



**HAL**  
open science

# Etude expérimentale du mécanisme néphrotoxique du tacrolimus et des effets pharmacodynamiques de ses métabolites

Hassan Aouad

► **To cite this version:**

Hassan Aouad. Etude expérimentale du mécanisme néphrotoxique du tacrolimus et des effets pharmacodynamiques de ses métabolites. Sciences agricoles. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0053 . tel-04220514

**HAL Id: tel-04220514**

**<https://theses.hal.science/tel-04220514v1>**

Submitted on 28 Sep 2023

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

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

**Université de Limoges**  
**ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)**  
**INSERM UMR-1248**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Pharmacologie, infectiologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par  
**Hassan AOUAD**

Le 27 septembre 2021

**Etude expérimentale du mécanisme néphrotoxique du tacrolimus et  
des effets pharmacodynamiques de ses métabolites**

Thèse dirigée par Pr. Marie ESSIG et Pr. Pierre MARQUET

JURY :

Président du jury  
Mme. Chantal BARIN-Le GUELLEC, MCU-PH, Université et CHU de Tours

Rapporteurs  
M. Olivier LAPREVOTE, PU-PH, Faculté de pharmacie de Paris et Hôpital Européen  
Georges Pompidou  
M. Nicolas PALLET, PU-PH, Faculté de Médecine, Centre de Cordeliers, Université  
de Paris et Hôpital Européen Georges Pompidou

Examineurs  
Mme. Chantal BARIN-Le GUELLEC, MCU-PH, Université et CHU de Tours



*A ma famille et mes amis*

*A l'âme du Dr. Toufik HOUMANI*

## Remerciements

---

A Professeur Olivier LAPREVOTE et Professeur Nicolas PALLET en leur qualité de rapporteurs ainsi que Docteur Chantal BARIN-Le GUELLEC en sa qualité d'examineur, c'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Merci à chacun d'entre vous pour le temps consacré à la lecture critique de mes travaux.

A Professeur Marie ESSIG et Professeur Pierre MARQUET :

Aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance, gratitude et respect envers vous. Professeur ESSIG, l'aventure a commencé avec vous, malgré toutes les difficultés et la distance, vous avez continué à surveiller mon travail. Professeur MARQUET, malgré la grosse charge de travail que vous assumez vous m'avez suivi de près pendant ces deux dernières années durant lesquelles vous m'avez ouvert des nouvelles portes grâce à votre brillance et créativité. Professeurs, merci pour vos encadrements, vos conseils et critiques constructives qui m'ont permis d'être le scientifique que je suis aujourd'hui, mais surtout un grand merci pour la personne agréable, respectueuse et sympathique que vous êtes! J'ai été ravi de travailler avec vous.

Aux agréables membres de l'équipe UMR-1248 :

Merci à François-Ludovic SAUVAGE et Emilie PINAULT pour les heures innombrables devant le spectre pour m'aider à avancer dans mes travaux et pour le temps que vous m'avez accordé pour m'expliquer et discuter. François, tu as galéré avec moi d'une façon quotidienne pendant les 4 ans je te remercie d'être aussi disponible et prêt pour m'aider ! Tu peux maintenant rester tranquille dans ton bureau sans que je vienne te déranger avec mon tacrolimus !

Merci à Hélène ARNION pour tes conseils et tes critiques constructives et d'être disponible pour m'aider et répondre à mes questions.

Merci à Jean-Sébastien BERNARD, monsieur « SUPER BCA » et le responsable hygiène et sécurité !!! Tu es arrivé à l'unité pendant ma deuxième année de thèse, plein de dynamisme et prêt à apprendre toutes les techniques utilisées que tu as pu maîtriser rapidement. Tu as été toujours prêt à m'aider dans mes expériences même les plus pénibles! En plus de tes qualités professionnelles tu es quelqu'un de très agréable et gentil capable de me faire sourire même dans les situations difficiles avec tes blagues !! Merci pour tous ces moments agréables !

Merci à Florent DI MEO. Je t'ai connu au début de ma thèse un chercheur dans l'unité très proche des étudiants qui rigole, qui donne des conseils et qui les consolide dans les moments difficiles. Je suis ravi que j'ai eu également l'opportunité de travailler avec toi, grâce à l'idée de Pr MARQUET, ou j'ai connu quelqu'un de très sérieux et impliqué dans son travail avec plein des idées et qui surtout prend son temps pour m'expliquer avec patience les travaux de dynamique moléculaire.

Merci à Roland LAWSON pour ces 4 années! Dès le début de ma thèse tu étais quelqu'un de très proche, qui a toujours le temps pour m'écouter et me donner des conseils

et des remarques pertinentes. Lorsque tu as lancé ta propre thématique sur la pharmacomicrobiomique tu m'as fait part de certaines réflexions et discussions très enrichissantes et tu m'as donné l'opportunité de participer dans la nuit européenne des chercheurs sur cette thématique, une expérience que j'ai bien aimée !! Je te souhaite le meilleur!

Merci à Quentin FAUCHER « le professeur », on s'est rencontré pendant ton stage de Master 2 et voilà tu vas bientôt soutenir ta thèse! Je suis ravi d'avoir partagé le même bureau avec toi pendant ces 4 ans avec plein de discussion intéressante et des moments magnifiques et finalement avec un article qui restera un souvenir commun de ces 4 ans!

A mes camarades et amis dans l'unité, Tom, Ben, Joseph, Manon, Ali, Eliès, Clarisse « téta », Roy, Mehdi, Angelika, Agota et Bénédicte. Je vous remercie pour les moments agréables et je vous souhaite le meilleur. Une mention spéciale pour Manon pour son aide précieux et sans hésitation lors de mes expériences.

Merci à Karen et Emmanuelle pour leurs gentillesse et leurs aides au quotidien.

Merci aux personnels du service de pharmacologie et de toxicologie de CHU de Limoges pour leur aide et leur gentillesse surtout Naïma TAFZI.

Merci à mes amis doctorant hors de l'unité, Nour, Hussein, Israa, Jennifer, Lina, Batoul, Linda, Zeina, May et Wadad pour les moments agréables. Mention spéciale à Zeinab et Iman (*les sœurs DALLOUL*) pour leurs aides précieux et leurs amitiés.

Un grand merci pour Pr. Hayat AZZOURI. Vous m'avez initiée à la toxicologie à la faculté de pharmacie, encadrée pour ma thèse de pharmacie et encouragée pour faire une thèse d'université. Je n'ai jamais oublié vos paroles apaisantes, basées sur votre expérience personnelle, qui m'avaient encouragé dans les jours les plus difficiles.

Merci à ma grande famille, mes oncles et tantes, et ma petite famille. Mon père, ma mère, sans vous je n'aurais pas pu venir en France pour continuer mes études supérieures et arriver à ce stade. Je n'oublierai jamais vos larmes, vos sourires, vos conseils, vos motivations et vos prières. Mes frères et leurs épouses, merci pour votre soutien inconditionné.

Merci à mes amis hors du labo en France et au Liban pour votre soutien pendant ces années.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des abréviations

---

APCI : *Atmospheric pressure chemical ionization*

AUC : aire sous la courbe

CRAC : *Calcium release-activated channels*

CYP : cytochrome P450

DAG : diacylglycerol

DDA : *data-dependent-acquisition*

DIA : *data-independent-acquisition*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESI : *electrospray ionisation*

FAB : *fast atom bombardment*

FBP1 : Fructose 1,6-bisphosphatase 1

FBP2 : Fructose 1,6-bisphosphatase 2

FT-ICR : *Fourier-transform ion cyclotron resonance*

GSK3 $\beta$  : glycogène synthase kinase 3 $\beta$

HLM : microsomes hépatiques humains

IEF : iso-électrofocalisation

IFN- $\gamma$  : interferon

IL-2 : interleukin 2

IL-3 : interleukin 3

IP3 : inositol-1,4,5- triphosphate

IT : ion trap

iTRAQ : *Isobaric Tag For Relative and Absolute Quantitation*

FKBP12 : *FK-506 Binding Protein 12*

LLC-PK1 : *Lilly Laboratories Cells Porcine Kidney 1*

LT : lymphocyte T

MALDI : *Matrix assisted laser désorption ionisation*

MLR : réaction lymphocytaire mixte

MnSOD : manganèse-superoxyde dismutase

MRM : *multiple-reaction-monitoring*

mTRAQ : *Amine-Modifying Labelling Reagent for Relative and Absolute Protein Quantitation*

MS : spectrométrie de masse

m/z : masse/charge

M-I : 13-déméthyltacrolimus

M-II : 30-déméthyltacrolimus

M-III : 15-déméthyltacrolimus

NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells*

PCK-1 : phosphoénolpyruvate kinase cytoplasmique 1

PLCy : Phospholipase C  $\gamma$

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PIP2 : phosphatidyl inositol-4,-diphosphate

Q : quadripôle

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : radicaux libres d'oxygène

SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SILAC : Stable isotope labelling by amino acids in cell culture

TAC : Tacrolimus

TCR : *T cell receptor*

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TMT : *Tandem Mass Tag*

TOF : *time of flight*



## Table des matières

---

Table des abréviations .....	6
Table des matières .....	8
Table des illustrations .....	9
Table des tableaux .....	10
Introduction générale .....	11
Chapitre I. Introduction .....	12
I.1. La protéomique .....	12
I.1.1. Définition .....	12
I.1.2. Protéomique basée sur la spectrométrie de masse .....	12
I.2. La métabolomique : .....	28
I.2.1. Définition .....	28
I.2.2. Spectrométrie de masse .....	28
I.2.3. Techniques de séparation .....	28
I.2.4. Quantification .....	30
I.3. Tacrolimus .....	31
I.3.1. Généralités : .....	31
I.3.2. Néphrotoxicité du tacrolimus .....	35
I.4. Métabolites du tacrolimus .....	42
I.5. Hypothèse de travail et objectifs .....	45
Chapitre II. Travaux personnels .....	46
II.1. Travail personnel 1 : Etude multi-omique de la néphrotoxicité du tacrolimus .....	47
II.1.1. Résumé : .....	47
II.1.2. Article 1: A multi-omics study to assess tacrolimus toxicity in proximal tubular cells .....	49
II.2. Travail personnel 2 : Effets pharmacologiques des métabolites du tacrolimus .....	68
II.2.1. Résumé .....	68
II.2.2. Article 2 : Potential Pharmacological Effects of Tacrolimus Metabolites .....	71
Chapitre III. Discussion, conclusion et perspective .....	101
III.1. Discussion et conclusion : Étude multi-omique de la néphrotoxicité du tacrolimus ..	101
III.2. Discussion et conclusion : Effets pharmacologiques des métabolites du tacrolimus	103
III.3. Perspective .....	105
Références bibliographiques .....	107

## Table des illustrations

---

Figure 1. Principe d'ionisation des analytes par l'electrospray (ESI).....	13
Figure 2. Schéma représentatif d'un spectromètre de masse de type quadripôle-TOF.....	16
Figure 3. Schéma représentant les différentes étapes de préparation d'échantillons et d'analyse avec les différentes approches de protéomique bottom-up.....	20
Figure 4. Schéma représentant la quantification des peptides lors des analyses label-free par les intensités des pics et le comptage des spectres. ....	22
Figure 5. Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique SILAC.....	23
Figure 6. Composition des tags iTRAQ et leur réaction avec les peptides.....	24
Figure 7. Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique iTRAQ. ....	25
Figure 8. Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique mTRAQ. ....	27
Figure 9. Structure du tacrolimus.....	32
Figure 10. Schéma représentant le mécanisme d'activation des lymphocytes T (a) et le mécanisme d'action du tacrolimus (b). ....	34
Figure 11. Schéma récapitulant les mécanismes de toxicité du tacrolimus au niveau des cellules tubulaires proximales.....	41
Figure 12. Les structures du tacrolimus et de ses métabolites décrites par Iwasaki et al.....	43
Figure 13. Structure du métabolite du tacrolimus généré par le microbiote intestinal, décrite par Guo et al.. ....	43

## Table des tableaux

---

Tableau 1. Résolution des différents analyseurs de masse .....	15
--	----

## Introduction générale

---

L'usage des immunosuppresseurs dans la pratique clinique a révolutionné la prise en charge des patients souffrant d'une défaillance de certains organes tels que le cœur, le foie, les reins, les poumons en offrant la possibilité d'effectuer des transplantations d'organes. En plus de ce contexte particulier, les immunosuppresseurs sont utilisés dans la prise en charge des maladies inflammatoires et auto-immunes.

