I., ... Yawalkar, N. (2015). European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris—Update 2015—Short version—EDF in cooperation with EADV and IPC. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(12), 2277–2294. <https://doi.org/10.1111/jdv.13354>
- Nuernberg, B., Koehnke, R., Solsky, M., Hoffman, J., & Furst, D. E. (1990). Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis and Rheumatism*, 33(6), 898–902. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1529-0131](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1529-0131)
- Oie, S., & Tozer, T. N. (1979). Effect of altered plasma protein binding on apparent volume of distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(9), 1203–1205. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680948>
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., & Nuttall, T., ... International Committee on Allergic Diseases of Animals (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11, 210. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0514-6>
- Pin, D., Fourel, I., Lussiez, C., Guinet, C., Berny, P., & Videmont, E. (2012). Pharmacokinetic and toxicity of methotrexate in the dog and its efficacy in canine atopic dermatitis: Fc-52. *Veterinary Dermatology*, 23(Suppl. 1), 45–46.
- Ronchera, C. L., Hernández, T., Peris, J. E., Torres, F., Granero, L., Jiménez, N. V., & Plá, J. M. (1993). Pharmacokinetic interaction between high-dose methotrexate and

- amoxicillin. *Therapeutic Drug Monitoring*, 15(5), 375–379. <https://doi.org/10.1097/00007691-199310000-00004>
- Schiff, M. H., Jaffe, J. S., & Freundlich, B. (2014). Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: Drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses ≥ 15 mg may be overcome with subcutaneous administration. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(8), 1549–1551. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205228>
- Smith, J. M., Cosulich, D. B., Hultquist, M. E., & Seeger, D. R. (1948). The chemistry of certain pteroylglutamic acid antagonists. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 10(3 Series II), 82–83. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1948.tb00920.x>
- Smolen, J. S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., ... van der Heijde, D. (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(6), 960–977. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210715>
- Swierkot, J., & Szechiński, J. (2006). Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reports: PR*, 58(4), 473–492.
- Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), 168–173.
- Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>
- Uwai, Y., Suzuki, R., & Iwamoto, K. (2011). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on pharmacokinetics of methotrexate: A meta-analysis. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 131(5), 853–861. <https://doi.org/10.1248/yakushi.131.853>
- Weatherhead, S. C., Wahie, S., Reynolds, N. J., & Meggitt, S. J. (2007). An open-label, dose-ranging study of methotrexate for moderate-to-severe adult atopic eczema. *The British Journal of Dermatology*, 156(2), 346–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07686.x>
- Weinstein, G. D., & Frost, P. (1971). Methotrexate for psoriasis. A new therapeutic schedule. *Archives of Dermatology*, 103(1), 33–38. <https://doi.org/10.1001/archderm.1971.04000130035004>
- Wiela-Hojenska, A., Orzechowska-Juzwenko, K., Swierkot, J., Wiland, P., Hurkacz, M., & Szechinski, J. (2004). Monitoring methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42(8), 434–441. <https://doi.org/10.5414/CP42434>

How to cite this article: Rostang A, Mosca M, Jeannin M, et al. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in healthy beagle dogs. *J vet Pharmacol Therap*. 2018;00:1–11. <https://doi.org/10.1111/jvp.12673>

3.4 Résultats - Discussion

Tolérance du MTX chez le chien

L'un des principaux objectifs de cet essai consistait en une évaluation de la tolérance du MTX chez le chien. On peut globalement conclure que ce médicament est **bien toléré** dans cette espèce.

Aucun effet secondaire grave n'a été observé durant les 20 semaines de traitement, malgré des doses fortes en fin d'essai (entre 1 et 1,2 mg/kg). Aucun signe de fibrose pulmonaire n'a été observé sur les radiographies effectuées en fin d'étude, ni à l'autopsie, ni lors des examens histopathologiques *post-mortem* qui ont suivi. De même, ni l'autopsie ni l'histopathologie n'ont révélé d'atteinte hépatique ou rénale. Sur le plan sanguin, aucun cas de pancytopenie n'a été observé.

Plusieurs effets secondaires cliniques mineurs, fréquemment rapportés chez l'homme, ont été observés chez le chien, sans jamais justifier un arrêt du traitement : des **troubles digestifs mineurs** (baisse d'appétit, anorexie, vomissements, diarrhée) et des **troubles cutanés mineurs** (érythème, squamosis). Au niveau biologique, des **élévations intermittentes des valeurs hépatiques**, principalement les ALAT, avec normalisation spontanée sans arrêt de traitement, ont été observées, comme chez l'homme. Au niveau hématologique, aucune modification significative n'a été enregistrée.

La baisse de poids observée sur la moitié des animaux dans l'étude de tolérance (DE-Study) peut être liée à **la baisse d'appétit consécutive au traitement à base de MTX**. Toutefois, elle se concentre principalement sur les dernières semaines de traitement (aux doses les plus fortes) et ne concerne que 3 des 6 chiens. Parmi ces 3 animaux, le plus âgé du groupe (8 ans), a une évolution qui pousse à s'interroger quant à l'influence du MTX : en effet, en semaine N°7, ce chien a présenté un épisode de diarrhée avec hyperthermie, abattement et induration des nœuds lymphatiques mandibulaires. Suite à la mise en place d'un traitement antibiotique de 3 semaines, une amélioration clinique rapide a été observée. Toutefois, dès la semaine 10, une rechute a été constatée, avec abattement, anorexie et hyperthermie, nécessitant la reprise de l'antibiothérapie. Celle-ci a été stoppée en semaine 17, mais l'état général de l'animal s'est à nouveau dégradé à partir de la semaine 18 jusqu'à son euthanasie en fin d'étude. Le probable foyer infectieux impliqué n'a pas été

trouvé, ni à l'aide des examens complémentaires réalisés (examens cliniques, analyses biologiques et échographies), ni à l'autopsie (sans ouverture de la boîte crânienne ni fente des mâchoires). Seule une maladie parodontale sévère, une leucopénie intermittente légère et des valeurs augmentées des ALAT depuis la semaine 6 (qui se normalisent en semaine 8 – 10 et 13) ont été rapportées chez ce chien. L'influence du MTX sur cette symptomatologie est délicate à déterminer mais ne peut être formellement écartée.

Pharmacocinétique

Les principaux résultats sont :

- Les concentrations plasmatiques en MTX, à 24h, peuvent être considérées comme **négligeables** (proches voire inférieures à la LOQ), comme ce qui est observé chez l'homme. Pour autant, un effet carry-over (période) a été mesuré dans l'étude B-Study, malgré un wash-out d'une semaine. Cet effet est peut-être lié au recyclage entéro-hépatique, voire au relargage depuis les formes intracellulaires, comme décrit par le modèle tri-compartimental chez l'homme après 24 h.
- Bien que simplement suggéré par l'analyse graphique, les données enregistrées lors de la DE-Study ne permettant pas une analyse statistique rigoureuse, il apparaît probable que, chez le chien comme chez l'homme, on assiste à **une saturation des capacités d'absorption du MTX par voie orale**, au-delà d'une certaine quantité administrée. La valeur suggérée ici serait de l'ordre de 0,75 mg/kg (chez l'homme, elle oscille plutôt entre 0,2 et 0,3 mg/kg).
- La biodisponibilité absolue, par voie orale, à la dose de 7,5 mg, est faible, **autour de 30%**, alors qu'elle est **presque totale par voie sous-cutanée**. Le protocole de la B-Study a été construit avec une administration de médicament indépendante du poids des animaux, comme utilisé en pratique chez l'homme. La dose de 7,5 mg correspond à une dose de 0,46 à 0,88 mg/kg selon l'animal considéré. La faible biodisponibilité enregistrée suggère que le seuil de saturation de l'absorption par voie orale est probablement inférieur à celui proposé au point précédent.
- Comme chez l'homme, il existe **une forte variabilité interindividuelle de l'absorption orale du MTX** (déviation absolue moyenne / moyenne = 33,36 %), alors que cette variabilité est **faible par voie injectable** : il est donc beaucoup plus difficile de

déterminer un schéma posologique utilisable par voie orale. Cette forte variabilité couplée à la faible biodisponibilité enregistrée par cette voie fait privilégier la forme injectable, surtout dans le cadre de la mise en place d'un essai comparatif.

- La **clairance chez le chien est de 2,35 mL/min/kg**, c'est-à-dire un peu supérieure à la clairance enregistrée chez l'homme (autour de 2 mL/min/kg). Ceci suggère qu'une dose similaire, voire légèrement supérieure, à celle employée chez l'homme devrait être efficace chez le chien, sous réserve que l'efficacité soit similaire entre les deux espèces.

Conclusion

Les essais précliniques sont **favorables à l'utilisation du MTX chez le chien**, et à la mise en place d'un essai clinique comparatif de phase III, afin d'évaluer son efficacité dans le traitement de la dermatite atopique canine, par comparaison au traitement de référence qu'est la ciclosporine. Le MTX semble bien toléré mais nécessite tout de même **un suivi clinique, hématologique et biochimique (enzymes hépatiques) rigoureux** pour s'assurer de sa bonne tolérance. Des troubles mineurs fréquents, de type digestifs ou cutanés, sont attendus. Pour la voie d'administration, la **forme injectable** devrait permettre de limiter la variabilité de l'absorption et donc d'améliorer notre lecture des résultats cliniques obtenus. Quant à la dose à employer, on peut *a priori* s'appuyer sur les doses utilisées dans l'espèce humaine. Les essais épars, réalisés avec la clientèle de VetAgro Sup, semblent confirmer la pertinence du **schéma hebdomadaire** chez le chien, même si, à ce stade, nous n'avons pas d'information sur le métabolisme intracellulaire du MTX dans cette espèce, et sur sa persistance au-delà des 24h post-administration.

RESULTATS

Perspectives cliniques – Mise en place d'un essai clinique de phase III pour le traitement de la dermatite atopique canine.

4.1 Contexte de l'étude

Diverses molécules sont utilisées par voie systémique en médecine humaine pour le traitement des cas sévères de dermatite atopique (cf. [Tableau 1](#)). Une étude, conduite en Amérique du Nord, révèle que près de 30% des dermatologues interrogés utilisent le MTX **en première intention** pour le traitement de la dermatite atopique sévère de l'enfant, et autant en seconde intention (Totri *et al.*, 2017). Ceci traduit une **généralisation de son usage pour cette indication chez l'homme**, malgré le petit nombre d'essais comparatifs, notamment versus le traitement de référence pour les cas sévères, la ciclosporine.

Dans un premier essai comparatif, ciclosporine *versus* méthotrexate, pour le traitement de la dermatite atopique sévère chez l'enfant, El-Khalawany *et al.* (2013) ont conclu que les deux molécules pouvaient être considérées comme **aussi efficaces et de tolérance similaire**, malgré un protocole d'étude qui n'était pas exempt de défauts, *a minima* dans sa retranscription (Tsakok *et al.*, 2014). Dans un essai plus récent, de phase III, en traitement de la dermatite atopique modérée à sévère de l'adulte, Goujon *et al.* (2018) concluent pour leur part à **une meilleure tolérance du MTX par rapport à la ciclosporine, une efficacité similaire à 16 semaines** mais une action beaucoup **plus lente**, avec des résultats médiocres à 8 semaines, le premier point de contrôle, pour les patients traités avec du MTX par rapport à la ciclosporine. La posologie efficace serait de 25 mg/semaine. Chez l'homme, le MTX représente, aujourd'hui, une molécule de remplacement de la ciclosporine dans le traitement de la dermatite atopique.

Qu'en est-il chez le chien ? L'essai ouvert, conduit en 2012, sur 10 chiens de la clientèle de VetAgro Sup, a permis d'enregistrer des **résultats encourageants**, avec une bonne tolérance, une amélioration de la médiane du score lésionnel de 67 % ainsi qu'une amélioration de 57% de la médiane du score de prurit, après 5 mois de traitement (Pin *et al.*, 2012). Toutefois, la faible taille de l'effectif, l'absence de tout traitement comparatif et de lot témoin, l'absence d'aveugle et l'utilisation concomitante, dans certains cas, de glucocorticoïdes, n'ont pas permis pas de conclusion définitive.

Nom de la molécule	Mode d'action	Schéma posologique	Suivi biologique recommandé	Effets secondaires	Contre-indications	Délai de réponse clinique	Usage validé par la FDA
Glucocorticoïdes	Modulation de l'expression génique	Prednisone: 0.75-1mg/kg/jour Méthyprednisolone : max 0.5mg/kg/j	<i>Init</i> : poids, taille, pression artérielle, stade pubertaire, état corporel, NFS, glycémie, bilan lipidique	Suppression de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, perturbation de la croissance, syndrome de Cushing, ostéoporose, prise de poids	Hypersensibilité, ulcère gastro-duodénal, psychonévroses, ostéoporose	rapide	Oui
Ciclosporine	Inhibition de récepteurs cytosoliques de la famille des immunophilines	3-5 mg/kg/j BID à l'induction, puis réduction progressive en fonction de la réponse clinique, dose d'entretien de 1,5 à 3 mg/kg/j pendant 6 à 12 mois.	<i>Init</i> : NFS, bilan métabolique complet, bilan lipidique, acide urique, pression artérielle. <i>Suivi</i> : dosage de la créatinine tous les 15 jours les 3 premiers mois puis 1 fois par mois, pression artérielle mensuelle une fois par mois	Atteinte rénale ou hépatique, hypertension, céphalées, hypertrichose, paresthésie, hyperplasie gingivale, troubles gastro-intestinaux, leucopénie, malaise	Autres immuno-modulateurs, immunodéficience, insuffisance rénale ou hépatique, tumeurs, antécédents de cancer, épilepsie	2 à 3 semaines	Non
Azathioprine	Bloque la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques	Dose de charge: 50mg/jour (0,5-3mg/kg/jour) Dose d'entretien: 2- 3 mg/kg/j	<i>Init</i> : NFS, bilan métabolique complet, thiopurine S-méthyltransférase <i>Suivi</i> : renouveler tous les 7 à 15 j jusqu'à stabilisation, puis tous les 2-3 mois.	Myalgies, troubles gastro-intestinaux, éruptions cutanées, érythème, urticaire, sur-infections virales cutanée, lymphopénie, aplasie médullaire, neutropénie, toxicité hépatique	Tumeurs malignes, taux de thiopurine S-méthyltransférase < 5 UI/mL, allergie à l'azathioprine ou à la 6-mercaptopurine	4 à 6 semaines, maximum 8 à 12 semaines	Non
Acide mycophénolique	Inhibition de l'inosine monophosphate déshydrogénase	40-50 mg/kg/jour	<i>Init</i> : NFS, bilan métabolique complet. <i>Suivi</i> : NFS tous les 15 jours les 2 premiers mois puis tous les 1-2 mois après stabilisation de la dose. Bilan métabolique complet 1 mois après stabilisation de la dose puis tous les 2 à 3 mois.	Douleurs abdominales, nausées, vomissements	Grossesse, allaitement, allergie à la molécule	4 à 8 semaines	Non
Méthotrexate	Inhibition de la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques	Variable, de 5 à 10 mg/semaine	<i>Init</i> : NFS, bilan métabolique complet, radiographie pulmonaire. <i>Suivi</i> : NFS et bilan métabolique complet 15 jours après le début du traitement puis tous les deux ou trois mois	Nausées, atteinte hépatique, myélosuppression	Grossesse, insuffisance hépatique, cytopénie	4 à 8 semaines, maximum 8 à 12 semaines	Non
Dupilumab	Inhibition de l'IL-4 et de l'IL-13	Dose de charge: 600mg SC Dose d'entretien: 300mg tous les 15 j	Pas de recommandation particulière	Réaction locale au site d'injection, assèchement et/ou prurit oculaire, céphalées, réurgence herpétique, rhinopharyngite, kératite, conjonctivite	Hypersensibilité	2 semaines, optimum après 16 semaines	oui, chez l'adulte
Aprémilast	Inhibiteur de la phosphodiesterase 4	Chez l'adulte: 30 mg/j, pas de dose définie chez l'enfant	Prise de poids, dépression	céphalées, troubles gastro-intestinaux	Hypersensibilité	non établi	non

Tableau 1. Traitements systémiques utilisés pour la gestion de la dermatite atopique de l'homme

Init, analyses à conduire avant initiation du traitement, FDA, US Food and Drug Administration ; NFS, numération de la formule sanguine ; SC, sous-cutané ; traduction d'un tableau de Glines et al. (2019)

4.2 Objectif

L'objectif de cette étude est de déterminer l'efficacité d'un traitement à base de MTX pour la gestion de la dermatite atopique modérée à sévère du chien. Pour atteindre cet objectif, un essai clinique de non infériorité, versus le traitement de référence (ciclosporine), a été mis en place. Cet essai est **multicentrique** (pour augmenter les capacités de recrutement des animaux), **randomisé**, en **double aveugle**.

4.3 Matériel et méthode

4.3.1 Choix des critères d'inclusion

Etablir un **diagnostic de certitude** de la dermatite atopique est une étape indispensable à la qualité des résultats de l'essai clinique. Le diagnostic de dermatite atopique est un diagnostic délicat qui requiert une expertise de la part du dermatologue vétérinaire. De ce fait, tous les investigateurs recrutés dans le cadre de l'étude sont, soit des vétérinaires spécialisés en dermatologie (spécialisation validée par le diplôme européen de dermatologie vétérinaire (ECVD)), soit des vétérinaires sous la supervision directe d'un spécialiste diplômé (résidents du collège européen de dermatologie).

De plus, lors de l'inclusion, différentes vérifications sont demandées au dermatologue :

- **Au moins 5 critères**, d'une des deux listes de critères de Favrot doivent être présents (Favrot *et al.*, 2010) ;
- **Au moins 6 zones distinctes** doivent présenter des lésions ;
- Le score CADESI-04 (Olivry *et al.*, 2014) doit être **au moins égal à 35**, caractérisant une dermatite atopique modérée à sévère, nécessitant un traitement immunomodulateur systémique. Le score CADESI-04 est un score lésionnel très utilisé pour évaluer la sévérité des lésions et évaluer leur évolution au cours du temps ;

- **L'exclusion des ectoparasites**, par recherche directe (raclage cutané) et par mise en place d'un protocole adapté de gestion du risque antiparasitaire en amont de l'inclusion ;
- L'**absence**, au moment de l'inclusion, **de complication infectieuse**, bactérienne ou fongique, confirmée par un examen cytologique (calque cutané). En cas de complication avérée, un traitement adapté est mis en place et l'inclusion reportée.

Des **critères d'exclusion** ont également été déterminés :

- Dermatose prurigineuse saisonnière ;
- Otite comme seul signe clinique ;
- Animal diabétique ;
- Animal souffrant d'une affection autre que la dermatite atopique – un examen clinique, biochimique (Urée, Créatinine, PAL, ALAT), hématologique (numération formule sanguine - NFS) et urinaire (bandelette urinaire) est réalisé à l'inclusion ;
- Ciclosporine ou MTX pouvant avoir des interactions médicamenteuses avec de nombreux médicaments, une liste exhaustive de molécules, dont l'usage est proscrit ou restreint, a été établie et est disponible en [annexe 1](#) ;
- Chiennes gestantes ou allaitantes ou tout animal destiné à la reproduction dans l'année suivant la fin du protocole clinique ;
- Chiens ayant reçu de la ciclosporine dans les 3 mois précédents, du MTX dans les 6 mois précédents.

4.3.2 Choix des marqueurs de suivi

Comme recommandé récemment par l'ICADA (*International Committee of Allergic Diseases of Animals*) – leur publication étant postérieure au lancement de l'étude, plusieurs indicateurs ont été retenus pour évaluer l'évolution de la maladie au cours du temps. Ces indicateurs s'avèrent être en parfaite adéquation avec les recommandations émises par cet organisme international (Olivry *et al.*, 2018) :

- Un **score lésionnel** : le **CADESI-04** (Olivry *et al.*, 2014) évalué par le vétérinaire dermatologue ;
- Un **score de prurit**, sur une échelle visuelle analogique, évalué par le propriétaire de l'animal ;
- Un enregistrement de la **satisfaction du propriétaire** quant à l'efficacité du traitement.

Toutefois, la **variabilité** liée à l'influence de la personne qui établit le score (vétérinaire ou propriétaire) peut être importante. Selon le protocole établi, le suivi d'un même animal doit être assuré par **un même dermatologue clinicien tout au long de l'étude**, la répétabilité du score CADESI-04 par un même clinicien au cours du temps ($r=0,97$ [$p < 0,0001$]) étant supérieure à la répétabilité du score entre cliniciens différents ($r=0,82$ [$p < 0,0001$]) (Olivry *et al.*, 2014). Malheureusement, les contraintes de service imposent, parfois, un suivi partagé entre dermatologues (en général entre un spécialiste reconnu et son résident). De même, le score de prurit est rempli par le même propriétaire tout au long de l'étude, sous réserve que l'animal soit présenté en consultation par la même personne. Ainsi, afin de ne pas s'appuyer exclusivement sur des marqueurs cliniques, une recherche de **marqueurs biologiques** a également été entreprise. Nous avons choisi de nous intéresser au profil cytokinique du sang des animaux. En effet, la récolte d'échantillons sanguins peut être effectuée facilement tous les mois, en pratique routinière, et l'acceptation par le propriétaire est bonne. Ainsi, certaines cytokines circulantes ont été identifiées comme de potentiels marqueurs définissant un profil immunologique « sain » ou « souffrant de DA ». L'analyse sera effectuée par quantification des ARNm (RT-qPCR) à partir de prélèvements mensuels de sang total, immédiatement mélangés avec un conservateur spécifique et congelés avant analyse ultérieure. Les cytokines retenues sont :

- ➔ **IL-10** (Nuttall *et al.*, 2019 ; Majewska *et al.*, 2016 ; Hayashiya *et al.*, 2002 ; Niwa, 2000 ; Auriemma *et al.*, 2013 ; Brunner *et al.*, 2017),
- ➔ **IL-13** (Majewska *et al.*, 2016 ; Nuttall *et al.*, 2019 ; Wakugawa *et al.*, 2001 ; La Grutta *et al.*, 2005 ; Matsunaga *et al.*, 2016 ; Schlotter *et al.*, 2011),
- ➔ **IL-22** (Hayashida *et al.*, 2011 ; Brunner *et al.*, 2017 ; Auriemma *et al.*, 2013 ; Lou *et al.*, 2017 ; Kwon *et al.*, 2010),

- ➔ **IL-31** (Lu *et al.*, 2018 ; Brunner *et al.*, 2017 ; Klonowska *et al.*, 2018 ; Majewska *et al.*, 2016 ; Gonzales *et al.*, 2013 ; Jin *et al.*, 2015),
- ➔ **IL-33** (Nuttall *et al.*, 2019 ; Asahina *et al.*, 2018 ; Asahina *et al.*, 2017),
- ➔ **TSLP** (Nuttall *et al.*, 2019 ; Klonowska *et al.*, 2018 ; Kim *et al.*, 2015 ; Klukowska-Rötzler *et al.*, 2013),
- ➔ **INF- γ** (Hayashiya *et al.*, 2002 ; Majewska *et al.*, 2016 ; Nuttall *et al.*, 2019 ; Wakugawa *et al.*, 2001 ; Brunner *et al.*, 2017).

4.3.3 Question principale

La question principale à laquelle cette étude a vocation à répondre est la suivante (critère principal) :

« **Après un délai de 6 mois de traitement, avec un risque de 5%, mesure-t-on une borne inférieure de l'intervalle de confiance 90%, de la différence MTX-Ciclosporine des scores CADESI-04, de moins de 20 % ?** » Ce delta de 20% a été défini comme le delta maximum acceptable par les cliniciens pour utiliser le MTX à la place de la ciclosporine. L'analyse sera réalisée, à la fois, en « **intention de traiter** », c'est-à-dire en prenant en compte tous les animaux dans leur groupe de randomisation initial, y compris ceux qui sont sortis prématurément du protocole, et en « **per protocole** », c'est-à-dire en ne prenant en compte que les animaux qui ont correctement suivi l'intégralité du protocole.

Le nombre de chiens nécessaires à une bonne analyse statistique a été fixé à **60**, répartis en 2 groupes de 30 animaux, aléatoirement traités, soit avec du MTX, soit avec de la ciclosporine. Pour disposer d'une puissance statistique qui permettrait de juger de la proportion de chiens dont la maladie est contrôlée par rapport aux chiens mal répondants entre les deux traitements, il aurait fallu recruter beaucoup plus d'animaux, d'autant que la définition même de chien « contrôlé » peut être soumise à discussion. Cela a justifié notre choix de formuler notre essai de non-infériorité avec un **critère quantitatif** dont la puissance dépendra, notamment, de la reproductibilité du score CADESI-04. C'est ainsi qu'avec 25 chiens par groupe, on pourra conclure à la non-infériorité, avec un risque de 5%, une puissance de 80 % et un delta de 20% fixés a priori, si la déviation standard du critère de

jugement est de moins de 28%. Une marge de sécurité de 10 chiens a été appliquée (perdu de vue, abandon de protocole, etc...).

4.3.4 Questions secondaires

Les résultats, mois par mois, seront regardés pour deux scores : le **score lésionnel** (CADESI-04), établi par le dermatologue investigateur et le **score de prurit**, établi par le propriétaire sur une échelle visuelle analogique. Ce suivi mensuel permettra d'évaluer la **durée avant réponse au traitement par le MTX**. En effet, si l'efficacité de la ciclosporine peut être généralement évaluée cliniquement après 3 à 6 semaines de traitement, il faut plutôt 4 à 8 semaines pour l'évaluation de l'efficacité clinique du MTX chez l'homme. Ce délai plus long est probablement lié à la pharmacocinétique particulière du MTX qui nécessite d'être transformé en forme polyglutamates, au sein des cellules cibles, pour atteindre sa pleine efficacité. Cette durée avant réponse clinique est **inconnue chez le chien** et sera donc étudiée au cours de l'essai clinique. De plus, un profil cytokinique mensuel sera établi, notamment dans l'objectif de déterminer si ce profil peut être utilisé comme **biomarqueur prédictif** de l'amélioration clinique à 7 mois.

Chez l'homme, la réponse clinique au traitement à base de MTX est assez **tardive**, la posologie à employer n'est **pas clairement établie**, avec de fortes variations d'un individu à l'autre, et il existe des différences importantes quant à la **tolérance de la molécule** entre individus (Lucas *et al.*, 2019). Tout ceci pose des difficultés aux dermatologues de médecine humaine dans la détermination de leur **schéma posologique**. En médecine vétérinaire, les mêmes contraintes seront probablement observées, surtout en raison des particularités génétiques des races canines. Ainsi, chez l'homme, un travail important est encore en cours pour trouver un **biomarqueur précoce** sur lequel appuyer une détermination individualisée du schéma posologique (*therapeutic drug monitoring*). Malheureusement, il n'y a pas de corrélation entre les concentrations plasmatiques en MTX et l'amélioration clinique (Wiela-Hojenska *et al.*, 2004), ce qui exclut cet indicateur. Le modèle le plus prometteur en médecine humaine reste **l'étude des formes polyglutamatisées intracellulaires**. L'utilisation d'un marqueur sanguin semble le moyen le plus approprié pour réaliser un suivi, la multiplication des biopsies sur un même individu n'étant pas réaliste. L'action anti-

inflammatoire et immunomodulatrice étant liée aux cellules de la lignée blanche, ces populations cellulaires semblaient les plus indiquées. Toutefois, il n'y a pas de corrélation entre le dosage des MTX-PG intra-leucocytaires et la réponse clinique lors d'arthrite rhumatoïde (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999), et une corrélation médiocre concernant les polynucléaires neutrophiles (non statistiquement significatives pour les patients répondant partiellement). De plus, ces populations cellulaires sont difficiles à séparer et le taux d'échantillons non analysables est nettement plus important que lorsque l'analyse est faite avec les globules rouges (GR) (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999). Bien que non impliqué dans le mécanisme d'action du MTX, le GR reste le meilleur candidat comme biomarqueur. Comme vu dans la **partie I**, l'érythrocyte, dépourvu des enzymes FPGS et GGH, reflète le taux d'exposition de la cellule à son état nucléé dans la moelle osseuse, avant libération dans la circulation générale. Les formes cellulaires immatures étant les plus affines pour le MTX, cet indicateur semble particulièrement pertinent. La mesure des MTX-PG intra-érythrocytaires est donc une mesure de l'exposition cellulaire de la moelle osseuse au cours des derniers mois (la durée de demi-vie des érythrocytes est de 120 jours). Elle a l'avantage d'être facile à obtenir (grande quantité de globules rouges lors d'un prélèvement sanguin), avec une extraction aisée et peu onéreuse, et sert, ainsi, de marqueur de substitution des globules blancs. Le lien entre efficacité clinique et MTX-PG intra-érythrocytaire a été démontré dans le nombreuses études (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2017a ; Dervieux *et al.*, 2004 ; den Boer, 2014 ; Rahman *et al.*, 2014) malgré une étude contradictoire lors d'arthrite rhumatoïde (Stamp *et al.*, 2010). C'est donc cet indicateur qui a été retenu chez le chien dans le cadre de l'essai clinique. Une mesure mensuelle des **formes polyglutamatisées intra-érythrocytaires** est donc planifiée, de manière à déterminer l'intérêt de cet indicateur chez le chien souffrant de dermatite atopique.

Enfin, les données pharmacocinétiques, dans nos essais précliniques, ont été obtenues chez des animaux de laboratoire de race Beagle, peu représentatifs de la population canine générale. Des prélèvements sanguins, dans les 24 h suivant l'administration du MTX (2 par mois – réalisées lors des visites de suivi), analysés selon un modèle de **pharmacocinétique de population**, permettront d'évaluer l'influence de certaines covariables (race, âge, score CADESI-04 de départ, biomarqueurs, 7 OH-MTX) sur

les grandeurs pharmacocinétiques mesurées. A terme, une modélisation du comportement du MTX chez le chien permettra de mieux définir la relation dose/effet.

4.3.5 Détermination du schéma posologique chez le chien

Chez l'homme, plusieurs schémas posologiques coexistent. Il existe pour chaque maladie une part significative de non-répondeurs (20 à 40 %).

Pour le traitement de **l'arthrite rhumatoïde**, une dose d'attaque plus faible (7,5 à 15 mg/semaine) est habituellement utilisée pour contrôler la tolérance de la molécule. Une augmentation rapide de la dose, jusqu'à **25 – 30 mg/semaine**, par voie orale ou sous-cutanée, avec une **supplémentation en acide folique**, est recommandée pour améliorer le taux de réponse. La dose maximale de MTX, si elle est bien tolérée, doit être maintenue pendant **8 à 12 semaines pour évaluer la réponse au traitement**. A noter que pour les populations asiatiques, il n'est pas recommandé de dépasser 20 mg/semaine. L'efficacité maximale est obtenue **au bout de 6 mois** (Smolen *et al.*, 2017). Un essai contrôlé, sur 16 semaines, en double aveugle, impliquant 80 patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, a comparé une prise orale hebdomadaire versus deux prises, pour une même dose globale (à 3 jours d'intervalle). Les résultats en termes d'efficacité ou de tolérance ont été similaires (Pandya *et al.*, 2002).

Pour le traitement du **psoriasis**, la dose initiale recommandée oscille entre 5 et 15 mg/semaine. Là encore, une augmentation rapide du schéma posologique à **15 mg/semaine** est associée à une meilleure réponse clinique. La dose maximale recommandée est de 25 mg/semaine. Comme pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, l'individualisation de la dose est basée **sur la réponse clinique du patient et sa tolérance au médicament**. Les 2 schémas posologiques les plus fréquents sont (Nast *et al.*, 2015 ; Menting *et al.*, 2016):

- **Protocole Weinstein** : 1/3 de la dose, trois fois à 12h d'intervalle, chaque semaine : issu du protocole proposé par Weinstein en 1971 (Weinstein *et al.*, 1971) pour une utilisation sur des cycles cellulaires très rapides (37,5 h dans le psoriasis versus 457 h pour des cellules épithéliales normales). Ce protocole réduisant C_{max} permettrait de limiter la survenue d'effets secondaires indésirables. Toutefois, aucune étude n'a

réellement tranché cette question et l'utilisation de ce protocole repose sur l'expérience du dermatologue. Ce protocole est réservé à la voie orale.

- **Protocole d'une dose hebdomadaire**, comme pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde. Ce protocole est utilisé par voie orale et par voie injectable.

Pour le traitement de la **dermatite atopique de l'homme**, il n'existe pas de consensus. Toutefois, les posologies utilisées au cours des différents essais publiés sont décrites dans le [tableau 2](#). Les doses efficaces oscillent entre **0,2 et 0,4 mg/kg/semaine**.

Etude	Nombre patients	Posologie	Principaux résultats cliniques
Etude rétrospective ouverte (Goujon <i>et al.</i> , 2006)	20	25 mg/sem, injectable (14) 7,5 mg/sem, oral (4) 15 mg/sem, oral (2) Puis réduction selon réponse	Amélioration clinique forte chez 75 % des patients à +3 mois Arrêt pour 2 patients pour mauvaise tolérance digestive.
Etude rétrospective ouverte (Zoller <i>et al.</i> , 2008)	6	10-20 mg/semaine, oral	Fortes améliorations cliniques. Pas d'effets secondaires
Etude rétrospective ouverte (Lyakhovitsky <i>et al.</i> , 2010)	20	Dose attaque : 10 à 25 mg/sem, en fonction du poids, augmentation 2,5 mg/sem tous les mois si besoin, max 25mg/sem	4 non-répondants. Pour les autres, réduction SCORAD de 44,3%. Intolérance digestive chez 5 patients dont arrêt temporaire MTX pour 3.
Essai comparatif randomisé ouvert (versus cyclosporine) (El-Khalawany <i>et al.</i> , 2013)	40	Protocole Weinstein, 7,5 mg/sem (dose attaque 5 mg/sem)	Résultats similaires sur le plan de l'amélioration clinique et de la tolérance entre les 2 molécules
Etude rétrospective ouverte (Dvorakova <i>et al.</i> , 2017)	47	0,2 à 0,5 mg/kg, oral ou SC	2 arrêts (non-répondant et intolérance), intolérance digestive pour 6 patients avec passage à forme injectable. Bons résultats cliniques.
Essai non-infériorité de phase III (Goujon <i>et al.</i> , 2018)	97	15 mg/sem oral, 25 mg/sem si réponse insuffisante à 8 sem	MTX 15 mg/sem < ciclo à S8, mais équivalent à 25 mg/sem à S20
Essai comparatif randomisé ouvert (versus azathioprine) (Gerbens <i>et al.</i> , 2018)	27	10 à 22,5 mg/sem	Résultats similaires sur le plan de l'amélioration clinique et de la tolérance entre les 2 molécules après 5 ans.
Etude rétrospective ouverte (Shah <i>et al.</i> , 2018)	41	10 à 25 mg/sem, oral ou injectable	Bonne amélioration clinique

Tableau 2. Schémas posologiques testés chez l'homme pour le traitement de la dermatite atopique modérée à sévère avec du méthotrexate

Quelle dose utiliser chez le chien ?

- La clairance du MTX n'étant que légèrement supérieure chez le chien par rapport à l'homme, des **posologies relativement semblables** devraient être proposées, sous réserve que leur efficacité soit similaire (Toutain *et al.*, 2004). Le rapport des clairances entre les 2 espèces serait autour des 1,2.
- La voie orale étant sujette à une très forte variabilité chez le chien, notamment lorsque les doses doivent être augmentées, il a été décidé de **privilégier la voie injectable sous-cutanée**.
- De nombreuses études préconisent **une escalade rapide des doses pour améliorer l'efficacité**, bien que la métabolisation du MTX en formes polyglutamatisées intracellulaires ne soient pas liée à la dose utilisée mais plutôt aux capacités métaboliques de l'individu (Hum *et al.*, 1997 ; Panetta *et al.*, 2002). Selon une méta-analyse conduite en 2011 en arthrite rhumatoïde, des doses plus fortes, dès le début du traitement, et une augmentation plus rapide du schéma posologique permettraient une meilleure efficacité du traitement (Mouterde *et al.*, 2011), bien que ceci reste discuté (Lucas *et al.*, 2019).
- Le MTX semble **bien toléré chez le chien** selon nos essais précliniques : une posologie forte pourrait donc être privilégiée pour l'essai clinique, pour améliorer la réponse clinique, d'autant que, selon la littérature, les **troubles digestifs semblent moindres par voie injectable** que par voie orale.
- **Une injection unique par semaine** a été privilégiée pour faciliter l'observance du traitement par rapport à d'autres protocoles dont l'amélioration de la tolérance n'est pas clairement démontrée.
- Il a été décidé de ne pas mettre en place de supplémentation en acide folique. En effet, l'intérêt réel de cet apport apparaît limité (comme vu dans la **partie I**), mais présente un risque de **retardement de la réponse clinique**
- La dose utilisée dans les essais précliniques, au sein des cliniques de VetAgro Sup, n'était pas déterminée en mg/kg mais en mg/chien, sur le modèle humain. Les doses utilisées oscillaient entre 0,2 et 0,5 mg/kg/sem, par paliers de 2,5 mg (forme galénique disponible), majoritairement autour de **0,5 mg/kg/semaine par voie orale**

(5 mg pour un chien bouledogue d'environ 10 kg, le cas le plus classique de dermatite atopique du chien).

→ *In fine*, la **dose de 0,5 mg/kg/semaine**, par **voie SC**, a été retenue comme dose pour l'essai clinique, une fois par semaine.

4.3.6 Protocole d'étude

Chaque chien inclus (atteint de dermatite atopique modérée à sévère) reçoit, **chaque jour, une administration orale de médicament A** (cyclosporine ou placebo) et, **chaque semaine, une injection SC de médicament B** (MTX ou placebo). Chaque animal reçoit obligatoirement l'un des deux traitements, il n'y a pas de témoin négatif. La cyclosporine est administrée à la dose de 5 mg/kg, une fois par jour en début d'étude, avec espacement possible au-delà, conformément à l'AMM. Le MTX est administré une fois par semaine, à la dose de 0,5 mg/kg par voie sous-cutanée, par le propriétaire formé à ce geste lors des premières visites au centre clinique.

Le **reconditionnement et l'anonymisation sont réalisés à VetAgro Sup**, soit par le directeur d'étude, soit par un pharmacien diplômé, en respectant les critères de qualité adaptés : hotte à flux laminaire pour garantir la stérilité des préparations, tenues de laboratoire, salle réservée à la réalisation de préparations magistrales, matériel stérile à usage unique, matière première de qualité pharmaceutique, traçabilité. Les flacons utilisés pour le conditionnement primaire sont teintés, afin de masquer les différences tinctoriales entre la molécule testée et son placebo. De plus, le conditionnement secondaire, spécialement développé pour cette étude, ne doit pas être ouvert par le vétérinaire dermatologue. Concernant le médicament A, reconditionné en flacons teintés de 100 mL, le placebo est du Syrspend SF PH4ND LIQUID (Fagron, France) dilué à 30 %. La cyclosporine est, en fonction du poids du chien, soit du SporimuneND 50 mg/mL (Dechra Pharmaceuticals, UK), soit du CyclavanceND 100 mg/mL (Virbac, France). En ce qui concerne le médicament B, reconditionné en flacons teintés stériles de 10 mL, le placebo est de l'eau pour préparation injectable (ppi). Le MTX est dilué, selon la taille de l'animal à traiter, à partir de LedertrexateND 50 mg/2mL (Neuraxfarm, France). Une étude de stabilité du MTX, après reconditionnement et dilution, a permis de vérifier sa parfaite stabilité après 35 jours à

température ambiante ou à +4 °C. Les préparations sont envoyées, chaque mois, à chaque centre clinique, par chronopost, en début de semaine (pour éviter les périodes de week-end).

L'étude est conduite en **double aveugle** et **randomisée**. Aucun autre traitement systémique n'est autorisé au cours de l'étude. **Seuls des traitements topiques, sans glucocorticoïdes** (lotions, bains, etc..), sont préconisés en soins locaux (exception faite de l'acéponate d'hydrocorticone – cf. [partie éthique et bien-être animal](#)).

Avant inclusion, pour chaque chien, est réalisé un **examen clinique complet**, un **examen dermatologique** (calque et raclage cutané) ainsi que des **examens hématologiques** (NFS), **biochimiques** (urée, créatinine, PAL, ALAT) et une **bandelette urinaire**. Les chiens sont inclus, exclusivement, par des **vétérinaires spécialisés en dermatologie**. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont précisés en [partie choix des critères d'inclusion](#).

Chaque chien est vu **tous les mois, durant 7 mois**, le jour de l'administration hebdomadaire du médicament B (MTX), pour suivi **clinique, dermatologique** (CADESI-04, score prurit), **voire biologique** (NFS, PAL, ALAT, UREE, CREAT et bandelette urinaire 2 mois après le début de l'étude ainsi qu'en fin d'étude) et réalisation de **prises de sang** (une prise de sang à l'arrivée dans la clinique et une en fin de consultation, pour réalisation de la cinétique de population (MTX plasmatique), des profils cytokiniques et des marqueurs polyglutamates intra-érythrocytaires). Les analyses hématologiques et biochimiques sont réalisées dans les différents centres cliniques. Les autres prélèvements biologiques sont préparés dans les centres cliniques et congelés à –20°C en attente du transfert à VetAgro Sup pour analyse.

Un **document est rempli, quotidiennement, par le propriétaire** pour consigner tous les signes cliniques enregistrés, en lien ou non avec la dermatose, ainsi que **tous les traitements administrés**, incluant les médicaments A et B. En fonction de la réponse clinique et de la tolérance du médicament, le vétérinaire dermatologue a la possibilité de moduler les médicaments, A et B, à la hausse (MTX) ou à la baisse (ciclosporine), chaque mois (à l'exception du dernier).

Une attention particulière a été apportée aux **interactions médicamenteuses** qui peuvent biaiser les résultats et sont particulièrement nombreuses, notamment avec la

ciclosporine. Une liste importante de molécules interdites ou à usage restreint est donc associée à l'étude (cf. [annexe 1](#)). Pour faire face aux situations cliniques les plus classiques en dermatologie canine, chez des animaux souffrant de dermatite atopique, des protocoles spécifiques ont été déterminés (otite, Malassezia, pyodermite, etc...) en limitant le plus possible l'emploi de molécules pouvant interagir avec la ciclosporine ou le MTX (cf. [annexe 1](#)).

4.3.7 Méthodes analytiques

Le MTX, ses métabolites (7OH-MTX) et ses dérivés polyglutamatisés sont analysés sur LC-MS/MS à partir de la publication de den Boer *et al.* (2013). Le détail de la méthodologie employée figure dans l'article « *Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in horses* », présenté dans la [partie V](#) de ce document. L'ensemble des analyses a été mis en œuvre par une ingénieure spécialisée au sein de l'unité de recherche

Le profil cytokinique est établi par RT-qPCR sur ARNm, au sein de l'unité de recherche (mise au point analytique en cours). L'ensemble des analyses y seront réalisées.

Les paramètres sanguins sont sous-traités aux laboratoires d'analyse des différents centres cliniques (écoles vétérinaires ou structures privées). L'objectif reste uniquement un suivi de la tolérance des médications pour chaque chien inclus. Les différentes méthodologies employées ne sont pas un frein dans ce cadre.

4.3.8 Ethique et bien-être animal

Le protocole d'étude a été soumis au **comité d'éthique de VetAgro Sup** et approuvé en 2017 (Avis N° 1738 du 28/11/17). Un document d'information standard détaillé a été rédigé et est systématiquement remis, 10 jours avant inclusion, au propriétaire. Un consentement éclairé est rempli et signé par ce dernier (cf. [Annexe 2](#)).

La réponse clinique étant tardive pour les deux molécules, certains traitements temporaires ont été autorisés pour ne pas laisser évoluer inutilement la dermatite atopique et limiter l'abandon de l'étude par les propriétaires. Ainsi, l'acéponate d'hydrocortisone, peu absorbé par voie transcutanée et disponible par voie locale chez le chien (CortavanceND,

Virbac, France) est autorisé, et même préconisé en début de protocole, pour soulager l'animal le temps que la réponse clinique se manifeste (1 à 2 mois en général). Tous les autres glucocorticoïdes, antiprurigineux, anti-inflammatoires ou immunomodulateurs sont interdits.

En fonction des complications qui pourraient survenir, en lien ou non avec la dermatite atopique, des adaptations du protocole ou une sortie anticipée de l'étude sont prévues. Le directeur d'étude, responsable du suivi du protocole, reste joignable en permanence au cours de l'étude, par les propriétaires et les vétérinaires.

Le financement de cette étude provient de fonds propres publics de l'unité de recherche ICE, et d'un fond de 25 000 € obtenu auprès du programme national de recherche clinique vétérinaire, supervisé par Agreenium (Institut Agronomique, vétérinaire et forestier de France). Il n'y a donc aucun conflit d'intérêt dans ce cadre.

4.4 Résultats préliminaires et discussion

4.4.1 Inclusions

En octobre 2019, 23 chiens ont été inclus, par 7 centres cliniques différents. Parmi eux, 18 sont sortis de l'étude (sortie anticipée ou fin d'étude) et forment la base de l'analyse ci-dessous. Sur ces 18 chiens, 10 ont reçu du MTX et 8 de la ciclosporine.

4.4.2 Tolérance et schéma posologique du méthotrexate

Concernant la tolérance, aucun effet secondaire grave n'a été observé. Toutefois, les troubles digestifs liés à l'utilisation du MTX par voie injectable, à la dose initialement retenue, ont été **bien plus importants qu'estimés**, engendrant, notamment, **vomissements et anorexie**, de manière +/- marquée **durant les 48 h suivant l'injection**. Ainsi, sur les 6 premiers chiens inclus, 4 ont reçu du MTX à la dose de 0,5 mg/kg/semaine.

→ Le chien EAL001 est sorti de l'étude, après 2 mois de traitement, pour **intolérance digestive et anorexie**, malgré un état général excellent et des épisodes d'anorexie limités à 6-12h post-administration, sans perturbation ni du comportement de l'animal (hors prise alimentaire), ni de l'évolution de sa masse corporelle au cours de

la durée du suivi. A noter que les propriétaires étaient très sensibles à tout symptôme de leur animal.

- ➔ Le chien EAJG003 est sorti de l'étude après la 4^{ème} injection de MTX. Les symptômes observés par les propriétaires étaient de l'anorexie sur environ 12h, suite aux 2 premières injections, des vomissements et de l'anorexie pendant 48 h, suivant l'avant-dernière injection, et des **troubles digestifs** plus importants (anorexie, vomissements et diarrhée) pendant environ 1 semaine suivant la dernière injection, ce qui a nécessité une prise en charge médicale symptomatique.
- ➔ Les chiens EAL002 et EADVM006 ont présenté quelques épisodes d'anorexie, en général, dans les 24 à 48h après l'injection, mais de manière plus atténuée. Ces effets indésirables se sont réduits, en intensité et en fréquence, au cours de l'étude.
- ➔ A noter que concernant les deux chiens traités avec la ciclosporine (EASM004 et EAADV005), seuls de **rare vomissements** ont été rapportés au cours des premiers mois de traitement. Le chien EAADV005 a manifesté plusieurs crises épileptiques au troisième mois de suivi (sans suite au-delà), ainsi qu'une PUPD associée à une malpropreté à partir du quatrième mois de suivi. Suite à une évaluation en médecine interne dans un centre spécialisé, une miction émotionnelle a été diagnostiquée.

Face à ces premiers retours, il a été décidé de **redéfinir le schéma posologique du MTX**, pour les chiens inclus à partir du chien N°7. Considérant que :

- lors de la détermination de la dose de MTX à tester, nous avons délibérément proposé une dose plutôt élevée dans le but d'améliorer la réponse clinique (cf. [partie détermination du schéma posologique](#))

- lors des essais précliniques, une dose de 0,5 mg/kg/semaine par voie orale (biodisponibilité d'environ 30 %) avait montré des résultats encourageants.

Une **nouvelle dose d'entretien de 0,25 mg/kg/semaine par voie injectable** a été retenue (biodisponibilité proche de 100%). Une dose d'attaque plus faible, de 0,15 mg/kg/semaine, a été mise en place le premier mois, afin d'évaluer la tolérance de la molécule et de limiter le risque d'abandon du protocole par les propriétaires, comme cela est pratiqué régulièrement chez l'homme. De même, un assouplissement du protocole permet au

praticien dermatologue d'augmenter la posologie en fonction de la réponse clinique et de la tolérance au cours de l'étude, jusqu'à un maximum de 0,5 mg/kg.

Depuis la mise en place de ce nouveau schéma posologique, **les effets secondaires digestifs ont été fortement réduits, aussi bien en intensité qu'en fréquence**, lorsqu'ils étaient présents. Sur l'ensemble des chiens concernés par cette analyse partielle, à partir du chien N°7, 6 chiens ont reçu du MTX et 6 chiens ont reçu de la ciclosporine.

- ➔ De rares périodes d'anorexie (0 à 2 par mois), et, plus rarement, des vomissements, sont rapportés dans les 12 à 24 h après l'injection de MTX, sans atteinte de l'état général, ni perte de poids significative. Ces symptômes, encore présents dans le premier mois, voire les 2 premiers mois, de traitement tendent à disparaître ensuite. Des résultats similaires sont rapportés pour la ciclosporine.
- ➔ Le chien EAL007, traité à la dose de 0,35 mg/kg/semaine de MTX depuis un mois lors de son dernier contrôle, est sorti de l'étude après 4 mois de traitement pour deux raisons :
 - Il répondait modérément au traitement (son score CADESI-04 était de 54 (ce qui fait pourtant une réduction de 50% par rapport à son score d'inclusion (111) mais il suivait une évolution défavorable), et son score de prurit restait encore très élevé (identique à l'inclusion)
 - La présence récurrente de périodes d'anorexie et l'apparition de quelques épisodes de vomissements suite à l'augmentation du schéma posologique, sans dégradation de l'état général, ni amaigrissement, étaient une source d'inquiétude de la propriétaire. Malheureusement, la sensibilité, parfois très importante, des propriétaires aux effets secondaires manifestés par leur animal, notamment l'anorexie, même si cette dernière n'engendre pas de conséquences cliniques significatives, induit un taux d'abandon du protocole important qu'il faudra analyser avec prudence en fin d'étude.
- ➔ Le chien EAA014, traité avec de la ciclosporine, à 5 mg/kg/j durant 3 mois, est sorti de l'étude pour abattement, vomissements, diarrhée et essoufflement, malgré l'amélioration clinique en cours de la dermatose. A noter qu'une cystite a été diagnostiquée au cours du suivi clinique (et un traitement mis en place).

4.4.3 Efficacité clinique du méthotrexate pour le traitement de la dermatite atopique canine

Sur les 18 chiens sortis de l'étude, 6 ont eu une sortie anticipée. 3 chiens sont sortis à cause d'une intolérance au MTX, 1 chien à cause d'une intolérance à la ciclosporine. Deux autres chiens ont eu une sortie anticipée :

- ➔ Le chien EADVM015, traité avec de la ciclosporine à 5 mg/kg/j durant 5 mois, est sorti de l'étude pour insuffisance d'efficacité.
- ➔ Le chien EADVM010, traité avec du MTX, à la dose de 0,35 mg/kg/semaine, durant 6 mois, est sorti de l'étude pour insuffisance d'efficacité, sans toutefois que ne soit testée la posologie maximale disponible (0,5 mg/kg/semaine). Pour cet animal, une allergie alimentaire est rapportée par le dermatologue investigateur, ainsi que de fréquents écarts dans la maîtrise de la ration du chien par les propriétaires, à l'origine d'une partie des symptômes observés au cours de l'étude. Un nouvel épisode de dégradation clinique associé à une inquiétude très importante des propriétaires a mis fin, prématurément, à l'essai clinique.

Les résultats de suivi mensuel du CADESI-04 et des scores de prurit sont présentés dans les **figures 6, 7, 8 et 9**. Pour le chien EAL017, alors que la réduction du score CADESI-04 était de 79% au contrôle mensuel précédent (6 mois – score de « 9 »), un séjour en gardiennage (dont une bagarre rapportée avec un chien) est à l'origine de la dégradation clinique le dernier mois (réduction du score de 51% - score de « 21 »).

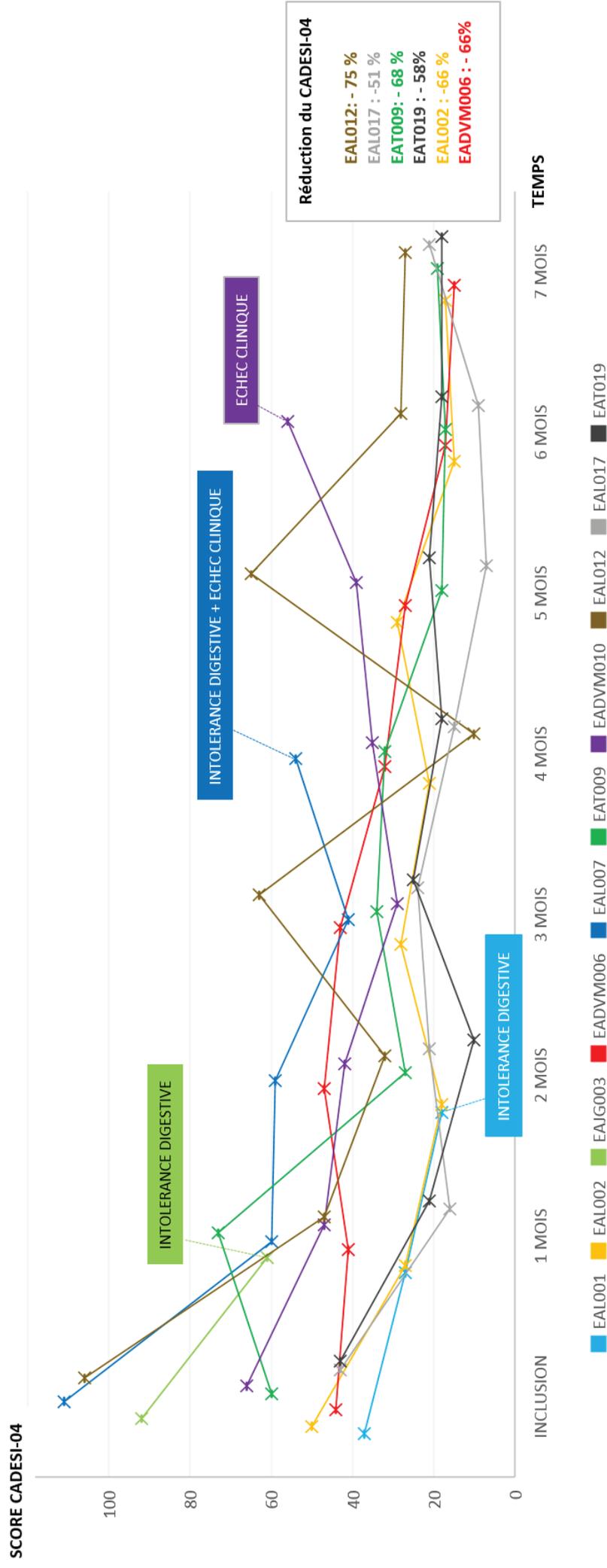


Figure 7. Evolution des scores CADESI-04 au cours du temps pour les animaux sous méthotrexate

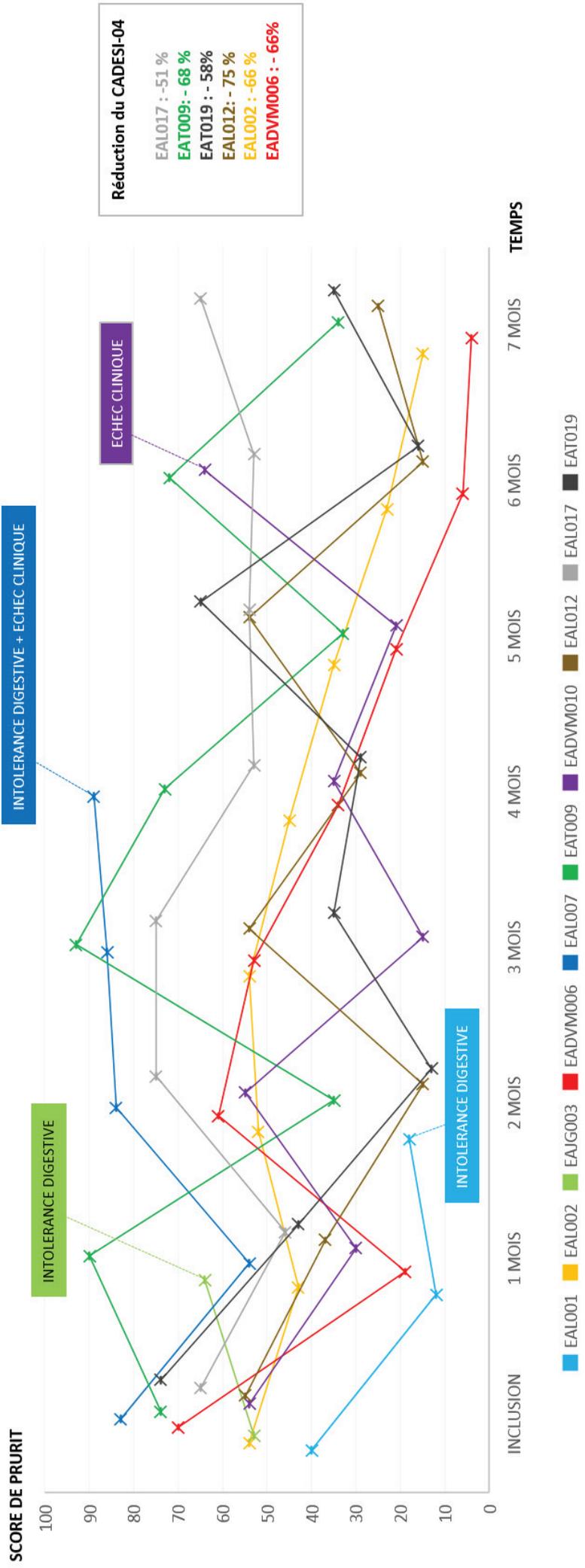


Figure 8. Evolution des scores de prurit au cours du temps pour les animaux sous méthotrexate

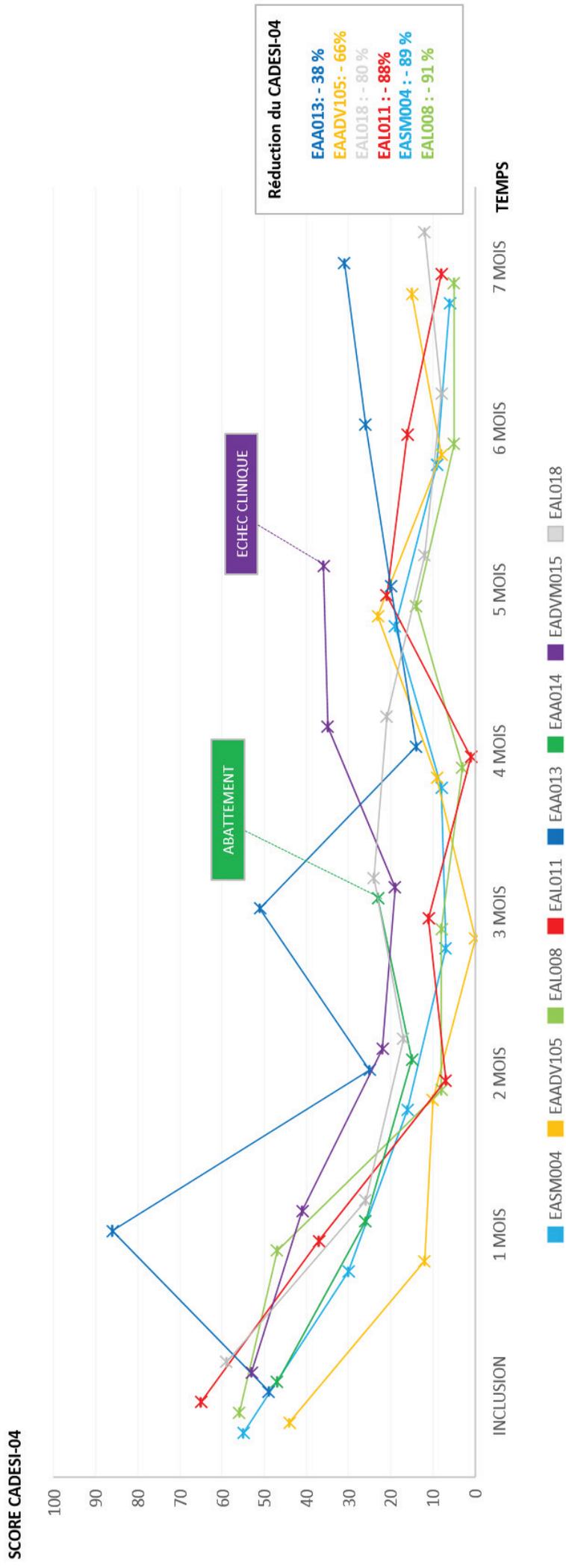


Figure 9. Evolution des scores CADESI-04 au cours du temps pour les animaux sous ciclosporine

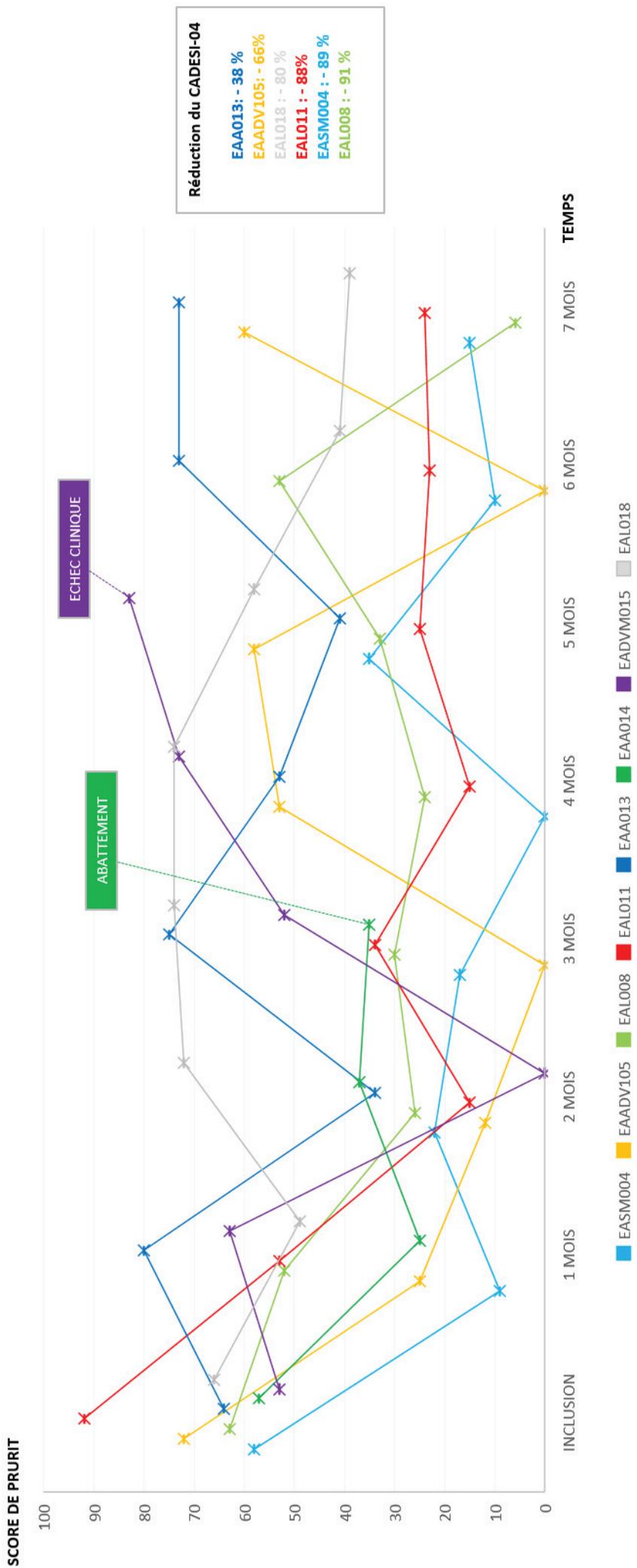


Figure 10. Evolution des scores de prurit au cours du temps pour les animaux sous ciclosporine

En conclusion, la quantité limitée de données ne permet pas de conclusions définitives ni d'analyse statistique des résultats à ce stade. Il apparaît toutefois que :

- le MTX a permis de **contrôler de manière satisfaisante la dermatite atopique de 6 chiens sur les 10** inclus dans l'étude. Les propriétaires de ces 6 animaux ont, par ailleurs, tous souhaité continuer avec cette molécule. Trois animaux ont été sortis précocement de l'étude pour troubles digestifs (principalement anorexie). Un animal n'a pas répondu de manière satisfaisante au protocole.
- La dose efficace de MTX oscille selon les animaux entre **0,25 et 0,5 mg/kg/semaine**, par voie injectable.

4.4.4 Pharmacologie du méthotrexate chez le chien

Seuls les échantillons des chiens EAL001, EAL002, EAJG003 et EAL007 ont été analysés en septembre 2019. Toutefois, sur ces 4 chiens ayant reçu du MTX, un seul a terminé l'étude (EAL002). Concernant les formes polyglutamatisées intra-érythrocytaires, le **tableau 3** résume les résultats obtenus. Conformément à ce qui est observé chez l'homme ou le cheval (*cf.* **partie V**), on **retrouve des formes polyglutamatisées de MTX-PG2 à MTX-PG5** chez le chien, avec un allongement des chaînes glutamates avec le temps. Le faible nombre d'échantillons analysés ne permet aucune autre conclusion.

	MTX-PG2	MTX-PG3	MTX-PG4	MTX-PG5	MTX-PG6	MTX-PG7
+1 mois	12.45	6.60	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>14.39</i>	<i>7.90</i>				
	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)
+2 mois	24.46	21.42	6.37	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>3.96</i>	<i>10.46</i>	<i>12.74</i>			
	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)	(4 chiens)
+3 mois	25.31	30.79	24.31	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>5.90</i>	<i>13.50</i>	<i>9.64</i>			
	(3 chiens)	(3 chiens)	(3 chiens)	(3 chiens)	(3 chiens)	(3 chiens)
+4 mois	29.47	49.04	54.93	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>			
	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)
+5 mois	39.60	71.11	53.62	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>			
	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)
+6 mois	30.78	26.64	25.33	<LOD	<LOD	<LOD
	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>			
	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)
+7 mois	36.42	58.33	66.38	30.67	<LOD	<LOD
	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>		
	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)	(1 chien)

Tableau 3. Concentrations de méthotrexate intra-érythrocytaire sous forme mono- ou polyglutamates (nmol/g de globules rouges) mesurées au cours de l'essai clinique.

La moyenne est indiquée en gras, et l'écart-type en italique. Sous chaque valeur est indiqué le nombre de chiens concernés. Les cases jaunes sont celle pour lesquelles sont disponibles au moins 3 valeurs issues de chiens différents.

4.5 Perspectives

L'étude va se poursuivre jusqu'au **recrutement des 60 chiens prévus** lors de la validation du protocole, ce qui prendra encore au moins 1 à 2 ans. Après analyse des résultats préliminaires, il n'est pas certain que l'on puisse conclure à la non-infériorité du MTX par rapport à la ciclosporine. Toutefois, à ce stade, cette molécule semble être une solution crédible pour le traitement de la dermatite atopique canine lorsque les autres traitements sont mal tolérés ou trop onéreux.

PARTIE V

RESULTATS

Etude de la pharmacocinétique du
méthotrexate dans l'espèce équine.

5.1 Contexte de l'étude

Chez le cheval, la pharmacopée disponible par voie systémique pour traiter certaines maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité, notamment en dermatologie, est globalement **limitée aux glucocorticoïdes**, avec toutes les complications que cela sous-entend à long terme. Grâce aux travaux conduits chez le chien à VetAgro Sup avec le MTX, travaux qui nous ont permis de mieux appréhender cette molécule, et suite à des demandes régulières de nouvelles solutions thérapeutiques pour les équidés lors de maladies à médiation immune souvent très handicapantes, le MTX est apparu comme une solution intéressante, dont l'évaluation pourrait permettre de proposer une prise en charge originale de certaines maladies. Son **utilisation réussie** dans la gestion d'un lupus érythémateux chez un âne (MOSCA M., article accepté), ou les résultats encourageants, pour cette même maladie, chez un cheval malheureusement perdu de vue (PIN D., données non publiées), nous ont conduits à mettre en place **deux essais pharmacocinétiques** nécessaires à la détermination d'un schéma posologique mieux adapté.

5.2 Objectifs

Deux études ont été conduites. La première, **l'étude de biodisponibilité (B-Study)**, construite en plan croisé (*cross over*), permet une évaluation des principales grandeurs pharmacocinétiques chez le cheval (biodisponibilité, clairance, temps moyen de résidence, demi-vie d'élimination, volume de distribution, concentration maximale). La seconde, une **étude d'une durée de 3 mois (LT-Study)**, a permis d'évaluer la tolérance de la molécule et de rechercher la présence de forme polyglutamatisées intracellulaires, afin de mieux appréhender le métabolisme de la molécule chez le cheval. L'objectif ultime est de proposer un schéma thérapeutique qui sera testé sur animal malade.

5.3 Publication N°2

ROSTANG, Antoine, Desjardins I, Espana B, Panzuti P, Berny P, Prouillac C, Pin D, 2019, Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in horses.

Article soumis au *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*

Original Article

Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in horses

Antoine Rostang*, Isabelle Desjardins, Bernadette Espana, Pauline Panzuti, Philippe Berny, Caroline Prouillac and Didier Pin

Univ Lyon, UP ICE, VetAgro Sup, F-69280 Marcy l'Etoile, France

* Corresponding author. Tel: +33 240 68 76 76

E-mail address: antoine.rostang@oniris-nantes.fr (A. ROSTANG)

Abstract (200 words)

This study aimed to investigate both the pharmacokinetic behavior and tolerance of methotrexate (MTX) in horses to design a specific dosing regimen as a new immunomodulatory drug for long-term treatment.