Le tacrolimus, un immunosuppresseur appartenant à la famille des inhibiteurs de la calcineurine, est actuellement l'un des piliers des protocoles d'immunosuppression utilisés dans le cadre de transplantation d'organes solides et d'autres maladies inflammatoires. Il est caractérisé d'une part par une bonne efficacité thérapeutique et d'autre part par un index thérapeutique étroit et une importante variabilité interindividuelle, liée en partie à des polymorphismes génétiques tels que celui du cytochrome P450 3A5. Ces deux dernières caractéristiques exposent les patients à un risque de toxicité aiguë liée à des concentrations sanguines supra-thérapeutiques ou à un rejet de greffe lié à une sous-exposition au tacrolimus. Ces deux risques ont diminué avec le développement du suivi thérapeutique pharmacologique et l'essor de la pharmacogénétique, qui ont permis une meilleure adaptation de la posologie du tacrolimus. De plus, le tacrolimus cause l'apparition d'une néphrotoxicité chronique malgré l'exposition des patients à des concentrations de niveau considéré comme thérapeutique, alors même que ce niveau thérapeutique a considérablement diminué depuis 20 ans. Contrairement au mécanisme d'action bien décrit du tacrolimus, le mécanisme complet de cette néphrotoxicité reste pour l'instant ambigu malgré l'élucidation de plusieurs mécanismes élémentaires potentiellement impliqués.

Le tacrolimus est métabolisé par le cytochrome 3A4 et 3A5 en un grand nombre de métabolites déméthylés et hydroxylés. L'influence de ces métabolites sur la pharmacologie et la toxicité du tacrolimus a été incomplètement explorée jusqu'ici. Malgré des travaux *in vitro* préliminaires qui ont montré que la majorité des métabolites du tacrolimus sont inactifs, les études cliniques sont contradictoires sur ce sujet, certaines suggérant un impact potentiel des métabolites sur l'activité et la toxicité du tacrolimus.

Ce travail vise à étudier différents aspects de la pharmacologie et la toxicité du tacrolimus. Elle est divisée en deux axes. Le premier est l'étude *in vitro* de la néphrotoxicité du tacrolimus par une double approche protéomique et métabolomique. Le deuxième est d'explorer l'hypothèse que les métabolites du tacrolimus pourraient se comporter comme des antagonistes du principe actif.

## Chapitre I. Introduction

---

### I.1. La protéomique

#### I.1.1. Définition

La protéomique est définie comme étant l'étude du protéome (1), comme la génomique est celle du génome, la transcriptomique est celle du transcriptome et la métabolomique est celle des métabolites. Le protéome désigne l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. Les études qualificatives et quantitatives des protéines peuvent être effectuées par différentes techniques biologiques « traditionnelles » telles que le Western blot, la microscopie à fluorescence ainsi que l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Ces techniques présentent plusieurs limites, dont leur incapacité à détecter simultanément un grand nombre de protéines et leur dépendance à l'existence d'anticorps spécifiques contre les protéines recherchées. Les progrès de la spectrométrie de masse, liés à l'utilisation de sources d'ionisation dites « douces » ou à la démocratisation des analyseurs à haute résolution, ainsi qu'à la mise au point de méthodes de retraitement informatique des données générées ont permis l'émergence de la protéomique basée sur la spectrométrie de masse (*MS-based proteomics*). Malgré ses énormes progrès techniques depuis sa conception, la protéomique basée sur la spectrométrie de masse présente toujours plusieurs limites et difficultés. Ceci a permis aux autres méthodes biologiques de conserver leurs places comme méthodes de validation des résultats de la protéomique, ou pour approfondir la recherche sur des protéines non détectées par la spectrométrie de masse.

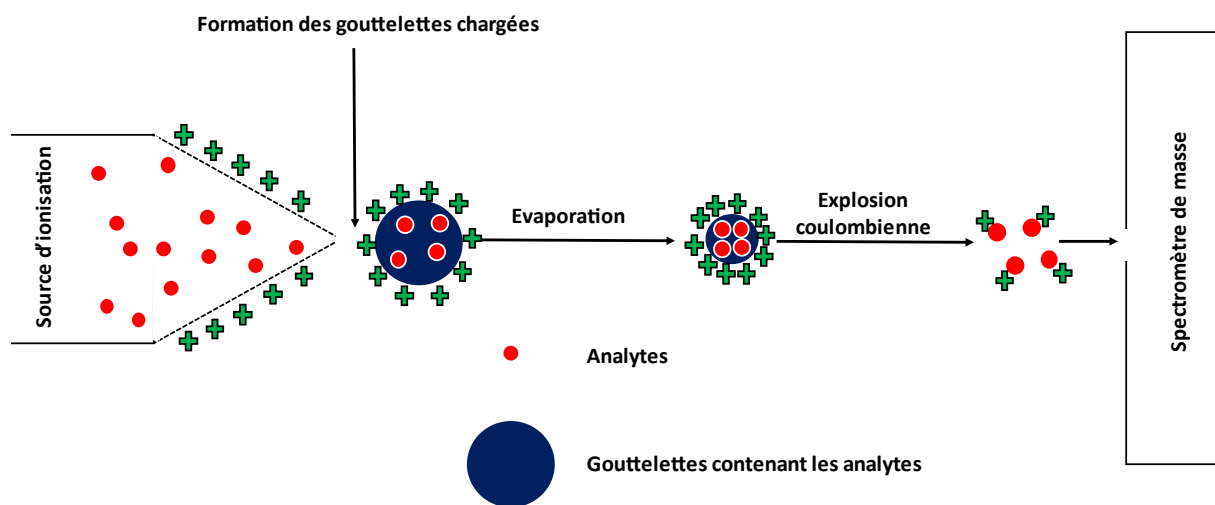
#### I.1.2. Protéomique basée sur la spectrométrie de masse

##### I.1.2.1. Spectrométrie de masse

Le premier spectromètre de masse a été inventé en 1913 à l'université de Cambridge, par le professeur Sir Joseph John Thomson (2). Le principe de cette technologie est de détecter des molécules chargées et de les caractériser selon le rapport masse/charge ( $m/z$ ). Généralement, un spectromètre de masse est formé de 3 éléments principaux : une source d'ionisation (pour ioniser les substances à analyser), un analyseur de masse (pour sélectionner les ions formés selon leur  $m/z$ ) et un détecteur d'ions.

De nombreuses sources d'ionisation ont été inventées en se basant sur des principes différents afin d'assurer une ionisation optimale en fonction des différentes substances organiques à analyser. La première d'entre elles est la source d'ionisation par impact électronique. Cette méthode est basée sur le principe d'un bombardement des molécules avec

des électrons de forte énergie, sous un vide poussé. Ces derniers vont alors arracher un électron et ainsi ioniser les molécules (3). Ce phénomène peut induire une fragmentation puissante des molécules au niveau de la source d'ionisation. D'autres méthodes d'ionisation, dites douces, ont ensuite été développées telles que l'ionisation chimique, le FAB (*fast atom bombardment*), l'ESI (*electrospray ionisation*) et le MALDI (*Matrix assisted laser desorption ionisation*)(4–7). Ces deux derniers modes d'ionisation sont les plus utilisés dans le domaine de la protéomique du fait de leur capacité à ioniser des substances de haut poids moléculaire, telles que les peptides et les protéines, sans les fragmenter au niveau de la source (8,9). L'ESI permet l'ionisation des molécules en phase liquide par l'application d'un voltage élevé au niveau d'une buse métallique de nébulisation, à pression atmosphérique. Ceci provoque la formation de gouttelettes chargées contenant les analytes. Le volume des gouttelettes va diminuer par évaporation au fur et à mesure de leur trajet. Ceci aboutit à l'explosion des gouttelettes (explosion coulombienne) sous l'effet de la répulsion des charges tout en libérant les analytes chargés en phase gazeuse (Figure 1)(9). Pour le MALDI, les analytes sont co-cristallisés dans une matrice. Une fois irradiés par un laser, les analytes sont libérés sous forme ionisée en phase gazeuse (10).



**Figure 1.** Principe d'ionisation des analytes par l'electrospray (ESI)

Suite à l'ionisation, les analyseurs de masse permettent de guider et de sélectionner les ions selon leur  $m/z$  avant leur détection. Plusieurs types d'analyseurs de masse existent tels que le quadripôle (Q), l'*ion trap* (IT) et trois types d'analyseurs haute résolution, les analyseurs à temps de vol ou TOF (*time of flight*), ceux de type *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) et l'*orbitrap*. Un quadripôle (Q), comme son nom l'indique, est formé de 4 pôles métalliques permettant l'analyse des ions en faisant varier simultanément des courants électriques continu et alternatif. Chaque courant est appliqué sur les pôles opposés, qui

induisent l'oscillation et le déplacement des ions dans le quadripôle. A chaque temps, une combinaison spécifique de ces courants électriques permet aux seules molécules possédant un  $m/z$  donné de traverser le quadripôle avec une trajectoire stable, permettant ainsi de les sélectionner et de les analyser. Un *ion trap* (IT) est une modification du quadripôle dans lequel les ions sont piégés dans l'analyseur à l'aide d'un courant continu. En changeant la fréquence du courant alternatif, des ions à  $m/z$  précis seront éjectés de l'analyseur pour être analysés. Le TOF est un analyseur dans lequel les ions vont voler dans un tube de vol suite à une accélération par un champ électrique. Le  $m/z$  de la molécule est calculé en fonction du temps de vol mesuré depuis l'accélération jusqu'à la détection. Le FT-ICR est un analyseur qui piège les ions par un champ magnétique. Grâce à ce champ magnétique, les ions se déplacent dans le détecteur selon une trajectoire circulaire, perpendiculaire au champ magnétique. Le  $m/z$  de chaque molécule est par la suite calculé selon la fréquence angulaire à l'aide de la transformation de Fourier. L'*orbitrap* est l'analyseur le plus récent dont le principe ressemble à celui de la FT-ICR. A l'intérieur de l'analyseur les ions sont piégés par un champ électrique qui induit le mouvement des ions, cette fois-ci dans des orbites, ce qui permet de calculer le  $m/z$  (11,12).