To determine the primary plasma pharmacokinetic variables after single intravenous, subcutaneous or oral administration, six horses were administered 0.3 mg/kg MTX in a crossover design study. After a 10-week washout, MTX was administered subcutaneously to three of the six previously treated horses at a dose of 0.3 mg/kg once per week for 3 months. In both studies, MTX and metabolite concentrations were measured using LC-MS/MS.

The absolute bioavailability of MTX was 73% following subcutaneous administration but less than 1% following oral administration. The plasma clearance was 1.54 mL/min/kg (extraction ratio = 2%). After 24 h, plasma concentrations were below the LOQ. No adverse effects were noted except for a moderate reversible elevation in liver enzymes (GLDH). With regards to the main metabolites of MTX, very low concentrations of 7-hydroxy-MTX were found, whereas polyglutamated forms (mainly short chains) were found in red blood cells.

A subcutaneous dose of 0.2 mg/kg per week may be safe and relevant in horses, although this has yet to be clinically confirmed.

Keywords: Bioavailability, Clearance, Horse, Immunomodulator, Tolerance

Introduction

Horses are affected by several autoimmune or immune-mediated diseases, such as dermatoses, anemia, thrombopenia, polysynovitis, polyneuritis, enteritis, and vasculitis (Mealey and Long, 2018). Immunosuppressive therapy becomes necessary when immune-mediated tissue damage is life-threatening or causes organ dysfunction (Felippe, 2016). These diseases may require long-term immunomodulatory treatment for several weeks to several months or even years. Few immunosuppressive drugs have been studied and are clinically used in horses (Felippe, 2016). In the absence of other therapeutic alternatives supported by robust evidence for their efficacy, corticosteroids are the most commonly used immunosuppressive drugs in horses. However, long-term corticosteroid administration may result in a large variety of adverse effects, including laminitis, increased susceptibility to infection, exacerbation of metabolic disorders in overweight animals, muscle wasting, polyuria-polydipsia, and, less commonly, steroid hepatopathy, altered bone metabolism, or iatrogenic hyperadrenocorticism (Felippe, 2016; Leclere, 2017). Other immunomodulatory drugs, such as cyclosporin, azathioprine, chlorambucil, cyclophosphamide, vincristine, or gold salts, have been used, but their lack of proven efficacy, prohibitive cost, and toxicity preclude their routine use in horses (Felippe, 2016; Leclere, 2017; Vandenabeele et al., 2004; White et al., 2005). In this context, a new effective, low-cost, and well-tolerated molecule could offer a substantial contribution to equine medicine.

Methotrexate (MTX), a folic acid analog with cytostatic activity, was first synthesized in 1948 (Smith et al., 1948). It was initially only used as a folate antagonist with antiproliferative and cytotoxic activities in cancer chemotherapy, and doses could be escalated up to 30 g/m² (Genestier et al., 2000). In human medicine, this molecule received renewed interest as a treatment for psoriasis in the 1960s, rheumatoid arthritis in the 1980s and, more recently, many other autoimmune or immune-mediated diseases (Mathers and Russell, 1993).

This renewed interest was correlated with the development of a particular dosing regimen, which involved weekly rather than daily administration at low doses (5-25 mg/week, i.e., from 0.08 to 0.5 mg/kg/week). Such a dosing regimen has never been tested in horses. At a medium daily dosage (0.37-1.16 mg/kg) in an experimental trial in 14 young ponies, Bello *et al.* (1973) reported severe immunosuppressive and toxic effects and suggested a high susceptibility to the toxic effects of MTX. Recently, one horse affected by cutaneous lupus erythematosus was treated with low-dose MTX once per week (from 0.25 to 0.5 mg/kg/week); there were no observed side effects and encouraging clinical results for several months before it was lost to follow-up (PIN D., unpublished clinical observation). In addition, although there may be significant pharmacological differences between donkeys and horses (Lizarraga *et al.*, 2004), MTX has been successfully administered at low dose (between 0.1 and 0.3 mg/kg/week) for more than 1 year to a donkey with cutaneous lupus erythematosus (MOSCA M., accepted for publication).

The objectives of this work were: first to assess the bioavailability of MTX in healthy horses; second, to evaluate the tolerance of low-dose MTX after a single use or repeated treatments for 3 months; and finally, to investigate the metabolism of MTX through an analysis of its metabolites: 7-hydroxy-MTX (7OH-MTX) and intracellular polyglutamated metabolites. Indeed, although the parent drug contains one glutamate moiety (MTX-PG1), intracellular MTX consists of multiple metabolites with a varying number of glutamate groups (MTX-PG₂₋₇) (Chabner *et al.*, 1985).

Materials and methods

Animals

According to Directive 2010/63/UE, all procedures used in these studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of VetAgro Sup (MENESR 20180611-11554227). Four female ponies (weighing between 170 and 260 kg) and two mares (weighing 442kg and 594 kg), between 13 and 20 years of age, were used in the bioavailability study (hereafter referred to as the B-Study). Three of these animals were also involved in a 3-month pharmacokinetic study (a long-term study, hereafter referred to as the LT-Study). Prior to the beginning of each study, each animal was established as healthy by a physical examination, a complete blood count, and a biochemistry profile.

Experimental design and sample collection for the B-Study

The horses and ponies were removed from the pasture at least 12 h before sampling was initiated. The mares were housed individually and ponies were housed in pairs during the sampling period with *ad libitum* access to grass hay and water. A complete clinical examination was performed prior to the administration of MTX and every 12 h. A catheter was placed into the jugular vein, as recommended by the NC3Rs (Burden et al., 2015). ×

The B-Study followed a 3×3 crossover design: each animal received a total dose of 0.3 mg/kg MTX for three distinct 24 h periods, either intravenously (IV) into the jugular vein (Ledertrexate, Biodim Laboratory, Paris, France), subcutaneously (SC) in the neck (Ledertrexate, Biodim Laboratory, Paris, France), or orally (OR) as a capsule (extemporaneous compounding, Fabre-Delpech Laboratory, Marseille, France). The horses were divided into three groups of two and were assigned to three separate sequences: group 1 received MTX first intravenously, then orally, and finally subcutaneously; group 2 received

MTX first subcutaneously, then intravenously, and finally orally; group 3 received MTX first orally, then subcutaneously, and finally intravenously. Serial blood samples were collected in EDTA tubes immediately before administration and at 0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h after. The plasma was separated by centrifugation at 2700×g for 10 min and immediately frozen at -20°C until use in the assay of MTX and 7-OH MTX (Limelette et al., 2003). A 3-week washout period was applied between each 24 h sampling period. During this period, the horses and ponies were returned to the pasture under clinical supervision.

Experimental design and sample collection for the LT-Study

A 10-week washout period was mandated between the two studies, in which the grazing animals were monitored visually, except for the post-administration week (the first) in which clinical supervision occurred at least once daily.

Two female ponies and one mare from the B-Study were enrolled in the LT-Study; the three animals were kept together in pasture with a full access to grass hay and water. The three horses/ponies received 0.3 mg/kg MTX (Ledertrexate, Biodim Laboratory, Paris, France) subcutaneously (alternating on each side of the neck) once per week for 3 months. A clinical examination was performed systematically prior to the administration of MTX. A visual inspection was performed twice per day during the study. Every 4 weeks, blood samples were collected from the jugular vein, prior to the MTX injection, and a complete blood count and biochemistry panel (including creatinine, GGT, and GLDH activity) were performed, and MTX and its metabolites in erythrocytes were quantified. For this analysis, blood samples were centrifuged and packed red blood cells (RBC) were stored at -20°C until analysis (Limelette et al., 2003; Stoop et al., 2018).

Sample analysis

The quantification of MTX and 7OH-MTX in plasma and of MTX-PG_n in RBC was performed using a LC-MS/MS system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) with a method adapted from den Boer *et al.* (2013). MTXPG1-7 standards were purchased from Schircks Laboratories (Baume, Switzerland). Stable-isotope-labeled internal standard MTX was purchased from Clearsynth Labs Ltd (Mumbai, India) and 7OH-MTX was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Owing to the significant matrix effect, spiked drug-free RBC pellets were used to establish standard curves. Six concentrations of MTXPG_n (2-100 nM for MTXPG1 to MTXPG3 and 5-500nM for MTXPG4 to MTXPG7) were used. The internal standard concentrations were maintained at 100 nM for the two matrix methods.

All samples were prepared as follows: 200 μ L RBC pellets or plasma was supplemented with 40 μ L cold internal standard solution at 2 μ M (100 nM final) and 240 μ L water. The proteins were precipitated by the addition of 320 μ L cold 16% perchloric acid to the diluted sample while vortexing, then incubated on ice for 30 min, and centrifuged for 10 min at 2700 \times g. Five microliters of the supernatant were injected in the LC-MS/MS system. The column was an Ace Excel C18 (ACE Ltd, Aberdeen, UK) and the mobile phase consisted of 10 mM ammonium bicarbonate adjusted to pH 10 with 25% ammonium hydroxide (A) and methanol (B). A flow rate of 0.5 mL/min was used. The limit of quantification was determined at 2 nmol/L (MTX-PG₁₋₃ and 7OH-MTX) and 5 nmol/L (MTX-PG₄₋₇). The accuracy was >62% for 7OH-MTX and >78% MTX-PG₁₋₇. The precision was <20% for six quality control levels.

Data analysis

Pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental analysis (NCA) Model 200 for the SC and for the oral route of administration (extravascular dosing,

linear trapezoidal linear interpolation, and 1/y weighting) and the NCA Model 201 for the IV route of administration (IV bolus, linear trapezoidal linear interpolation, and 1/y weighting) with WinNonlin 6.4[®] software (Certara, Princeton, USA). A high random inter-occasion clearance variability was observed. To substantially decrease the variability of the results and to avoid individual bioavailabilities higher than 100%, the computed bioavailability was corrected by the terminal half-life as a surrogate for clearance, assuming the volume of distribution as invariable, using the following equation (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004a):

$$F (\%) = \frac{AUC_{SC}}{AUC_{IV}} \times \frac{t_{1/2IV}}{t_{1/2sc}} \times 100$$

The rate constant of the terminal phase (λ_z) was determined from a linear regression of the logarithmic plasma concentration versus time curve using a minimum of three data points. Analysis of variance (ANOVA) was used to ensure there was no carry-over effect using RStudio software (version 3.5.2) on natural log-transformed AUC_{last} . The data normality was assessed based on the examination of histograms, normal Q-Q plots of the residuals, and the Shapiro-Wilk test. Homogeneity of variance was assessed by plotting residuals against the predicted values. All statistical tests were two-tailed and the significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

B-Study

The mean concentration versus time profiles of MTX after SC or IV administration are presented in Figure 1. The calculated pharmacokinetic parameters are expressed as the arithmetic mean \pm standard deviation in Table 1. The absolute bioavailability of MTX in

horses was 73% following subcutaneous injection but less than 1% following oral administration. After 24 h, all plasma concentrations were below the LOQ. Neither the order nor the time of administration was observed to affect the results, confirming the absence of any carry over effect. The mean absorption time (MAT) after SC administration was 1.93 h. The plasma clearance was 1.54 mL/min/kg. As the cardiac output in horses is 74 mL/min/kg (Fisher and Dalton, 1959), the extraction ratio is 2%, which confirms that MTX is a low extraction ratio drug in horses. Plasma levels of 7OH-MTX were detected but were below the LOQ for all animals, regardless of the route of administration.

No systemic or local (injection site) adverse effects were observed, regardless of the route of administration. No alteration of the complete blood count was observed. In the biochemical assessment, three ponies showed a slight increase in the GLDH activity but values were still within reference ranges (see Table 2). No increase in GGT activity was noted. Creatinine remained within the reference values.

LT-Study

Neither clinical side effects nor injection site reactions were observed during the 3 months of weekly treatment. The weight of the animals remained stable. No alteration of the complete blood count was observed. In the biochemical assessments, an increase in the GLDH activity in Pony 4 was observed 55 and 84 days after treatment (see Table 2), with an increase in GGT on Day 84 (GGT < 25 UI/L from Day 0 to Day 56, and 46 UI/L on Day 84). One month after the end of the study, the liver enzymes activities were normal (GGT = 23 UI/L, GLDH = 4.2 UI/L).

At Day 28, MTX-PG₂ was detected in the RBCs of all animals. The mean concentration gradually increased over the course of the study (see Table 3). MTX-PG₃ was

first detected in erythrocytes at Day 56, in a single horse, in which an increased in GLDH was also observed. MTX-PG₄₋₇ were not detected during this trial.

Discussion

This study provides an important PK dataset for MTX in equine species, which is vital, because the available data in the literature are scarce and incomplete. These data are essential for the design of an effective and safe dosing regimen for the treatment of various autoimmune or immune-mediated diseases in horses.

One of our objectives was to evaluate the routes of administration. The influence of food intake on bioavailability is already controversial in humans (Godfrey et al., 1998; Hamilton and Kremer, 1995; Oguey et al., 1992). To propose an approach that can be easily and routinely used in horses, we deliberately chose not to restrict dietary intake during the B-Study, even though this may have had a significant influence on the absorption process of oral MTX. Moreover, the galenic forms available, with tablet doses of 2.5 to 25 mg, are not suitable for the treatment of horses. We decided therefore to use compounded MTX for the *per os* administration, despite the potential effect on bioavailability. In these conditions, for clinical use in horses, the oral administration of low-dose MTX should be excluded, owing to insufficient bioavailability. These results differs from values that have been recorded in dogs (Rostang et al., 2018) or in humans (Tian and Cronstein, 2007). Regardless a the non-total absolute subcutaneous bioavailability in horses, unlike the results observed in humans (Edelman et al., 1984; Jundt et al., 1993) or dogs (Rostang et al., 2018), we decided to conduct our LT-Study using the SC administration of MTX, which is the most relevant and practical route used by owners and veterinary practitioners.

At a medium daily dosage (0.37-1.16 mg/kg/day), Bello *et al.* (1973) reported the high susceptibility of 14 young ponies to the toxic effects of MTX, with anorexia, constipation, or diarrhea, steady reduction in total leukocytes, and mortality. Indeed, severe gross and microscopic lesions were found in the gastro-intestinal tract, the mesenteric lymph nodes, the adrenal glands, and the liver. There was no euthanasia or autopsy specified in our protocol, which limits the detection of some side effects that have no clinical effects. In the conditions used in our study, no clinically detectable adverse reactions, anorexia, or digestive signs were observed, in neither our experimental studies nor our clinical use outside of the study. Gastrointestinal adverse events are very frequent (approximately 31%, and up to 62% in some studies) and constitute the major reason for drug discontinuation in humans (Mathers and Russell, 1993; Salliot and van der Heijde, 2009) and dogs (Rostang, unpublished data). Although the number of animals involved in our studies was small, if a similar frequency of these events occurred in horses, they would have been expected to be observed, and this was not the case. Similarly, minor hematological effects (mild to moderate leukopenia, or even thrombocytopenia) are commonly observed in humans or dogs receiving low-dose MTX, occurring in up to 24% of patients followed for long periods (Mathers and Russell, 1993; Rostang *et al.*, 2018). However, no changes in the hematological profile have yet been observed in horses administered low doses. Moderate and reversible liver damage in one pony was reported in our LT-study. However, it should be mentioned that an ivermectin and praziquantel-based antiparasitic treatment was administered to this animal at the end of the LT-study. Thus, the increase in GLDH activity may be related either to gastrointestinal parasitism or to the effect of MTX. Indeed, another untreated pony in the same pasture at the same time also experienced an isolated increase in GLDH, which normalized after deworming, supporting the hypothesis of digestive parasitism. However, transient elevations in liver enzymes are commonly seen in human patients receiving MTX (Mathers and Russell,

1993; Salliot and van der Heijde, 2009). Similarly, in the B-Study, a slight increase in GLDH activity was observed in half of the horses (although the values remained within the reference ranges). Although it is not possible to exclude the influence of parasitism on the hepatic biochemical values recorded during the LT-Study, the data observed in horses treated with MTX were consistent with those reported in humans. In conclusion, caution should be applied in interpreting the liver damage in the LT-Study, but elevation of liver enzymes may often be observed in horses. Based on data from the literature, mainly from humans, the other serious side effects of low-dose MTX include pulmonary toxicity, sudden severe pancytopenia, renal dysfunction, or hepatic fibrosis. MTX-induced lung changes, which are rarely described in humans and observed mainly with high-dose regimens, have never been observed in horses (Bello et al., 1973). To the best of our knowledge, sudden severe pancytopenia has not been observed at low doses in animals other than rodents (Kojima et al., 2012). The etiology of MTX-induced renal dysfunction is believed to be mediated by the precipitation of MTX, especially its metabolite, in the renal tubules owing to its very low solubility in an acidic environment. As very low amounts of the less water-soluble 7OH-MTX was produced in horses from this study, and as urine in this species is more alkaline than in humans, it may limit the acute nephrotoxicity due to MTX precipitation in acidic urine (Widemann and Adamson, 2006). The influence of low-dose MTX on hepatic fibrosis is controversial (Cipriani et al., 2014; Tishler et al., 1992). Finally, given the considerations of the limited sample size, MTX is apparently well tolerated in horses, although complete clinical, pulmonary, hepatic, and hematological monitoring is strongly recommended, as for humans, and in a larger number of animals.

Understanding the specificities of MTX metabolism and elimination in horses may help to determine the most relevant *in vivo* dose.

- The main route of MTX metabolism involves its hydroxylation by the liver aldehyde oxidase to form 7 OH-MTX (Genestier et al., 2000). This route accounts for approximately 10% of MTX in humans, although the inter-individual variability is very high (Baggott and Morgan, 2009; Mathers and Russell, 1993). This metabolite has a lower inhibitory activity on most of the target enzymes. However, it competes with MTX on all these enzymes (Baggott and Morgan, 2009). Thus, guinea pigs and rabbits, species in which the activity of aldehyde oxidase is very high, are found to be very insensitive to MTX adverse effects, whereas rats and mice, species in which this enzyme is very inactive, have poor tolerance to this drug (Johns and Loo, 1967). The low level of MTX-oxidizing activity in horses suggest that the dose to be used should be reduced.
- The second route of metabolism is the intracellular conversion of MTX to polyglutamates, which is the most important metabolic pathway with respect to efficacy in humans (Grim et al., 2003). The goal of weekly low-doses methotrexate is to produce long-lasting therapeutic effects while limiting adverse effects. As MTX is rapidly eliminated from the plasma, the prolonged efficacy occurs through intracellular accumulation. MTX is indeed converted to polyglutamate forms by binding a variable number of glutamate groups in cells; this process increases the size of the molecule and makes it much more anionic (Chabner et al., 1985). As a result, MTX polyglutamates (MTX-PGs) cannot diffuse out of the cell. Moreover, MTX-PGs have a more efficient function on the targeted enzymes compared with MTX, making MTX a prodrug (Chabner et al., 1985). This is the first time that MTX-PGs in erythrocytes have been detected in horses. This evidence confirms the relevance of weekly administration in this species as well, with a probable prolonged efficacy, despite very low plasma

concentrations after 24 h. After 3 months of low-dose MTX, the vast majority of MTX-PGs in the erythrocyte compartment consisted of short-chain MTX-PG₁₋₂, with limited long-chain MTX-PG₃ and an absence of very long-chain MTX-PG₄₋₇. This differed from human studies, in which long-chain MTX-PG₃ was the predominant intra-cellular form at steady-state (see Table 4). However, the results observed after 3 months in horses do not allow us to predict the steady-state concentrations, especially as it can take a long time to reach steady-state (from 6 to 42 weeks in humans, depending on the studies), with the selective accumulation of longer chain MTX-PGs at the expense of short-chain MTX-PGs (Ćalasan et al., 2015; Dalrymple et al., 2008; de Rotte et al., 2015; den Boer et al., 2013; Dervieux et al., 2010; Woolf et al., 2012). The MTX dose, route of administration, age of patient, and patient's renal function are strongly associated with MTX-PG levels in humans (den Boer, 2014; Dervieux et al., 2010); therefore, this may apply to horses as well.

- MTX is largely excreted unchanged in the urine in humans (65%-80%), with a major role played by glomerular filtration, and partially via the biliary route (Swierkot and Szechiński, 2006). In our study, the plasma clearance of MTX was 1.54 mL/min/kg. For a dosage of 10 mg/m² MTX (approximately 0.25 mg/kg) in humans, the measured plasma clearance was 84.6 mL/min/m² (approximately 2 mL/min/kg) (Herman et al., 1989). In dogs, the plasma clearance was equal to 2.35 mL/min/kg (Rostang et al., 2018). The reduced plasma clearance, usual on large animals (allometric model), would imply the dose to be used should be reduced.

The 0.3 mg/kg dose selected in our trials was empirically determined, based on preliminary results obtained from clinical use in dogs, one donkey, and a few horses. When

the dose is not well defined in a given species, a dose can be tentatively extrapolated from another species using plasma clearance, on assumption that drug potency is species-independent (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004b). According to this assumption, the dose to be used in horses could be reduced compared with the recommended dose in humans, although this hypothesis has not been verified for MTX in horses to date. Moreover, as increased catabolism to 7OH-MTX may interfere with polyglutamate formation (Baggott and Morgan, 2009), decrease MTX retention (Goldman and Matherly, 1985) and reduce efficacy (Baggott and Morgan, 2009), its absence in equine medicine may explain the greater sensitivity to side effects and therefore the need for careful monitoring and reduced doses.

Conclusion:

We suggest that with appropriate clinical, biochemical, and hematological follow-up, MTX can be a relevant, well-tolerated, and affordable drug in horses. The dose to be used has not yet been precisely determined, but our results suggested that the dose should be comparably lower than that used in humans or dogs. On a weekly basis, a SC dose of 0.2 mg/kg may be relevant in horses, although this has yet to be confirmed. However, it should be noted that a measurable clinical response occurs between 4 and 8 weeks in humans (Goujon et al., 2006) and over a similar duration in dogs [PIN D. – personal observation]; thus, this could also be the probable duration of treatment before clinical response in horses. Further studies are warranted to assess the potential toxicity and clinical efficacy of MTX in various autoimmune and immune-mediated diseases in equine species.

Acknowledgements

We would like to thank Samantha Gallagher, Fanny Grel, and Gloria Rocafort for their assistance with animal care and sample collection, and Pr Chantal Thorin (ONIRIS) for her help using R software.

This project was funded by the ICE research unit's own funds.

Conflict of interest statement

No competing interests have been declared

Author contribution statement

All authors have made substantial contributions to conception, acquisition or analysis of data, manuscript drafting or critical review, and approved the final manuscript.

References

Baggott, J.E., Morgan, S.L., 2009. Methotrexate catabolism to 7-hydroxymethotrexate in rheumatoid arthritis alters drug efficacy and retention and is reduced by folic acid supplementation. *Arthritis Rheum.* 60, 2257–2261. <https://doi.org/10.1002/art.24685>

Bello, T.R., Amborski, G.F., Torbert, B.J., 1973. Effects of the immunosuppressant methotrexate in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 34, 1291–1297.

Burden, N., Chapman, K., Sewell, F., Robinson, V., 2015. Pioneering better science through the 3Rs: an introduction to the national centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 198–208.

Ćalasan, M.B., den Boer, E., de Rotte, M.C.F.J., Vastert, S.J., Kamphuis, S., de Jonge, R., Wulffraat, N.M., 2015. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in juvenile idiopathic arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 402–407. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203723>

Chabner, B.A., Allegra, C.J., Curt, G.A., Clendeninn, N.J., Baram, J., Koizumi, S., Drake, J.C., Jolivet, J., 1985. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest.* 76, 907–912. <https://doi.org/10.1172/JCI112088>

Cipriani, P., Ruscitti, P., Carubbi, F., Liakouli, V., Giacomelli, R., 2014. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 10, 1519–1530. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.962996>

Dalrymple, J.M., Stamp, L.K., O'Donnell, J.L., Chapman, P.T., Zhang, M., Barclay, M.L., 2008. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3299–3308. <https://doi.org/10.1002/art.24034>

de Rotte, M.C.F.J., den Boer, E., de Jong, P.H.P., Pluijm, S.M.F., Ćalasan, M.B., Weel, A.E., Huisman, A.M., Gerards, A.H., van Schaeybroeck, B., Wulffraat, N.M., Lindemans, J., Hazes, J.M.W., de Jonge, R., 2015. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with

lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 408–414. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203725>

den Boer, E., 2014. Therapeutic Drug-Monitoring of Methotrexate-Polyglutamates in Rheumatoid Arthritis (PhD). Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

den Boer, E., Meesters, R.J.W., van Zelst, B.D., Luider, T.M., Hazes, J.M.W., Heil, S.G., de Jonge, R., 2013. Measuring methotrexate polyglutamates in red blood cells: a new LC-MS/MS-based method. *Anal. Bioanal. Chem* 405, 1673–1681. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6581-7>

Dervieux, T., Zablocki, R., Kremer, J., 2010. Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49, 2337–2345. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq216>

Divers, T., Barton, M., 2018. Disorders of the liver, in: *Equine Internal Medicine - 4th Edition*. Elsevier, St Louis, Missouri, pp. 843–887.

Edelman, J., Biggs, D.F., Jamali, F., Russell, A.S., 1984. Low-dose methotrexate kinetics in arthritis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35, 382–386.

Felippe, M.J.B., 2016. Immunosuppressive therapy, in: *Equine Clinical Immunology*. Wiley Blackwell, Oxford (UK).

Fisher, E.W., Dalton, R.G., 1959. Cardiac output in horses. *Nature* 184, 2020–2021. <https://doi.org/10.1038/1842020b0>

Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K., Revillard, J.P., 2000. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47, 247–257.

Godfrey, C., Sweeney, K., Miller, K., Hamilton, R., Kremer, J., 1998. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46, 369–376.

Goldman, I.D., Matherly, L.H., 1985. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther.* 28, 77–102.

Goujon, C., Bérard, F., Dahel, K., Guillot, I., Hennino, A., Nosbaum, A., Saad, N., Nicolas, J.-F., 2006. Methotrexate for the treatment of adult atopic dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 16, 155–158.

Grim, J., Chládek, J., Martínková, J., 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* 42, 139–151. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342020-00003>

Hamilton, R.A., Kremer, J.M., 1995. The effects of food on methotrexate absorption. *J. Rheumatol.* 22, 630–632.

Herman, R.A., Veng-Pedersen, P., Hoffman, J., Koehnke, R., Furst, D.E., 1989. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J. Pharm. Sci.* 78, 165–171.

Johns, D.G., Loo, T.L., 1967. Metabolite of 4-amino-4-deoxy-N10-methylpteroylglutamic acid (Methotrexate). *J. Pharm. Sci.* 56, 356–359. <https://doi.org/10.1002/jps.2600560310>

Jundt, J.W., Browne, B.A., Fiocco, G.P., Steele, A.D., Mock, D., 1993. A comparison of low dose methotrexate bioavailability: oral solution, oral tablet, subcutaneous and intramuscular dosing. *J. Rheumatol.* 20, 1845–1849.

Kojima, S., Yoshida, T., Sasaki, J., Takahashi, N., Kuwahara, M., Shutoh, Y., Saka, M., Nakashima, N., Kosaka, T., Harada, T., 2012. Induction of hyperchromic microcytic anaemia by repeated oral administration of methotrexate in rats. *J. Toxicol. Sci.* 37, 957–968.

Leclere, M., 2017. Corticosteroids and immune suppressive therapies in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 33, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.11.008>

Limelette, N., Ferry, M., Branger, S., Thuillier, A., Fernandez, C., 2003. In vitro stability study of methotrexate in blood and plasma samples for routine monitoring. *Ther Drug Monit.* 25, 81–87.

Lizarraga, I., Sumano, H., Brumbaugh, G.W., 2004. Pharmacological and pharmacokinetic differences between donkeys and horses. *Equine Vet. Educ.* 16, 102–112. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2004.tb00275.x>

Mathers, D., Russell, A.S., 1993. Methotrexate, in: *Second-Line Agents in the Treatment of Rheumatic Diseases., Inflammatory Disease and Therapy Series.* Jonathan S. Dixon and Daniel E. Furst., New York, pp. 431–432.

Mealey, R., Long, M., 2018. Mechanisms of Disease and Immunity, in: *Equine Internal Medicine.* Elsevier, St Louis, Missouri.

Oguey, D., Kölliker, F., Gerber, N.J., Reichen, J., 1992. Effect of food on the bioavailability of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35, 611–614.

Rostang, A., Mosca, M., Jeannin, M., Luissiez, C., Berny, P., Fourel, I., Pin, D., Prouillac, C., 2018. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in healthy beagle dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 41(5), 659–669. <https://doi.org/10.1111/jvp.12673>

Salliot, C., van der Heijde, D., 2009. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1100–1104. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.093690>

Smith, J.M., Cosulich, D.B., Hultquist, M.E., Seeger, D.R., 1948. The chemistry of certain pteroylglutamic acid antagonists. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 10, 82–83. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1948.tb00920.x>

Stoop, M.P., Visser, S., van Dijk, E., Aerts, J.G.J.V., Stricker, B.H., Luijck, T.M., 2018. High and individually variable enzymatic activity precludes accurate determination of pemetrexed,

methotrexate and their polyglutamate metabolite concentrations in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.014>

Swierkot, J., Szechiński, J., 2006. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Rep.* 58, 473–492.

Tian, H., Cronstein, B.N., 2007. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull. N. Y. U. Hosp. Jt. Dis.* 65, 168–173.

Tishler, M., Caspi, D., Halperin, Z., Baratz, M., Moshkowitz, M., Yaron, M., 1992. A prospective analysis of liver biopsies in rheumatoid arthritis patients receiving long term methotrexate therapy. *Rheumatol. Int.* 12, 39–41. <https://doi.org/10.1007/BF00246875>

Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004a. Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x>

Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004b. Plasma clearance. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>

Vandenabeele, S.I.J., White, S.D., Affolter, V.K., Kass, P.H., Ihrke, P.J., 2004. Pemphigus foliaceus in the horse: a retrospective study of 20 cases. *Vet. Dermatol.* 15, 381–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2004.00423.x>

White, S.D., Maxwell, L.K., Szabo, N.J., Hawkins, J.L., Kollias-Baker, C., 2005. Pharmacokinetics of azathioprine following single-dose intravenous and oral administration and effects of azathioprine following chronic oral administration in horses. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1578–1583.

Widemann, B.C., Adamson, P.C., 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 11, 694–703. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-6-694>

Woolf, R.T., West, S.L., Arenas-Hernandez, M., Hare, N., Peters van Ton, A.M., Lewis, C.M., Marinaki, A.M., Barker, J.N.W.N., Smith, C.H., 2012. Methotrexate polyglutamates as a marker of patient compliance and clinical response in psoriasis: a single-centre prospective study. *Br. J. Dermatol.* 167, 165–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10881.x>

Table 1

Plasma pharmacokinetic variables (mean +/- standard deviation (SD)) for methotrexate after a single subcutaneous or intravenous administration at 0.3 mg/kg in six healthy horses

Variable	Route of administration	
	IV	SC
λ_z (per h)	0.31 ± 0.13	0.34 ± 0.06
$T_{1/2}$ (h)	2.47 ± 0.67	2.07 ± 0.37
AUC _{last} (mg.min/L)	225.2 ± 94.7	130.6 ± 26.7
MRT _{last} (h)	0.8 ± 0.2	2.7 ± 0.6
CL (mL/min/kg)	1.54 ± 0.64	NA
V _{ss} (mL/kg)	82.2 ± 48.8	NA
T _{max} (h)	NA	1 ± 0.4
C _{max} (ng/mL)	NA	687 ± 315
F (%)	NA	73 ± 16

λ_z , rate constant of the terminal phase; $T_{1/2}$, half-life of the terminal phase; AUC_{last}, area under the plasma concentration vs. time curve from time 0-12 h; MRT_{last}, mean residence time; CL, systemic clearance; V_{ss}, apparent volume of distribution as steady state; T_{max}, time to maximum plasma concentration (observed); C_{max}, maximum plasma concentration observed; F, bioavailability.

Table 2

Glutamate dehydrogenase (GLDH) activity measurements (UI/L) during the bioavailability study (B-Study) and the long-term study (LT-Study) in the healthy horses involved. There was a 10-week washout period between the two studies.

	Ref range from the testing laboratory	B-Study		LT-Study				
		Day 0, before treatment administration	15 days after the end of the study (8 weeks after the previous measurement)	Day 0 - before treatment administration	Day 28	Day 56	Day 84 - end of the study	Day 112
Pony 1	0.5 - 5 UI/L	3.02	2.19	1.9	1.3	2.9	4.4	NA
Pony 2	0.5 - 5 UI/L	2.01	4.8	NA	NA	NA	NA	NA
Pony 3	0.5 - 5 UI/L	2.05	4.6	NA	NA	NA	NA	NA
Pony 4	0.5 - 5 UI/L	1.98	4.52	6	2.4	16.5	59.1	4.2
Mare 1	0.5 - 5 UI/L	2.48	1.84	NA	NA	NA	NA	NA
Mare 2	0.5 - 5 UI/L	1.6	2.6	1.7	0.8	2.9	3.4	NA

Table 3

Concentration of methotrexate in mono (MTX) and polyglutamated forms (MTX-PG₂₋₇) in red blood cells of three horses treated for 3 months with a dose of 0.3mg/kg/week, expressed as nmol/L of packed erythrocytes.

	Day 0	Day 28	Day 56	Day 84 - end of the study
MTX	Pony 1	41.11	33.57	33.22
	Pony 4	41.25	39.68	36.33
	Mare 2	41.81	34.46	37.59
MTX-PG2	Pony 1	5.58	8.08	8.51
	Pony 4	7.50	11.35	12.35
	Mare 2	4.51	6.09	7.65
MTX-PG3	Pony 1	<LOD	<LOD	<LOD
	Pony 4	<LOD	2.40	1.95
	Mare 2	<LOD	<LOD	<LOD
MTX-PG4-7	Pony 1	<LOD	<LOD	<LOD
	Pony 4	<LOD	<LOD	<LOD
	Mare 2	<LOD	<LOD	<LOD

Table 4

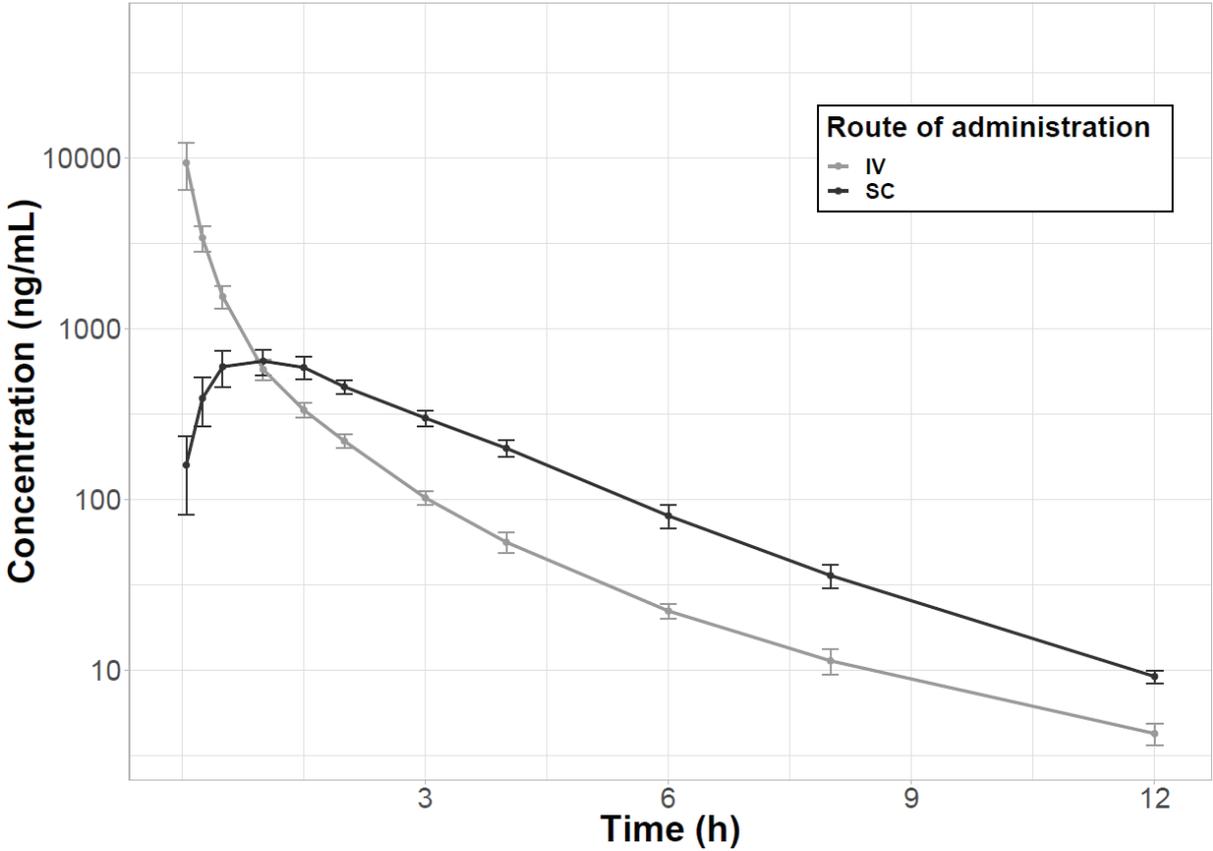
Concentration of methotrexate in mono (MTX) and polyglutamate forms (MTX-PG₂₋₇) in red blood cells in humans, expressed as nmol/L of packed erythrocytes

	Concentrations, expressed as nmol/L of packed erythrocytes					
	mean ± SD	median (IQR)	median (IQR)	median (min-max)	mean ± SD	median (min-max)
MTX	18.2 ± 8.1	25.3 (19.7 - 33.8)	30 (19.8 - 47.4)	28 (0 - 337)	16.2 ± 7.4	30 (0 - 186)
MTX-PG2	17.8 ± 6.0	18.7 (14.8 - 24.3)	21.2 (15.9 - 27.4)	21 (0 - 82)	16.2 ± 7.4	21 (0 - 69)
MTX-PG3	28.6 ± 11.9	23.0 (13.9 - 33.9)	49 (36.5 - 61.4)	48 (0 - 97)	40.4 ± 23.1	56 (0 - 136)
MTX-PG4	8.1 ± 4.3	4.2 (2.0 - 8.7)	20.0 (11.4 - 30.2)	19 (0 - 88)	11.9 ± 8.8	20 (0 - 100)
MTX-PG5	0.8 ± 1.9	0.7 (0.3 - 1.8)	4.7 (2.0 - 9.3)	5 (0 - 64)	0.8 ± 1.3	4 (0 - 82)
Median MTX dosage	15 mg/week	10 mg/m ² /week	25 mg/week	25 mg/week	15 mg/week	25 mg/week
Number of patients involved	33	113	247	228	14	177
Disease treated	Psoriasis	JVA	RA	RA	Psoriasis	RA
Number of weeks after treatment	12	12	12	12	52	36
Reference	Woolf et al., 2012	Calasan et al., 2015	den Boer, 2014	de Rotte et al., 2015	Woolf et al., 2012	de Rotte et al., 2015

JVA, juvenile idiopathic arthritis; RA, rheumatoid arthritis; IQR, interquartile range; min-max, minimum-maximum; MTX, methotrexate; MTX-PG 2-5, methotrexate polyglutamate 2 to 5; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; min, minimum; max, maximum

Figure legends

Fig 1. Plasma concentration (mean +/- standard deviation (SD)) following intravenous (IV; in light grey) or subcutaneous (SC; in dark grey) administration of a single dose of methotrexate at 0.3 mg/kg to six healthy horses



5.4 Résultats - Discussion

Tolérance du MTX chez le cheval

Aucun effet secondaire indésirable n'a été enregistré au cours des deux essais, ni sur le **plan clinique**, ni sur le **plan hématologique**. Les seules modifications enregistrées concernent les **enzymes hépatiques** :

- 3 animaux ont eu une légère augmentation de la concentration sérique en **GLDH** au cours de la *B-Study*, à des valeurs qui restent dans l'intervalle des valeurs usuelles.
- Durant la *LT-Study*, 1 poney (qui appartenait au groupe d'animaux ayant déjà eu une augmentation légère de la GLDH au cours de la B-Study) a présenté une augmentation plus marquée de la GLDH à la fin du second mois de traitement, augmentation confirmée par une forte hausse des valeurs de la **GLDH** (59,1 UI/L) et des **GGT** (46 UI/L) à la fin de l'étude. Ces valeurs se sont normalisées à l'arrêt du traitement. A noter, toutefois, qu'il existait une suspicion d'infestation parasitaire concomitante qui pourrait expliquer cette forte hausse des enzymes hépatiques. Ainsi, un autre poney, non inclus dans l'étude, mais présent sur la même pâture, a également eu une augmentation des valeurs de GLDH. Suite à la mise en place d'un traitement à base d'ivermectine et de praziquantel, les valeurs de GLDH des deux animaux se sont normalisées. Le MTX étant également connu pour être responsable d'augmentations transitoires des valeurs hépatiques, il est difficile de conclure quant à l'origine de cette augmentation dans ce contexte.

Les deux études conduites ne peuvent être qualifiées d'études de tolérance, ne comprenant ni utilisation de doses fortement majorées, ni examen *post-mortem*, et un nombre restreint de sujets. Toutefois, l'objectif était de s'assurer de l'absence de contre-indication majeure ou d'effets secondaires fréquents ou graves, lors de l'utilisation du MTX chez le cheval. En effet, la seule publication disponible, quant à l'utilisation du MTX chez le cheval, bien qu'à dose « moyenne » (0,37 à 1,16 mg/kg), une fois par jour (et non une fois par semaine), mettait en évidence une sensibilité accrue des équidés par rapport à d'autres espèces (Bello *et al.*, 1973). Aucun des effets secondaires graves (fibrose pulmonaire, atteinte rénale, pancycopénie) ou fréquents (atteinte digestive ou hématologique), classiquement associés au MTX, n'a été observé au cours de l'étude. Dans le cadre d'une

utilisation hebdomadaire à faible dose, le MTX semble donc **bien toléré chez le cheval**, bien qu'un **suivi clinique, biochimique et hématologique attentif** reste **très fortement recommandé** lors de l'utilisation de cette molécule.

Pharmacocinétique

Les principaux résultats sont :

- La **biodisponibilité par voie orale est très faible** (<1 %) et discrédite cette voie d'administration pour cette espèce. L'absence de diète alimentaire a pu influencer l'absorption par voie orale mais l'utilisation routinière du MTX en clinique équine ne serait que difficilement compatible avec la mise en place d'une diète avant chaque prise médicamenteuse, d'où le choix de ne pas restreindre la prise de nourriture.
- La biodisponibilité par voie sous-cutanée est de **73 %**, c'est-à-dire non totale, contrairement à l'homme ou au chien.
- Après 24h, les concentrations plasmatiques sont **toutes inférieures à la LOQ**.
- Le 7-OH MTX a été détecté dans le plasma des animaux mais à des concentrations très faibles (< LOQ) : ce n'est donc **pas un métabolite significatif chez le cheval**. Chez l'homme, environ 10 % du MTX est métabolisé en 7OH-MTX, métabolite qui entre en compétition avec le MTX sur ses cibles. Son absence dans l'espèce équine incite à réduire les doses de MTX utilisées par rapport à celles utilisées chez l'homme.
- Des **formes polyglutamatisées** ont été détectées dès le premier mois de traitement (MTX-PG2). Les formes tri-glutamates ont été détectées dès la fin du second mois de traitement. On retrouve donc un métabolisme cellulaire similaire à celui décrit chez l'homme. Un schéma posologique hebdomadaire reste donc pertinent pour cette espèce.
- La clairance chez le cheval est faible, à **1,54 +/- 0,64 mL/min/kg**. Chez l'homme, la clairance est de 2 mL/min/kg. Considérant une action similaire de la molécule sur ses cibles entre les espèces humaines et équines, la posologie employée chez le cheval devrait être réduite par rapport à celle utilisée chez l'homme.

Conclusion

A condition d'assurer **d'un suivi clinique, hématologique et biochimique rigoureux**, le MTX devrait être testé chez le cheval souffrant de maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité, comme un **immunomodulateur alternatif, peu onéreux et bien toléré à faible dose**. La dose à utiliser reste délicate à déterminer mais les éléments pharmacocinétiques nous incitent à penser qu'une posologie réduite, par rapport à celle utilisée chez l'homme, devrait être suffisante. En rassemblant l'ensemble des données cliniques, paracliniques et pharmacocinétiques obtenues chez le cheval, l'homme et le chien, nous proposons la dose de **0,20 mg/kg/semaine**. Naturellement, des essais cliniques devront être menés pour confirmer cette proposition.

5.5 Perspectives cliniques

Contrairement à ce qui est proposé chez le chien, avec la mise en place d'une étude clinique à même de vérifier l'efficacité de la molécule dans la gestion de la dermatite atopique modérée à sévère, il sera difficile en médecine équine de mettre en place de tels essais. En effet, les maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité susceptibles d'être traitées par le MTX restent rares. Au mieux, il pourrait être proposé un protocole raisonné dans le cadre d'un essai ouvert à destination des vétérinaires spécialisés en médecine équine (via des organisation professionnelles type Association Vétérinaire Equine Française), ce qui permettrait un recrutement plus large et des données d'efficacité dans un délai raisonnable. *A minima*, les dermatologues et internistes de VetAgro Sup continueront de le proposer comme alternative thérapeutique sur les cas qui leur seront présentés.

Conclusions et perspectives

Le MTX, une molécule très utilisée chez l'homme à faible dose comme immunomodulateur et anti-inflammatoire, est **absent de l'arsenal thérapeutique vétérinaire**. Pourtant, les alternatives thérapeutiques pour le traitement des maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité sont **peu nombreuses**. Notre travail a permis d'obtenir des **données précliniques chez le chien et le cheval**, données indispensables pour envisager son utilisation en pratique. Nos résultats sont **concordants** avec les données obtenues chez l'homme. Ceci ouvre des perspectives intéressantes quant à l'utilisation de cette molécule chez le chien et le cheval.

Chez le chien, le MTX devrait être administré par **voie injectable**, la biodisponibilité orale étant faible. Le MTX semble **bien toléré** à faible dose hebdomadaire **par voie SC**, avec principalement des **effets secondaires digestifs peu graves** (anorexie voire vomissements) et des **élévations intermittentes des enzymes hépatiques**. Une **dose d'attaque de 0,15 mg/kg/semaine** reste recommandée le premier mois de traitement, ainsi qu'un **suivi clinique, hématologique et biochimique, rigoureux**. En fonction de la réponse clinique et de la tolérance de la molécule, la dose peut être progressivement augmentée. Pour le traitement de la dermatite atopique du chien, l'étude clinique est en cours. Toutefois, plusieurs chiens ont montré une très bonne réponse au traitement à base de MTX, à des doses oscillant entre **0,25 et 0,5 mg/kg/semaine**. L'étude doit être poursuivie pour conclure sur l'intérêt de cette molécule dans la gestion de la dermatite atopique du chien.

Chez le cheval, la **voie injectable** sera également privilégiée, l'absorption par voie orale étant presque nulle dans les conditions de notre étude. La **tolérance semble excellente** mais le faible nombre d'animaux suivis incite à la prudence lors de l'utilisation de cette molécule, avec, là-encore, la mise en place d'un **suivi clinique, hématologique et biochimique (rénal et hépatique) rigoureux**. Les données pharmacocinétiques recueillies suggèrent qu'une dose de **0,20 mg/kg/semaine est adaptée à cette espèce**. Toutefois, l'absence de données d'efficacité ne permet pas de conclure sur l'intérêt clinique réel de cette molécule dans l'espèce équine.

Références bibliographiques

AJMANI S, PREET SINGH Y, PRASAD S, CHOWDHURY A, AGGARWAL A, LAWRENCE A, MISRA R, MISHRA R et AGARWAL V, 2017. Methotrexate-induced pancytopenia: a case series of 46 patients. In : *International Journal of Rheumatic Diseases*. 5 mars 2017. DOI 10.1111/1756-185X.13004.

ALLEGRA CJ, CHABNER BA, DRAKE JC, LUTZ R, RODBARD D et JOLIVET J, 1985. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 15 août 1985. Vol. 260, n° 17, p. 9720-9726.

ALLEGRA CJ, DRAKE JC, JOLIVET J et CHABNER BA, 1985. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. août 1985. Vol. 82, n° 15, p. 4881-4885.

AMMERSBACH MG, KRUTH SA, SEARS W et BIENZLE D, 2006. The effect of glucocorticoids on canine lymphocyte marker expression and apoptosis. In : *Journal of Veterinary Internal Medicine*. octobre 2006. Vol. 20, n° 5, p. 1166-1171. DOI 10.1892/0891-6640(2006)20[1166:teogoc]2.0.co;2.

ANGELIS-STOFORIDIS P, VAJDA FJ et CHRISTOPHIDIS N, 1999. Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. In : *Clinical and Experimental Rheumatology*. juin 1999. Vol. 17, n° 3, p. 313-320.

ANGIER RB et BOOTHE JH, 1946. The structure and synthesis of the liver L. casei factor. In : *Science*. 31 mai 1946. Vol. 103, n° 2683, p. 667-669.

ANTONY AC, 1992. The biological chemistry of folate receptors. In : *Blood*. 1 juin 1992. Vol. 79, n° 11, p. 2807-2820.

ASAHINA R et MAEDA S, 2017. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. In : *Veterinary Dermatology*. février 2017. Vol. 28, n° 1, p. 16-e5. DOI 10.1111/vde.12351.

ASAHINA R, NISHIDA H, KAMISHINA H et MAEDA S, 2018. Expression of IL-33 in chronic lesional skin of canine atopic dermatitis. In : *Veterinary Dermatology*. juin 2018. Vol. 29, n° 3, p. 246-e91. DOI 10.1111/vde.12531.

ASSARAF YG, 2006. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. In : *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. octobre 2006. Vol. 9, n° 4-5, p. 227-246. DOI 10.1016/j.drug.2006.09.001.

- AURIEMMA M, VIANALE G, AMERIO P et REALE M, 2013. Cytokines and T cells in atopic dermatitis. In : *European Cytokine Network*. mars 2013. Vol. 24, n° 1, p. 37-44. DOI 10.1684/ecn.2013.0333.
- BACHTEL JC, PENDERGRAFT JS, ROSYCHUK RAW, GUSTAFSON DL, HANSEN RJ et LUNGHOFFER PJ, 2015. Comparison of the stability and pharmacokinetics in dogs of modified ciclosporin capsules stored at -20°C and room temperature. In : *Veterinary Dermatology*. août 2015. Vol. 26, n° 4, p. 228-e50. DOI 10.1111/vde.12222.
- BAGGOTT JE, MORGAN SL et VAUGHN WH, 1994. Differences in methotrexate and 7-hydroxymethotrexate inhibition of folate-dependent enzymes of purine nucleotide biosynthesis. In : *The Biochemical Journal*. 15 juin 1994. Vol. 300, p. 627-629.
- BAGGOTT JE, BRIDGES SL et MORGAN SL, 2005. Evidence for two phenotypes in the metabolism of methotrexate to 7-hydroxymethotrexate in patients with rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. janvier 2005. Vol. 52, n° 1, p. 356-358. DOI 10.1002/art.20742.
- BAGGOTT JE et MORGAN SL, 2009. Methotrexate catabolism to 7-hydroxymethotrexate in rheumatoid arthritis alters drug efficacy and retention and is reduced by folic acid supplementation. In : *Arthritis and Rheumatism*. août 2009. Vol. 60, n° 8, p. 2257-2261. DOI 10.1002/art.24685.
- BANGERT CA et COSTNER MI, 2007. Methotrexate in dermatology. In : *Dermatologic Therapy*. août 2007. Vol. 20, n° 4, p. 216-228. DOI 10.1111/j.1529-8019.2007.00135.x.
- BANNWARTH B, PÉHOURCQ F, SCHAEVERBEKE T et DEHAIS J, 1996. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *Clinical Pharmacokinetics*. mars 1996. Vol. 30, n° 3, p. 194-210. DOI 10.2165/00003088-199630030-00002.
- BARNES PJ, 2006. Corticosteroids: the drugs to beat. In : *European Journal of Pharmacology*. 8 mars 2006. Vol. 533, n° 1-3, p. 2-14. DOI 10.1016/j.ejphar.2005.12.052.
- BECKER ML, VAN HAANDEL L, GAEDIGK R, LASKY A, HOELTZEL M, STOBAUGH J et LEEDER JS, 2010. Analysis of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with juvenile idiopathic arthritis: effect of route of administration on variability in intracellular methotrexate polyglutamate concentrations. In : *Arthritis and Rheumatism*. juin 2010. Vol. 62, n° 6, p. 1803-1812. DOI 10.1002/art.27434.
- BELLO TR, AMBORSKI GF et TORBERT BJ, 1973. Effects of the immunosuppressant methotrexate in ponies. In : *American Journal of Veterinary Research*. octobre 1973. Vol. 34, n° 10, p. 1291-1297.
- BENITO-GARCIA E, HELLER JE, CHIBNIK LB, MAHER NE, MATTHEWS HM, BILICS JA, WEINBLATT ME et SHADICK NA, 2006. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. In : *The Journal of Rheumatology*. juillet 2006. Vol. 33, n° 7, p. 1275-1281.

BOFFA MJ, CHALMERS RJ, HABOUBI NY, SHOMAF M et MITCHELL DM, 1995. Sequential liver biopsies during long-term methotrexate treatment for psoriasis: a reappraisal. In : *The British Journal of Dermatology*. novembre 1995. Vol. 133, n° 5, p. 774-778. DOI 10.1111/j.1365-2133.1995.tb02754.x.

BOONCHOONG N, 2003. Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. In : *Mahidol University - Journal of pharmaceutical sciences*. décembre 2003. Vol. 30, n° 3.

BRESSOLLE F, BOLOGNA C, KINOWSKI JM, SANY J et COMBE B, 1998. Effects of moderate renal insufficiency on pharmacokinetics of methotrexate in rheumatoid arthritis patients. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. février 1998. Vol. 57, n° 2, p. 110-113. DOI 10.1136/ard.57.2.110.

BRUNNER PM, SUÁREZ-FARIÑAS M, HE H, MALIK K, WEN HC, GONZALEZ J, CHAN TC, ESTRADA Y, ZHENG X, KHATTRI S, DATTOLA A, KRUEGER JG et GUTTMAN-YASSKY E, 2017. The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. In : *Scientific Reports*. 18 2017. Vol. 7, n° 1, p. 8707. DOI 10.1038/s41598-017-09207-z.

ÁLASAN MB, DEN BOER E, DE ROTTE MCFJ, VASTERT SJ, KAMPHUIS S, DE JONGE R et WULFFRAAT NM, 2015. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in juvenile idiopathic arthritis patients. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. février 2015. Vol. 74, n° 2, p. 402-407. DOI 10.1136/annrheumdis-2013-203723.

CATHARINE R et SCOTT-MONCRIEFF R, 2014a. Pathogenesis of immune-mediated disorders. In : *Small Animal Internal Medicine - Fifth edition*. Richard W. Nelson and C. Guillermo Couto. Saint Louis : Elsevier. p. 1398-1401.

CATHARINE R et SCOTT-MONCRIEFF R, 2014b. Treatment of primary immune-mediated diseases. In : *Small Animal Internal Medicine - fifth edition*. Richard W. Nelson and C. Guillermo Couto. St Louis, Missouri : Elsevier.

CHABANNE L, 2003. Traitements immunosuppresseurs. In : *EMC - Vétérinaire*. 2003.

CHABNER BA, ALLEGRA CJ, CURT GA, CLENDENINN NJ, BARAM J, KOIZUMI S, DRAKE JC et JOLIVET J, 1985. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? In : *The Journal of Clinical Investigation*. septembre 1985. Vol. 76, n° 3, p. 907-912. DOI 10.1172/JCI112088.

CHABNER BA et YOUNG RC, 1973. Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. In : *The Journal of Clinical Investigation*. août 1973. Vol. 52, n° 8, p. 1804-1811. DOI 10.1172/JCI107362.

CHAN ESL et CRONSTEIN BN, 2013. Mechanisms of action of methotrexate. In : *Bulletin of the Hospital for Joint Disease*. 2013. Vol. 71 Suppl. 1, p. S5-8.

CHAN ESL, MONTESINOS MC, FERNANDEZ P, DESAI A, DELANO DL, YEE H, REISS AB, PILLINGER MH, CHEN JF, SCHWARZSCHILD MA, FRIEDMAN SL et CRONSTEIN BN., 2006. Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. In : *British*

Journal of Pharmacology. août 2006. Vol. 148, n° 8, p. 1144-1155. DOI 10.1038/sj.bjp.0706812.

CHELLO PL, SIROTNAK FM et DORICK DM, 1980. Alterations in the kinetics of methotrexate transport during growth of L1210 murine leukemia cells in culture. In : *Molecular Pharmacology*. septembre 1980. Vol. 18, n° 2, p. 274-280.

CHLÁDEK J, SIMKOVÁ M, VANECKOVÁ J, HROCH M, CHLÁDKOVA J, MARTÍNKOVÁ J, VÁVROVÁ J et BERÁNEK M, 2008. The effect of folic acid supplementation on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate during the remission-induction period of treatment for moderate-to-severe plaque psoriasis. In : *European Journal of Clinical Pharmacology*. avril 2008. Vol. 64, n° 4, p. 347-355. DOI 10.1007/s00228-007-0442-x.

CIPRIANI P, RUSCITTI P, CARUBBI F, LIAKOULI V et GIACOMELLI R, 2014. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. In : *Expert Review of Clinical Immunology*. novembre 2014. Vol. 10, n° 11, p. 1519-1530. DOI 10.1586/1744666X.2014.962996.

CREEMERS MC, FRANSSSEN MJ, VAN DE PUTTE LB, GRIBNAU FW et VAN RIEL PL, 1995. Methotrexate in severe ankylosing spondylitis: an open study. In : *The Journal of Rheumatology*. juin 1995. Vol. 22, n° 6, p. 1104-1107.

CRONSTEIN BN, NAIME D et OSTAD E, 1993. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. In : *The Journal of Clinical Investigation*. décembre 1993. Vol. 92, n° 6, p. 2675-2682. DOI 10.1172/JCI116884.

CUTOLO M, BISSO A, SULLI A, FELLI L, BRIATA M, PIZZORNI C et VILLAGGIO B, 2000. Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. In : *The Journal of Rheumatology*. novembre 2000. Vol. 27, n° 11, p. 2551-2557.

CUTOLO M, SULLI A, PIZZORNI C, SERIOLO B et STRAUB RH, 2001. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. août 2001. Vol. 60, n° 8, p. 729-735.

DALRYMPLE JM, STAMP LK, O'DONNELL JL, CHAPMAN PT, ZHANG M et BARCLAY ML, 2008. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. novembre 2008. Vol. 58, n° 11, p. 3299-3308. DOI 10.1002/art.24034.

DE ROTTE MCFJ, DEN BOER E, DE JONG PHP, PLUIJM SMF, CALASAN MB, WEEL AE, HUISMAN AM, GERARDS AH, VAN SCHAEYBROECK B, WULFFRAAT NM, LINDEMANS J, HAZES JMW et DE JONGE R, 2015. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. février 2015. Vol. 74, n° 2, p. 408-414. DOI 10.1136/annrheumdis-2013-203725.

DEN BOER E, 2014. *Therapeutic Drug-Monitoring of Methotrexate-Polyglutamates in Rheumatoid Arthritis*. PhD. Rotterdam, The Netherlands : Erasmus University Medical Center. ISBN/EAN: 978-90-7138-200-0.

DEN BOER E, MEESTERS RJW, VAN ZELST BD, LUIDER TM, HAZES JMW, HEIL SG et DE JONGE R, 2013. Measuring methotrexate polyglutamates in red blood cells: a new LC-MS/MS-based method. In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. février 2013. Vol. 405, n° 5, p. 1673-1681. DOI 10.1007/s00216-012-6581-7.

DERVIEUX T, FURST D, LEIN DO, CAPPS R, SMITH K, WALSH M et KREMER J, 2004. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. septembre 2004. Vol. 50, n° 9, p. 2766-2774. DOI 10.1002/art.20460.

DERVIEUX T, KREMER J, LEIN DO, CAPPS R, BARHAM R, MEYER G, SMITH K, CALDWELL J et FURST DE, 2004. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. In : *Pharmacogenetics*. novembre 2004. Vol. 14, n° 11, p. 733-739.

DERVIEUX T, ZABLOCKI R et KREMER J, 2010. Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. In : *Rheumatology*. décembre 2010. Vol. 49, n° 12, p. 2337-2345. DOI 10.1093/rheumatology/keq216.

DESFONTIS JC, 2010. *Guide pratique des médicaments à usage vétérinaire*. Nantes : Med'com Editions.

DJURIĆ Z, ŠARANAC L, BUDIĆ I, PAVLOVIĆ V et DJORDJEVIĆ J, 2018. Therapeutic role of methotrexate in pediatric Crohn's disease. In : *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 1 août 2018. Vol. 18, n° 3, p. 211-216. DOI 10.17305/bjbms.2018.2792.

DRAKE JC, ALLEGRA CJ, BARAM J, KAUFMAN BT et CHABNER BA, 1987. Effects on dihydrofolate reductase of methotrexate metabolites and intracellular folates formed following methotrexate exposure of human breast cancer cells. In : *Biochemical Pharmacology*. 15 juillet 1987. Vol. 36, n° 14, p. 2416-2418.

DVORAKOVA V, O'REGAN GM et IRVINE AD, 2017. Methotrexate for Severe Childhood Atopic Dermatitis: Clinical Experience in a Tertiary Center. In : *Pediatric Dermatology*. septembre 2017. Vol. 34, n° 5, p. 528-534. DOI 10.1111/pde.13209.

EDELMAN J, BIGGS DF, JAMALI F et RUSSELL AS, 1984. Low-dose methotrexate kinetics in arthritis. In : *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. mars 1984. Vol. 35, n° 3, p. 382-386.

EGAN LJ, SANDBORN WJ, MAYS DC, TREMAINE WJ, FAUQ AH et LIPSKY JJ, 1999. Systemic and intestinal pharmacokinetics of methotrexate in patients with inflammatory bowel disease. In : *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. janvier 1999. Vol. 65, n° 1, p. 29-39. DOI 10.1016/S0009-9236(99)70119-0.

EL-KHALAWANY MA, HASSAN H, SHAABAN D, GHONAIM N et EASSA B, 2013. Methotrexate versus cyclosporine in the treatment of severe atopic dermatitis in children: a multicenter experience from Egypt. In : *European Journal of Pediatrics*. mars 2013. Vol. 172, n° 3, p. 351-356. DOI 10.1007/s00431-012-1893-3.

FABRE G, FABRE I, MATHERLY LH, CANO JP et GOLDMAN ID, 1984. Synthesis and properties of 7-hydroxymethotrexate polyglutamyl derivatives in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 25 avril 1984. Vol. 259, n° 8, p. 5066-5072.

FABRE I, FABRE G et GOLDMAN ID, 1984. Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. In : *Cancer Research*. août 1984. Vol. 44, n° 8, p. 3190-3195.

FAVROT C, STEFFAN J, SEEWALD W et PICCO F, 2010. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. In : *Veterinary Dermatology*. février 2010. Vol. 21, n° 1, p. 23-31. DOI 10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x.

FELIPPE MJB, 2016. Immunosuppressive therapy. In : *Equine Clinical Immunology*. M. Julia B. Felipe. Oxford (UK) : Wiley Blackwell.

FERGUSON DC et HOENIG M, 2018. Glucocorticoids, mineralocorticoids and adrenolytic drugs. In : *Veterinary Pharmacology and Therapeutics - tenth edition*. Jim E. Riviere and Mark G. Papich. New York : Wiley Blackwell. p. 729-762.

FERRARI S et SERRA M, 2015. An update on chemotherapy for osteosarcoma. In : *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2015. Vol. 16, n° 18, p. 2727-2736. DOI 10.1517/14656566.2015.1102226.

FIEHN C, 2011. [The other opinion: nephrotoxicity of low-dose methotrexate - a problem which does not exist]. In : *Zeitschrift Fur Rheumatologie*. décembre 2011. Vol. 70, n° 10, p. 825-826. DOI 10.1007/s00393-011-0909-0.

FLOHR C et IRVINE AD, 2013. Systemic therapies for severe atopic dermatitis in children and adults. In : *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1 septembre 2013. Vol. 132, n° 3, p. 774- 774.e6. DOI 10.1016/j.jaci.2013.03.016.

FORSYTHE P et PATERSON S, 2014. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. In : *The Veterinary Record*. mars 2014. Vol. 174 Suppl 2, p. 13-21. DOI 10.1136/vr.102484.

FUNK RS, VAN HAANDEL L, BECKER ML et LEEDER JS, 2013. Low-dose methotrexate results in the selective accumulation of aminoimidazole carboxamide ribotide in an erythroblastoid cell line. In : *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. octobre 2013. Vol. 347, n° 1, p. 154-163. DOI 10.1124/jpet.113.206672.

GALIVAN J et RHEE MS, 1995. Insulin-dependent suppression in glutamyl hydrolase activity and elevated cellular methotrexate polyglutamates. In : *Biochemical Pharmacology*. 9 novembre 1995. Vol. 50, n° 10, p. 1659-1663.

GEDON NKY et MUELLER RS, 2018. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. In : *Clinical and Translational Allergy*. 2018. Vol. 8, p. 41. DOI 10.1186/s13601-018-0228-5.

GENESTIER L, PAILLOT R, FOURNEL S, FERRARO C, MIOSSEC P et REVILLARD JP, 1998. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. In : *The Journal of Clinical Investigation*. 15 juillet 1998. Vol. 102, n° 2, p. 322-328. DOI 10.1172/JCI2676.

GENESTIER L, PAILLOT R, QUEMENEUR L, IZERADJENE K et REVILLARD JP, 2000. Mechanisms of action of methotrexate. In : *Immunopharmacology*. mai 2000. Vol. 47, n° 2-3, p. 247-257.

GERBENS LA, HAMANN SS, BROUWER MWD, ROEKEVISCH E, LEEFLANG MMG et SPULS PI, 2018. Methotrexate and azathioprine for severe atopic dermatitis: a 5-year follow-up study of a randomized controlled trial. In : *The British Journal of Dermatology*. 2018. Vol. 178, n° 6, p. 1288-1296. DOI 10.1111/bjd.16240.

GLINES KR, STIFF KM, FREEZE M, CLINE A, STROWD LC et FELDMAN SR, 2019. An update on the topical and oral therapy options for treating pediatric atopic dermatitis. In : *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2019. Vol. 20, n° 5, p. 621-629. DOI 10.1080/14656566.2018.1561868.

GODFREY C, SWEENEY K, MILLER K, HAMILTON R et KREMER J, 1998. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *British Journal of Clinical Pharmacology*. octobre 1998. Vol. 46, n° 4, p. 369-376.

GOLDMAN ID et MATHERLY LH, 1985. The cellular pharmacology of methotrexate. In : *Pharmacology & Therapeutics*. 1985. Vol. 28, n° 1, p. 77-102.

GONZALES AJ, HUMPHREY WR, MESSAMORE JE, FLECK TJ, FICI GJ, SHELLY JA, TEEL JF, BMMERT GF, DUNHAM SA, FULLER TE et MCCALL RB, 2013. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. In : *Veterinary Dermatology*. février 2013. Vol. 24, n° 1, p. 48- 53.e11-12. DOI 10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x.

GOUJON C, BÉRARD F, DAHEL K, GUILLOT I, HENNINO A, NOSBAUM A, SAAD N et NICOLAS JF, 2006. Methotrexate for the treatment of adult atopic dermatitis. In : *European journal of dermatology*. avril 2006. Vol. 16, n° 2, p. 155-158.

GOUJON C, VIGUIER M, STAUMONT-SALLÉ D, BERNIER C, GUILLET G, LAHFA M, FERRIER LE BOUEDEC MC, CAMBAZARD F, BOTTIGIOLI D, GRANDE S, DAHEL K, BÉRARD F, RABILLOUD M, MERCIER C et NICOLAS JF, 2018. Methotrexate Versus Cyclosporine in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Phase III Randomized Non-inferiority Trial. In : *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. avril 2018. Vol. 6, n° 2, p. 562- 569.e3. DOI 10.1016/j.jaip.2017.07.007.

GRIM J, CHLÁDEK J et MARTÍNKOVÁ J, 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. In : *Clinical Pharmacokinetics*. 2003. Vol. 42, n° 2, p. 139-151. DOI 10.2165/00003088-200342020-00003.

GUTIERREZ-UREÑA S, MOLINA JF, GARCÍA CO, CUÉLLAR ML et ESPINOZA LR, 1996. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. février 1996. Vol. 39, n° 2, p. 272-276. DOI 10.1002/art.1780390214.

HAMILTON RA et KREMER JM, 1995. The effects of food on methotrexate absorption. In : *The Journal of Rheumatology*. avril 1995. Vol. 22, n° 4, p. 630-632.

HAMILTON RA et KREMER JM, 1997. Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. In : *Br J Rheumatol*. janvier 1997. n° 36 (1), p. 86-90.

HAUSTEIN UF et RYTTER M, 2000. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment. In : *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. septembre 2000. Vol. 14, n° 5, p. 382-388.

HAYASHIDA S, UCHI H, TAKEUCHI S, ESAKI H, MOROI Y et FURUE M, 2011. Significant correlation of serum IL-22 levels with CCL17 levels in atopic dermatitis. In : *Journal of Dermatological Science*. janvier 2011. Vol. 61, n° 1, p. 78-79. DOI 10.1016/j.jdermsci.2010.08.013.

HAYASHIYA S, TANI K, MORIMOTO M, HAYASHI T, HAYASAKI M, NOMURA T, UNE S, NAKAICHI M et TAURA Y, 2002. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. In : *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. février 2002. Vol. 49, n° 1, p. 27-31.

HENDEL J et NYFORS A, 1984a. Nonlinear renal elimination kinetics of methotrexate due to saturation of renal tubular reabsorption. In : *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1984. Vol. 26, n° 1, p. 121-124.