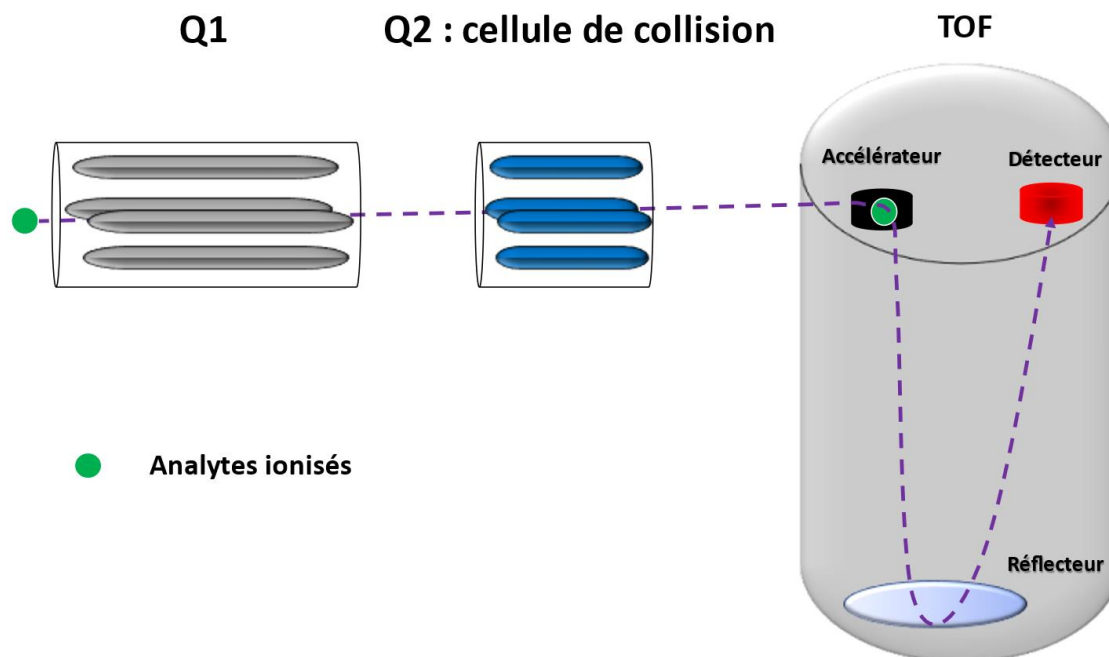
Ces analyseurs sont actuellement surtout utilisés en combinaison tels que Q-Q, Q-IT, Q-TOF et Q-Orbitrap ; d'où la notion de spectrométrie de masse en tandem. Dans ces spectromètres, les analyseurs sont séparés par une cellule de collision dans laquelle les ions sont accélérés et entrent en collision avec un gaz inerte, ce qui permet la fragmentation des molécules (12). Ceci permet d'avoir deux types de spectres lors des analyses non ciblées : le spectre MS1, dans lequel le  $m/z$  de l'ion parent est visualisé et le spectre MS2, qui montre les  $m/z$  des fragments de l'ion parent, appelés ions fils. L'objectif de la fragmentation est d'accentuer la caractérisation de la molécule à analyser. Dans le cadre de la protéomique, ces spectres de fragmentation (MS2) fournissent des informations essentielles pour la caractérisation des peptides ou des protéines analysées, en plus de la masse de l'ion parent. C'est la raison pour laquelle les spectromètres de masse les plus utilisés en protéomique sont une combinaison des analyseurs quadripôle-TOF (Figure 2) ou quadripôle-*orbitrap* (13). En effet ces analyseurs permettent d'obtenir des spectres de haute résolution (tableau 1). Ces spectres montrent des fragments produits suite à des coupures des liaisons peptidiques. La différence de masse observée entre deux fragments consécutifs correspond idéalement à la masse d'un résidu d'acide aminé. La méthode d'identification de la séquence peptidique *de novo* est basée sur l'attribution de cette différence de masse à l'acide aminé, afin de tracer la séquence peptidique. Or la situation n'est pas toujours idéale, avec l'absence de certains fragments dans le spectre MS2 ; c'est pour cela que l'identification se fait également par une comparaison des spectres observés par rapport à des spectres théorique d'une séquence théorique afin d'identifier la

séquence totale, même en l'absence de certains fragments. Ces méthodes d'identification sont surtout appliquées pour les peptides car leur spectre de fragmentation est plus simple que celui des protéines. Les analyses non ciblées peuvent être effectuées selon deux modes, DDA (*data-dependent-acquisition*) ou DIA (*data-independent-acquisition*). La DDA consiste en l'analyse des ions les plus intenses détectés dans une fenêtre de temps précise. Concernant la DIA, elle consiste à effectuer des analyses séquentielles dans une fenêtre de masse globale. En effet, l'instrument se focalise sur une petite fenêtre de masse d'ions précurseurs pendant un temps précis et fragmente tous les ions parents présents. Ce processus est répété sur des petites fenêtres de manière croissante afin de couvrir l'ensemble des masses. Les analyses de type SWATH-MS (*Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra*) sont des analyses de type DIA qui consistent à sélectionner et fragmenter théoriquement tous les ions dans une fenêtre de masse donnée. Ceci génère des spectres de fragmentation complexes qui, suite à leur interprétation par rapport à une librairie de spectre, permettent d'identifier les ions parents et de tracer des XIC (*extracted ion chromatogram*) pour les quantifier.

**Tableau 1.** Résolution des différents analyseurs de masse (14)

Analyseur de masse	Résolution
Quadripôle	100-1000
<i>Ion trap</i>	1000-10000
TOF	1000-40000
<i>Orbitrap</i>	10000-150000
FT-ICR	10000-1000000





**Figure 2.** Schéma représentatif d'un spectromètre de masse de type quadripôle-TOF

### I.1.2.2. Technique de séparation

Au vu de la complexité des échantillons protéiques à analyser et afin d'améliorer l'identification des protéines, différentes techniques de séparation sont utilisées en amont de l'injection des échantillons dans le spectromètre de masse. Ces techniques sont basées sur plusieurs principes et peuvent être utilisées séparément ou en combinaison.

#### I.1.2.2.1. Chromatographie liquide :

La chromatographie liquide est une technique de séparation des substances basée sur la différence d'affinité des molécules vis-à-vis d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. La chromatographie liquide en phase inverse est la technique de chromatographie la plus utilisée en protéomique. Pendant la séparation, les peptides et les protéines sont élués de la colonne chromatographique par un gradient de phase apolaire (14). Dans le cas de l'utilisation d'une source d'ionisation ESI, le système chromatographique peut être relié directement au spectromètre de masse alors que, dans le cas d'une ionisation par MALDI, une chromatographie *offline* est réalisée en amont afin de séparer les échantillons et de les déposer sur une plaque MALDI. Avec l'augmentation de la performance des spectromètres de masse et de leur résolution, les techniques de chromatographie liquide ont également évolué afin d'assurer une meilleure séparation. Il a ainsi été développé des chromatographies en 2 dimensions et 3 dimensions où plusieurs types de chromatographie liquide sont réalisés en série. Les analytes sont alors séparés, dans un premier temps, par un type de chromatographie (dimension 1) et dans un second temps ils sont séparés par un autre type

de chromatographie (dimension 2). Ainsi, la chromatographie échangeuse de cations, la chromatographie échangeuse d'anions, la chromatographie d'exclusion de taille et la chromatographie à interactions hydrophiles peuvent être couplées à la chromatographie en phase inverse (15).

#### **I.1.2.2.2. Iso-électrofocalisation**

L'iso-électrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des ampholytes tels que les peptides et les protéines selon leur pH isoélectrique (pHi). Ce dernier est défini comme étant le pH pour lequel une molécule présente une charge totale neutre. Les analytes sont soumis à un courant électrique et migrent dans un gel contenant un gradient fixe de pH jusqu'à la zone de pH correspondant à leur pHi (16). Cette technique de séparation permet de fractionner un échantillon en plusieurs échantillons selon la longueur du gel utilisé.

#### **I.1.2.2.3. Electrophorèse en deux dimensions (2D)**

Dans l'électrophorèse en 2D, la première migration est effectuée par IEF et la deuxième par électrophorèse classique de type SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*). Cette technique permet donc de séparer les protéines selon 2 critères, le pHi et le poids moléculaire (17). Suite à la migration, les gels sont colorés et les protéines apparaissent sous forme de *spots* dont le volume est proportionnelle à leur abondance.

#### **I.1.2.2.4. Gel-Eluted Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis**

Il s'agit d'une technique de séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Les protéines sont déposées sur une colonne de gel et un courant électrique permettant de séparer les molécules est appliqué. Une fois arrivées à la fin de la colonne, les protéines sont relarguées dans une chambre de collecte contenant une phase liquide (18). Ceci permet de séparer un échantillon complexe de protéines en plusieurs fractions protéiques en phase liquide dont chacune contient un intervalle de masses protéiques.

### **I.1.2.3. Les approches d'analyse des protéines**

En raison de leur poids moléculaire élevé, l'analyse des protéines en spectrométrie de masse représente un vrai défi. Deux approches, appelées *top-down* et *bottom-up*, chacune présentant des avantages et des inconvénients spécifiques quant aux informations qu'elle apporte.

#### **I.1.2.3.1. TOP-DOWN**

Cette approche consiste à analyser les protéines entières sans modifier la séquence protéique lors de la préparation de l'échantillon. Ceci permet d'analyser les « *proteoform* ». Le

*proteoform* signifie les différentes formes d'une protéine causées par des variations génétiques, d'épissages alternatifs d'ARN ou des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la glycosylation (19). Cette approche permet d'identifier des isoformes de protéines, qui peuvent dépendre d'un tissu ou apparaître lors d'une pathologie ou d'une toxicité. Ces analyses présentent des défis techniques induits par la nature de l'échantillon. Les mélanges complexes tels que les lysats cellulaires et tissulaires contiennent des protéines avec une grande variabilité de solubilité. Ceci peut provoquer lors de la préparation des échantillons la précipitation et l'agrégation de certains types de protéines, telles que les protéines membranaires (20). Ce problème ne se pose pas pour les échantillons non complexes pour lesquels les conditions de préparation de l'échantillon sont facilement adaptées afin de garder les protéines en solution, une simple filtration étant souvent suffisante avant l'analyse. De plus, la vigilance doit être de mise afin de conserver les modifications post-traductionnelles et de ne pas générer d'autres modifications lors de la préparation de l'échantillon. Les protéines sont des molécules de haut poids moléculaire ce qui rend leur fragmentation plus difficile. De même, ce haut poids moléculaire pose problème lors de l'ionisation par une source de type ESI où les protéines ont le plus souvent plusieurs états de charge et des spectres de fragmentation très complexes à analyser (21). Des solutions à ces problèmes ont été apportées par les spectromètres de masse à haute résolution et l'optimisation des techniques de préparation et de séparation des échantillons.

#### **1.1.2.3.2. BOTTOM-UP**

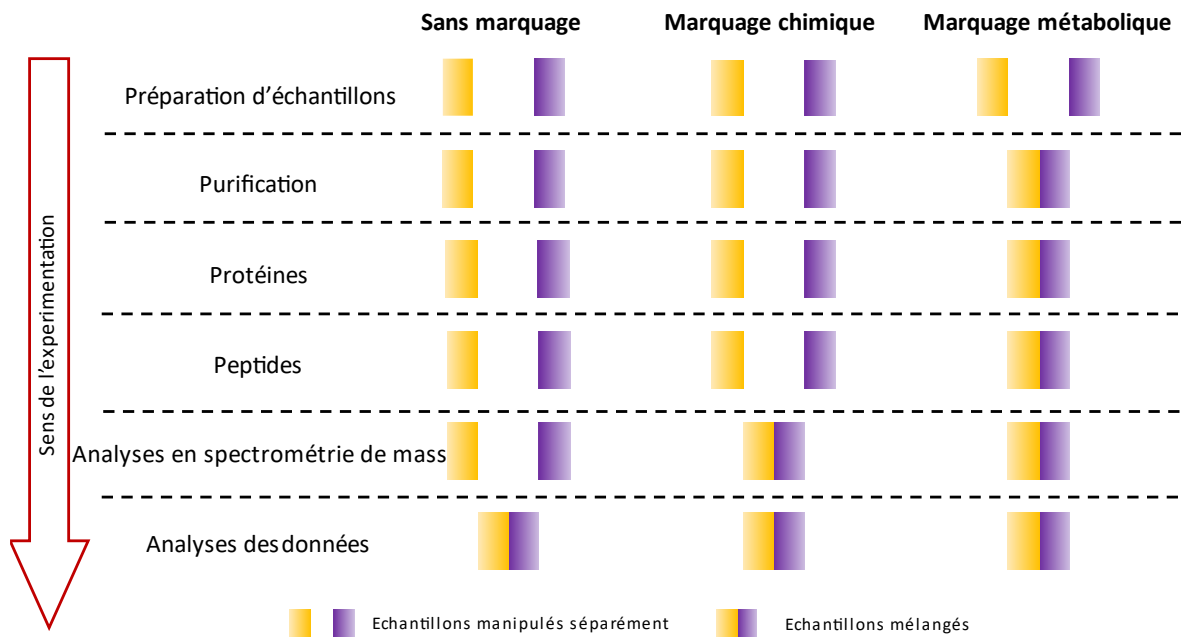
Également appelée *shotgun*, il s'agit de l'approche protéomique la plus utilisée. Contrairement à l'approche *top-down*, l'approche *bottom-up* consiste en une digestion des protéines par des enzymes protéolytiques spécifiques, suivie par la séparation par chromatographie liquide et l'analyse en spectrométrie de masse des peptides générés (22). Ceci facilite la conception des protocoles de préparation d'échantillons, par rapport aux analyses *top-down*, puisque la majorité des peptides sont solubles dans l'eau. De plus, les peptides digérés étant de faible poids moléculaire, cela facilite leur ionisation et leur fragmentation, ainsi que l'analyse des fragments afin de reconstruire la séquence. Malgré ces deux avantages, cette approche a des inconvénients incontournables. Le temps nécessaire à la préparation de l'échantillon est généralement long en raison de l'étape de digestion, et la couverture de la séquence protéique est incomplète. Ceci peut être dû à la formation de peptides de très faible taille non détectés lors des analyses, ainsi qu'au fait que des peptides peuvent être communs à plusieurs protéines (23). Cela peut également être lié au mode d'acquisition, DIA et DDA, qui ne permet pas de les détecter lors des analyses ou simplement parce que la quantité de ces peptides est inférieure à la limite de détection. Cette approche est surtout utilisée lors des analyses quantitatives. Malgré la couverture incomplète de la séquence protéique, qui engendre une

perte d'informations sur les modifications post-traductionnelles, cette approche peut être utilisée comme analyse complémentaire aux analyses *top-down* afin de détecter la position des modifications post-traductionnelles, surtout dans les mélanges non complexes. La Trypsine est l'enzyme la plus utilisée mais d'autres le sont également, telles que la Chymotrypsine, la Lysyl endopeptidase (Lys-C), la Peptidyl-Lys metalloendopeptidase (lys-N), la Glutamyl peptidase I (Glu-C), la Peptidyl-Asp metallopeptidase (Asp-N), la Lysarginase, la clostripain (Arg-C), la Pepsine, la Candidapepsin-9 (Sap9) et l'omptin (Ompt) (24). Cette gamme d'enzymes permet de couper à des niveaux spécifiques de la séquence protéique ; ceci est très utile pour étudier les positions des modifications post-traductionnelles.