HENDEL J et NYFORS A, 1984b. Pharmacokinetics of methotrexate in erythrocytes in psoriasis. In : *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1984. Vol. 27, n° 5, p. 607-610.

HOEKSTRA M, HAAGSMA C, NEEF C, PROOST J, KNUIF A et VAN DE LAAR M, 2006. Splitting high-dose oral methotrexate improves bioavailability: a pharmacokinetic study in patients with rheumatoid arthritis. In : *The Journal of Rheumatology*. mars 2006. Vol. 33, n° 3, p. 481-485.

HORNUNG N, ELLINGSEN To, ATTERMANN J, STENGAARD-PEDERSEN K et POULSEN JH, 2008. Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy. In : *The Journal of Rheumatology*. septembre 2008. Vol. 35, n° 9, p. 1709-1715.

HUBER AM, 2018. Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies. In : *Pediatric Clinics of North America*. 2018. Vol. 65, n° 4, p. 739-756. DOI 10.1016/j.pcl.2018.04.006.

HUM MC, SMITH AK, LARK RH, WINICK NJ et KAMEN BA, 1997. Evidence for negative feedback of extracellular methotrexate on blasts of acute lymphoblastic leukemia in vitro. In : *Pharmacotherapy*. décembre 1997. Vol. 17, n° 6, p. 1260-1266.

IVEN H et BRASCH H, 1990. Cephalosporins increase the renal clearance of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in rabbits. In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1 mai 1990. Vol. 26, n° 2, p. 139-143. DOI 10.1007/BF02897260.

IZZEDINE H, LAUNAY-VACHER V, KARIE S, CAMELLA C, DE PERSON F et DERAY G, 2005. Is low-dose methotrexate nephrotoxic? Case report and review of the literature. In : *Clinical Nephrology*. octobre 2005. Vol. 64, n° 4, p. 315-319. DOI 10.5414/cnp64315.

JIN SY, LIM WS, SUNG NH, CHEONG KA et LEE AY, 2015. Combination of glucosamine and low-dose cyclosporine for atopic dermatitis treatment: a randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel clinical trial. In : *Dermatologic Therapy*. février 2015. Vol. 28, n° 1, p. 44-51. DOI 10.1111/dth.12163.

JOHNS DG et LOO TL, 1967. Metabolite of 4-Amino-4-deoxy-N10-methylpteroylglutamic Acid (Methotrexate). In : *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1 mars 1967. Vol. 56, n° 3, p. 356-359. DOI 10.1002/jps.2600560310.

JOHNSON TB, NAIR MG et GALIVAN J, 1988. Role of folylpolyglutamate synthetase in the regulation of methotrexate polyglutamate formation in H35 hepatoma cells. In : *Cancer Research*. 1 mai 1988. Vol. 48, n° 9, p. 2426-2431.

JOLIVET J et CHABNER BA, 1983. Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₄ and 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₅ to dihydrofolate reductase. In : *The Journal of Clinical Investigation*. septembre 1983. Vol. 72, n° 3, p. 773-778. DOI 10.1172/JCI111048.

JUNDT JW, BROWNE BA, FIOCCO GP, STEELE AD et MOCK D, 1993. A comparison of low dose methotrexate bioavailability: oral solution, oral tablet, subcutaneous and intramuscular dosing. In : *The Journal of Rheumatology*. novembre 1993. Vol. 20, n° 11, p. 1845-1849.

KIM HJ, AHRENS K, PARK HM et MARSELLA R, 2015. First report in a dog model of atopic dermatitis: expression patterns of protease-activated receptor-2 and thymic stromal lymphopoietin. In : *Veterinary Dermatology*. juin 2015. Vol. 26, n° 3, p. 180-185, e36-37. DOI 10.1111/vde.12203.

KIM YJ, SONG M et RYU JC, 2009. Inflammation in methotrexate-induced pulmonary toxicity occurs via the p38 MAPK pathway. In : *Toxicology*. 27 février 2009. Vol. 256, n° 3, p. 183-190. DOI 10.1016/j.tox.2008.11.016.

KLONOWSKA J, GLEŃ J, NOWICKI RJ et TRZECIAK M, 2018. New Cytokines in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis-New Therapeutic Targets. In : *International Journal of Molecular Sciences*. 9 octobre 2018. Vol. 19, n° 10. DOI 10.3390/ijms19103086.

KLUKOWSKA-RÖTZLER J, CHERVET L, MÜLLER EJ, ROOSJE P, MARTI E et JANDA J, 2013. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. In : *Veterinary Dermatology*. février 2013. Vol. 24, n° 1, p. 54-59. DOI 10.1111/j.1365-3164.2012.01096.x.

KOIZUMI S, CURT GA, FINE RL, GRIFFIN JD et CHABNER BA, 1985. Formation of methotrexate polyglutamates in purified myeloid precursor cells from normal human bone marrow. In : *The Journal of Clinical Investigation*. mars 1985. Vol. 75, n° 3, p. 1008-1014. DOI 10.1172/JCI111761.

KORELL J, DUFFULL SB, DALRYMPLE JM, DRAKE J, ZHANG M, BARCLAY ML et STAMP LK, 2014. Comparison of intracellular methotrexate kinetics in red blood cells with the kinetics in other cell types. In : *British Journal of Clinical Pharmacology*. mars 2014. Vol. 77, n° 3, p. 493-497. DOI 10.1111/bcp.12209.

KORELL J, STAMP LK, BARCLAY ML, DALRYMPLE JM, DRAKE J, ZHANG M et DUFFULL SB, 2013. A population pharmacokinetic model for low-dose methotrexate and its polyglutamated metabolites in red blood cells. In : *Clinical Pharmacokinetics*. juin 2013. Vol. 52, n° 6, p. 475-485. DOI 10.1007/s40262-013-0052-y.

KREMER JM, 1997. Safety, efficacy, and mortality in a long-term cohort of patients with rheumatoid arthritis taking methotrexate: followup after a mean of 13.3 years. In : *Arthritis and Rheumatism*. mai 1997. Vol. 40, n° 5, p. 984-985. DOI 10.1002/art.1780400533.

KREMER JM, GALIVAN J, STRECKFUSS A et KAMEN B, 1986. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. In : *Arthritis and Rheumatism*. juillet 1986. Vol. 29, n° 7, p. 832-835.

KREMER JM et LEE JK, 1986. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. juillet 1986. Vol. 29, n° 7, p. 822-831. DOI 10.1002/art.1780290702.

KREMER JM et LEE JK, 1988. A long-term prospective study of the use of methotrexate in rheumatoid arthritis. Update after a mean of fifty-three months. In : *Arthritis and Rheumatism*. mai 1988. Vol. 31, n° 5, p. 577-584. DOI 10.1002/art.1780310501.

KREMER JM, PETRILLO GF et HAMILTON RA, 1995. Pharmacokinetics and renal function in patients with rheumatoid arthritis receiving a standard dose of oral weekly methotrexate: association with significant decreases in creatinine clearance and renal clearance of the drug after 6 months of therapy. In : *The Journal of Rheumatology*. janvier 1995. Vol. 22, n° 1, p. 38-40.

KREMER, JM et PHELPS CT, 1992. Long-term prospective study of the use of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Update after a mean of 90 months. In : *Arthritis and Rheumatism*. février 1992. Vol. 35, n° 2, p. 138-145. DOI 10.1002/art.1780350203.

KREMER JM, 2004. Toward a better understanding of methotrexate. In : *Arthritis and Rheumatism*. mai 2004. Vol. 50, n° 5, p. 1370-1382. DOI 10.1002/art.20278.

KREMER JM, 2014. Still trying to understand methotrexate. In : *The Journal of Rheumatology*. novembre 2014. Vol. 41, n° 11, p. 2099-2101. DOI 10.3899/jrheum.141081.

KRIVIT W, BRUBAKER C, HARTMANN J, MURPHY ML, PIERCE M et THATCHER G, 1966. Induction of remission in acute leukemia of childhood by combination of prednisone and either 6-mercaptopurine or methotrexate. In : *The Journal of Pediatrics*. juin 1966. Vol. 68, n° 6, p. 965-968.

KWON YS, OH SH, WU WH, BAE BG, LEE HJ, LEE MG et LEE KH, 2010. CC chemokines as potential immunologic markers correlated with clinical improvement of atopic dermatitis patients by immunotherapy. In : *Experimental Dermatology*. mars 2010. Vol. 19, n° 3, p. 246-251. DOI 10.1111/j.1600-0625.2009.00971.x.

LA GRUTTA S, RICHIUSA P, PIZZOLANTI G, MATTINA A, PAJNO GB, CITARRELLA R, PASSALACQUA G et GIORDANO C, 2005. CD4(+)IL-13(+) cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. In : *Allergy*. mars 2005. Vol. 60, n° 3, p. 391-395. DOI 10.1111/j.1398-9995.2005.00733.x.

LEBBE C, BEYELER C, GERBER NJ et REICHEN J, 1994. Intraindividual variability of the bioavailability of low dose methotrexate after oral administration in rheumatoid arthritis. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. juillet 1994. Vol. 53, n° 7, p. 475-477.

LEBRUN-VIGNES B, BACHELEZ H et CHOSIDOW O, 1999. Le méthotrexate en dermatologie: pharmacologie, indications, utilisation et précautions d'emploi. In : *La Revue de Médecine Interne*. 1 août 1999. Vol. 20, p. 384s-392s. DOI 10.1016/S0248-8663(99)80512-8.

LECLERE M, 2017. Corticosteroids and Immune Suppressive Therapies in Horses. In : *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. avril 2017. Vol. 33, n° 1, p. 17-27. DOI 10.1016/j.cveq.2016.11.008.

LIN Y, DUEKER SR, FOLLETT JR, FADEL JG, ARJOMAND A, SCHNEIDER PD, MILLER JW, GREEN R, BUCHHOLZ BA, VOGEL JS, PHAIR RD et CLIFFORD AJ, 2004. Quantitation of in vivo human folate metabolism. In : *The American Journal of Clinical Nutrition*. septembre 2004. Vol. 80, n° 3, p. 680-691. DOI 10.1093/ajcn/80.3.680.

LONDON IM et SHEMIN D, 1949. Heme synthesis and red blood cell dynamics in normal humans and in subjects with polycythemia vera, sickle-cell anemia, and pernicious anemia. In : *The Journal of Biological Chemistry*. mai 1949. Vol. 179, n° 1, p. 463-484.

LOU H, LU J, CHOI EB, OH MH, JEONG M, BARMETTLER S, ZHU Z et ZHENG T, 2017. Expression of IL-22 in the Skin Causes Th2-Biased Immunity, Epidermal Barrier Dysfunction, and Pruritus via Stimulating Epithelial Th2 Cytokines and the GRP Pathway. In : *Journal of Immunology*. 01 2017. Vol. 198, n° 7, p. 2543-2555. DOI 10.4049/jimmunol.1600126.

LU J, WU K, ZENG Q, XIANG Y, GAO L et HUANG J, 2018. Serum interleukin-31 level and pruritus in atopic dermatitis: A Meta-analysis. In : *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*. 28 février 2018. Vol. 43, n° 2, p. 124-130. DOI 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.003.

LUCAS CJ, DIMMITT SB et MARTIN JH, 2019. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis-A review. In : *British Journal of Clinical Pharmacology*. octobre 2019. Vol. 85, n° 10, p. 2228-2234. DOI 10.1111/bcp.14057.

LYAKHOVITSKY A, BARZILAI A, HEYMAN R, BAUM S, AMICHAÏ B, SOLOMON M, SHPIRO D et TRAU H, 2010. Low-dose methotrexate treatment for moderate-to-severe atopic dermatitis in adults. In : *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. janvier 2010. Vol. 24, n° 1, p. 43-49. DOI 10.1111/j.1468-3083.2009.03351.x.

MAJEWSKA A, GAJEWSKA M, DEMBELE K, MACIEJEWSKI H, PROSTEK A et JANK M, 2016. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. In : *BMC veterinary research*. 23 août 2016. Vol. 12, n° 1, p. 174. DOI 10.1186/s12917-016-0805-6.

MARSELLA R et GIROLOMONI G, 2009. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. In : *The Journal of Investigative Dermatology*. octobre 2009. Vol. 129, n° 10, p. 2351-2357. DOI 10.1038/jid.2009.98.

MASUDA M, IZUKA Y, YAMAZAKI M, NISHIGAKI R, KATO Y, NIINUMA K, SUZUKI H et SUGIYAMA Y, 1997. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. In : *Cancer Research*. 15 août 1997. Vol. 57, n° 16, p. 3506-3510.

MATHERS D et RUSSELL AS, 1993. Methotrexate. In : *Second-line agents in the treatment of rheumatic diseases*. New York: Jonathan S. Dixon and Daniel E. Furst. Inflammatory disease and therapy series, 9. p. 431-432.

MATSUNAGA MC et YAMAUCHI PS, 2016. IL-4 and IL-13 Inhibition in Atopic Dermatitis. In : *Journal of drugs in dermatology: JDD*. 1 août 2016. Vol. 15, n° 8, p. 925-929.

MAY KP, WEST SG, MCDERMOTT MT et HUFFER WE, 1994. The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. In : *Arthritis and Rheumatism*. février 1994. Vol. 37, n° 2, p. 201-206. DOI 10.1002/art.1780370208.

MENTING SP, DEKKER PM, LIMPENS J, HOOFT L et SPULS PI, 2016. Methotrexate Dosing Regimen for Plaque-type Psoriasis: A Systematic Review of the Use of Test-dose, Start-dose, Dosing Scheme, Dose Adjustments, Maximum Dose and Folic Acid Supplementation. In : *Acta Dermato-Venereologica*. janvier 2016. Vol. 96, n° 1, p. 23-28. DOI 10.2340/00015555-2081.

MINARD-COLIN V, BRUGIÈRES L, REITER A, CAIRO MS, GROSS TG, WOESSMANN W, BURKHARDT B, SANDLUND JT, WILLIAMS D, PILLON M, HORIBE K, AUPERIN A, LE DELEY MC, ZIMMERMAN M, PERKINS SL, RAPHAEL M, LAMANT L, KLAPPER W, MUSSOLIN L, POIREL HA, MACINTYRE E, DAMM-WELK C, ROSOLEN A et PATTE C, 2015. Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents: Progress Through Effective Collaboration, Current Knowledge, and Challenges Ahead. In : *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20 septembre 2015. Vol. 33, n° 27, p. 2963-2974. DOI 10.1200/JCO.2014.59.5827.

MOUTERDE G, BAILLET A, GAUJOUX-VIALA C, CANTAGREL A, WENDLING D, LE LOËT X et SCHAEVERBEKE T, 2011. Optimizing methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: a

systematic literature review. In : *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. décembre 2011. Vol. 78, n° 6, p. 587-592. DOI 10.1016/j.jbspin.2011.01.010.

MOYAERT H, VAN BRUSSEL L, BOROWSKI S, ESCALADA M, MAHABIR SP, WALTERS RR et STEGEMANN MR, 2017. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. In : *Veterinary Dermatology*. 14 septembre 2017. DOI 10.1111/vde.12478.

NAKASHIMA-MATSUSHITA N, HOMMA T, YU S, MATSUDA T, SUNAHARA N, NAKAMURA T, TSUKANO M, RATNAM M et MATSUYAMA T, 1999. Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. août 1999. Vol. 42, n° 8, p. 1609-1616. DOI 10.1002/1529-0131(199908)42:8<1609::AID-ANR7>3.0.CO;2-L.

NAST A, GISONDI P, ORMEROD AD, SAIAG P, SMITH C, SPULS PI, ARENBERGER P, BACHELEZ H, BARKER J, DAUDEN E, DE JONG EM, FEIST E, JACOBS A, JOBLING R, KEMÉNY L, MACCARONE M, MROWIETZ U, PAPP KA, PAUL C, REICH K, ROSUMECK S, TALME T, THIO HB, VAN DE KERKHOF P, WERNER RN et YAWALKAR N, 2015. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris--Update 2015--Short version--EDF in cooperation with EADV and IPC. In : *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. décembre 2015. Vol. 29, n° 12, p. 2277-2294. DOI 10.1111/jdv.13354.

NESHER G, OSBORN TG et MOORE TL, 1996. In vitro effects of methotrexate on polyamine levels in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. In : *Clinical and Experimental Rheumatology*. août 1996. Vol. 14, n° 4, p. 395-399.

NESHER G, MATES M et ZEVIN S, 2003. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. février 2003. Vol. 48, n° 2, p. 571-572. DOI 10.1002/art.10766.

NIWA Y, 2000. Elevated RANTES levels in plasma or skin and decreased plasma IL-10 levels in subsets of patients with severe atopic dermatitis. In : *Archives of Dermatology*. janvier 2000. Vol. 136, n° 1, p. 125-126. DOI 10.1001/archderm.136.1.125.

NUERNBERG B, KOEHNKE R, SOLSKY M, HOFFMAN J et FURST DE, 1990. Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. In : *Arthritis and Rheumatism*. juin 1990. Vol. 33, n° 6, p. 898-902.

NUTTALL T, REECE D et ROBERTS E, 2014. Life-long diseases need life-long treatment: long-term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. In : *The Veterinary Record*. mars 2014. Vol. 174, n° Suppl 2, p. 3-12. DOI 10.1136/vr.102471.

NUTTALL TJ, MARSELLA R, ROSENBAUM MR, GONZALES AJ et FADOK VA, 2019. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. In : *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juin 2019. Vol. 254, n° 11, p. 1291-1300. DOI 10.2460/javma.254.11.1291.

OGUEY D, KÖLLIKER F, GERBER NJ et REICHEN J, 1992. Effect of food on the bioavailability of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. In : *Arthritis and Rheumatism*. juin 1992. Vol. 35, n° 6, p. 611-614.

OLIVRY T, BENSIGNOR E, FAVROT C, GRIFFIN CE, HILL PB, MUELLER RS, PLANT JD, WILLIAMS HC et INTERNATIONAL COMMITTEE OF ALLERGIC DISEASES OF ANIMALS (ICADA), 2018. Development of a core outcome set for therapeutic clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis (COSCAD'18). In : *BMC veterinary research*. 16 août 2018. Vol. 14, n° 1, p. 238. DOI 10.1186/s12917-018-1569-y.

OLIVRY T, SARIDOMICHELAKIS M, NUTTALL T, BENSIGNOR E, GRIFFIN CE, HILL PB et INTERNATIONAL COMMITTEE ON ALLERGIC DISEASES OF ANIMALS (ICADA), 2014. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. In : *Veterinary Dermatology*. avril 2014. Vol. 25, n° 2, p. 77-85, e25. DOI 10.1111/vde.12107.

OLSEN EA, 1991. The pharmacology of methotrexate. In : *Journal of the American Academy of Dermatology*. août 1991. Vol. 25, n° 2 Pt 1, p. 306-318.

ORTIZ Z, SHEA B, SUAREZ-ALMAZOR ME, MOHER D, WELLS GA et TUGWELL P, 1998. The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of randomized controlled trials. In : *The Journal of Rheumatology*. janvier 1998. Vol. 25, n° 1, p. 36-43.

PANDYA S, AGGARWAL A et MISRA R, 2002. Methotrexate twice weekly vs once weekly in rheumatoid arthritis: a pilot double-blind, controlled study. In : *Rheumatology International*. mai 2002. Vol. 22, n° 1, p. 1-4.

PANETTA JC, PAUGH SW et EVANS WE, 2013. Mathematical modeling of folate metabolism. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*. octobre 2013. Vol. 5, n° 5, p. 603-613. DOI 10.1002/wsbm.1227.

PANETTA JC, YANISHEVSKI Y, PUI CH, SANDLUND JT, RUBNITZ J, RIVERA GK, RIBEIRO R, EVANS WE et RELLING MV, 2002. A mathematical model of in vivo methotrexate accumulation in acute lymphoblastic leukemia. In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. novembre 2002. Vol. 50, n° 5, p. 419-428. DOI 10.1007/s00280-002-0511-x.

PAPICH MG, 2009. Immunosuppressive drugs and cyclosporine. In : *Veterinary pharmacology and therapeutics - ninth edition*. Jim E. Riviere and Mark G. Papich. Ames : Wiley-Blackwell.

PIN D, FOUREL I, LUSSIEZ C, GUINET C, BERNY P et VIDEMONT E, 2012. Pharmacokinetic and toxicity of methotrexate in the dog and its efficacy in canine atopic dermatitis: Fc-52. In : *Veterinary Dermatology*. 1 juillet 2012. Vol. 23 (Suppl. 1), p. 45-46.

PINEDO HM, ZAHARKO DS, BULL J et CHABNER BA, 1977. The relative contribution of drug concentration and duration of exposure to mouse bone marrow toxicity during continuous methotrexate infusion. In : *Cancer Research*. février 1977. Vol. 37, n° 2, p. 445-450.

PREY S et PAUL C, 2009. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate-associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. In : *The British Journal of Dermatology*. mars 2009. Vol. 160, n° 3, p. 622-628. DOI 10.1111/j.1365-2133.2008.08876.x.

PUÉCHAL X, PAGNOUX C, PERRODEAU E, HAMIDOU M, BOFFA JJ, KYNDT X, LIFERMANN F, PAPO T, MERRIEN D, SMAIL A, DELAVAL P, HANROTEL-SALIOU C, IMBERT B, KHOUATRA C, LAMBERT M, LESKÉ C, LY KH, PERTUISET E, ROBLOT P, RUIVARD M, SUBRA JF, VIALARD JF, TERRIER B, COHEN P, MOUTHON L, LE JEUNNE C, RAVAUD P, GUILLEVIN L et FRENCH VASCULITIS STUDY GROUP, 2016. Long-Term Outcomes Among Participants in the WEGENT Trial of Remission-Maintenance Therapy for Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) or Microscopic Polyangiitis. In : *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*. mars 2016. Vol. 68, n° 3, p. 690-701. DOI 10.1002/art.39450.

QUÉMÉNEUR L, MICHALLET MC, FERRARO-PEYRET C, SAINT-MÉZARD P, BENETIÈRE J, DUCLUZEAU MT, NICOLAS JF et REVILLARD JP, 2003. Immunosuppressive antimetabolites inhibit induction of contact hypersensitivity while lymphoablative drugs also prevent its expression. In : *European journal of dermatology: EJD*. décembre 2003. Vol. 13, n° 6, p. 540-547.

RAHMAN SI, SIEGFRIED E, FLANAGAN KH et ARMBRECHT ES, 2014. The methotrexate polyglutamate assay supports the efficacy of methotrexate for severe inflammatory skin disease in children. In : *Journal of the American Academy of Dermatology*. février 2014. Vol. 70, n° 2, p. 252-256. DOI 10.1016/j.jaad.2013.10.001.

RASHMIR-RAVEN AM, 2018. Disorders of the skin. In : *Equine internal medicine - fourth edition*. Stephen M. Reed, Warwick M. Bayly and Debra C. Sellon. Saint Louis : Elsevier.

RESTREPO LF, GIRALDO R, LONDOÑO J, PINZÓN C, CORTES A, BALLESTEROS G et SANTOS AM, 2016. Pharmacogenetics of methotrexate in rheumatoid arthritis: A systematic review. In : *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*. 1 avril 2016. Vol. 23, n° 2, p. 102-114. DOI 10.1016/j.rcreue.2016.08.002.

REU S, NEREGÅRD P, AF KLINT E, KOROTKOVA M et CATRINA AI, 2013. Synovial membrane immunohistology in early-untreated rheumatoid arthritis reveals high expression of catabolic bone markers that is modulated by methotrexate. In : *Arthritis Research & Therapy*. 2013. Vol. 15, n° 6, p. R205. DOI 10.1186/ar4398.

Rheumatoid Arthritis Clinical Trial Archive Group, 1995. The effect of age and renal function on the efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *The Journal of Rheumatology*. février 1995. Vol. 22, n° 2, p. 218-223.

RODENHUIS S, KREMER JM et BERTINO JR, 1987. Increase of dihydrofolate reductase in peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients treated with low-dose oral methotrexate. In : *Arthritis and Rheumatism*. avril 1987. Vol. 30, n° 4, p. 369-374. DOI 10.1002/art.1780300402.

ROSENBLATT DS et WHITEHEAD VM, 1983. Methotrexate polyglutamates in cultured human cells. In : *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1983. Vol. 163, p. 275-285. DOI 10.1007/978-1-4757-5241-0_21.

ROTHERM L, ARONHEIM A et ASSARAF YG, 2003. Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 14 mars 2003. Vol. 278, n° 11, p. 8935-8941. DOI 10.1074/jbc.M209578200.

SAKTHISWARY R et SURESH E, 2014. Methotrexate in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its efficacy. In : *Lupus*. mars 2014. Vol. 23, n° 3, p. 225-235. DOI 10.1177/0961203313519159.

SALLIOT C et VAN DER HEIJDE D, 2009. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. juillet 2009. Vol. 68, n° 7, p. 1100-1104. DOI 10.1136/ard.2008.093690.

SCHIFF MH, JAFFE JS et FREUNDLICH B, 2014. Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses ≥ 15 mg may be overcome with subcutaneous administration. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. août 2014. Vol. 73, n° 8, p. 1549-1551. DOI 10.1136/annrheumdis-2014-205228.

SCHLOTTER YM, RUTTEN VPMG, RIEMERS FM, KNOL EF et WILLEMSE T, 2011. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 septembre 2011. Vol. 143, n° 1-2, p. 20-26. DOI 10.1016/j.vetimm.2011.05.025.

SCHMEDT N, ANDERSOHN F et GARBE E, 2012. Signals of progressive multifocal leukoencephalopathy for immunosuppressants: a disproportionality analysis of spontaneous reports within the US Adverse Event Reporting System (AERS). In : *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. novembre 2012. Vol. 21, n° 11, p. 1216-1220. DOI 10.1002/pds.3320.

SCHRØDER H, 1987. Methotrexate kinetics in myeloid bone marrow cells and peripheral neutrophils. In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1987. Vol. 19, n° 1, p. 42-46.

SCHRØDER H et FOGH K, 1988. Methotrexate and its polyglutamate derivatives in erythrocytes during and after weekly low-dose oral methotrexate therapy of children with acute lymphoblastic leukemia. In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1988. Vol. 21, n° 2, p. 145-149.

SCHRØDER H, FOGH K et HERLIN T, 1988. In vivo decline of methotrexate and methotrexate polyglutamates in age-fractionated erythrocytes. In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1988. Vol. 21, n° 2, p. 150-155.

SEIDEMAN P, BECK O, EKSBORG S et WENNBERG M, 1993. The pharmacokinetics of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in patients with rheumatoid arthritis. In : *British Journal of Clinical Pharmacology*. avril 1993. Vol. 35, n° 4, p. 409-412. DOI 10.1111/j.1365-2125.1993.tb04158.x.

SHAH N, ALHUSAYEN R, WALSH S et SHEAR NH, 2018. Methotrexate in the Treatment of Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Retrospective Study. In : *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. octobre 2018. Vol. 22, n° 5, p. 484-487. DOI 10.1177/1203475418781336.

SHEA B, SWINDEN MV, TANJONG GHOGOMU E, ORTIZ Z, KATCHAMART W, RADER T, BOMBARDIER C, WELLS GA et TUGWELL P, 2013. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. In : *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 31 mai 2013. n° 5, p. CD000951. DOI 10.1002/14651858.CD000951.pub2.

SHIDARA K, HOSHI D, INOUE E, YAMADA T, NAKAJIMA A, TANIGUCHI A, HARA M, MOMOHARA S, KAMATANI N et YAMANAKA H, 2010. Incidence of and risk factors for interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis in a large Japanese observational cohort, IORRA. In : *Modern Rheumatology*. juin 2010. Vol. 20, n° 3, p. 280-286. DOI 10.1007/s10165-010-0280-z.

SIROTNAK FM et MOCCIO DM, 1980. Pharmacokinetic basis for differences in methotrexate sensitivity of normal proliferative tissues in the mouse. In : *Cancer Research*. avril 1980. Vol. 40, n° 4, p. 1230-1234.

SMOLEN JS, LANDEWÉ R, BIJLSMA J, BURMESTER G, CHATZIDIONYSIOU K, DOUGADOS M, NAM J, RAMIRO S, VOSHAAR M, VAN VOLLENHOVEN R, ALETAHA D, ARINGER M, BOERS M, BUCKLEY CD, BUTTGEREIT F, BYKERK V, CARDIEL M, COMBE Be, CUTOLO M, VAN EIJK-HUSTINGS Y, EMERY P, FINCKH A, GABAY C, GOMEZ-REINO J, GOSSEC L, GOTTENBERG JE, HAZES JMW, HUIZINGA T, JANI M, KARATEEV D, KOULOUMAS M, KVIEN T, LI Z, MARIETTE X, MCINNES I, MYSLER E, NASH P, PAVELKA K, POÓR G, RICHEZ C, VAN RIEL P, RUBBERT-ROTH A, SAAG K, DA SILVA J, STAMM T, TAKEUCHI T, WESTHOVENS R, DE WIT M et VAN DER HEIJDE D, 2017. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. In : *Annals of the Rheumatic Diseases*. juin 2017. Vol. 76, n° 6, p. 960-977. DOI 10.1136/annrheumdis-2016-210715.

SONGSIRIDEJ N et FURST DE, 1990. Methotrexate--the rapidly acting drug. In : *Bailliere's Clinical Rheumatology*. décembre 1990. Vol. 4, n° 3, p. 575-593.

SOUZA CP, ROSYCHUK RAW, CONTRERAS ET, SCHISSLER JR et SIMPSON AC, 2018. A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. In : *Veterinary Dermatology*. décembre 2018. Vol. 29, n° 6, p. 489-e164. DOI 10.1111/vde.12682.

STAMP LK, O'DONNELL JL, CHAPMAN PT, ZHANG M, FRAMPTON C, JAMES J et BARCLAY ML, 2009. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. In : *Arthritis and Rheumatism*. août 2009. Vol. 60, n° 8, p. 2248-2256. DOI 10.1002/art.24653.

STAMP LK, O'DONNELL JL, CHAPMAN PT, ZHANG M, JAMES J, FRAMPTON C et BARCLAY ML, 2010. Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in

rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. In : *Arthritis and Rheumatism*. février 2010. Vol. 62, n° 2, p. 359-368. DOI 10.1002/art.27201.

SWANSON DL, BARNES SA, MENGDEN KOON SJ et EL-AZHARY RA, 2007. Caffeine consumption and methotrexate dosing requirement in psoriasis and psoriatic arthritis. In : *International Journal of Dermatology*. février 2007. Vol. 46, n° 2, p. 157-159. DOI 10.1111/j.1365-4632.2006.02954.x.

SWIERKOT J et SZECHIŃSKI J, 2006. Methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *Pharmacological reports: PR*. août 2006. Vol. 58, n° 4, p. 473-492.

TAKAHASHI C, KANEKO Y, OKANO Y, TAGUCHI H, OSHIMA H, IZUMI K, YAMAOKA K et TAKEUCHI T, 2017a. Association of erythrocyte methotrexate-polyglutamate levels with the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a 76-week prospective study. In : *RMD open*. 2017. Vol. 3, n° 1, p. e000363. DOI 10.1136/rmdopen-2016-000363.

TAKAHASHI C, KANEKO Y, OKANO Y, TAGUCHI H, OSHIMA H, IZUMI K, YAMAOKA K et TAKEUCHI T, 2017b. Association of erythrocyte methotrexate-polyglutamate levels with the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a 76-week prospective study. In : *RMD Open*. 3 janvier 2017. Vol. 3, n° 1. DOI 10.1136/rmdopen-2016-000363.

TERESI ME, CROM WR, CHOI KE, MIRRO J et EVANS WE, 1987. Methotrexate bioavailability after oral and intramuscular administration in children. In : *The Journal of Pediatrics*. mai 1987. Vol. 110, n° 5, p. 788-792.

TIAN H et CRONSTEIN BN, 2007. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. In : *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*. 2007. Vol. 65, n° 3, p. 168-173.

TISHLER M, CASPI D, HALPERIN Z, BARATZ M, MOSHKOWITZ M et YARON M, 1992. A prospective analysis of liver biopsies in rheumatoid arthritis patients receiving long term methotrexate therapy. In : *Rheumatology International*. 1 mars 1992. Vol. 12, n° 1, p. 39-41. DOI 10.1007/BF00246875.

TIZARD IR, 2013. Drugs and other agents that affect the immune system. In : *Veterinary Immunology - ninth edition*. St Louis, Missouri : Elsevier.

TOTRI CR, EICHENFIELD LF, LOGAN K, PROUDFOOT L, SCHMITT J, LARA-CORRALES I, SUGARMAN J, TOM W, SIEGFRIED E, CORDORO K, PALLER AS et FLOHR C, 2017. Prescribing practices for systemic agents in the treatment of severe pediatric atopic dermatitis in the US and Canada: The PeDRA TREAT survey. In : *Journal of the American Academy of Dermatology*. février 2017. Vol. 76, n° 2, p. 281-285. DOI 10.1016/j.jaad.2016.09.021.

TOUTAIN PL et BOUSQUET-MÉLOU A, 2004. Plasma clearance. In : *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. décembre 2004. Vol. 27, n° 6, p. 415-425. DOI 10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x.

TSAKOK T et FLOHR C, 2014. Methotrexate vs. ciclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis in children: a critical appraisal. In : *The British Journal of Dermatology*. mars 2014. Vol. 170, n° 3, p. 496-498; discussion 498-499. DOI 10.1111/bjd.12820.

URQUHART BL, GREGOR JC, CHANDE N, KNAUER MJ, TIRONA RG et KIM RB, 2010. The human proton-coupled folate transporter (hPCFT): modulation of intestinal expression and function by drugs. In : *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. février 2010. Vol. 298, n° 2, p. G248-254. DOI 10.1152/ajpgi.00224.2009.

VALERINO DM, JOHNS DG, ZAHARKO DS et OLIVERIO VT, 1972. Studies of the metabolism of methotrexate by intestinal flora. I. Identification and study of biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-methylptericoic acid. In : *Biochemical Pharmacology*. 15 mars 1972. Vol. 21, n° 6, p. 821-831. DOI 10.1016/0006-2952(72)90125-6.

VAN ROON EN et VAN DE LAAR MFJ, 2010. Methotrexate bioavailability. In : *Clinical and Experimental Rheumatology*. octobre 2010. Vol. 28, n° 5 Suppl 61, p. S27-32.

VANDENABEELE SIJ, WHITE SD, AFFOLTER VK, KASS PH et IHRKE PJ, 2004. Pemphigus foliaceus in the horse: a retrospective study of 20 cases. In : *Veterinary Dermatology*. décembre 2004. Vol. 15, n° 6, p. 381-388. DOI 10.1111/j.1365-3164.2004.00423.x.

VERGNE P, LIAGRE B, BERTIN P, COOK-MOREAU J, TREVES R, BENEYTOUT JL et RIGAUD M, 1998. Methotrexate and cyclooxygenase metabolism in cultured human rheumatoid synoviocytes. In : *The Journal of Rheumatology*. mars 1998. Vol. 25, n° 3, p. 433-440.

VOLK EL et SCHNEIDER E, 2003. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. In : *Cancer Research*. 1 septembre 2003. Vol. 63, n° 17, p. 5538-5543.