#### **I.1.2.4. Les approches de la protéomique différentielle (protéomique quantitative)**

La protéomique différentielle peut être définie comme la méthodologie qui permet l'analyse de différents échantillons protéiques et la quantification relative des protéines présentes dans un échantillon par rapport à un autre. Ce type d'analyse est effectué afin de comparer le profil protéomique des échantillons provenant d'organismes exposés à des conditions différentes. Ceci permet de comprendre les mécanismes de toxicité cellulaire induits par certains produits chimiques tels que les médicaments, comme dans le cadre de cette thèse, ou des conditions de culture variables, telles que l'hypoxie. A l'échelle humaine, ces analyses sont utilisées dans le but d'identifier des biomarqueurs d'une maladie ou d'une toxicité dans les matrices biologiques (sang, urine, salive, biopsie). Ces techniques peuvent être également utilisées dans d'autres domaines tels que la biologie végétale et l'agroalimentaire.

Les approches de protéomique différentielle peuvent être séparées en 2 groupes selon la méthode de séparation, les approches basées sur la séparation sur gel et les approches basées sur la séparation chromatographique. Trois approches sont décrites pour cette dernière : sans marquage (*label-free*), avec marquage métabolique et avec marquage chimique (Figure 3). Ces approches sont majoritairement basées sur la méthode d'analyse *bottom-up*. Nous décrivons les approches les plus utilisées.



**Figure 3.** Schéma représentant les différentes étapes de préparation d'échantillons et d'analyse avec les différentes approches de protéomique bottom-up.

#### I.1.2.4.1. Approche basée sur la séparation sur gel (2D SDS-PAGE)

Cette approche permet la séparation des protéines et la comparaison de plusieurs échantillons. Chaque échantillon migre séparément sur un gel 2D puis suite à la coloration, les volumes des *spots* sont quantifiés ; seuls les *spots* montrant des variations d'intensité (augmentation ou diminution d'expression) sont analysés. Cette technique présente une grande variabilité de migration entre les différents gels, d'où le développement de la technique 2D-DIGE. Cette technique se base sur un marquage protéique par différents fluorophores au niveau des lysines permettant ainsi de discriminer les différents échantillons (25). Ces derniers sont alors mélangés et migrent sur le même gel atténuant ainsi la variabilité des analyses. La différence d'intensité de fluorescence permet la quantification des protéines et l'analyse par spectrométrie de masse permet leur identification.

#### I.1.2.4.2. Approche basée sur la séparation par chromatographie liquide

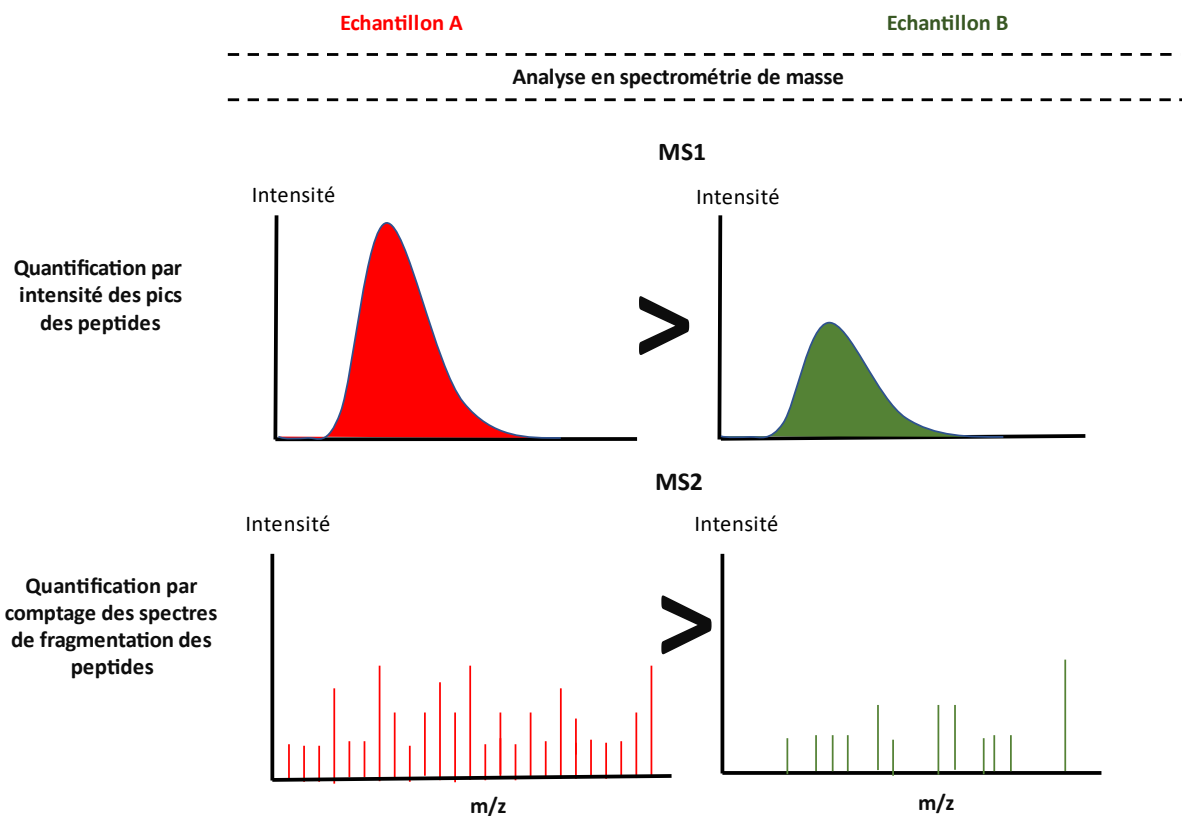
##### I.1.2.4.2.1. Sans marquage (*Label-free*)

Il s'agit de l'approche la plus rapide, la moins chère et présentant une capacité de comparaison des échantillons théoriquement infinie. Elle est basée sur une simple préparation d'échantillon. Après extraction des protéines, celles-ci subissent une purification suivie par une dénaturation et une digestion par une enzyme sélectionnée. Les peptides sont par la suite extraits et analysés par spectrométrie de masse. Leur quantification, comme dans le cas de toutes les

analyses protéomiques, représente un véritable défi. Sur la base des informations générées par le spectromètre de masse, trois méthodes de quantification peuvent être utilisées :

- Le comptage de spectres (*spectral-counting*) basé sur le spectre MS2 généré après la fragmentation des peptides. Plus les spectres sont nombreux, plus le peptide est présent. La somme de tous les spectres des peptides spécifiques de la protéine est proportionnelle à la concentration de la protéine (Figure 4) (26).
- L'aire sous la courbe des pics du spectre MS1 peut également être utilisée. L'aire sous la courbe reflète la quantité de chaque peptide. La somme des aires sous la courbe des peptides reflète par la suite la quantité de la protéine (Figure 4) (27).
- Le score emPAI, calculé à partir du score PAI qui est égal au rapport du « nombre de peptides détectés/nombre de peptides théoriques » d'une protéine. Plus une protéine est abondante dans un échantillon, plus le nombre de peptides spécifiques de cette protéine augmente, et, par conséquent, plus le score PAI augmente. Le score emPAI ( $= 10^{PAI} - 1$ ) présente une proportionnalité plus élevée par rapport à l'abondance des protéines que le score PAI (28).

Malgré les avantages de cette approche sans marquage, un inconvénient majeur est la variabilité analytique. Les échantillons sont préparés séparément ce qui engendre une variabilité due à leur manipulation et à leur digestion. De plus, les échantillons sont analysés séparément ce qui engendre une variabilité analytique.



**Figure 4.** Schéma représentant la quantification des peptides lors des analyses label-free par les intensités des pics et le comptage des spectres.

#### I.1.2.4.2.2. Marquage métabolomique

##### I.1.2.4.2.2.1. *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture* « SILAC »

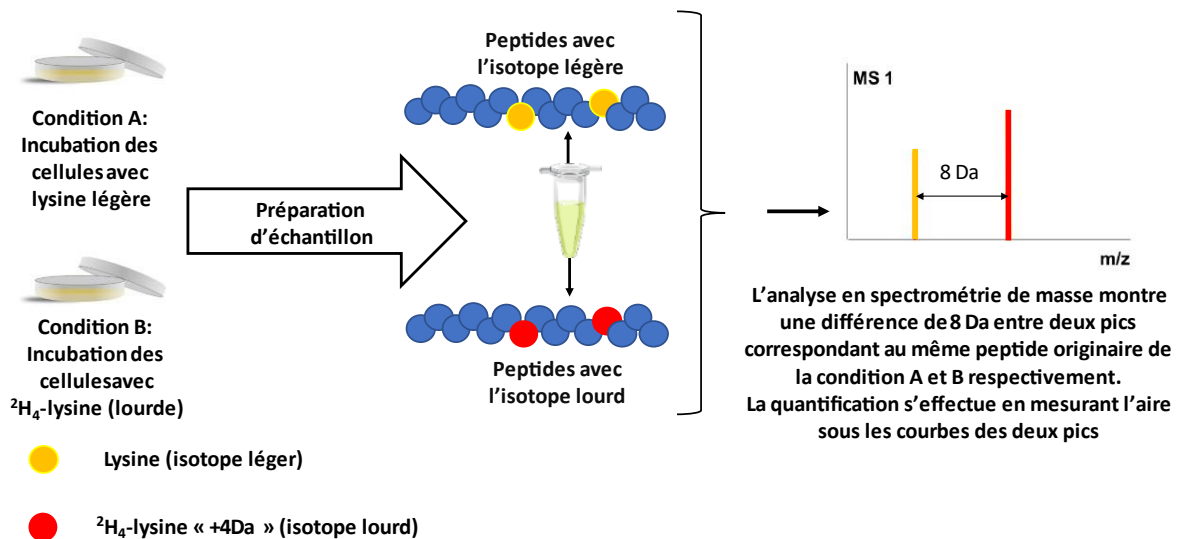
Décrite pour la première fois en 2002, cette technique est basée sur le marquage des protéines *in vivo* par des isotopes d'acides aminés (23). Le principe est de cultiver les cellules dans des milieux de culture dépourvus en certains acides aminés essentiels, qui sont remplacés par leurs isotopes lourds et légers respectifs. Lors de la synthèse protéique dans les cellules, ces isotopes d'acides aminés sont incorporés. Ceci permet de différencier la condition expérimentale de chaque protéine lors de l'analyse en spectrométrie de masse puisque les protéines issues de la culture contenant l'isotope lourd de l'acide aminé ont une masse supérieure à celles issues de la culture contenant l'acide aminé naturel.

La première méthode a été décrite avec 2 formes de leucine, la leucine normale et la leucine D3 ce qui a permis de comparer deux conditions expérimentales (29). Actuellement, il existe 2 isotopes de lysine et d'arginine. Les isotopes de lysine D<sub>4</sub> L-lysine (isotope légère) et <sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>2</sub> L-lysine (isotope lourd) présentent une différence de masse de 4 et 8 Da par rapport à la lysine naturelle, respectivement. Les isotopes <sup>13</sup>C<sub>6</sub> L-arginine (isotope légère) et <sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>4</sub> L-

arginine (isotope lourd) présentent une différence de masse de 6 et de 10 Da par rapport à l'arginine naturelle, respectivement. Ces isotopes ont été développés pour comparer 3 conditions expérimentales en utilisant les isotopes de lysine ou d'arginine. Cependant, des utilisations combinées des deux types d'isotopes pour comparer 4 ou 5 conditions expérimentales ont été décrites (30).

Bien que cette technique puisse être utilisée pour l'approche *top-down*, son utilisation majeure reste en *bottom-up*. Dès l'extraction, les protéines provenant des différentes conditions expérimentales sont mélangées en quantité équivalente. Ceci représente l'avantage majeur de cette méthode pour laquelle la variabilité analytique liée à la préparation d'échantillon, surtout la digestion, et à l'analyse en spectrométrie de masse est minimisée. De plus, le fait que le marquage soit effectué par des isotopes d'acides aminés et non par des *tags* permet d'avoir un marquage très stable. Cependant, le désavantage est le long temps de culture cellulaire nécessaire pour que les cellules puissent incorporer totalement les isotopes des acides aminés dans les protéines (minimum 5 doublings cellulaires) (30). Cette technique ne permet pas non plus d'analyser les protéines provenant de prélèvements biologiques.

Concernant l'analyse en spectrométrie de masse, la quantification est basée sur le spectre MS1 et l'identification sur le spectre MS2. Pour un peptide donné, le spectre MS1 montre 2 ou 3 pics (selon le nombre de conditions étudiées) avec un delta de masse correspondant aux isotopes d'acides aminés incorporés (Figure 5)



**Figure 5.** Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique SILAC.



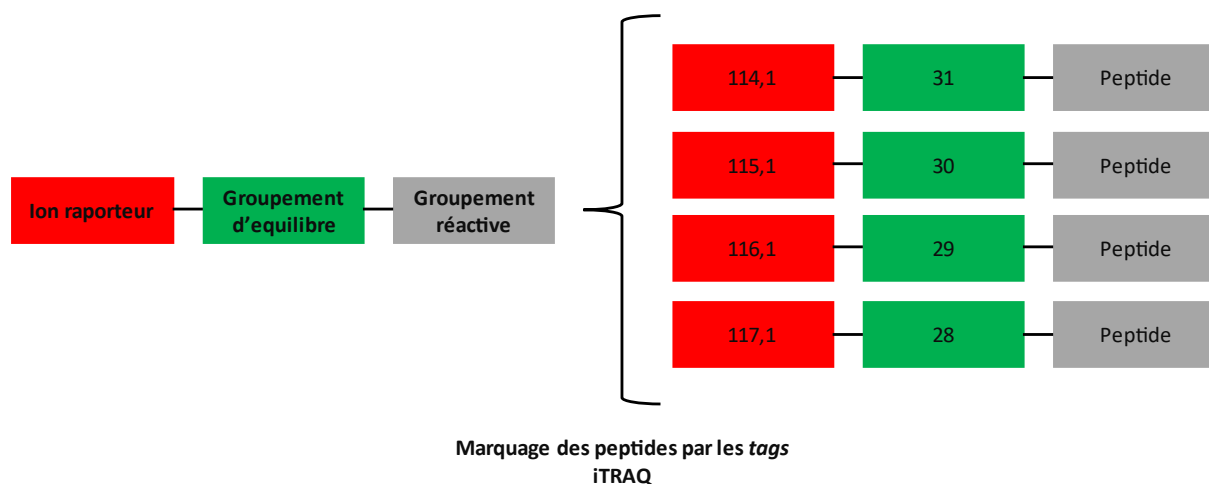
### I.1.2.4.2.3. Marquage chimique

#### I.1.2.4.2.3.1. *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation* « iTRAQ »

Il s'agit d'une technologie de protéomique différentielle basée sur le marquage par des *tags*, identiques structurellement et isobariques, de l'amine terminale ou latérale -tels qu'au niveau de la lysine et de l'arginine- des peptides générés suite à la digestion des protéines. Ces *tags* permettent la quantification lors des analyses en spectrométrie de masse. Cette technique a été décrite pour la première fois en 2004 (31) et permet de comparer 2 à 8 échantillons protéiques différents.

Pour avoir une masse égale pour les différents *tags* et pour qu'ils puissent se lier au niveau des groupements amines, les *tags* iTRAQ sont formés de 3 groupements (Figure 6)

- Un groupement réactif permettant la formation d'une liaison covalente avec les groupements amines (*amine specific peptide reactive group*)
- Un groupement rapporteur (*reporter ion*) ayant une masse différente selon le *tag* grâce à la présence des isotopes de carbone et azote. Pour l'iTRAQ 4plex, on trouve les masses d'ion rapporteur suivantes 114,1, 115,1, 116,1, 117,1 Da et pour l'iTRAQ 8-plex, on ajoute les masses suivantes 113,1, 118,1, 119,1 121,1 Da.
- Un groupement d'équilibre (*balancer group*) permettant de lier l'ion rapporteur au groupement réactif tout en conservant une masse totale (groupement d'équilibre + groupement rapporteur) de 145,1 Da pour les *tags* en 4-plex et de 305,1 pour les *tags* en 8-plex grâce à des isotopes d'oxygène et de carbone.



**Figure 6.** Composition des tags iTRAQ et leur réaction avec les peptides.

Le principe d'utilisation de la technique iTRAQ est le suivant : les protéines sont extraites des échantillons, une quantité égale de protéines de chaque échantillon est digérée puis incubée

avec un *tag* iTRAQ pour le marquage. Les échantillons sont par la suite mélangés et analysés par spectrométrie de masse. Puisque les *tags* sont structuralement identiques et isobariques, les peptides marqués sont élués en même temps et détectés sous la forme d'un seul pic chromatographique en MS1. Lors de la fragmentation, les groupements rapporteurs sont libérés des *tags*. Ceci donne 2 éléments en spectre MS2, les pics des ions du groupement rapporteur dont l'abondance correspond à la quantité du peptide dans chaque échantillon et le spectre de fragmentation du peptide qui permet l'identification (Figure 7)

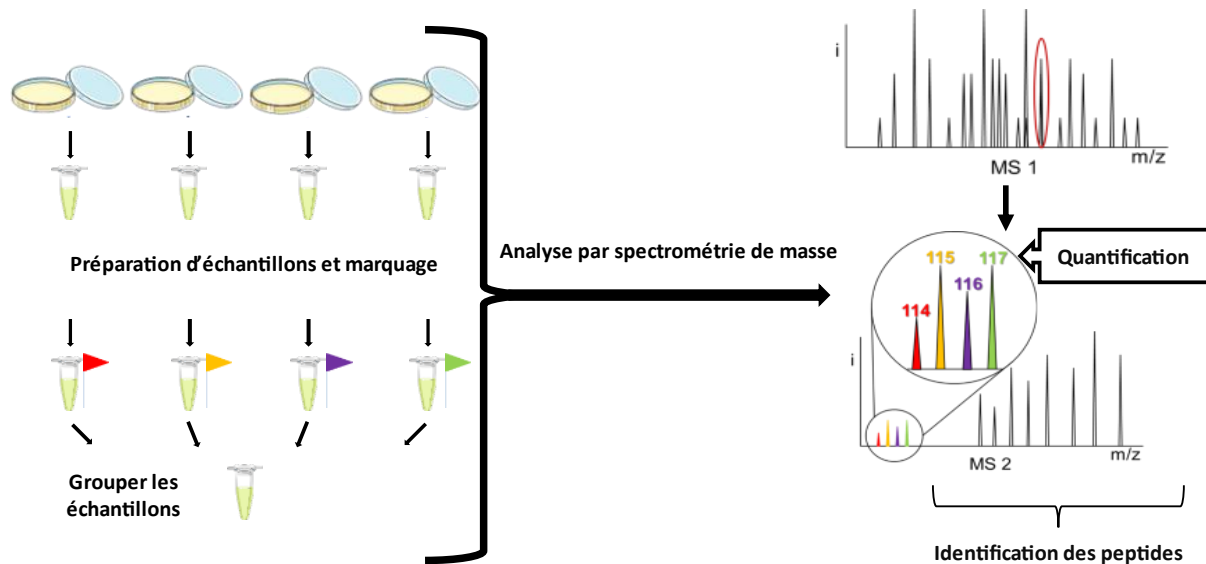


Figure 7. Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique iTRAQ.

Ce mode de détection permet de diminuer la variabilité analytique liée au spectromètre de masse tout en augmentant la sensibilité de la méthode pour détecter les peptides. Cette augmentation de sensibilité est liée au fait que les mêmes peptides provenant des différentes conditions sont élués sous la forme d'un seul pic. De plus, le marquage avec des *tags* permet de marquer tous les peptides dans la solution, contrairement au SILAC, qui marque juste les peptides contenant l'arginine ou la lysine, et les protéines présentes dans différentes matrices, et pas seulement les protéines cellulaires. Par contre, la variabilité liée à la préparation d'échantillon est supérieure à celle du SILAC principalement parce que les échantillons ne sont groupés qu'après l'étape de marquage. De plus, une problématique de sous-estimation des variations d'expression a été évoquée avec cette technique de marquage chimique (32).

#### 1.1.2.4.2.3.2. Tandem Mass Tag « TMT »

Cette technologie est basée sur le même principe que l'iTRAQ mais avec des tags structuralement différents. Elle a été décrite pour la première fois en 2003 en utilisant juste 2 tags, lourd et léger (33). De même que pour l'iTRAQ, les réactifs TMT sont formés de 3 groupements : un groupement réactif avec l'amine (*amine reactive group*), un groupement de

normalisation de masse (*mass normalizer*) et un groupement rapporteur de masse (*mass reporter*). Il existe plusieurs variantes de la technique TMT. Les TMT 6-plex, 10-plex et 11-plex ont des *tags* de même structure mais des nombres d'isotopes de carbone et d'azote différents, alors que le TMTpro 16-plex possède des *tags* de structure différente. La masse des ions rapporteurs varie entre 126 à 134 Da.

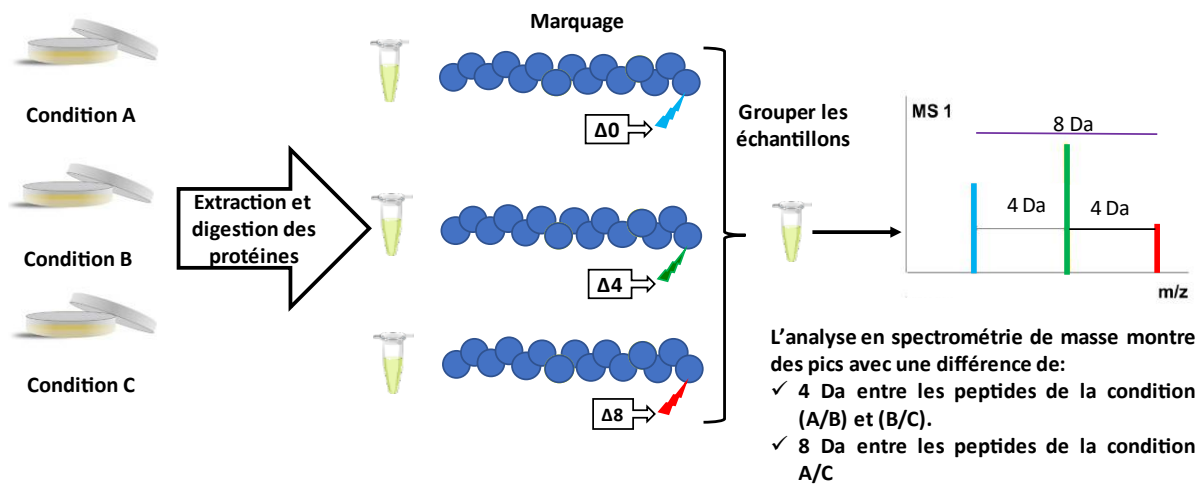
En dehors du nombre de conditions qui peuvent être comparées simultanément, les deux technologies ont les mêmes avantages et inconvénients, de préparation d'échantillon et d'analyse. D'autres avantages techniques peuvent être évoqués en faveur du TMT comme la commercialisation des résines anti-tagTMT qui permet une meilleure purification des échantillons marqués. La technologie donne d'autres options de marquage avec d'autres types de *tag* comme l'iodoTMT 6 plex. Ces *tags* ont une structure similaire à celle des *tags* TMT traditionnels, mais un groupement réactif avec les cystéines. Ceci permet la détection de certaines modifications post traductionnelles au niveau des cystéines telles que la nitrosylation ou l'oxydation (34).