WAKUGAWA M, HAYASHI K, NAKAMURA K et TAMAKI K, 2001. Evaluation of mite allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis patients: association between IL-13 and mite-specific IgE levels. In : *Journal of Dermatological Science*. février 2001. Vol. 25, n° 2, p. 116-126.

WANG YM, SUTOW WW, ROMSDAHL MM et PEREZ C, 1979. Age-related pharmacokinetics of high-dose methotrexate in patients with osteosarcoma. In : *Cancer Treatment Reports*. mars 1979. Vol. 63, n° 3, p. 405-410.

WASCHER TC, HERMANN J, BREZINSCHKEK HP, BREZINSCHKEK R, WILDERS-TRUSCHNIG M, RAINER F et KREJS GJ, 1994. Cell-type specific response of peripheral blood lymphocytes to methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. In : *The Clinical Investigator*. juillet 1994. Vol. 72, n° 7, p. 535-540.

WATELET B, SAMSON M, DE BOYSSON H et BIENVENU B, 2017. Treatment of giant-cell arteritis, a literature review. In : *Modern Rheumatology*. septembre 2017. Vol. 27, n° 5, p. 747-754. DOI 10.1080/14397595.2016.1266070.

WEIGAND M, FREI E, GRAF N et WIESSLER M, 2000. Comparative analysis of methotrexate polyglutamates in lymphoblast preparations from bone marrow and blood, and the

contribution of residual red blood cells. In : *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. juillet 2000. Vol. 126, n° 7, p. 407-411.

WEINBLATT ME, TRENTHAM DE, FRASER PA, HOLDSWORTH DE, FALCHUK KR, WEISSMAN BN et COBLYN JS, 1988. Long-term prospective trial of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. In : *Arthritis & Rheumatism*. 1 février 1988. Vol. 31, n° 2, p. 167-175. DOI 10.1002/art.1780310203.

WEINSTEIN GD et FROST P, 1971. Methotrexate for psoriasis. A new therapeutic schedule. In : *Archives of Dermatology*. janvier 1971. Vol. 103, n° 1, p. 33-38.

WHITE SD, MAXWELL LK, SZABO NJ, HAWKINS JL et KOLLIAS-BAKER C, 2005. Pharmacokinetics of azathioprine following single-dose intravenous and oral administration and effects of azathioprine following chronic oral administration in horses. In : *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2005. Vol. 66, n° 9, p. 1578-1583.

WHITING-O'KEEFE QE, FYE KH et SACK KD, 1991. Methotrexate and histologic hepatic abnormalities: a meta-analysis. In : *The American Journal of Medicine*. juin 1991. Vol. 90, n° 6, p. 711-716.

WHITLEY NT et DAY MJ, 2011. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. In : *The Journal of Small Animal Practice*. février 2011. Vol. 52, n° 2, p. 70-85. DOI 10.1111/j.1748-5827.2011.01024.x.

WIDEMANN BC et ADAMSON PC, 2006. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. In : *The Oncologist*. juin 2006. Vol. 11, n° 6, p. 694-703. DOI 10.1634/theoncologist.11-6-694.

WIELA-HOJENSKA A, ORZECZOWSKA-JUZWENKO K, SWIERKOT J, WILAND P, HURKACZ M et SZECHINSKI J, 2004. Monitoring methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. In : *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. août 2004. Vol. 42, n° 8, p. 434-441.

WIELINGA P, HOOIJBERG JH, GUNNARSDOTTIR S, KATHMANN I, REID G, ZELCER N, VAN DER BORN K, DE HAAS Ma, VAN DER HEIJDEN I, KASPERS G, WIJNHOLDS J, JANSEN G, PETERS G et BORST P, 2005. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. In : *Cancer Research*. 15 mai 2005. Vol. 65, n° 10, p. 4425-4430. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-2810.

WILSON PM, DANENBERG PV, JOHNSTON PG, LENZ HJ et LADNER RD, 2014. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. In : *Nature Reviews. Clinical Oncology*. mai 2014. Vol. 11, n° 5, p. 282-298. DOI 10.1038/nrclinonc.2014.51.

WINFIELD LD, WHITE SD, AFFOLTER VK, RENIER AC, DAWSON D, OLIVRY T, OUTERBRIDGE CA, WANG YH, IYORI K et NISHIFUJI K, 2013. Pemphigus vulgaris in a Welsh pony stallion: case report and demonstration of antidesmoglein autoantibodies. In : *Veterinary Dermatology*. avril 2013. Vol. 24, n° 2, p. 269-e60. DOI 10.1111/vde.12002.

WOOLF RT, WEST SL, ARENAS-HERNANDEZ M, HARE N, PETERS VAN TON AM, LEWIS CM, MARINAKI AM, BARKER JNWN et SMITH CH, 2012. Methotrexate polyglutamates as a marker of patient compliance and clinical response in psoriasis: a single-centre prospective study. In : *The British Journal of Dermatology*. juillet 2012. Vol. 167, n° 1, p. 165-173. DOI 10.1111/j.1365-2133.2012.10881.x.

ZAGER RF, FRISBY SA et OLIVERIO VT, 1973. The effects of antibiotics and cancer chemotherapeutic agents on the cellular transport and antitumor activity of methotrexate in L1210 murine leukemia. In : *Cancer Research*. juillet 1973. Vol. 33, n° 7, p. 1670-1676.

ZHAO R, DIOP-BOVE N, VISENTIN M et GOLDMAN ID, 2011. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. In : *Annual Review of Nutrition*. 21 août 2011. Vol. 31, p. 177-201. DOI 10.1146/annurev-nutr-072610-145133.

ZHAO R et GOLDMAN ID, 2003. Resistance to antifolates. In : *Oncogene*. 20 octobre 2003. Vol. 22, n° 47, p. 7431-7457. DOI 10.1038/sj.onc.1206946.

ZOLLER L, RAMON M et BERGMAN R, 2008. Low dose methotrexate therapy is effective in late-onset atopic dermatitis and idiopathic eczema. In : *The Israel Medical Association journal: IMAJ*. juin 2008. Vol. 10, n° 6, p. 413-414.

ZONNEVELD IM, BAKKER WK, DIJKSTRA PF, BOS JD, VAN SOESBERGEN RM et DINANT HJ, 1996. Methotrexate osteopathy in long-term, low-dose methotrexate treatment for psoriasis and rheumatoid arthritis. In : *Archives of Dermatology*. février 1996. Vol. 132, n° 2, p. 184-187.

Annexe 1 : Protocole d'étude clinique

« Utilisation du méthotrexate versus ciclosporine dans le traitement de la dermatite atopique canine (DAc) »

Investigateur / Directeur d'étude : **Antoine ROSTANG**

Rédacteur du protocole : **Antoine ROSTANG**

Approbation par le comité d'éthique en date du **18 nov 2017, Avis N°1738**

Comité de pilotage du projet :

- Antoine ROSTANG (résident/doctorant – directeur d'étude)
- Philippe BERNY (Prof, res ECVPT)
- Bernadette ESPANA (Ingénieure d'étude – responsable partie analytique)
- Didier PIN (Prof, res ECVD – dermatologue vétérinaire)
- Caroline PROUILLAC (Pharmacien, MC)
- Pierre-Louis TOUTAIN (Prof em, res ECVPT)

Principaux investigateurs :

Pour les écoles vétérinaires :

Noms	Qualification	Ecole	Rôle dans l'essai clinique
MOSCA Marion	DVM, dipl ECVD, MC	VetAgro Sup	Dermatologue: recrutement et suivi des cas, encadrement clinique pour VetAgroSup
PANZUTI Pauline	DVM, résidente ECVD	VetAgro Sup	Dermatologue: recrutement et suivi des cas
MAACHE Mimoun	Pharmacien, pHd, PH	VetAgro Sup	Pharmacien: responsable préparations pharmaceutiques
CADIERGUES Marie-Christine	DVM, dipl ECVD, pHd, HDR, PR	ENVT	Dermatologue: recrutement et suivi des cas, encadrement clinique pour ENVT
LECRU Line	DVM, résidente ECVD, MCC	ENVT	Dermatologue: recrutement et suivi des cas
PRESSANTI Charline	DVM, dipl ECVD, PH	ENVT	Dermatologue: recrutement et suivi des cas
COMBARROS Daniel	DVM, résident ECVD, AERC	ENVT	Dermatologue: recrutement et suivi des cas
BRIAND Amaury	DVM, résident ECVD, AERC	ENVA	Dermatologue: recrutement et suivi des cas, encadrement clinique pour ENVA
CROSZAS Odile	DVM, PH	ENVA	Dermatologue: recrutement et suivi des cas

Pour les centres clinique privés :

Cliniciens privés	Qualifications	Lieux d'exercice
GERMAIN Pierre-Antoine	DVM, dipl ECVD	74
PRELAUD Pascal	DVM, dipl ECVD	78
VIDEMONT Emilie	DVM, dipl ECVD	74
BUENDIA Estelle	DVM, résident ECVD	69/42
VIAUD Sébastien	DVM, dipl ECVD	33
LAFFORT Catherine	DVM, dipl ECVD	33
DEVEZE Marc	DVM, ESVD	13
BORD Thierry	DVM, CES	13
FORGET Marc	DVM, CES	73

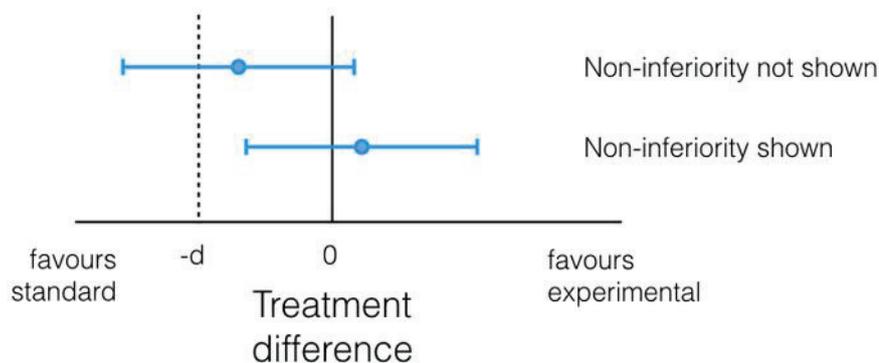
1. BUT

QUESTION PRINCIPALE :

La question principale à laquelle ce projet a vocation à répondre est la suivante (critère principal) :

Mesure-t-on, après un délai de 6 mois de traitement, avec un risque 5%, une borne inférieure de l'intervalle de confiance 90% de la différence MTX – Ciclosporine des scores CADESI-04 de moins de 20% ?

Ce delta de 20% a été défini comme étant le delta maximum qui serait accepté par les cliniciens pour utiliser le MTX à la place de la ciclosporine.



Il s'agit donc d'un essai de non infériorité. L'analyse réalisée sera à la fois en intention de traiter (ITT) et en per protocole (PP).

Différents critères de jugement secondaires seront également mesurés à titre descriptif :

- Réduction du score CADESI-04 aux différents temps intermédiaires
- Différence du nombre d'animaux considérés comme répondant parfaitement au traitement (c'est-à-dire avec CADESI-04 <10) à tous les temps et après 6 mois
- Proportion de CADESI-04 <50% à tous temps intermédiaires et après 6 mois
- Réduction du score VAS à tous les temps mesurés et après 6 mois
- Réduction des scores IL associés à tous les temps mesurés et après 6 mois

Critère principal d'évaluation : **CADESI-04** :

- Score sur 180 ; 20 zones x 3 types de lésions x 3 notations (0-1-2-3) = 180 points.
- Répétabilité du score : entre différents cliniciens, majoritairement découvrant la grille : $r = 0.82$ ($p < 0.0001$) (Olivry et al., 2014)
- Par un même clinicien au cours du temps : $r = 0.97$ ($p < 0.0001$) (Olivry et al., 2014)
- La variabilité inter-clinicien étant supérieure à la variabilité intra-clinicien : **la grille CADESI-04 doit être lue par le même clinicien tout au long de l'étude.** (Olivry et al., 2014)
- Le chien est considéré comme sain si son CADESI-04 < 10.
- Le chien souffre d'une DAC légère pour CADESI-04 entre 10 et 34
- Le chien souffre d'une DAC modérée pour CADESI-04 entre 35 et 59
- Le chien souffre d'une DAC sévère pour CADESI-04 à partir de 60.
- **Une DAC est considérée comme contrôlée par son traitement si CADESI-04 < 10 : critère de guérison.**

QUESTIONS SECONDAIRES :

Les questions secondaires auxquels ce projet a vocation à répondre sont les suivantes :

Peut-on déterminer un seuil prédictif de l'amélioration clinique à 7 mois à différents temps (1 mois, 2 mois, 3 mois) avec l'un des biomarqueurs suivants : MTX-PG intra-érythrocytaires, IL-4, IL-10, IL-13, IL-31, TNF- α ? (analyse CART)

Existe-t-il une variation de la $\frac{1}{2}$ vie du MTX au cours du temps ? Quel est l'influence de certains cofacteurs (race, âge, score CADESI-04 de départ, 7 OH-MTX) sur $T_{1/2}$?

Peut-on modéliser le comportement intracellulaire du MTX dans les globules rouges afin de mieux en comprendre le fonctionnement ?

2. MATERIEL

2.1 : Système d'essai biologique

- Espèce canine, toutes races
- Poids supérieur à 4 kg et inférieur à 40 kg
- Statut : dermatite atopique modérée à sévère
- Age : plus de 6 mois et moins de 8 ans.
- Sexe : tous sexes
- Hébergement : animaux de propriétaires

2.1.1 : Critère d'inclusion

Critères retenus pour le diagnostic de la DA :

critères de Favrot **ET** grille CADESI-04.

L'inclusion sera réalisée par un vétérinaire spécialisé en dermatologie (diplômé ECVD ou ACVD ou sous la supervision directe d'un tel diplômé [résidents]). Ne seront retenus que les chiens souffrant d'une dermatite atopique modérée à sévère, c'est-à-dire pour lesquels la mise en place d'un traitement immunomodulateur est nécessaire, au-delà des traitements locaux classiques, ce qui se traduit par un score minimal de 35 au CADESI-04.

- ✓ **Au moins 5 critères d'une des deux listes de Favrot** (Favrot *et al*, 2010) **et**
- ✓ **Grille CADESI-04** (Olivry *et al*, 2014) avec **au moins 6 zones touchées ET un score > 35.** **et**
- ✓ **Exclusion de l'influence d'ectoparasites** (raclage cutané, protocole adapté de gestion du risque antiparasitaire [APE]). **et**
- ✓ En cas de complication infectieuse ou fongique, un traitement adéquat sera réalisé avant l'inclusion dans l'étude (calque cutané obligatoire).

Tableau 4 : Listes de critères diagnostiques de la DAC d'après Favrot

Première liste	Deuxième liste
<ul style="list-style-type: none">• Apparition des symptômes avant l'âge de 3 ans• Vit principalement à l'intérieur• Prurit corticosensible• Infection à <i>Malassezia</i> chronique ou récurrente• Atteinte des extrémités des pattes avant• Atteinte des conques auriculaires• Bord des oreilles épargné• Zone dorsolombaire épargnée	<ul style="list-style-type: none">• Apparition des symptômes avant l'âge de 3 ans• Vit principalement à l'intérieur• Prurit primaire à son apparition • Atteinte des extrémités des pattes avant• Atteinte des conques auriculaires• Bord des oreilles épargné• Zone dorsolombaire épargnée

D'après Favrot *et al.* (2010), pour être considéré comme suspect de DAC, un chien doit présenter au moins 5 critères d'une ces deux listes.

CADESI-04 (ICADA)		Erythème	Lichénification	Excoriations et/ou alopecie	TOTAL
Lèvres		1			
Face médiale du pavillon de l'oreille	Gauche	2			
	Droit	3			
Creux axillaire	Gauche	4			
	Droit	5			
Main (face dorsale et face palmaire combinées)	Gauche	6			
	Droit	7			
Pied (face dorsale et face palmaire combinées)	Gauche	8			
	Droit	9			
Pli du coude (cubital flexor)	Gauche	10			
	Droit	11			
Face palmaire du métacarpe (depuis le carpe jusqu'aux coussinets métacarpiens)	Gauche	12			
	Droit	13			
Flancs	Gauche	14			
	Droit	15			
Région inguinale	Gauche	16			
	Droit	17			
Abdomen		18			
Périnée (depuis vulve/scrotum jusqu'à l'anus)		19			
Face ventrale de la partie proximale de la queue		20			

Noter chaque site et chaque type de lésion avec un score comme suit:
rien= 0; léger = 1, modérée = 2, sévère = 3

SCORE FINAL (20 X 3 X 3 = 180):

2.1.2 : Critère d'exclusion

- ✓ Dermatite atopique saisonnière
- ✓ Otite comme seul signe clinique
- ✓ Animal diabétique
- ✓ Animal souffrant d'une affection autre que la DA

- ✓ Chiens ayant reçu un traitement anti-inflammatoire stéroïdien
 - par voie topique depuis moins de 10 jours
 - par voie orale depuis moins de 15 jours,
 - par voie parentérale depuis moins de 1 mois pour les formes non retard,
 - depuis moins de 3 mois pour les formes retard
- ✓ Chiens ayant reçu un traitement antihistaminique depuis moins de 15 jours.
- ✓ Chiens ayant reçu un traitement immunomodulateur depuis moins de 3 mois
- ✓ Chiens sous désensibilisation
- ✓ Chiens sous biothérapie (Cytopoint®) ou ayant reçu une biothérapie depuis moins de 6 mois.
- ✓ Chiens ayant reçu un traitement à base d'oclacitinib (Apoquel®) depuis moins de 7 jours.
- ✓ Chiens ayant reçu du mavacoxib (Trocoxil®) depuis moins de 7 mois
- ✓ Chiens ayant reçu **dans les 30 jours précédents** l'un des traitements suivants :
 - APE/API : spinosad, endectocide (sélamectine, éprinomectine, ivermectine, moxidectine, milbémycine), lévamisole, émodepside, pyriméthamine
 - AINS (tous, avec temps rallongé pour les longues actions [mavacoxib = depuis moins de 7 mois])
 - Antibiotiques : pénicillines (A, G et M), macrolides, lincosamides, synergistines, aminosides, rifampicine, rifabutine, sulfamides +/- triméthoprime, acide fusidique, vancomycine
 - Antifongiques : Imidazolés (kétoconazole, itraconazole, énilconazole, fluconazole), amphotéricine B
 - Anticonvulsivants : barbituriques, benzodiazépines
 - Anticancéreux : tous
 - Insuline
 - Acide folique ou folinique
 - Lopéramide
 - Métoclopramide
 - Oméprazole
 - Spironolactone
 - Antiviraux
 - Anticoagulants
 - Antiagrégants plaquettaires (ticlopidine, dipyridamole)
 - Verapamil, diltiazem
 - Autres familles : théophylline, probénécide, rétinoïdes (rétinol, trétinoïne, isotrétinoïne, étrétinate, acitrétine, tazarotène, bexarotène, adapalène), léflunomide, cholestiramine, hydroxychloroquine, amiodarone, toute molécule connue comme substrat de la P-GP.
 - Médecines alternatives : phytothérapie, aromathérapie, homéopathie, etc...
- ✓ Chiennes gestantes ou allaitantes, ainsi que tout animal destiné à la reproduction dans l'année à venir.
- ✓ Chiens dont l'examen clinique général révèle une anomalie.
- ✓ Chiens dont les examens complémentaires de pré-inclusion révèlent une numération - formule sanguine, une biochimie (PAL, ALAT, UREE, CREAT) ou une analyse d'urine significativement anormale (bandelette, réfractomètre).

- ✓ Vaccin vivant utilisé dans les 15 derniers jours.
- ✓ Chiens ayant reçu dans les 3 mois précédents : ciclosporine
- ✓ Chiens ayant reçu dans les 6 mois précédents : méthotrexate

2.1.3 : Examens complémentaires de pré-inclusion

- ➔ Examen biochimique: **PAL, ALAT, UREE, CREAT**
- ➔ Examen hématologique : **NFS**
- ➔ Analyse urinaire : **bandelette urinaire + densité optique**

2.1.4 : Evaluation clinique à l'inclusion

- ➔ Grille CADESI-04 par un vétérinaire spécialisé, dipl ECVD ou ACVD ou sous la supervision d'un diplômé ECVD/ACVD. Un même animal sera suivi par le même spécialiste tout au long de l'étude.
- ➔ Grille de score de prurit par le propriétaire (Echelle Visuelle Analogique)

2.1.5 : Engagement du propriétaire

- ✓ Protocole **validé par le comité d'éthique de VetAgro Sup (Avis N°1738 du 28/11/17)**
- ✓ Signature par le propriétaire d'un **document de consentement éclairé**
- ✓ **Le propriétaire s'engage à respecter scrupuleusement le protocole de l'étude clinique, notamment le planning de suivi.**
- ✓ Prise en charge de **la totalité des frais liés à l'étude clinique** (incluant le traitement) à partir de la visite d'inclusion ou de pré-inclusion, sous réserve du respect scrupuleux du protocole par le propriétaire. Ces frais incluent toutes les analyses liées au suivi de la tolérance du traitement (biochimie, hématologie), les visites chez le vétérinaire (aux dates prévues par le protocole), les traitements administrés. La prise en charge n'inclue pas les traitements antiparasitaires, vaccinations ou visites chez le vétérinaire liées à toutes affections rencontrées au cours du protocole.
- ✓ Chaque propriétaire disposera du numéro de téléphone direct (portable) du directeur d'étude (vétérinaire) qui pourra répondre à leur question en cas de besoin/difficulté/erreur de protocole.
- ✓ Chaque propriétaire disposera de documents à présenter avec son animal à chaque consultation, aussi bien dans le cadre du suivi prévu qu'en dehors (exclusion de certains API/APE par exemple).
- ✓ Chaque propriétaire disposera d'un document de suivi à remplir régulièrement, lui permettant notamment de consigner tout signe clinique anormal relevé ainsi que les dates et horaires d'administration des médicaments.

- ✓ Lors des visites chez le vétérinaire-dermatologue investigateur, le propriétaire aura à remplir une grille de prurit via une échelle visuelle analogique.
- ✓ Le propriétaire s'engage à signaler toute erreur sur le suivi du protocole au Directeur d'étude ou à son vétérinaire/dermatologue référent.
- ✓ Aucun traitement (allopathique ou non [phytothérapie, aromathérapie, homéopathie]), aucune automédication ni aucun changement d'alimentation ne doit être mis en place sur l'animal sans l'accord express du directeur d'étude. Le vétérinaire/dermatologue référent peut être amené à mettre place des traitements complémentaires, à condition que ce dernier soit clairement mentionné dans la partie 3.3 Traitements autorisés, et non mentionnés dans la partie 3.4 Traitements non autorisés. En cas de doute, le Directeur d'étude est le seul habilité à prendre une décision. Le non-respect de ces conditions peut conduire à l'exclusion de l'étude.

2.2 : Réactifs (médicaments)

→ Ciclosporine :

Sporimune® 50 mg/mL, solution buvable, Dechra®, reconditionnée à VetAgro Sup.

Cyclavance® 100 mg/mL, solution buvable, Virbac®, reconditionnée à VetAgro Sup

Administration 1 fois par jour durant 2 mois puis espacement possible tous les 2 jours ensuite selon l'amélioration clinique.

Administration à l'écart des repas : 2 h avant ou 2 h après le repas

Dose AMM : 5 mg/kg, 1 fois par jour durant 2 mois, puis 5 mg/kg tous les 2 jours si amélioration clinique

→ Méthotrexate :

Ledertrexate® injectable, 50 mg en ampoules de 2 mL, laboratoires Neuraxfarm®, reconditionné et dilué en flacons multi-ponctionnables à VetAgro Sup.

Etude de stabilité du MTX après reconditionnement et dilution terminée : stabilité parfaite après 35 jours à température ambiante ou à +4 °C.

Injection 1 fois par semaine

Dose employée : 0,5 mg/kg, 1 fois par semaine, **par injection sous-cutanée**. Si absence d'amélioration après 3 mois utilisation : 0,75 mg/kg. Si absence d'amélioration après 4 mois d'utilisation : 1 mg/kg. Dose maximale : 1 mg/kg.

→ Placebos :

Syrspend® SF PH4 Liquide neutre 100 MI : solution buvable

Eau ppi pour solution injectable

Placebo oral : 1 fois par jour pendant 2 mois puis tous les 2 jours si amélioration clinique

Placebo injectable : injection 1 fois par semaine, avec augmentation du volume si absence d'amélioration clinique.

2.3 : Equipement et fournitures

- ✓ Dosage MTX-PG : mise au point analytique en cours sur **LC-MS/MS**. De nombreuses publications disponibles chez l'homme.

Etalons MTX-PG :

Product	Product	MW	Ref	CAS numbers	
16.701	p-Aminobenzoyl-L-glutamic acid	266,3		PABA-Glu ₁	
16.702	p-Aminobenzoyldi-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	446,5	2, 12	PABA-Glu ₂	
16.703	p-Aminobenzoyltri-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	592,6	2, 12	PABA-Glu ₃	
16.704	p-Aminobenzoyltetra-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	738,8	2, 12	PABA-Glu ₄	
16.705	p-Aminobenzoylpenta-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	884,9	2, 12	PABA-Glu ₅	
16.706	p-Aminobenzoylhexa-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	1031	2, 12	PABA-Glu ₆	
16.707	p-Aminobenzoylhepta-γ-L-glutamic acid, ammonium salt	1177,2	2, 12	PABA-Glu ₇	

Etalon 7 OH-MTX (en cours) : mesure plasmatique médecine de population

- ✓ Dosage cytokinique : **qPCR sur ARNm**, mise au point analytique en cours (nombreuses publications également disponibles chez le chien) :
 - IL-10, IL-13, IL-22, IL-31, IL-33, TSLP, INF-γ
- ✓ Analyses des paramètres sanguins, hépatiques et rénaux (tolérance des médicaments, inclusion) : **sous-traitance laboratoires d'analyses des différentes écoles vétérinaires françaises.**

3. METHODE

3.1 Constitution des groupes et nombre de sujets

60 chiens atteints de dermatite atopique modérée à sévère seront recrutés et aléatoirement répartis en 2 lots de 30 animaux : traitement MTX ou traitement ciclosporine. Pour y parvenir, nous effectuerons un essai multicentrique (4 écoles vétérinaires) sur une durée de 1 an :

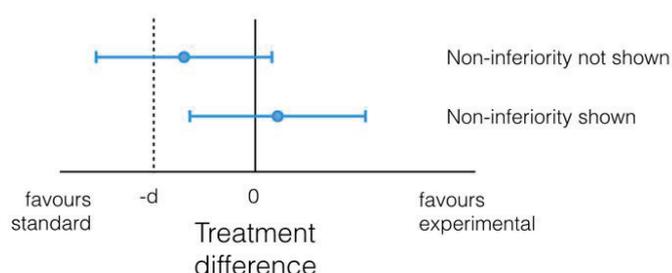
Durée d'inclusion de 8 mois (à raison de 2 inclusions par centre et par mois)

Durée de suivi pour chaque chien : 7 mois

Durée totale de l'étude : 15 mois

Répartition aléatoire des animaux selon grille prévue dans le protocole d'étude

Remarque : Le nombre d'animaux recrutés ne sera pas suffisant pour disposer d'une puissance statistique permettant un critère de jugement portant sur une proportion de chiens guéris ou améliorés. Cela a justifié notre choix de formuler notre essai de non infériorité avec un critère quantitatif dont la puissance dépendra notamment de la reproductibilité du score CADESI-04. C'est ainsi qu'avec 25 chiens par groupe, on pourra conclure à la non infériorité avec un risque de 5 %, une puissance de 80 % et un delta de 20% fixés a priori si la déviation standard du critère de jugement est de moins de 28 %.



Significance level (alpha)	5%
Power (1-beta)	80%
Standard deviation of outcome	28
Non-inferiority limit, d	20
<input type="button" value="Calculate sample size"/>	
Sample size required per group	25
Total sample size required	50

Sealed Envelope Ltd. 2012. Power calculator for continuous outcome non-inferiority trial. [Online] Available from: <https://www.sealedenvelope.com/power/continuous-noninferior/> [Accessed Wed Nov 22 2017]

Une marge de sécurité de 10 chiens a été appliquée (perdu de vue, abandon de protocole, etc...).

3.2 Réalisation des traitements

Double aveugle :

Compte tenu des formes galéniques et des modalités de traitement très différentes de la ciclosporine (voie orale) et du MTX (injectable), et afin de s'assurer d'une étude en double aveugle, le service de Pharmacie de VetAgro Sup, en étroite collaboration avec le directeur d'étude, réalisera un reconditionnement des traitements utilisés pour les rendre anonymes. De même, des traitements placebo seront employés.

- ✓ Chaque chien recevra chaque jour (au départ) puis tous les deux jours (par la suite) un médicament A à prendre par voie orale qui sera soit un placebo soit de la ciclosporine. L'administration sera effectuée par le propriétaire de l'animal, préalablement formé à ce geste lors de la visite d'inclusion.
- ✓ Chaque chien recevra également une fois par semaine une injection SC du médicament B qui sera soit un placebo soit du méthotrexate. L'administration sera effectuée par le propriétaire de l'animal, préalablement formé à ce geste lors de la visite d'inclusion.
- ✓ Ni le propriétaire, ni le vétérinaire ne seront informés sur le traitement employé chez le chien. Le directeur d'étude sera le seul à connaître le traitement de chaque animal. Il ne participera à aucune des évaluations cliniques effectuées par les dermatologues.

- ✓ Selon l'AMM de la ciclosporine, après 2 mois d'utilisation, en cas de réponse clinique satisfaisante, la prise de ciclosporine doit être espacée tous les deux jours. La réduction de la posologie du médicament A (ciclosporine ou placebo) sera déterminée par le dermatologue à partir des observations cliniques dès la **visite N°5**, conformément au calendrier ci-dessous.
 - En cas d'amélioration clinique (signes cliniques correctement contrôlés, c'est-dire réduction CADESI-04 de 50% à 100%, à l'appréciation du dermatologue), le médicament A sera à prendre toutes les 48 h et non toutes les 24h. Information obligatoire du Directeur d'étude.
 - En cas d'absence d'amélioration clinique (réduction score CADESI-04 < 50%), le médicament A sera pris toutes les 24h, donc sans modification de posologie. Information obligatoire du Directeur d'étude.
 - En cas de non réduction de la posologie du médicament A lors de la visite N°5 : le même raisonnement sera effectué à chaque visite et la posologie réduite dès que l'amélioration clinique sera satisfaisante. A défaut, la posologie de départ sera maintenue jusqu'au terme de l'étude.

- ✓ La posologie de MTX peut être augmenté en cas de réponse insatisfaisante au traitement. L'augmentation de la posologie du médicament B (MTX ou placebo) sera déterminée par le dermatologue à partir des observations cliniques dès la **visite N°6**, conformément au calendrier ci-dessous.
 - En **cas d'amélioration clinique** (signes cliniques correctement contrôlés, c'est-dire réduction CADESI-04 de 50% à 100%, à l'appréciation du

dermatologue), il n'y aura pas de modification de la posologie à employer. Information obligatoire du Directeur d'étude.

- En cas d'absence d'amélioration clinique, la posologie d'administration du médicament B sera modifiée, en passant à 0,75 mg/kg au lieu de 0,50 mg/kg (via une augmentation du volume injecté), toujours une seule fois par semaine. Information obligatoire du Directeur d'étude.
- En cas d'augmentation de la posologie lors de la visite N°6 :
 - lors de la visite suivante (N°7, un mois plus tard), si le dermatologue constate de nouveau une absence d'amélioration clinique, la posologie du médicament B peut être augmentée jusqu'à 1 mg/kg (via une nouvelle augmentation du volume injecté). Il n'y aura plus d'augmentation de posologie au-delà de 1 mg/kg. Maintien donc de cette posologie de 1 mg/kg jusqu'à la fin de l'étude.
 - Si par contre le dermatologue constate une amélioration clinique satisfaisante à 0,75 mg/kg, maintien de cette posologie jusqu'au terme de l'étude.
 - Dans tous les cas, information obligatoire du Directeur d'étude.

3.2 : Calendrier du suivi clinique et para-clinique

A. Visite N°1 de pré-inclusion (10 jours minimum avant inclusion) :
--

- ✓ Fiche clinique de pré-inclusion à remplir avec
 - Identification administrative de l'animal
 - Vérification rapide des critères d'inclusion et d'exclusion par le dermatologue investigateur (la vérification complète sera effectuée au moment de l'inclusion)
 - **Pesée de l'animal** (à transmettre impérativement au Directeur d'étude)

- ✓ Examens biologiques de pré-inclusion
 - Hématologie : NFS : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école : tube sec, minimum 1mL
 - Biochimie : Urée, Créat, PAL, ALAT : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école : tube EDTA, minimum 1mL
 - Bandelette urinaire : réalisée par le dermatologue investigateur
 - Densité optique urinaire : réfractomètre (dermatologue investigateur)

- ✓ Explication/discussion avec le propriétaire des objectifs, méthodologie, durée, prise en charge financière et engagement nécessaire à pleine réussite de l'étude.

- ✓ Remise obligatoire du document d'information standard et du formulaire de consentement éclairé qui devra impérativement être rapporté par le propriétaire à la prochaine visite (dite d'inclusion).

- ✓ Evaluation voire correction de la stratégie de lutte contre puces/tiques.

- ✓ Gestion des troubles infectieux si nécessaire avant inclusion (attention aux traitements interdits, cf. ci-dessous).

A la suite de cette visite, prise de contact obligatoire avec le Directeur d'étude.

DEROGATION A LA VISITE DE PRE-INCUSION

Lorsque le diagnostic de dermatite atopique canine modérée à sévère est très fortement suspecté par le dermatologue investigateur précocement au cours de la démarche diagnostique, il est possible de « fusionner » la visite de pré-inclusion et la visite d'inclusion lors de l'établissement du diagnostic définitif, ceci afin d'améliorer la prise en charge de l'animal et de limiter les risques de refus d'étude (risque notamment lié au délai supplémentaire entre la visite de pré-inclusion et la visite d'inclusion).

La visite de pré-inclusion peut être « fusionnée » avec la visite d'inclusion, sous les conditions suivantes :

- Le chien doit avoir été vu en consultation par un vétérinaire dermatologue dans le centre d'essai clinique au moins une fois dans les 2 mois précédents l'inclusion.
- Remise du document standard d'information au moins 10 jours avant la visite d'inclusion (la voie numérique est acceptée, la version papier sera alors délivrée durant la visite d'inclusion). Lors de la visite précédente, sous réserve du diagnostic final, une présentation complète de l'étude, ses contraintes et ses limitations doit avoir été effectuée par le vétérinaire investigateur.
- Vérification des critères d'exclusion en amont de la visite d'inclusion.
- Vérification préalable de la stratégie de lutte contre les puces. Vérifier également le non emploi de molécules proscrites.
- Il ne pourra plus y avoir de changement de vétérinaire investigateur pour le chien considéré à partir de la visite d'inclusion (contrairement à la visite de pré-inclusion).
- **Accord obligatoire du directeur d'étude en amont de l'inclusion.** Récupération obligatoire des coordonnées des propriétaires et du poids de l'animal. Le directeur d'étude contactera les propriétaires avant la visite d'inclusion.
- Les examens biologiques (hématologie, biochimie) de pré-inclusion seront effectués lors de la visite d'inclusion : le propriétaire devra attendre la confirmation téléphonique d'inclusion, liée aux résultats obtenus, avant de débiter le traitement de ses animaux, traitement qui lui aura été remis suite à la visite d'inclusion.
- Pour rappel : ne peut être inclus qu'un animal dépourvu de complications infectieuses, fongiques ou parasitaires au moment de l'inclusion.