#### **1.1.2.4.2.3.3. Amine-Modifying Labelling Reagent for Relative and Absolute Protein**

##### **Quantitation « mTRAQ »**

Le mTRAQ est une technologie développée à partir de l'iTRAQ mais, comme son nom l'indique, avec des *tags* non isobariques. Cette technologie évoquée pour la première fois en 2008 (35) permet de comparer 3 conditions différentes. Comme ceux de l'iTRAQ, les *tags* mTRAQ sont formés de 3 groupements, mais le groupement d'équilibre est remplacé par un groupement de liaison avec une masse constante. Ceci permet au groupement rapporteur de changer la masse totale du *tag* d'où la notion des *tags* non isobariques avec des différences de masse de 4 et 8 Da.

Le principe de préparation d'échantillon est similaire à celui de l'iTRAQ et partage les mêmes avantages et inconvénients, mais la principale différence concerne l'analyse par spectrométrie de masse. Même si les *tags* ont une masse différente causée par la présence des isotopes de carbone et d'azote, leur structure similaire permet leur élution simultanée de la colonne chromatographique. Ceci permet d'avoir, pour un même peptide 3 ions parents avec une différence de masse minimum de 4 ou 8 Da dont chaque ion correspond à un peptide issu d'un échantillon protéique (une augmentation de différence est causée par la présence d'acides aminés avec un groupement amine sur la chaîne latérale). Contrairement à l'iTRAQ, le mTRAQ a été développé afin d'effectuer des analyses ciblées. L'analyse en spectrométrie de masse est alors faite en mode MRM (multi-reaction-monitoring) et la quantification se fait en utilisant la transition contenant le *tag* mTRAQ (Figure 8).



**Figure 8.** Schéma représentatif d'une analyse protéomique avec la technique mTRAQ.

## **I.2. La métabolomique :**

### **I.2.1. Définition**

La métabolomique est l'une des différentes branches émergentes des -omiques. Elle consiste en l'étude de molécules de faible poids moléculaire, nommés métabolites, et de leurs dérivés, issus du métabolisme cellulaire avec des techniques de dosage de haut débit (36). Parmi ces métabolites on distingue les éléments intermédiaires du cycle de Krebs, les acides aminés et les di- et tri-peptides, les acides nucléiques, les vitamines ainsi que les carbohydrates. Les métabolites sont les produits d'une chaîne de régulation et de production complexe et dynamique qui affecte directement des événements intracellulaires ou systémiques au niveau des organismes complexes (38). Ces métabolites peuvent être recherchés dans des extraits cellulaires ainsi que dans différentes matrices biologiques telles que le sérum, l'urine et la salive, dans le but de comprendre certains mécanismes de régulation physiologiques et pathologiques ainsi que d'identifier des biomarqueurs potentiels.

### **I.2.2. Spectrométrie de masse**

Le dosage des métabolites est effectué traditionnellement par des techniques spécifiques, principalement par des méthodes enzymatiques et spectrophotométriques, d'où l'intérêt d'utiliser des méthodes de dosage polyvalentes et plus rapides capables d'analyser des échantillons souvent complexes. Les techniques analytiques les plus utilisées sont la RMN (résonance magnétique nucléaire) et la SM. Nous allons nous focaliser sur l'analyse par SM. L'analyse métabolomique par SM présente des avantages majeurs par rapport à la RMN puisqu'elle est moins exigeante en termes de quantité et de pureté d'échantillons. Par contre, l'effet matrice causé par une compétition au niveau de l'ionisation des molécules reste un grand défi pour les analyses en SM. L'ESI est la source d'ionisation la plus utilisée pour les analyses métabolomiques mais d'autres types d'ionisation peuvent également être utilisés tels que le MALDI, l'APCI (*Atmospheric pressure chemical ionization*) et l'impact électronique (lors des analyses en CG-SM). Concernant les analyseurs, le triple quadripôle est le plus utilisé dans le cadre des analyses quantitatives ciblées en mode MRM ce qui permet d'avoir une bonne sensibilité. Les analyseurs à haute résolution tels que quadripôle-TOF, quadripôle-orbitrap et FT-ICR sont surtout utilisés pour les analyses non ciblées. L'introduction des échantillons dans les systèmes de SM peut être effectuée par injection directe ou grâce à un couplage avec différentes techniques de séparation (38).

### **I.2.3. Techniques de séparation**

A l'instar de la protéomique, la séparation est un élément important pour les analyses métaboliques surtout pour les mélanges complexes. En considérant les diverses propriétés

physico-chimiques des métabolites ciblés et le but des analyses, différentes techniques de séparation peuvent être envisagées (39).

### **I.2.3.1. Chromatographie liquide**

Il s'agit d'une technique de séparation polyvalente qui permet de séparer efficacement, selon les conditions analytiques utilisées, différents types de métabolites en se basant sur leurs propriétés physico-chimiques. Les deux types de séparation les plus utilisés sont :

- La chromatographie en phase inverse : phase stationnaire hydrophobe avec une phase mobile liquide qui augmente en hydrophobicité pendant l'analyse pour éluer les analytes.
- La chromatographie à interaction hydrophile (HILIC) : phase stationnaire hydrophile avec une phase mobile liquide qui augmente en hydrophilie pendant l'analyse pour éluer les analytes.

La technique de séparation peut être choisie en fonction des caractéristiques physicochimiques des métabolites ciblés, en particulier de leur hydrophilie ou lipophilie. D'autres techniques de chromatographie liquide, telles que la chromatographie échangeuse d'ions et la chromatographie en phase supercritique, peuvent éventuellement être utilisées.

### **I.2.3.2. Chromatographie gazeuse**

Cette technique de séparation est basée sur l'affinité des analytes pour une phase stationnaire (solide ou liquide) vis-à-vis d'une phase mobile gazeuse. Cette technique est surtout réservée aux métabolites volatils. Elle peut toutefois être appliquée à des métabolites, initialement non volatils, rendus plus apolaires et donc plus volatils par un procédé de dérivation chimique (40).

### **I.2.3.3. Electrophorèse capillaire**

La séparation des analytes s'effectue sous l'influence d'un champ électrique dans un liquide conducteur. Cette technique s'intéresse aux métabolites polaires et chargés, et permet de les séparer selon leur rapport charge/volume.

### **I.2.3.4. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse**

Pour ce mode de séparation, les métabolites doivent être ionisés au niveau de la source puis séparés dans une chambre contenant un gaz inerte capable de diminuer la vitesse de migration des molécules selon leur volume. Les analytes passent par la suite dans l'analyseur. Différentes technologies ont été développées à partir de ce principe. Cette technique permet de séparer des molécules isomères et isobares qu'on ne peut pas différencier avec les autres techniques de séparation. De plus, elle peut être couplée à d'autres méthodes de séparation,

telle que la chromatographie liquide par exemple, afin d'avoir une meilleure séparation et détection des métabolites (41).

#### **I.2.4. Quantification**

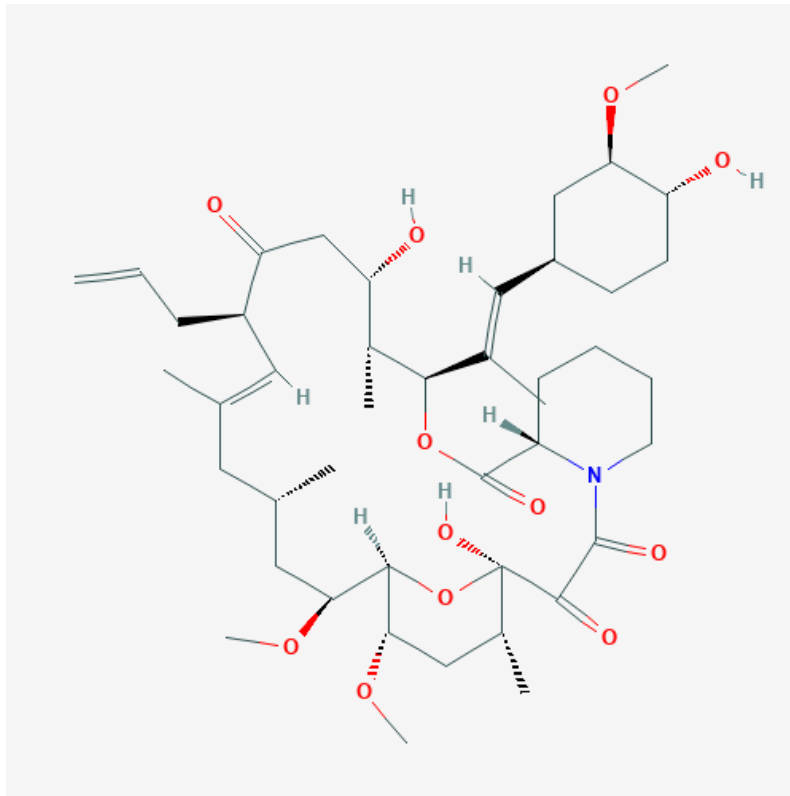
Contrairement à la protéomique, la quantification en métabolomique est une procédure simple basée sur le calcul des aires sous la courbe (AUC) des pics chromatographiques. Les AUC des métabolites sont par la suite normalisées par rapport à l'AUC de l'étalon interne dans le but d'effectuer des comparaisons entre les différents échantillons. Le challenge à ce niveau est de trouver l'étalon interne le plus convenable afin d'avoir la meilleure précision possible.

### I.3. Tacrolimus

#### I.3.1. Généralités :

Le tacrolimus ou FK-506, isolé en 1984 de la bactérie *Streptomyces tsukubaensis*, est un macrolide lactone qui appartient à la famille des inhibiteurs de la calcineurine (Figure 9). Il est actuellement l'un des piliers du traitement immunosuppresseur en transplantation d'organes solides. Son activité immunosuppressive a été mise en évidence en 1987 *in vitro* et *in vivo* sur des cellules humaines et des modèles murins (42,43). *In vitro*, en utilisant le test de réactions lymphocytaire mixte sur des cellules humaines et murines, le tacrolimus est capable de diminuer la multiplication des cellules, le nombre des lymphocytes T CD8+, l'expression des récepteurs de l'IL-2 et la sécrétion de l'IL-2, l'IL-3 et l'IFN- $\gamma$ . *In vivo*, trois types d'expérimentations ont été effectuées sur des souris. La première a consisté à administrer des érythrocytes de moutons à des souris traitées ou non par tacrolimus. Par la suite, les cellules de rate des souris ont été mises en contact avec des érythrocytes de moutons, en présence des facteurs du complément pour effectuer le test de formation de plaque. Ce test a montré que les cellules de la rate des souris traitées par tacrolimus provoquent moins de lyse des érythrocytes, ce qui signifie que le tacrolimus diminue l'immunisation des souris. Le deuxième test a consisté à évaluer l'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée (MBSA). Ce test a montré que les souris traitées par tacrolimus lors du premier contact avec la MBSA présentent moins de signes d'hypersensibilité par rapport aux souris contrôles. Le dernier test a permis d'évaluer la réponse immunitaire des souris suite à l'injection des cellules de rate d'une autre souche de souris, avec ou sans traitement par tacrolimus. Les souris traitées par tacrolimus présentaient des ganglions lymphatiques de taille inférieure à ceux des souris contrôles, signifiant que le tacrolimus diminue la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules du non-soi. D'autres études d'efficacité ont été également effectuées chez des rats, chiens, singes et babouins (44–46). En 1989, une étude effectuée chez 14 transplantés hépatiques, qui avaient eu un épisode de rejet de greffe, ou qui avaient également reçu une transplantation rénale, pancréatique ou une nouvelle transplantation hépatique, a montré l'efficacité du tacrolimus comme traitement immunosuppresseur en transplantation (47). Actuellement, le tacrolimus est indiqué dans les différents types de transplantation d'organe solide comme les reins, le foie, le cœur et les poumons. Dans le cadre des protocoles immunosuppresseurs chez les transplantés, il est utilisé en combinaison avec d'autres médicaments tels que les corticoïdes et l'acide mycophénolique (48). Le tacrolimus est également utilisé dans le traitement de certaines maladies auto-immunes ou inflammatoires telles que la dermatite atopique, la rectocolite hémorragique, le syndrome néphrotique idiopathique et la hyalinose segmentaire et focale chez les enfants, ou la myasthénie (49–53).

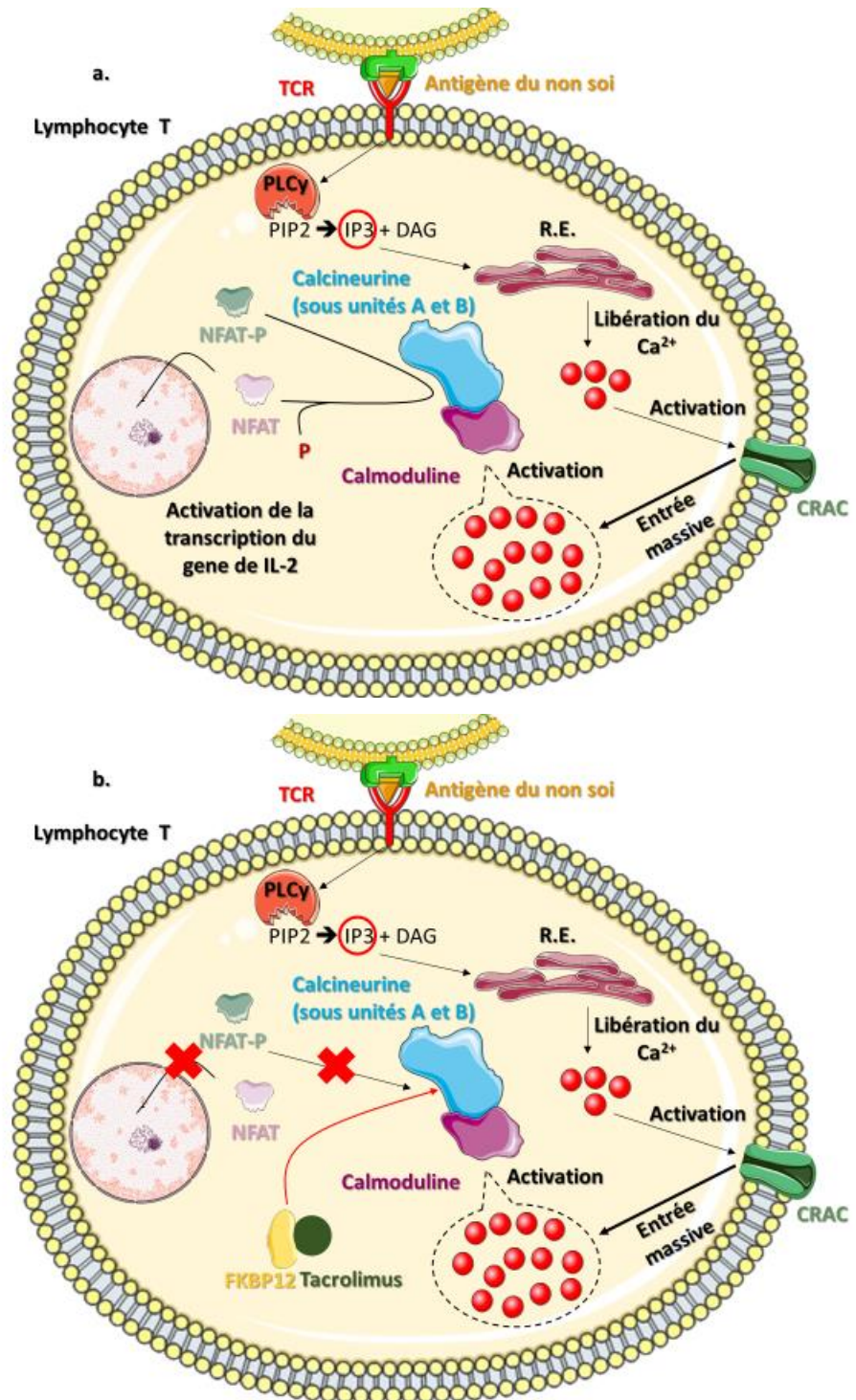




**Figure 9.** Structure du tacrolimus (54).

Afin de comprendre le mécanisme d'action immunosuppressive du tacrolimus, il faut évoquer le mécanisme d'activation des lymphocytes T (LT), acteurs essentiels dans la réponse immunitaire et le rejet des greffons. Suite à la reconnaissance d'un non-soi par l'intermédiaire du récepteur TCR (*T cell receptor*), la PLC $\gamma$  (Phospholipase C  $\gamma$ ) activée provoque l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl inositol-4,-diphosphate) membranaire en IP<sub>3</sub> (inositol-1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycérol). L'IP<sub>3</sub> se fixe au niveau du réticulum endoplasmique et provoque le relargage du calcium. Le calcium intracellulaire relargué active les canaux CRAC (*Calcium release-activated channels*) et induit une entrée massive du calcium extracellulaire. Ceci active la calmoduline (une protéine calcium-dépendante) qui se lie à la calcineurine. Cette deuxième protéine, constituée de 2 sous-unités A et B, est une sérine-thréonine phosphatase qui est capable de déphosphoryler le facteur de Transcription NFAT. Une fois déphosphorylé, le NFAT migre dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles, dont le gène codant pour l'IL-2 (interleukine 2) (Figure 10). L'IL-2 stimule ses propres récepteurs au niveau des LT, par des communications autocrines et paracrines, et provoque l'activation des voies de signalisation JAK-STAT, RAS-MAPK et PI3K-AKT-mTORC1. Ces dernières sont impliquées dans le maintien de la survie cellulaire, l'activité métabolique, la stimulation de la multiplication cellulaire et l'inhibition du blocage du cycle cellulaire, ainsi que la différenciation des LT CD4+

en Th1, Th2, l'activation des lymphocytes CD8+ (cytotoxique) et des LT régulateurs. De plus l'IL-2 est capable de stimuler les lymphocytes B, les cellules NK, ainsi que les monocytes (55). Les inhibiteurs de la calcineurine, comme leur nom l'indique, inhibent l'activité phosphatase de la calcineurine, ce qui inhibe la translocation nucléaire de NFAT puis la sécrétion d'IL2. Pour obtenir cette inhibition, le tacrolimus se lie à la protéine intracellulaire FKBP12 (*FK-506 Binding Protein 12*) (Figure 10). Ce complexe interagit au niveau du domaine catalytique des sous-unités A et B de la calcineurine (56) et l'empêche de déphosphoryler le NFAT. De façon similaire, la cyclosporine, le premier inhibiteur de calcineurine découvert, inhibe la déphosphorylation de NFAT mais après s'être liée à la cyclophiline (57).



**Figure 10.** Schéma représentant le mécanisme d'activation des lymphocytes T (a) et le mécanisme d'action du tacrolimus (b). Abréviations : TCR (*T cell receptor*), PLC (*Phospholipase C*  $\gamma$ ), PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*), IP3 (*inositol-1,4,5-triphosphate*), DAG (*diacylglycérol*), R.E. (*réticulum endoplasmique*), CRAC (*Calcium release-activated channels*), FKBP12 (*FK-506 binding protein 12*), NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*).

Le tacrolimus est administré majoritairement par voie orale (il existe toutefois des formes injectables et topiques). Il est métabolisé par les cytochromes P450 (CYP) 3A4 et 3A5 intestinaux et hépatiques et est éliminé majoritairement par voie biliaire. Le tacrolimus est

également un substrat de la P-glycoprotéine (transporteur d'efflux), qui est exprimée entre autres par les entérocytes, les hépatocytes et les cellules épithéliales des tubules rénaux. La surveillance de la concentration sanguine de tacrolimus est un élément essentiel de l'ajustement individuel de posologie, car le tacrolimus a une fourchette thérapeutique étroite (les concentrations résiduelles actuellement visées varie de 4 à 15 ng/ml), et une forte variabilité pharmacocinétique. Cette variabilité est liée en partie à des polymorphismes génétiques des CYP et à des interactions médicamenteuses au niveau des CYP et de la P-gp (58). L'utilisation de tacrolimus est grevée d'un certain nombre d'effets indésirables dont l'augmentation du risque infectieux, l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète, la neurotoxicité et la néphrotoxicité (59). Les paragraphes suivants ont pour objet de présenter les différentes manifestations histologiques et mécanismes physiologiques et cellulaires de la néphrotoxicité du tacrolimus, décrits dans la littérature.

### **I.3.2. Néphrotoxicité du tacrolimus**

La néphrotoxicité est l'un des effets indésirables majeurs du tacrolimus et représente l'une des limites actuelles à l'augmentation de la survie du greffon rénal. On différencie deux types de néphrotoxicité, aiguë et chronique, dont les manifestations histologiques et fonctionnelles ainsi que les mécanismes cellulaires associés sont différents.

#### **I.3.2.1. La néphrotoxicité aiguë**

C'est une toxicité qui peut apparaître à tout moment du traitement et est corrélée à la concentration sanguine du tacrolimus, surtout au-delà de 20 ng/ml (concentration maintenant considérée comme supra-thérapeutique) (60). Cette néphrotoxicité se manifeste par une augmentation de la créatinine plasmatique due à une diminution du débit de filtration glomérulaire, dans un premier temps réversible lors de la diminution de la dose du tacrolimus. Les mécanismes détaillés causant la diminution du débit de filtration ne sont pas complètement élucidés pour l'instant, mais ils impliquent des modifications hémodynamiques causées par un dérèglement de la balance entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Ce dérèglement cause une vasoconstriction de l'artère rénale afférente, aboutissant à la diminution de la pression de filtration glomérulaire. Une autre conséquence est que le rein est soumis à un état d'ischémie relative, capable de causer plusieurs types de dysfonctionnements et de lésions.

L'exposition au tacrolimus de cellules rénales mésangiales de rat en culture primaire et de cellules tubulaires proximales LLC-PK1 cause une augmentation de la sécrétion de l'endothéline, impliquée dans la vasoconstriction artérielle par l'activation de ses propres récepteurs. Cette augmentation de la concentration d'endothéline a été également constatée chez les rats et les patients traités par tacrolimus (61–64). L'augmentation d'autres facteurs

vasoconstricteurs a également été décrite : par exemple, le thromboxane B2 urinaire, métabolite du thromboxane A2, était augmenté chez des rats traités par tacrolimus (65).

La vasoconstriction induite par les facteurs vasoconstricteurs est potentialisée par une diminution des facteurs vasodilatateurs. Une diminution de la concentration urinaire de 6-Keto-prostaglandine F1 alfa, un métabolite de la prostacycline, a été décrite chez des rats et des transplantés hépatiques traités par tacrolimus (65,66). De plus un dérèglement de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) a été observé : le tacrolimus diminue la synthèse de NO au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules rénales du tube proximal (67,68).

La concentration de rénine était augmentée dans les reins de rats traités par tacrolimus (69,70), activant ainsi le système rénine – angiotensine – aldostérone, impliqué dans la régulation de la pression artérielle par une vasoconstriction et une rétention sodique. De plus, des traitements inhibiteurs du système rénine/angiotensine ont montré une capacité à inverser la néphrotoxicité aiguë chez les rats traités par tacrolimus (71,72).