B. Visite N°2 : Inclusion : (10 jours minimum après la visite N°1)

- ✓ Fiche clinique d'inclusion à remplir avec
 - Commémoratifs/Anamnèse
 - Vérification des critères d'inclusion :
 - Examen clinique et complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : absence de troubles infectieux (y compris cutanés) au moment de l'inclusion.
 - CADESI-04
 - Listes de Favrot
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Vérification des critères d'exclusion :
 - Pathologies concomitantes
 - Reproduction
 - Interactions médicamenteuses
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Prise de sang (4mL) sur tube EDTA à centrifuger pour séparation culot et plasma, stockage des deux à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
 - Dans le cadre de la dérogation de la visite de pré-inclusion :
 - Hématologie : NFS : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école : tube sec, minimum 1mL
 - Biochimie : Urée, Créat, PAL, ALAT : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école : tube EDTA, minimum 1mL
 - Bandelette urinaire : réalisée par le dermatologue investigateur
 - Densité optique urinaire : réfractomètre (dermatologue investigateur)
 - Détermination du calendrier des prochaines visites jusqu'au terme de l'étude.
- ✓ Formation du propriétaire aux gestes techniques :
 - Injection sous-cutanée à l'aide d'eau ppi. Le propriétaire DOIT effectuer LUI-MEME l'intégralité du geste (ponction du volume, préparation à l'injection et injection) avec le vétérinaire investigateur pour le former. Au besoin, plusieurs injections d'eau ppi peuvent être effectuées.

Attention : le médicament B ne doit pas être administré au cours de la visite.

- Administration d'un liquide par voie orale. Le propriétaire doit effectuer LUI-MEME l'intégralité du geste (ponction du volume, administration orale) à l'aide d'une seringue fournie et d'eau du robinet, avec le vétérinaire investigateur pour le former.

Attention : le médicament A ne doit pas être administré au cours de la visite.

- ✓ Récupération et signature OBLIGATOIRE du formulaire de consentement éclairé par le propriétaire. Validation orale avec lui de chaque item précisé dans le formulaire de consentement, notamment l'implication attendue de sa part, les restrictions nécessaires, l'obligation de rapporter les reliquats de médicament A et B, le risque manipulateur tératogène pour le médicament B. A l'exception du dernier item (être informé des résultats de l'essai clinique), tous les items sont obligatoires. Le document d'information standard est laissé au propriétaire afin qu'il puisse s'y référer à tout moment.
- ✓ Remise au propriétaire des médicaments A et B qui représente 1 mois de traitement.
 - Bien rappeler que le médicament A devra être administré **par voie orale, une fois par jour**, à l'heure choisi par le propriétaire mais toujours le même. Il devra le noter sur la fiche de suivi clinique.
 - Bien rappeler que le médicament B devra être administré **par voie injectable sous-cutanée, une fois par semaine**. Cette administration devra se faire toujours le même jour chaque semaine, jour qui correspondra au jour choisi des visites de contrôle chez le dermatologue investigateur si le traitement est effectué le matin, ou la veille si le traitement est effectué le soir (pour réaliser la pharmacocinétique de population du MTX plasmatique, il faut moins de 12h entre l'administration hebdomadaire du médicament B et la prise de sang de contrôle chez le vétérinaire investigateur). Il devra noter le jour et l'heure d'administration sur la fiche de suivi clinique.
 - Remise de la « fiche mensuelle de suivi clinique par le propriétaire » : parcourir le document avec le propriétaire et explique clairement chaque item (enregistrement des traitements et éventuels effets secondaires par le propriétaire). Préciser les modalités de correction en cas d'erreur (erreur rayée doit rester lisible et correction notée à côté).
 - Rappeler que cette fiche de suivi clinique doit être rapportée à chaque visite chez le vétérinaire investigateur.
- ✓ Remise au propriétaire du document « Mon chien est inclus dans un essai clinique », qu'il devra présenter à toute personne amenée à intervenir directement (vétérinaire, ostéopathe, etc..) ou indirectement (pharmacien, homéopathe, etc...) sur le chien.
- ✓ Photographies si possibles

A la suite de cette visite, le chien est officiellement inclus dans l'étude avec un numéro attribué qui le suivra tout au long de l'étude. Ce numéro est construit ainsi :

EA (Essai Atopie) A/L/N/T (Alfort, Lyon, Nantes ou Toulouse) 0XX (de 001 à 060) XX (Initiales du vétérinaire investigateur)

(ex : EA/L/001/DP : pour le premier chien qui sera recruté pour l'étude, localisé à VetAgroSup et suivi par Didier Pin)

Attention : à partir de cette visite d'inclusion, le vétérinaire investigateur doit suivre personnellement l'animal durant toute la durée de son inclusion dans l'étude. Il peut y avoir différents investigateurs dans chaque centre, mais chacun doit suivre les cas qu'il recrute lui-même sur toute la durée de l'étude (ceci étant lié à la répétabilité du score CADESI-04 essentiellement, mais également à la bonne qualité du suivi des propriétaires). L'investigateur ne peut changer qu'entre les visites N°1 (pré-inclusion) et 2 (inclusion).

C. Visite N°3 : suivi à + 1 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 1 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Vérification de la capacité de réalisation d'une injection par le propriétaire via l'utilisation d'eau ppi, sous la supervision du vétérinaire investigateur. Correction des erreurs si besoin.
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Deux prises de sang (4mL) sur tube EDTA, espacées de la durée de la consultation (le plus espacées possibles). Ces deux prélèvements seront analysés dans le cadre d'une pharmacocinétique de population, d'où l'intérêt d'un espacement maximal. Ces deux prises de sang seront centrifugées pour séparation culot et plasma, avec stockage des deux (culot et plasma) à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent.
Délivrance des médicaments A et B pour le mois à venir.
- ✓ Vérification de la bonne gestion de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire
- ✓ Photographies si possibles

D. Visite N°4 : Contrôle à 2 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Hématologie : NFS : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école (tube sec, minimum 1mL)
 - Biochimie : Urée, Créat, PAL, ALAT : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école (tube EDTA, minimum 1mL)
 - Bandelette urinaire : réalisée par le dermatologue investigateur
 - Densité optique urinaire : réfractomètre (dermatologue investigateur)
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 2 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Prise de sang (4mL) sur tube EDTA à centrifuger pour séparation culot et plasma, stockage séparé des deux à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.

E. Visite N°5 : Contrôle à 3 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Deux prises de sang (4mL) sur tube EDTA, espacées de la durée de la consultation (le plus espacées possibles). Ces deux prélèvements seront analysés dans le cadre d'une pharmacocinétique de population, d'où l'intérêt d'un espacement maximal. Ces deux prises de sang seront centrifugées pour séparation culot et plasma, avec stockage des deux (culot et plasma) à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament A (buvable) :**
 - **Si le médicament A buvable était encore administré tous les jours :**
 - Si amélioration du CADESI-04 entre 50 et 100%, à l'appréciation du dermatologue investigateur : le médicament A sera

- administré tous les 2 jours au lieu de tous les jours = changement de posologie
- Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%) : maintien du médicament buvable A tous les jours = maintien de posologie.
- **Si le médicament A buvable était déjà administré un jour sur deux :**
 - Si la situation clinique est satisfaisante ou améliorée : maintien de la posologie toutes les 48 h.
 - Si dégradation clinique depuis le mois précédent suite au changement du schéma posologique, à l'appréciation du vétérinaire investigateur : le médicament A sera à nouveau administré tous les jours = changement de posologie.
- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament B (injectable) :**
 - Si amélioration du CADESI-04 entre 50 et 100%, à l'appréciation du dermatologue investigateur : le médicament B sera administré à la même posologie une fois par semaine = maintien schéma posologique. Toutefois, le prescripteur a également la possibilité d'augmenter la posologie à 0,75 mg/kg s'il estime l'amélioration insatisfaisante.
 - Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%), à l'appréciation du dermatologue : possibilité d'augmenter le schéma posologique du médicament B à 0,75 mg/kg au lieu de 0,5mg/kg = changement de posologie. En fonction de la dimension du chien, la concentration du médicament B employée pourra différer pour limiter les volumes à injecter : elle sera précisée sur le flaconnage (y compris s'il ne s'agit que du placebo, de manière à garantir le double aveugle). Le calcul du volume à injecter chaque semaine pour le mois à venir sera effectué par le vétérinaire investigateur et inscrit sur la « fiche mensuelle de suivi clinique par le propriétaire ».
- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent.
Délivrance des médicaments A et B pour le mois à venir.
- ✓ Vérification de la bonne gestion de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire
- ✓ Photographies si possibles

F. Visite N°6 : Contrôle à 4 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Prise de sang (4mL) sur tube EDTA à centrifuger pour séparation culot et plasma, stockage des deux à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
 - A la demande du directeur d'étude, déterminé de manière aléatoire, une seconde prise de sang pourra être demandée au vétérinaire investigateur, sur tube EDTA uniquement (4mL). Ce prélèvement sera effectué le plus rapidement possible (1^{er} acte à faire sur l'animal). Il sera ensuite centrifugé pour séparation culot et plasma, et les deux prélèvements seront stockés séparément à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs

intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse. Le redoublement de ce prélèvement permettra d'affiner la modélisation du comportement pharmacocinétique du MTX. A ce titre, il sera demandé au vétérinaire investigateur d'espacer le plus possible les deux prélèvements.

- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament A (buvable) :**
 - **Si le médicament A buvable est encore administré tous les jours :**
 - Si amélioration du CADESI-04 entre 50 et 100%, à l'appréciation du dermatologue investigateur : le médicament A sera administré tous les 2 jours au lieu de tous les jours = changement de posologie
 - Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%) : maintien du médicament buvable A tous les jours = maintien de posologie.
 - **Si le médicament A buvable est administré un jour sur deux :**
 - Si la situation clinique est satisfaisante ou améliorée : maintien de la posologie toutes les 48 h.
 - Si dégradation clinique depuis le mois précédent suite au changement du schéma posologique, à l'appréciation du vétérinaire investigateur : le médicament A sera à nouveau administré tous les jours = changement de posologie.

- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament B (injectable) :**
 - Si la situation clinique est satisfaisante ou améliorée, à l'appréciation du vétérinaire investigateur : maintien de la posologie en cours du médicament B (0,5 mg/kg ou 0,75 mg/kg)
 - Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%), à l'appréciation du dermatologue : augmentation du schéma posologique du médicament B à 1 mg/kg au lieu de 0,75mg/kg = changement de posologie. En fonction de la dimension du chien, la concentration du médicament B employée pourra différer pour limiter les volumes à injecter : elle sera précisée sur le flaconnage ainsi que sur la fiche de suivi (y compris s'il ne s'agit que du placebo, de manière à garantir le double aveugle). Le calcul du volume à injecter chaque semaine pour le mois à venir sera effectué par le vétérinaire investigateur et inscrit sur la « fiche mensuelle de suivi clinique par le propriétaire ».

- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent.
Délivrance des médicaments A et B pour le mois à venir.

- ✓ Vérification de la bonne gestion de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire

- ✓ Photographies si possibles

G. Visite N°7 : Contrôle à 5 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Prise de sang (4mL) sur tube EDTA à centrifuger pour séparation culot et plasma, stockage des deux à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
 - Deux prises de sang (4mL) sur tube EDTA, espacées de la durée de la consultation (le plus espacées possibles). Ces deux prélèvements seront analysés dans le cadre d'une pharmacocinétique de population, d'où l'intérêt d'un espacement maximal. Ces deux prises de sang seront centrifugées pour séparation culot et plasma, avec stockage des deux (culot et plasma) à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant

centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.

- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament A (buvable) :**
 - **Si le médicament A buvable est encore administré tous les jours :**
 - Si amélioration du CADESI-04 entre 50 et 100%, à l'appréciation du dermatologue investigateur : le médicament A sera administré tous les 2 jours au lieu de tous les jours = changement de posologie
 - Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%) : maintien du médicament buvable A tous les jours = maintien de posologie.
 - **Si le médicament A buvable est administré un jour sur deux :**
 - Si la situation clinique est satisfaisante ou améliorée : maintien de la posologie toutes les 48 h.
 - Si dégradation clinique depuis le mois précédent suite au changement du schéma posologique, à l'appréciation du vétérinaire investigateur : le médicament A sera à nouveau administré tous les jours = changement de posologie.

- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament B (injectable) :**
 - A partir du 5^{ème} mois, il n'y aura théoriquement plus de modification du schéma posologique du médicament B. L'animal reçoit soit 0,5 mg/kg, soit 0,75 mg/kg soit 1 mg/kg de médicament B en fonction des résultats cliniques enregistrés les mois précédents = maintien de la posologie.
 - Toutefois, une demande exceptionnelle et justifiée de modification posologique à la hausse peut encore être demandée au directeur d'étude par le dermatologue investigateur, avec un maximum de 1 mg/kg.

- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent.
Délivrance des médicaments A et B pour le mois à venir.

- ✓ Vérification de la bonne gestion de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire

- ✓ Photographies si possibles

H. Visite N°8 : Contrôle à 6 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Prise de sang (4mL) sur tube EDTA à centrifuger pour séparation culot et plasma, stockage des deux à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.
 - A la demande du directeur d'étude, déterminé de manière aléatoire, une seconde prise de sang pourra être demandée au vétérinaire investigateur, sur tube EDTA uniquement (4mL). Ce prélèvement sera effectué le plus rapidement possible (1^{er} acte à faire sur l'animal). Il sera ensuite centrifugé pour séparation culot et plasma, et les deux prélèvements seront stockés séparément

à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du 7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse. Le redoublement de ce prélèvement permettra d'affiner la modélisation du comportement pharmacocinétique du MTX. A ce titre, il sera demandé au vétérinaire investigateur d'espacer le plus possible les deux prélèvements.

- ✓ **Ré-évaluation du schéma posologique du médicament A (buvable) :**
 - **Si le médicament A buvable est encore administré tous les jours :**
 - Si amélioration du CADESI-04 entre 50 et 100%, à l'appréciation du dermatologue investigateur : le médicament A sera administré tous les 2 jours au lieu de tous les jours = changement de posologie
 - Si résultats cliniques décevants (amélioration du CADESI-04 < 50%) : maintien du médicament buvable A tous les jours = maintien de posologie.
 - **Si le médicament A buvable est administré un jour sur deux :**
 - Si la situation clinique est satisfaisante ou améliorée : maintien de la posologie toutes les 48 h.
 - Si dégradation clinique depuis le mois précédent suite au changement du schéma posologique, à l'appréciation du vétérinaire investigateur : le médicament A sera à nouveau administré tous les jours = changement de posologie.

- ✓ **Pas de réévaluation du schéma posologique du médicament B (injectable) : aucune réduction de dose prévue.**

- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent. Délivrance des médicaments A et B pour le mois à venir.

- ✓ Vérification de la bonne gestion de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire

- ✓ Photographies si possibles

I. Visite N°9 : visite de fin d'étude à 7 mois

- ✓ Fiche clinique de suivi à 2 mois à remplir
 - Efficacité du traitement :
 - Examen clinique
 - Si nécessaire, examens complémentaires (calque cutané, raclage cutané) : la mise en place d'un traitement anti-infectieux est possible en se référant à la partie 3.3 de ce document (traitements autorisés).
 - CADESI-04
 - Grille de prurit (Echelle Visuelle Analogique) : par le propriétaire
 - Tolérance du traitement
 - Vérification du traitement antipuce
 - Enregistrement des éventuels effets secondaires rapportés par le propriétaire ou enregistrés au cours de la visite
 - Surveillance particulière de la fonction respiratoire : si présence de toux, dyspnée ou auscultation anormale : radiographie pulmonaire (méthotrexate).
 - Surveillance particulière du diabète chez le West Highland White Terrier (ciclosporine)
 - Pesée de l'animal
 - Prélèvements biologiques
 - Hématologie : NFS : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école (tube sec, minimum 1mL)
 - Biochimie : Urée, Créat, PAL, ALAT : réalisée dans les laboratoires d'analyse de chaque école (tube EDTA, minimum 1mL)
 - Bandelette urinaire : réalisée par le dermatologue investigateur
 - Densité optique urinaire : réfractomètre (dermatologue investigateur)
 - Prise de sang (0.5 mL) à conserver à -20°C dans le tube de conservation fourni pour recherche par qPCR des marqueurs cytokiniques (ARNm). L'injection des 0.5mL de sang dans le tube de conservation doit être effectuée dans les 5 minutes suivant la prise de sang. Une fois dans le tube de conservation, le prélèvement peut rester à température ambiante plusieurs heures.
 - Deux prises de sang (4mL) sur tube EDTA, espacées de la durée de la consultation (le plus espacées possibles). Ces deux prélèvements seront analysés dans le cadre d'une pharmacocinétique de population, d'où l'intérêt d'un espacement maximal. Ces deux prises de sang seront centrifugées pour séparation culot et plasma, avec stockage des deux (culot et plasma) à -20°C. Le plasma permettra la mesure du MTX et du

7OH-MTX plasmatique. Le culot permettra la mesure des marqueurs intra-érythrocytaires (MTX-PG). La durée avant centrifugation puis congélation peut être de plusieurs heures, le risque principal étant lié à l'hémolyse.

- ✓ Récupération des reliquats des médicaments A et B du mois précédent.
- ✓ Récupération de la fiche de suivi clinique remplie par le propriétaire durant l'étude.
- ✓ Questionnaire de fin d'étude (en annexe)
- ✓ FIN DU PROTOCOLE : la levée de l'aveugle pour le propriétaire aura lieu à la fin de la visite (après réalisation des grilles CADESI-04, prurit et PS) par appel du directeur d'étude. Le propriétaire et son vétérinaire seront alors libres de maintenir le traitement ou de le modifier à leur convenance.

3.3 : Traitements autorisés

- Antiparasitaires externes, tous les mois ou tous les 3 mois, à l'exclusion des molécules citées en 3.4 traitements interdits.
- Antiparasitaires internes, à l'exclusion des molécules citées en 3.4 traitements interdits
- Shampoings antiseptiques réguliers, réhydratants cutanés
- Seul traitement auriculaire autorisé avec corticoïdes : **Easotic® (Virbac)** (acéponate d'hydrocortisone). *
- Tous les traitements auriculaires sans corticoïdes sont autorisés.
- Un seul traitement local à base de corticoïdes autorisé (acéponate d'hydrocortisone) : **Cortavance® (Virbac)**
- Traitements antibiotiques autorisés à l'appréciation du dermatologue :
 - **Céfalexine**
 - **Fluoroquinolones**
- Traitements antifongiques systémiques autorisés, à l'appréciation du dermatologue (dans la mesure du possible, privilégier la voie topique):
 - *Malassezia* : **Terbinafine**
 - Teignes : **Griséofulvine**

3.4 : Traitements non autorisés

Antibiotiques	Sulfamides +/- triméthoprime Pénicillines (A, G et M) Macrolides, lincosamides et synergistines Aminosides Rifampicine, rifabutine Acide fusidique, vancomycine, Ciprofloxacine
Anti-inflammatoires	Tous AINS interdits Tous AIS interdits (sauf acéponate d'hydrocortisone par voie locale [Cortavance®] ou auriculaire (Easotic®))
Antiparasitaires internes	Endectocides (ivermectine, moxidectine, éprinomectine, milbémycine, sélamectine) Lévamisole Emodepside Pyriméthamine
Antiparasitaires externes	Spinosad Endectocides (ivermectine, moxidectine, éprinomectine, sélamectine)
Antifongiques	Imidazolés (kétoconazole, itraconazole, énilconazole, fluconazole) Amphotéricine B
Anticancéreux	Tous interdits, notamment cytostatiques, dont méthotrexate
Anticonvulsivants	Tous interdits (barbituriques, benzodiazépines, etc...)
Antiprurigineux	Oclacitinib (Apoquel®)
Immunomodulateur/suppresseur	Ciclosporine, Tacrolimus, Léflunomide
Biothérapie	Lokivetmab (Cytopoint®)

Diurétiques	Spironolactone
Antiviraux	Tous
Inhibiteurs calciques	Vérapamil, diltiazem
Antiémétiques	Métoclopramide
Antidiarrhéiques	Lopéramide
Anticoagulants/ Antiagrégants plaquettaires	Héparine, Ticlopidine, Dipyridamole
Inhibiteurs pompe à protons	Oméprazole
Autres classes thérapeutiques	Probénécide Acide folique ou folinique Insuline Théophylline Rétinoïdes Cholestiramine Hydroxychloroquine Amiodarone
Médecines alternatives	Phytothérapie, aromathérapie, homéopathie, etc...

- Pas de modification du régime alimentaire

3.5: Sorties de l'étude

- ✓ Aggravation des lésions cutanées ou du prurit considérés comme échecs de traitement > 3 mois
- ✓ Effets secondaires délétères
- ✓ Nécessité d'emploi de traitements invalidant le protocole
- ✓ Non présentation aux conditions du suivi
- ✓ Non-respect du protocole par le propriétaire
- ✓ Mort

3.6: Analyse des données

Test de student, test khi-2, test wilcoxon, coefficient de corrélation de spearman, ANOVA, Courbes ROC, logiciel R, logiciel Phoenix WinNonlin

3.7: Corrections des données brutes

Dans le mesure du possible, éviter toute rature sur le document. En cas d'erreur, rayer d'un trait la mention incorrecte (attention, celle-ci DOIT rester lisible : ne pas raturer), et indiquer initiales et date de la correction.

AR le 16/01/18

Exemple : ~~2,5 mL~~ 1,5 mL

4. DEVIATIONS AU PROTOCOLE

Toute déviation au protocole sera signalée au Directeur de l'étude dès son identification et sera notée sur l'annexe « Déviation ».

5. EVENEMENTS REMARQUABLES

Tout évènement remarquable survenant lors du déroulement du protocole devra immédiatement être signalé au Directeur de l'étude, à tout moment ; 24h/24, 7 jours /7 :

Contact Antoine ROSTANG (Directeur d'étude) : **06 62 34 78 33** :

- Laisser un message si absence de réponse en direct avec coordonnées à rappeler.
- Si absence de rappel dans les 2 h, laisser de nouveau un message.

6. ARCHIVAGE

Toutes les données brutes seront archivées au service de pharmacie toxicologie de VetAgro Sup, sous la responsabilité du Directeur d'étude.

Les prélèvements sanguins seront conservés à terme dans ce même service sauf les prélèvements hémato/bioch conservés dans les différents laboratoires d'analyse.

ANNEXE : Echelle visuelle analogique

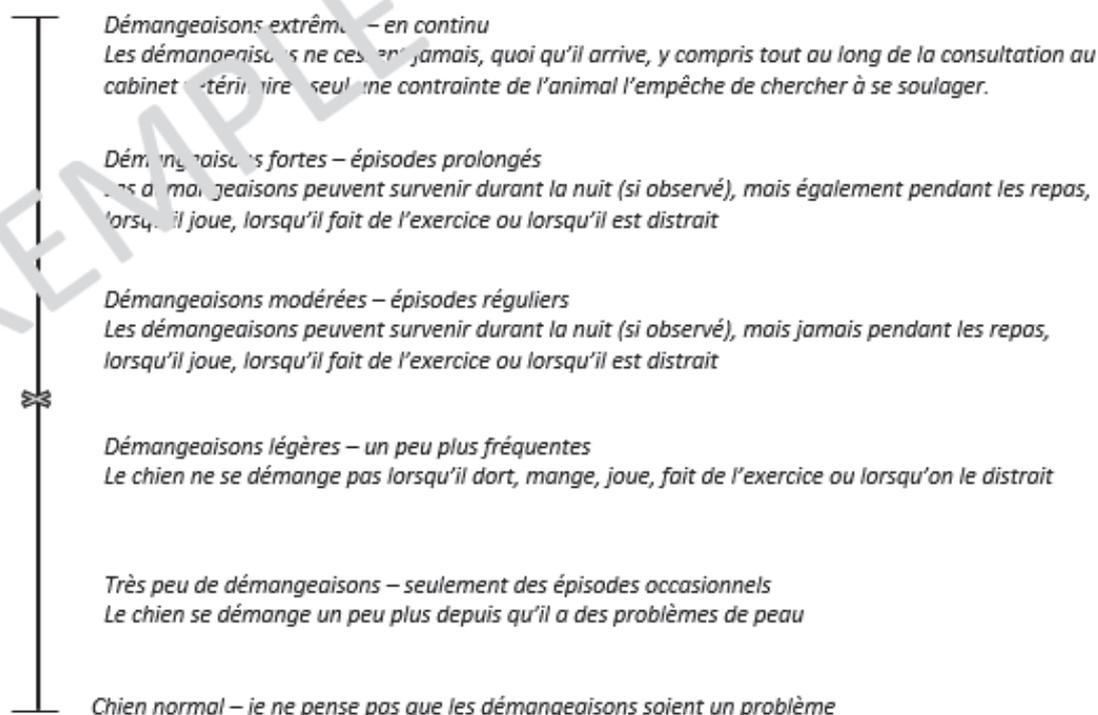
Grille d'évaluation du prurit de votre chien

Echelle Visuelle Analogique : consigne au patient.

Les manifestations cliniques des démangeaisons chez le chien incluent pour l'animal le fait **de se lécher, de se gratter, de se mordiller, de se mordre, de se frotter, de se mâchouiller** certaines zones de son corps. L'objectif est de quantifier les démangeaisons chez votre animal. Nous vous proposons ainsi d'utiliser une sorte de thermomètre du prurit, via l'utilisation d'une échelle visuelle analogique (représentée ci-dessous).

Ainsi, l'intensité de la démangeaison peut être définie par un trait tracé sur cette échelle. L'extrémité basse de l'échelle correspond à un chien normal, sans problème de démangeaison. L'extrémité haute, aux démangeaisons les plus fortes imaginables. Plus le trait est proche de l'extrémité haute, plus les démangeaisons sont fortes.

En tant que propriétaire de l'animal, partageant son existence, c'est à vous d'évaluer le niveau de démangeaison de votre animal en traçant une croix sur l'échelle visuelle analogique, comme dans l'exemple ci-dessous : ici démangeaisons légères à modérées.



Questionnaire de fin d'étude (à remplir par le propriétaire)

Ce questionnaire est essentiellement conçu pour évaluer votre sentiment quant à la forme galénique employée pour traiter la dermatite atopique canine. En conséquence, ces questions sont indépendantes du traitement effectivement reçu par votre animal et de sa réponse au traitement employé.

Remarque : ces informations seront traitées de façon totalement **anonyme**

Nom de la personne remplissant le formulaire :

Question 1 :

Je suis :

- Satisfait de la situation clinique de mon animal en cette fin d'étude
- Non satisfait de la situation clinique de mon animal en cette fin d'étude
 - Pourquoi ?

Question 2 :

Evaluation de la réponse clinique de l'animal par le propriétaire (échelle OGATE) : sélectionnez une seule réponse.

Que pensez-vous de la réponse de votre animal au traitement proposé ?

- Aucune réponse
- Une réponse faible au traitement
- Une réponse modérée au traitement
- Une réponse bonne au traitement
- Une réponse excellente au traitement

Question 3 : Ce que je pense de l'administration injectable un jour par semaine pour contrôler la dermatite atopique de mon animal ?

a/ Sur la fréquence d'administration *(si plusieurs réponses, merci de les hiérarchiser)*

- Très pratique, une seule injection par semaine limite les manipulations
- Peu pratique, je préférerais un traitement quotidien
- Peu pratique, je préférerais un traitement mensuel
- Je n'ai pas d'avis sur la question

b/ Sur l'acte d'injection

- Très facile, j'ai rapidement maîtrisé le geste
- Facile aujourd'hui, mais il m'a fallu pas mal de temps pour maîtriser le geste
- Difficile, c'est toujours une source importante de stress pour moi

- Le risque lié à l'auto-injection est une source importante de stress pour moi
- Le risque lié à l'auto-injection n'a pas été source de stress pour moi

Question 4 : Ce que je pense de l'administration orale tous les jours, puis à jours alternés pour contrôler la dermatite atopique de mon animal :

a/ Sur la fréquence d'administration *(plusieurs réponses possibles)*

- Très pratique, aussi bien une fois par jour que tous les deux jours : aucune difficulté pour moi
- Très pratique au début, tous les jours mais plus difficile ensuite, lorsque l'administration ne se fait qu'un jour sur deux, avec un stress important de se tromper
- Peu pratique, dès le départ : contrainte trop forte de devoir donner chaque jour le médicament à mon chien : je préfère un schéma posologique différent (hebdomadaire ou mensuel).

- Donner en dehors des repas n'a pas été difficile pour moi
- Donner en dehors des repas a été une contrainte difficile à gérer pour moi.

b/ Sur la voie orale *(si plusieurs réponses, merci de les hiérarchiser)*

- Très facile à faire prendre à mon animal
- Selon les jours, plus ou moins facile à faire prendre à mon animal
- Selon les jours, parfois très difficile à faire prendre à mon animal
- Toujours très compliqué à faire prendre à mon animal, source importante de stress pour moi

Question 5 :

Ce qui déterminerait pour moi le choix du traitement idéal pour mon animal (considérant une efficacité similaire des traitements) :

- Praticité : je préfère une voie orale
- Praticité : je préfère une voie injectable
- Praticité : je n'ai pas de préférence entre les voies orales ou injectables

- Fréquence : je préfère un traitement chaque jour
- Fréquence : je préfère un traitement hebdomadaire
- Fréquence : je préfère un traitement mensuel
- Fréquence : je ne suis pas gêné par un changement de fréquence au cours du temps (tous les jours, puis tous les 2 jours voire tous les 3 ou 4 jours)
- Fréquence : je n'aime pas changer la fréquence de traitement de mon animal.

- Coût : c'est le critère principal pour moi, bien avant les deux précédents, et je choisirais toujours le traitement le moins cher (sous réserve de son efficacité).
- Coût : c'est un critère important mais au moins autant que les deux précédents, je serais prêt à préférer un traitement plus onéreux qui me correspondrait mieux
- Coût : c'est un critère important mais le confort de vie pour mon animal et pour moi prime largement sur l'aspect financier.
- Coût : le coût est très clairement un frein dans le choix du traitement de mon animal : je ne peux me permettre de traitement onéreux.

- Coût : je suis prêt à préférer un traitement moins efficace s'il se révèle nettement moins cher.
- Coût : le coût moyen (tout compris) que je suis prêt à dépenser par mois pour mon chien souffrant de dermatite atopique
 - Moins de 50 €
 - De 50 à 100 €
 - De 100 à 200 €
 - De 200 à 300 €
 - Plus de 300 €

Quel est votre ressenti quant au déroulé de cette étude (informations, formation aux gestes techniques, suivi, disponibilité des personnes impliquées, compréhension de vos difficultés, etc...) ?

- Bon suivi, bon encadrement
- Parfois un peu perdu
- Souvent un peu perdu
- Très déçu du suivi réalisé

N'hésitez pas à laisser un commentaire concernant votre ressenti en tant que propriétaire d'un chien inclus dans cette étude dans le cadre ci-dessous. Nous sommes notamment intéressés par ce qui pourrait être amélioré dans l'accompagnement des propriétaires pour une prochaine étude.

Commentaires libres du propriétaire :

FIN DU QUESTIONNAIRE

Amendement N°1 du protocole d'étude clinique « Utilisation du méthotrexate versus ciclosporine dans le traitement de la dermatite atopique canine (DAc) ».

Des signes d'intolérance du MTX injectable (troubles gastro-intestinaux essentiellement) lors des toutes premières administrations (1^{er} mois de traitement) ont été enregistrés depuis le démarrage de l'étude. Ces troubles semblent rétrocéder spontanément avec le temps mais sont une source de stress pour l'animal et son propriétaire, et une cause d'abandon de protocole. Chez l'homme, pour s'assurer de la meilleure tolérance possible, la dose utilisée lors du premier mois de traitement est une demi-dose. L'impact de ce schéma posologique n'est pas clairement défini mais ne modifierait que peu la réponse pharmacologique au cours du premier mois de traitement (biotransformation en MTX-PG).

Le schéma posologique de chaque chien étant adapté à la réponse clinique obtenue, un amendement du schéma posologique du MTX au cours du premier mois de traitement ne devrait que peu modifier les résultats cliniques attendus entre les chiens traités avant et après cet amendement.

C'est pourquoi, il est décidé que les chiens recevant du méthotrexate seront traités non plus à 0,5 mg/kg mais à 0,25 mg/kg/semaine le premier mois, puis 0,5 mg/kg/semaine les mois suivants, tel que prévu par le protocole initial. Cette modification prend effet le lundi 8 octobre 2018.

Le directeur d'étude, Antoine ROSTANG

Amendement N°2 du protocole d'étude clinique « Utilisation du méthotrexate versus ciclosporine dans le traitement de la dermatite atopique canine (DAc) ».

Comme annoncé en octobre 2018, des signes d'intolérance du MTX injectable, relativement fréquents, bénins et réversibles (troubles gastro-intestinaux essentiellement) ont été enregistrés depuis le démarrage de l'étude. Ce constat a été dès lors à l'origine d'un premier amendement du protocole de l'étude clinique avec mise en place d'une posologie à 0,25 mg/kg/semaine le premier mois de traitement. Dans la plupart des cas, ces troubles rétrocedent après quelques semaines de traitement sans intervention spécifique. Depuis la modification du schéma posologique à l'inclusion, nous avons enregistré une réduction significative des troubles gastro-intestinaux, et une réponse clinique à ce stade tout aussi satisfaisante, bien qu'il semble exister des différences individuelles.

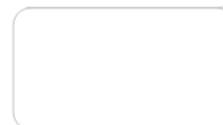
Les essais de tolérance réalisés chez le Beagle en amont de l'essai clinique, y compris à forte dose, n'avaient pas mis en évidence de troubles particuliers, notamment gastro-intestinaux. Ces essais n'ont toutefois été conduits que par voie orale et dans une seule race. Au lancement de l'essai clinique, le schéma posologique retenu avait privilégié une posologie élevée, comme recommandée en médecine humaine pour une réponse clinique plus précoce, bien que ce dernier point n'ait jamais été formellement démontré. Il apparaît aujourd'hui que cette posologie n'est pas sans risque sur le plan de la tolérance, alors que sa rapidité accrue d'efficacité n'est pas démontrée.

En conséquence, pour s'adapter à ces premiers résultats terrain, une modification du protocole prenant en compte une plus grande adaptabilité à la réponse individuelle de l'animal a été décidée.

- ➔ La dose choisie à l'inclusion est abaissée à 0,15 mg/kg
- ➔ Le dermatologue aura une possibilité accrue de moduler cette posologie au cours de l'étude. Les fiches cliniques vont toutes être modifiées en ce sens.
- ➔ Pour les chiens déjà inclus qui ont eu des problèmes de tolérance, chaque cas est déjà géré individuellement en partenariat avec le directeur d'étude.
- ➔ Pour les chiens déjà inclus qui n'ont pas eu de problèmes de tolérance, une possibilité de réduction des doses utilisées sera offerte au dermatologue au cours des prochaines visites à venir.

Le directeur d'étude, Antoine ROSTANG

Annexe 2 : Document d'information standard



DOCUMENT D'INFORMATION STANDARD

Contexte :

Une dermatite atopique a été diagnostiquée à votre animal. C'est une affection fréquente qui nécessite la mise en place d'un traitement de votre animal. Le traitement actuel de cette maladie permet le contrôle de la dermatose **mais non sa guérison définitive**. De ce fait, votre animal sera contraint à être traité durant toute sa vie, ce qui demande un investissement personnel et financier important pour vous.

En fonction de la gravité de la maladie, différents traitements peuvent être proposés par votre vétérinaire. Un traitement par voie locale (shampoings, crèmes, etc...) peut être suffisant pour traiter une dermatite atopique légère à modérée, mais le recours à la voie générale reste indispensable lors d'atteinte modérée à sévère. Si votre vétérinaire vous propose d'intégrer cet essai clinique, c'est que votre animal nécessite la mise en place d'un traitement par voie générale.

A ce jour, différentes molécules ont confirmé leur efficacité dans le traitement par voie générale de la dermatite atopique canine, en association avec des traitements locaux :

- La ciclosporine, c'est le traitement de référence. Toutefois elle reste onéreuse et implique une administration quotidienne. Après plusieurs semaines de traitement (ceci variable selon les animaux), les prises peuvent être espacées (tous les 2, puis tous les 3 voire 4 jours).
- Les glucocorticoïdes sont efficaces et bon marché mais sources d'effets secondaires importants et parfois graves sur le long terme : il est donc préférable de les réserver à des traitements de courtes durées.
- L'oclacitinib (Apoquel®) est un traitement disponible depuis environ 3 ans, par voie orale, une à deux fois par jour en phase d'initiation du traitement. Il ne traite que certains effets de la dermatite atopique, à savoir les démangeaisons, ce qui peut être suffisant pour contrôler la maladie dans de nombreux cas. Toutefois, son arrêt entraîne automatiquement et rapidement une réapparition des symptômes. Son coût reste assez important. Il fait l'objet d'une surveillance active par l'Agence Européenne du Médicament pour d'éventuels effets secondaires sur le long terme.
- Le lokivetmab (Cytopoint®) est un traitement mis sur le marché cette année. Il agit essentiellement sur les démangeaisons causées par la maladie, via l'administration d'anticorps spécifiques, par voie injectable une fois par mois. C'est un traitement immunologique d'un coût encore relativement important.
- Le méthotrexate : c'est une molécule ancienne, découverte en 1948. Elle a beaucoup d'indications chez l'homme (arthrite rhumatoïde, psoriasis, etc...). Récemment, le méthotrexate a démontré son efficacité dans la dermatite atopique chez l'homme, adulte et enfant, maladie très proche de la dermatite atopique du chien. A la suite de ces résultats, plusieurs essais ont été conduits dans le traitement de la dermatite atopique chez le chien, à la fois pour vérifier son absence de toxicité et son efficacité, avec des résultats très encourageants. Le méthotrexate est disponible par voie orale ou injectable et s'administre une fois par semaine, ce qui en fait un traitement peu onéreux.

Afin de mieux accompagner les propriétaires dans le traitement de leur animal atteint de dermatite atopique, et de limiter ainsi l'abandon ou l'euthanasie de ces animaux, nous

avons besoin de conduire des études cliniques. Aujourd'hui, **votre animal peut être inclus dans une étude clinique**. Cette étude est effectuée dans le cadre d'un doctorat universitaire vétérinaire réalisé à VetAgro Sup (Ecole Vétérinaire de Lyon) et implique différents vétérinaires spécialistes (dermatologues, pharmacologues) répartis dans les différentes écoles vétérinaires françaises. Bien qu'une partie du financement de cette étude puisse provenir d'appels d'offre de différents organismes (publics ou privés), aucun droit de regard n'est accordé aux bailleurs de fond, les résultats ne souffriront donc d'aucun conflit d'intérêt.

Objectif :

La ciclosporine est aujourd'hui le traitement de référence de la dermatite atopique canine. Les résultats préliminaires obtenus avec le méthotrexate chez le chien sont très satisfaisants, aussi bien en termes de sécurité d'emploi qu'en termes d'efficacité. Ceci nous conduit à mener une étude permettant de comparer ces deux thérapeutiques en vue de répondre aux questions suivantes :

- Le méthotrexate constitue-t-il une molécule de remplacement intéressante à la ciclosporine dans le traitement de la dermatite atopique du chien ?
- Quels biomarqueurs sanguins permettraient aux cliniciens d'évaluer précocement l'efficacité du méthotrexate et d'optimiser rapidement la posologie employée ?

Pour répondre à ces deux questions est mise en place une **étude clinique** :

- **Multicentrique** : les quatre écoles vétérinaires françaises sont impliquées, nous permettant de recruter un grand nombre de chiens atteints de dermatite atopique.
- **Randomisée** : chaque chien recevra un traitement soit à base de méthotrexate, soit à base de ciclosporine de manière totalement aléatoire, afin que rien ne puisse altérer la qualité du résultat comparatif. La randomisation est déjà effectuée au moment où vous lisez ces lignes, ce n'est pas votre vétérinaire qui décidera du traitement à employer.
- **En double aveugle** : ni le propriétaire ni le vétérinaire/dermatologue ne seront informés du traitement retenu pour le chien, afin qu'il n'y ait aucun biais quant aux résultats cliniques mesurés. Vous administrerez donc les médicaments sans connaître leur contenu. Seul le directeur d'étude sera en mesure de connaître le traitement reçu par chaque animal, raison pour laquelle les évaluations cliniques ne seront pas réalisées par lui.

Si vous acceptez l'inclusion dans cette étude, votre animal **sera suivi durant 7 mois** par l'ensemble de l'équipe depuis son inclusion jusqu'à la fin du protocole clinique. L'étude clinique impliquant tous les animaux durera 14 à 16 mois.

Cette étude fera l'objet de plusieurs publications de recherche dans des revues scientifiques ainsi que de plusieurs présentations dans des congrès français ou internationaux. A ces fins, il n'y aura pas d'utilisation nominative des données, seule une analyse statistique sera effectuée

Préalable

Tous les chiens recevront un traitement considéré comme efficace, aucun chien ne sera traité exclusivement avec un placebo : la prise en charge optimale du traitement de votre animal sera assurée qu'elle que soit le traitement aléatoirement retenu pour votre animal. **Notre objectif premier reste de traiter efficacement votre animal.** Tout au long de l'étude, son état de santé sera scrupuleusement suivi (cf. partie méthode) et toutes les mesures nécessaires prises en cas de difficultés (y compris une sortie de l'étude et une levée de l'aveugle). La meilleure prise en charge possible de chaque chien souffrant de dermatite atopique reste notre ultime objectif.

Méthode

Pré-inclusion

Une dermatite atopique vient d'être diagnostiquée à votre animal. Votre vétérinaire – dermatologue vous propose donc de participer à cet essai clinique. Ce document vous permet de comprendre ce que cela va impliquer pour vous et votre animal. Si vous acceptez de rentrer dans cette étude, voici comment les choses vont se dérouler :

- Ce document vous est remis par votre vétérinaire durant ce que nous appelons la visite de pré-inclusion. Durant cette visite, votre vétérinaire va effectuer plusieurs actes très courants dans ce type de pathologie :
 - ✓ Un examen clinique général de votre animal
 - ✓ Quelques examens complémentaires indispensables au diagnostic de la dermatite atopique de votre animal, afin d'écartier tout autre maladie : calque cutané, raclage cutané, prise de sang pour mesure des paramètres sanguins, hépatiques et rénaux, prélèvements d'urines (miction naturelle).
 - ✓ Une vérification et, éventuellement, une modification de vos protocoles de gestion des parasites externes (puces, tiques)
 - ✓ La vérification de la possibilité de vous inclure dans l'étude (vérification des critères d'inclusion et d'exclusion) : le vétérinaire va notamment vérifier les traitements antérieurs que votre animal a pu recevoir.
 - ✓ La pesée de votre animal
 - ✓ La mise en place d'un traitement antibiotique ou antifongique au besoin. Votre chien doit être indemne de complications infectieuses ou fongiques lors de l'inclusion dans l'étude. Il est courant que de nouveaux épisodes infectieux aient lieu au cours du traitement de la dermatite atopique : cela est prévu dans le protocole d'étude, votre animal sera traité en conséquence et non exclu de l'étude.

- Ce document a également pu vous être remis au cours d'une visite chez votre dermatologue vétérinaire, avant même l'établissement du diagnostic définitif. Ce processus est prévu dans le protocole d'étude et permet une prise en charge plus rapide de votre animal, lorsque c'est possible, sous réserve de la confirmation du diagnostic de dermatite atopique canine. Cette dérogation de la visite de pré-inclusion reporte les actes prévus lors de cette visite durant la visite d'inclusion. Les prérequis nécessaires à cette dérogation sont vérifiés par votre dermatologue vétérinaire. Cela ne change pratiquement rien pour le propriétaire. La durée de réflexion d'au minimum 10 jours est également assurée en amont de la visite d'inclusion.

A l'issu de la visite de pré-inclusion, votre chien ne sera pas encore inclus dans l'étude :

1. D'une part, afin de vous laisser un temps suffisant pour prendre votre décision définitive en toute connaissance de cause (cette durée de réflexion est d'au minimum 10 jours).
2. D'autre part, afin de laisser le temps au directeur d'étude d'effectuer les analyses sanguines, de vérifier la possibilité de votre inclusion, de vous contacter pour répondre à vos éventuelles questions et de préparer le traitement de votre animal.
3. Enfin, pour permettre que soient guéries les complications infectieuses ou fongiques de votre animal, si nécessaire.

A l'issu de cette visite de pré-inclusion et du temps de réflexion minimum de 10 jours, votre chien pourra être inclus dans l'étude clinique.

Calendrier des visites

L'intégralité des visites prévues au protocole se dérouleront de la même manière. Elles sont toutes obligatoires. Les différents actes qui seront effectués par votre vétérinaire-dermatologue sont les suivants :

- ✓ Un examen clinique général de votre animal
- ✓ Un bilan des observations cliniques/ évolution de la santé de votre animal depuis votre dernière visite
- ✓ Un examen dermatologique de votre animal avec établissement d'un score lésionnel réalisé selon une grille particulière appelée CADESI-04
- ✓ La réalisation d'une grille de prurit (vous devrez estimer l'intensité des démangeaisons de votre animal sur une grille spécialement développée pour).
- ✓ La réalisation de prises de sang
- ✓ La pesée de votre animal
- ✓ La remise de l'ensemble des traitements jusqu'au prochain rendez-vous
- ✓ La confirmation de la date du prochain rendez-vous

Les visites seront planifiées ainsi :

1. Lors de la visite d'inclusion, en plus de ce qui a été décrit ci-dessus, vous serez formé par votre vétérinaire à administrer convenablement les deux traitements que va recevoir votre animal via l'emploi de placebos. Cette visite sera la plus longue de l'étude car elle nécessitera une vérification rigoureuse des critères d'inclusion et d'exclusion, ainsi qu'une étude approfondie des commémoratifs de votre chien.
2. Ensuite, une visite de suivi sera planifiée tous les mois jusqu'à 7 mois après le début du traitement. Dans la mesure du possible, cette visite sera réalisée le même jour de la semaine durant les 7 mois que durera l'étude, jour qui doit correspondre à l'administration du traitement injectable (médicament B). Comme le propriétaire devra lui-même évaluer les démangeaisons de son animal lors de chaque visite, il est important que l'intégralité des visites de suivi soit effectuée par la même personne, dans la mesure du possible.
3. En fonction des résultats cliniques observés sur votre animal, le schéma posologique sera réévalué voire modifié après 2 mois de traitement par le vétérinaire dermatologue, conformément au protocole d'étude.
4. Au cours des visites de suivi, une à deux (maximum) prises de sang pourront être réalisées afin de mieux comprendre comment se comporte le médicament sur votre animal.

Traitement de votre animal

Comme vu dans la partie « Objectif » ci-dessus, ni vous ni votre vétérinaire ne connaîtrez le traitement qui aura été aléatoirement attribué à votre animal. Vous recevrez chaque mois 2 médicaments qui seront toutes les deux administrées à votre animal :

- Un médicament A qui sera administré par voie orale tous les jours, à l'écart des repas (minimum 2h avant ou 2h après le repas). Au cours de l'étude, votre vétérinaire pourra être amené à espacer les prises toutes les 48 h.
- Un médicament B qui sera administré par injection sous-cutanée, une seule fois par semaine, le matin. Lors de la première visite, votre vétérinaire vous formera à ce geste particulier qui est couramment pratiqué par beaucoup de personnes pour elles-mêmes (diabétiques, etc..) ou pour leur animal. Le temps nécessaire sera pris pour vous permettre d'être suffisamment à l'aise avec cette procédure. Ceci correspondra donc à la réalisation de 4 à 5 injections chaque mois. ATTENTION : cette injection ne doit pas être réalisée par une femme enceinte ou par une personne souhaitant concevoir un enfant durant la durée de l'essai clinique (cf. risques pour le propriétaire ci-dessous).

Engagement du propriétaire

La qualité de l'étude et de ses résultats est directement liée à **la qualité de l'engagement de chacun des propriétaires**. Nous sommes conscients que l'engagement demandé est important mais l'amélioration de la prise en charge de la santé de nos animaux, comme des contraintes demandées aux propriétaires, est au cœur de nos préoccupations : grâce à vous, nous souhaitons déterminer précisément le meilleur protocole de traitement aussi bien pour la santé de votre animal, que pour la maîtrise des coûts ou l'adéquation avec les contraintes spatio-temporelles du propriétaire.

En rentrant dans cette étude, vous acceptez donc **d'en respecter les contraintes jusqu'au terme de l'étude**. En tant qu'organisme public, nos ressources financières sont limitées et l'investissement que nous mettons pour chaque animal inclus est perdu si votre animal sort du protocole avant le terme de l'étude. Il est donc important pour vous comme pour nous que vous vous engagiez à suivre le protocole de cet étude **jusqu'à son terme**.

En rentrant dans cette étude, vous acceptez donc d'en respecter les contraintes suivantes :

- Respecter scrupuleusement le planning de l'étude, notamment concernant les **dates de consultation** chez le vétérinaire investigateur. Si, pour des raisons personnelles, vous ne pouvez pas présenter votre chien à la consultation de suivi à la date initialement prévue, vous devez le présenter dans les 5 jours qui précèdent ou les 5 jours qui suivent cette date (en accord avec son vétérinaire investigateur et avec le directeur d'étude). Au-delà de ce délai, le chien sera exclu de l'étude.
- Administrer **rigoureusement les traitements** tels que prévus par le protocole.
- Signaler tous les éventuels effets secondaires observés sur votre chien : les traitements employés ont tous déjà été testés quant à leurs effets secondaires. A ce jour aucun effet secondaire grave ou irréversible n'a été rapporté. Toutefois, des effets secondaires non graves peuvent apparaître et il est important pour l'étude qu'ils soient notifiés. Si nécessaire, une adaptation du traitement, une levée de l'aveugle voire un arrêt du traitement sera envisagé : cette décision sera prise par le directeur de l'étude, en concertation avec votre vétérinaire investigateur.

- **Aucun traitement** (y compris homéopathie, phytothérapie, aromathérapie, etc...) ne doit être employé sur vos animaux sans l'accord explicite du directeur de l'étude. En effet, ces derniers pourraient avoir une influence sur les traitements utilisés et donc les résultats observés. Certains traitements sont autorisés dans le protocole d'étude, en cas de besoin, et peuvent être prescrits par le vétérinaire dermatologue. Si une visite chez un vétérinaire est nécessaire durant la durée de l'étude pour un problème relevant ou non de la dermatite atopique, le vétérinaire doit **IMPERATIVEMENT** être informé de la participation de votre animal à une étude clinique et un document spécifique doit lui être remis (notamment si ce n'est pas lui qui assure le suivi de votre animal dans le cadre de cet essai : ce document s'intitule : « Mon chien est inclus dans un essai clinique »).
- Concernant les **traitements antiparasitaires (vermifuges, puces, tiques)**, certaines molécules sont interdites. Un document vous sera fourni (« Mon chien est inclus dans un essai clinique ») : il vous suffira de le remettre à la structure qui vous délivre votre antiparasitaire afin que ce professionnel de la santé puisse s'assurer qu'il ne vous délivre pas une molécule interdite. Si vous achetez des produits en dehors des circuits médicaux traditionnels, vous devez contacter impérativement le directeur de l'étude pour vous assurer que le produit choisi n'est pas interdit dans le protocole d'étude. La vaccination de votre animal peut être maintenue au cours de l'étude, à l'exclusion des vaccins vivants.
- Vous disposerez d'un document à remplir quotidiennement concernant le suivi du traitement de votre animal (moins de 5 min par jour).
- Vous devez maintenir obligatoirement un schéma de lutte contre les puces sur votre animal, comme déterminé avec votre vétérinaire investigateur.
- Vous vous engagez à ne pas modifier le régime alimentaire de votre chien durant toute la durée de l'étude, sans l'accord express du directeur d'étude.
- Vous vous engagez à ne pas mettre votre chien à la reproduction durant toute la durée de l'étude, et durant les 6 mois qui suivent la fin de l'étude si votre chien a reçu du méthotrexate (information donnée lors de la levée de l'aveugle en fin de protocole).
- La réglementation vous impose de **ramener scrupuleusement, chaque mois, à votre vétérinaire, l'intégralité des flacons (vides ou pleins) que vous avez reçus**. Ceci conditionnera votre obtention du traitement du mois suivant.
- Vous vous engagez à **signaler IMPERATIVEMENT** du directeur de l'étude tout écart à ces contraintes : une erreur est toujours possible et rien ne vous sera reproché. **Il est par contre FONDAMENTAL que vous signaliez scrupuleusement toute erreur ou difficulté rencontrée, afin que cette dernière soit prise en compte dans l'analyse finale.**

Le vétérinaire investigateur et le directeur de l'étude se réservent le droit de mettre fin à l'étude en cas de mauvaise observance du propriétaire.

Prise en charge financière

La participation à cette recherche ne donne lieu à **aucune indemnité financière**.

Toutefois, en échange de votre engagement, outre la satisfaction de permettre à la médecine vétérinaire de progresser tout en limitant le recours à l'expérimentation animale, seront **intégralement prises en charge** par VetAgro Sup :

- ➔ **La consultation d'inclusion dans l'étude** telles que décrite dans le protocole d'étude clinique.

- **Toutes les consultations de suivi** dans le cadre défini par le protocole d'étude clinique.
- La réalisation des **examens complémentaires** tels que définis dans le protocole d'étude clinique, à savoir la réalisation d'analyses sanguines (biochimiques, hématologique) et urinaires lors de l'inclusion et des consultations de suivi
- La réalisation **d'analyses de biomarqueurs sanguins** (interleukines et métabolites intracellulaires).
- Le **traitement systémique** aléatoirement déterminé par le protocole d'étude (ciclosporine ou méthotrexate).

Ce qui reste à la charge du propriétaire de l'animal :

- **Toutes les visites préalables au diagnostic de dermatite atopique et à la visite d'inclusion** dans l'étude clinique restent à charge du propriétaire. **La visite ci-dessus nommée « pré-inclusion »** n'est pas prise en charge dans la mesure où elle ne modifie pas votre parcours de soin normal. Seules les analyses nécessaires à l'inclusion de votre animal seront prises en charge (mesures sanguines et urinaires).
- Le traitement habituel de la dermatite atopique modérée à sévère nécessite également des **traitements locaux complémentaires** (crèmes, shampoings, etc..) qui restent à votre charge.
- **Tout traitement supplémentaire** lié à la dermatite atopique et à ses complications infectieuses ou fongiques n'est pas pris en charge, y compris au cours de l'étude, y compris entre la visite de pré-inclusion et la visite d'inclusion.
- **Le traitement de toute affection survenant durant l'étude, qu'elle qu'en soit la cause**, ne sera également pas pris en charge.
- **Les traitements préventifs comme les vaccins ou les antiparasitaires** restent à la charge du propriétaire. Le maintien d'une protection antipuce adaptée durant toute la durée de l'étude clinique est obligatoire.

Traitement des données personnelles

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle nous vous proposons de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales de votre animal seront transmises au directeur d'étude et/ou aux personnes ou sociétés agissant pour son compte, dans des conditions assurant leur confidentialité, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification de ces données. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission de ces données. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du vétérinaire de votre choix à l'ensemble des données médicales de votre animal.

Gestion du matériel biologique

Les prélèvements biologiques (prises de sang) effectués sur votre animal sont susceptibles d'être conservés et utilisés pour les besoins de la recherche. Vous pouvez vous opposer à cette conservation en contactant directement le directeur d'étude.

Risques pour le propriétaire

Le méthotrexate comme la ciclosporine sont disponibles dans de nombreux médicaments pour l'homme. De nombreux effets secondaires sont rapportés chez l'homme. Il faudra donc être vigilant quant à la manipulation de ces substances.

Les personnes présentant une hypersensibilité connue à la ciclosporine doivent éviter tout contact avec le médicament A. Bien se laver les mains après administration. En cas de contact accidentel du produit avec la peau ou les yeux, laver la zone touchée avec de l'eau propre. En cas d'ingestion accidentelle, demander l'avis d'un médecin immédiatement après avoir demandé une levée de l'aveugle en urgence au Directeur d'étude.

Les personnes souffrant d'une insuffisance hépatique grave, d'une insuffisance rénale grave, d'une insuffisance respiratoire, d'affections chroniques graves doivent éviter tout contact avec le médicament B.

De même, les injections du médicament B ne doivent pas être réalisées par des femmes enceintes ni par des hommes ou des femmes souhaitant concevoir un enfant durant la durée de l'étude, ni par des femmes en période d'allaitement. Chez l'Homme, lors de la mise en place d'un traitement à base de méthotrexate, une contraception efficace doit obligatoirement être mise en place pour le patient. Ces restrictions sont liées à l'effet tératogène (et stérilisant) du méthotrexate en cas d'auto-injection accidentelle. Il n'y a donc aucune restriction quant aux personnes/animaux en contact avec le chien. A l'issue de l'étude, il n'existera plus de restriction pour les propriétaires dans la perspective de concevoir un enfant (sauf s'ils désirent maintenir leur animal sous méthotrexate). Même en cas d'auto-injection accidentelle, les effets sont relativement brefs dans le temps quant à leur impact sur la fertilité.

Effets secondaires pour l'animal

Pour la ciclosporine, on retrouve sur la notice des médicaments destinés aux chiens les effets secondaires suivants :

- Troubles gastro-intestinaux : vomissements, selles molles ou mucoïdes, diarrhées.
- Léthargie ou hyperactivité
- Anorexie
- Hyperplasie gingivale bénigne à modérée
- Réactions cutanées telles que papillomes ou modification du pelage
- Pavillon auriculaire rouge et gonflé
- Faiblesse ou crampe musculaire
- Salivation modérée et transitoire
- Dans de très rares cas, diabète sucré, notamment chez le West Highland White Terrier.

Pour le méthotrexate, il n'existe pas de médicament enregistré chez le chien et l'on utilise une préparation de la médecine humaine. Toutefois, les essais préliminaires effectués à VetAgro Sup ont permis de décrire les effets secondaires suivants chez le chien:

- Troubles gastro-intestinaux : vomissements, nausées, diarrhées.
- Anorexie
- Réactions cutanées telles qu'érythème ou squamosis.
- Perte de poids

Sortie de l'étude

La sortie de l'étude a normalement lieu à l'issue de la 7^{ème} visite de contrôle, 7 mois après le début du protocole. Après la réalisation des examens prévus lors de cette dernière visite, le directeur d'étude communiquera au propriétaire de l'animal le traitement que ce dernier a reçu (ciclosporine ou méthotrexate). Ce dernier sera libre de continuer ce traitement ou d'en choisir un autre, en accord avec son vétérinaire.

Malheureusement, une sortie anticipée de l'étude peut avoir lieu dans les cas suivants :

- Aggravation des lésions cutanées ou du prurit considérés comme échecs de traitement trois mois après inclusion dans l'étude
- Effets secondaires délétères
- Nécessité d'emploi de traitements invalidant le protocole
- Non présentation aux conditions du suivi
- Non-respect du protocole par le propriétaire
- Le décès de l'animal, quelle que soit sa cause (accident, maladie, etc...)

De plus, le vétérinaire investigateur et le directeur de l'étude se réservent le droit de mettre fin unilatéralement à l'étude ou d'exclure un animal de l'étude sans l'accord du propriétaire.

Enfin, le propriétaire est libre de décider à tout moment de la sortie de son animal de l'étude sans avoir à se justifier et sans que cela ne porte préjudice à la qualité des soins dont bénéficiera son animal auprès du vétérinaire dermatologiste investigateur. Si vous décidez de quitter l'étude, les éléments biologiques et les données cliniques préalablement obtenus seront conservées et utilisées pour les besoins de la recherche.

Contact

Vous disposez des coordonnées directes du directeur d'étude, lui-même vétérinaire, qui pourra prendre les mesures nécessaires en cas d'urgence, 24h/24, 7j/7 par téléphone. Bien entendu, le directeur d'étude sera en contact direct et permanent avec le vétérinaire dermatologue qui assure le suivi de votre animal. Notre collaboration étroite garantira la meilleure prise en charge possible de votre animal.

De plus, aux horaires de bureau, vous pourrez également contacter le directeur d'étude pour toute question ou demande concernant votre animal ou l'essai clinique. N'hésitez surtout pas à le joindre en cas de besoin.

Par ailleurs, lui-même vous contactera avant l'inclusion de votre animal, à la fin de l'étude et aléatoirement durant la durée de l'étude pour s'assurer que tout va pour le mieux et répondre à toutes vos questions.

« Ce document a pour but de vous expliquer l'importance de votre engagement dans cette étude. Nous avons besoin de vous pour faire progresser les connaissances scientifiques et assurer à votre chien aujourd'hui, mais également à l'ensemble des chiens souffrant de dermatite atopique demain, la meilleure prise en charge possible.

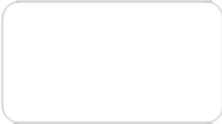
Merci de nous aider à y parvenir »

Antoine ROSTANG, vétérinaire, directeur de l'étude clinique.

Service de pharmacologie/toxicologie de VetAgro Sup (Ecole Vétérinaire de Lyon)

Téléphone : 06 62 34 78 33, joignable 24h/24, 7j/7 si urgence, aux heures de bureau sinon.

→ Laissez-moi un message, avec vos coordonnées, ne rappelez que si pas de nouvelles dans les 2 heures.



FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Je soussigné,
Adresse :
.....
.....
Téléphone portable :
.....
Propriétaire du chien :
de race :
de sexe :
âgé de :
identifié sous le numéro :

- accepte que mon animal participe à un essai clinique permettant d'améliorer la prise en charge des chiens atteints de dermatite atopique. Cette étude est réalisée par le Dr , qui assurera le suivi de mon chien tel que prévu dans le protocole d'étude, sous la supervision du Dr ROSTANG Antoine, directeur d'étude.
 - J'ai reçu et lu attentivement le document d'information standard
 - J'ai eu suffisamment de temps pour réfléchir à la participation de mon animal à cette étude clinique et prendre ma décision en toute connaissance de cause.
 - L'objectif de cet essai m'a été clairement présenté ainsi que la méthodologie, la durée, les bénéfices attendus et les risques associés.
 - J'ai bien compris les contraintes qui seront les miennes durant la participation de mon animal à cette étude clinique et je m'engage à les respecter jusqu'au terme du protocole clinique.
 - J'ai été bien informé(e) que la participation de mon chien à cette étude sera de 7 mois.
 - Je suis conscient(e) de l'interdiction d'administrer tout médicament à mon animal (incluant traitements antiparasitaires, allopathiques, phytothérapeutiques, aromathérapeutiques, homéopathiques) sans en avoir préalablement référé soit à mon vétérinaire dermatologue, soit au directeur d'étude.
 - Je m'engage à informer tout professionnel de la santé pouvant intervenir directement (vétérinaire, ostéopathe, etc..) ou indirectement (pharmaciens, homéopathes, etc...) sur mon chien de la participation de ce dernier à une étude clinique et des limitations qui en résultent, en présentant systématiquement le document « Mon chien est inclus dans un essai clinique ».
 - J'ai bien noté les coordonnées du vétérinaire-dermatologue qui m'a proposé d'intégrer cette étude, ainsi que les coordonnées du directeur de l'étude clinique.
 - J'accepte de contacter le directeur d'étude dans les délais les plus brefs si je constate un effet anormal grave ou si je suis amené à devoir présenter mon chien pour des

troubles de la santé, qu'ils soient ou non en lien avec la thérapie suivie (incluant accidents, maladies, etc...)

- Je m'engage formellement à signaler toute erreur ou toute déviation au protocole le plus rapidement possible au directeur d'étude.
- J'ai bien compris quels actes étaient pris en charge par les services de pharmacie et dermatologie de VetAgro Sup et quels sont ceux qui restaient à ma charge.
- J'ai pris connaissance du fait que le comité d'éthique de VetAgro Sup a donné un avis favorable à cette recherche en date du 28 novembre 2017 (Avis N° 1738).
- J'ai été informé(e) que cette étude fera l'objet de plusieurs publications scientifiques dans des revues à comité de relecture, de présentations lors de congrès vétérinaires français ou internationaux ainsi que d'une thèse universitaire auprès de l'école doctorale interdisciplinaire sciences santé (EDISS) de l'université de Lyon. Dans ce cadre, il n'y aura pas d'utilisation nominative des données, seule une analyse statistique des données sera effectuée.
- Je suis parfaitement conscient(e) que je peux à tout moment retirer mon consentement à la participation de mon animal à cette recherche, et cela quelques soient mes raisons et sans encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice. Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à mes relations avec le vétérinaire investigateur. En cas de retrait de mon consentement, les éléments biologiques recueillis sur mon animal et les données personnelles collectées pourront être utilisés pour l'étude. Mon consentement ne décharge en rien l'investigateur et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.
- Le méthotrexate est une molécule tératogène. La mise en place d'un traitement à base de méthotrexate chez l'homme ou la femme implique la mise en place d'une contraception obligatoire. Je suis parfaitement informé que toute personne souhaitant concevoir un bébé durant toute la durée de l'étude ne doit en aucun cas manipuler le médicament B (homme ou femme). De la même manière, je suis parfaitement informé qu'une femme enceinte ou une femme qui allaite ne doit en aucun cas manipuler le médicament B. Il n'y a par contre aucune contre-indication pour ces personnes à être au contact avec l'animal traité. Le risque pour l'être humain est lié à une auto-injection accidentelle.
- Le méthotrexate étant une molécule tératogène, je m'engage à ne pas mettre mon chien à la reproduction durant toute la durée de l'étude, et durant les 6 mois qui suivent la fin de l'étude si mon chien a reçu du méthotrexate (information donnée lors de la levée de l'aveugle en fin de protocole).
- J'accepte que les prélèvements biologiques effectués sur mon chien soient conservés au-delà de la fin de l'étude pour les besoins de la recherche.
- Je m'engage à rapporter chaque mois les reliquats de médicaments non employés au vétérinaire investigateur, conformément à la réglementation.
- Je souhaite être informé(e) des résultats de l'essai clinique à l'issue de l'étude.

Date :

Signature

Titre : Le méthotrexate chez le chien et le cheval : études pharmacocinétiques et perspectives cliniques

Mots clés : méthotrexate, chien, cheval, pharmacocinétique, tolérance, clairance, biodisponibilité, dermatite atopique, posologie

Résumé : Le méthotrexate est très utilisé chez l'homme à faible dose hebdomadaire, comme immunomodulateur et anti-inflammatoire. En médecine canine ou équine, il pourrait représenter une alternative intéressante pour traiter les maladies auto-immunes ou dues à un phénomène d'hypersensibilité. C'est pourquoi notre étude a pour principal objectif d'évaluer sa tolérance chez le chien et le cheval, et de déterminer un schéma posologique adapté à chaque espèce, par une approche pharmacocinétique. Nos résultats montrent que la tolérance du méthotrexate chez l'animal est bonne. Chez le chien, on note des effets secondaires peu graves (anorexie voire vomissements ou diarrhée) et des élévations intermittentes des enzymes hépatiques. Chez le cheval, les seuls effets secondaires enregistrés concernent les enzymes hépatiques, avec des élévations réversibles à l'arrêt du traitement. La biodisponibilité par voie orale est beaucoup plus faible que par voie sous-cutanée, et inférieure à 1% chez le cheval. La clairance de la molécule chez le chien est légèrement supérieure à l'homme. Chez le cheval, une clairance et un métabolisme réduit conduisent à recommander une diminution des doses. Nous proposons 0,2 mg/kg/semaine, ce qui devra être confirmé par des essais cliniques. Notre second objectif est d'évaluer l'efficacité du méthotrexate pour le traitement de la dermatite atopique du chien, au travers de la mise en place d'un essai clinique de phase III en double aveugle. Le recrutement des animaux est toujours en cours. Toutefois, les premiers résultats obtenus sur 6 chiens sont satisfaisants en terme de réponse clinique, à une posologie oscillant entre 0,25 et 0,5 mg/kg/semaine par voie sous-cutanée.

Title: Methotrexate in dogs and horses: pharmacokinetic studies and clinical perspectives.

Key words: methotrexate, dog, horse, pharmacokinetic, tolerance, clearance, bioavailability, atopic dermatitis, dosage

Abstract: Methotrexate is widely used in humans at low doses, once weekly, as an immunomodulating and anti-inflammatory drug. This drug may be an interesting therapeutic alternative for the management of autoimmune or hypersensitivity diseases in pets or horses. The main objective of our study is to evaluate its tolerance in dogs and horses, and to study its pharmacokinetic characteristics to determine an appropriate dosing regimen for each species. Our results show that methotrexate is well tolerated in animals. In dogs, mild adverse effects (anorexia or even vomiting or diarrhea) and intermittent elevations of liver enzymes are observed. In horses, the only adverse effects reported are elevations in liver enzymes, reversible upon discontinuation of treatment. Oral bioavailability is much lower than subcutaneous bioavailability, and less than 1 % in horses. The methotrexate clearance in dogs is slightly higher than in humans. In horses, reduced clearance and metabolism lead to a recommendation for lower doses. We suggest 0.2 mg/kg/week, which will have to be confirmed by clinical trials. Our second objective is to evaluate the efficacy of methotrexate in the treatment of atopic dermatitis in dogs in a double-blind Phase III clinical trial. Animal recruitment is still ongoing. The first results obtained on 6 dogs, however, are satisfactory in terms of clinical response to a dosage ranging from 0.25 to 0.5 mg/kg/week subcutaneously