En plus des modifications hémodynamiques, des toxicités vasculaires et tubulaires ont été décrites pour le tacrolimus. Ces toxicités se manifestent histologiquement par l'apparition de vacuolisations des cellules épithéliales tubulaires et des myocytes vasculaires, de dépôts hyalins des artérioles et de thrombi de fibrine dans les glomérules (73,74).

### **I.3.2.2. La néphrotoxicité chronique**

Contrairement à la néphrotoxicité aiguë, la néphrotoxicité chronique est caractérisée par des atteintes irréversibles, avec un déclin du fonctionnement rénal. Cette toxicité est le résultat des perturbations hémodynamiques chroniques exposant les reins à un état d'hypoxie, ainsi que des effets toxiques directs du tacrolimus au niveau des cellules vasculaires et rénales. Ces effets toxiques se manifestent histologiquement par une hyalinose vasculaire, une atrophie tubulaire, de la fibrose interstitielle et une glomérulosclérose (73,75). Il faut noter toutefois que ces lésions ne sont pas spécifiques et peuvent être trouvées chez des transplantés qui n'ont jamais reçu de tacrolimus (76,77) .

#### **I.3.2.2.1. Mécanismes cellulaires de la toxicité tubulaire du tacrolimus**

La toxicité du tacrolimus sur les cellules tubulaires est un phénomène connu depuis les premières années de son utilisation (78,79), mais ses mécanismes restent toujours mal connus, malgré des progrès et des hypothèses. Les paragraphes suivants ont pour objet de présenter les différents mécanismes de toxicité au niveau des cellules tubulaires proximales décrits pour le tacrolimus (Figure 11).

### I.3.2.2.1.1. Toxicité mitochondriale

La mitochondrie est une cible majeure de la toxicité induite par les médicaments. Une atteinte mitochondriale perturbe l'état énergétique de la cellule, induit un stress oxydant et peut déclencher une apoptose. La capacité du tacrolimus à induire des atteintes mitochondriales a été mise en évidence sur des mitochondries isolées par Zini *et al.* Ils ont montré une diminution de la phosphorylation oxydative par inhibition des complexes III et V dans les mitochondries isolées du cerveau de rat incubées avec des doses croissantes de tacrolimus inférieures à 1  $\mu\text{M}$  (80). Une autre étude effectuée par Henke *et al.* sur des mitochondries rénales de rat a montré que le tacrolimus, à une dose de 70  $\mu\text{M}$ , diminue l'*uptake* de l'ATP de 50 % ainsi que la respiration indépendante de la phosphorylation oxydative (81). En plus, Simon *et al.* ont constaté que le TAC à une dose de 1  $\mu\text{M}$  avait un faible effet inhibiteur du facteur III et provoquait un découplage de la phosphorylation oxydative par changement de la fluidité membranaire des mitochondries rénales isolées (82). Au niveau cellulaire, Massicot *et al.* ont montré sur des LLC-PK1 exposées au tacrolimus à une concentration de 110  $\mu\text{M}$  pendant 4h, correspondant à l'IC50 pour ce temps d'incubation, une diminution de la concentration d'ATP intracellulaire. Cette diminution était par contre absente à une concentration de 80  $\mu\text{M}$  (IC50 pour 6h) pendant 6h (41). De plus, Yu *et al.* ont exposé des cellules tubulaires proximales humaines HK-2 au tacrolimus à une concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  (62.1  $\mu\text{M}$ ) pendant 12h et ont trouvé une diminution de la viabilité cellulaire, une augmentation des concentrations d'ion superoxydes et l'apparition de dysfonctionnements des mitochondries (diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de la respiration mitochondriale). Un co-traitement par la coenzyme Q10 (agent antioxydant) a diminué ces dysfonctionnements et a restauré la viabilité cellulaire. Pour valider ces résultats *in vitro*, des expériences ont été effectuées dans le cadre de la même étude sur des rats traités par des injections sous-cutanées de TAC à la dose de 1.5 mg/kg/j pendant 4 semaines. Les rats traités par TAC ont présenté une fibrose interstitielle rénale et une augmentation des marqueurs de stress oxydant tels que 8-OHdG (8-hydroxy-2-désoxyguanosine) et le 4-HHE (4-hydroxy-2-hexénal). La taille, la surface, le volume et le nombre des mitochondries avaient diminué. Le co-traitement des souris par du coenzyme Q10 a diminué significativement les marqueurs de stress oxydant, sans retourner au niveau du contrôle, et amélioré les paramètres structuraux des mitochondries (42). Dans une étude similaire sur des cellules HK-2 incubées pendant 12 h avec 50  $\mu\text{g/ml}$  de tacrolimus, Lim *et al.* (85) ont montré une perte de la polarisation mitochondriale et une diminution des paramètres de la respiration cellulaire. De plus, chez les souris ayant reçu par voie sous-cutanée 1.5mg/mg/j de tacrolimus pendant 4 semaines, ils ont constaté une diminution de la taille et du nombre des mitochondries des tubules proximaux (85).

### I.3.2.2.2. Stress oxydant

Le stress oxydant est un phénomène retrouvé lors de nombreuses toxicités médicamenteuses. Il est causé par un dérèglement de l'équilibre entre, d'une part, la formation des radicaux libres, et d'autre part les enzymes et les composés antioxydants. C'est un mécanisme impliqué dans la néphrotoxicité induite par le tacrolimus. En effet, Husamura *et al.* ont exposé des LLC-PK1 à 50µM de TAC pendant 24h et ont constaté une diminution de la viabilité cellulaire, accompagnée d'une augmentation de l'activité de la caspase 3 et de l'apoptose. Ils ont également démontré qu'en présence d'extrait de thé vert et de deux polyphénols, l'epigallocatechin-gallate et l'epigallocatechin, connus pour leur activité antioxydante, le taux d'apoptose et l'activité de la caspase 3 diminuaient (86). Une autre étude effectuée par Lee *et al.* (87) a montré le même phénomène mais avec du ginsenoside Rb1. Brièvement, des LLC-PK1 incubées avec 60µM de TAC en présence de ginsenoside Rb1 présentaient une mortalité par apoptose moindre que les cellules traitées par TAC seul (87). Plusieurs équipes ont tenté de décrire le mécanisme cellulaire impliqué dans le stress oxydant induit par le tacrolimus. Parmi elles, Zhou *et al.* ont montré, sur des LLC-PK1 et HEK293, que la toxicité du TAC passait par l'augmentation de la production des radicaux libres d'oxygène (ROS) via l'augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des LLC-PK1 exposées à 60 µM de TAC présentaient une augmentation significative de la mortalité, alors que l'augmentation de l'activité de la caspase 3 était constatée dès 40 µM. De plus, à une dose de 60 µM, la quantité de ROS intracellulaire augmentait significativement. La mortalité induite par le TAC à 60 µM était bloquée par l'ajout de la catalase, capable de dégrader le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>, et de la N-acétylcystéine qui permet la régénération du pool de glutathion, important pour neutraliser les ROS. La transfection des LLC-PK1 par le gène de la catalase humaine protégeait également les cellules contre la toxicité de TAC. Comme la toxicité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passe par l'apparition de radicaux hydroxyles, les auteurs ont traité les cellules avec du benzoate de sodium, qui neutralise les radicaux hydroxyles, ou par de la déféroxamine, chélateur du fer responsable de la transformation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en radical hydroxyle. Les résultats ont montré que ces deux substances sont protectrices contre la toxicité de tacrolimus, confirmant l'implication du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans cette toxicité. Ils ont constaté que l'ion superoxyde, contrairement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n'était pas impliqué dans la toxicité du tacrolimus : les cellules HEK293 qui surexpriment la manganèse-superoxyde dismutase (MnSOD) capable de transformer les ions superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne sont pas protégées de l'effet délétère du TAC contrairement à celles qui surexpriment la catalase (88). Au contraire, Lim *et al.* ont constaté, sur des souris et des cellules HK-2, un rôle crucial de MnSOD dans la néphrotoxicité du TAC. Sur les souris traitées par 1.5mg/kg/j de TAC pendant 4 semaines par voie sous-cutanée, l'équipe a trouvé une augmentation de la fibrose interstitielle rénale, une augmentation de la 8-OHdG et de la 4-HHE témoignant de l'augmentation du stress oxydant,

un changement de la forme des mitochondries, une diminution de l'expression mitochondriale de la MnSOD et une activation de la voie de PI3K/AKT et de la translation nucléaire de FoxO3a, un facteur de transcription du gène de MnSOD. Ces effets ont été bloqués par Klotho, une protéine connue pour avoir un effet anti-âge et antioxydant. Les études mécanistiques sur les HK-2 exposées à 60 µg/ml de TAC pendant 12h ont montré une diminution de la viabilité cellulaire, de l'expression de l'ARNm du MnSOD et de la translocation du FoxO3a. De plus, le TAC activait la voie de PI3K/AKT, inhibiteur de la transcription de la MnSOD. Par conséquent, en présence de TAC, la MnSOD était sous-exprimée ce qui induisait le stress oxydant. Le co-traitement des cellules HK-2 avec la protéine Klotho, neutralisait l'effet du TAC, augmentait l'expression de MnSOD et restaurait la viabilité cellulaire (89). Une autre étude effectuée par la même équipe sur des souris, dans les mêmes conditions, a confirmé ces résultats et a fait le lien entre la capacité antioxydante du ginseng dans le cas d'une exposition au tacrolimus et l'augmentation de l'expression de Klotho et par la suite de MnSOD (85).

#### **I.3.2.2.3. Stress du réticulum endoplasmique**

Le stress du réticulum endoplasmique est un phénomène déclenché par l'accumulation de protéines mal conformées. Cette accumulation induit une réponse appelée *unfolded protein response* (UPR) qui provoque la surexpression des protéines impliquées dans le repliement et la dégradation des protéines, mais peut également induire l'apoptose. Contrairement à la cyclosporine, le stress de RE est un phénomène controversé pour le TAC et les données restent limitées. Du *et al.* (90) ont montré suite à l'incubation des cellules LLC-PK1 et NRK-52E avec du TAC, à la concentration de 10 µM et 30µM respectivement, une augmentation de la transcription des gènes *GRP78* et *CHOP (C/EBP homologous protein)*, marqueurs du stress du RE. De plus, ils ont proposé que l'effet immunosuppresseur pourrait être secondaire à un stress du RE, en plus de l'inhibition de la calcineurine (90). Dans une autre étude de transcriptomique ciblée, effectuée sur des cellules MCT (murines) exposées à 20 µg/ml de TAC, Gonzalez-Guerrero *et al.* ont constaté une augmentation des facteurs impliqués dans l'UPR tels que CHOP, ATF6, TRIB3, témoins d'un stress du RE (91).

#### **I.3.2.2.4. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et fibrose**

La TEM correspond à une perte des caractéristiques épithéliales des cellules différenciées au profit de caractéristiques mésenchymateuses. Cette transition est marquée par une perte de la polarisation apico-basale et l'apparition d'une cyto-architecture proche de celle des fibroblastes, avec diminution des adhésions intercellulaires et augmentation de la capacité migratoire et de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. Malgré le débat concernant l'origine des cellules qui subissent la TEM, la TEM est considérée comme causale de la fibrose tubulaire. *In vivo*, au niveau des cellules tubulaires proximales une augmentation



de la vimentine et une translocation vers le cytoplasme de la  $\beta$ -caténine membranaire, où elle est liée à la cadhérine, a été observée chez les patient traités par tacrolimus, témoignant d'une TEM (92). De Plus, Bennet *et al.* ont montré la capacité de TAC, à une dose de 5  $\mu$ M pendant 12h et 48h, à induire une TEM sur des cellules HK-2. A cette concentration, le TAC n'affectait pas la viabilité cellulaire mais induisait un changement morphologique avec une perte des jonctions serrées et une augmentation de la capacité migratoire. De plus le TAC induisait plusieurs marqueurs de la TEM tels que la fibronectine, la vimentine, la Métalloprotéinase-9, la protéine  $\alpha$ -SMA (alfa-smooth muscle actine) et le TGF- $\beta$ , et diminuait l'expression de l'E-cadhérine. L'inhibition de l'activité kinase des récepteurs 1 du TGF- $\beta$  abolissait l'effet du TAC. Ceci montre l'importance du TGF- $\beta$  dans le processus de TEM induit par TAC (93).

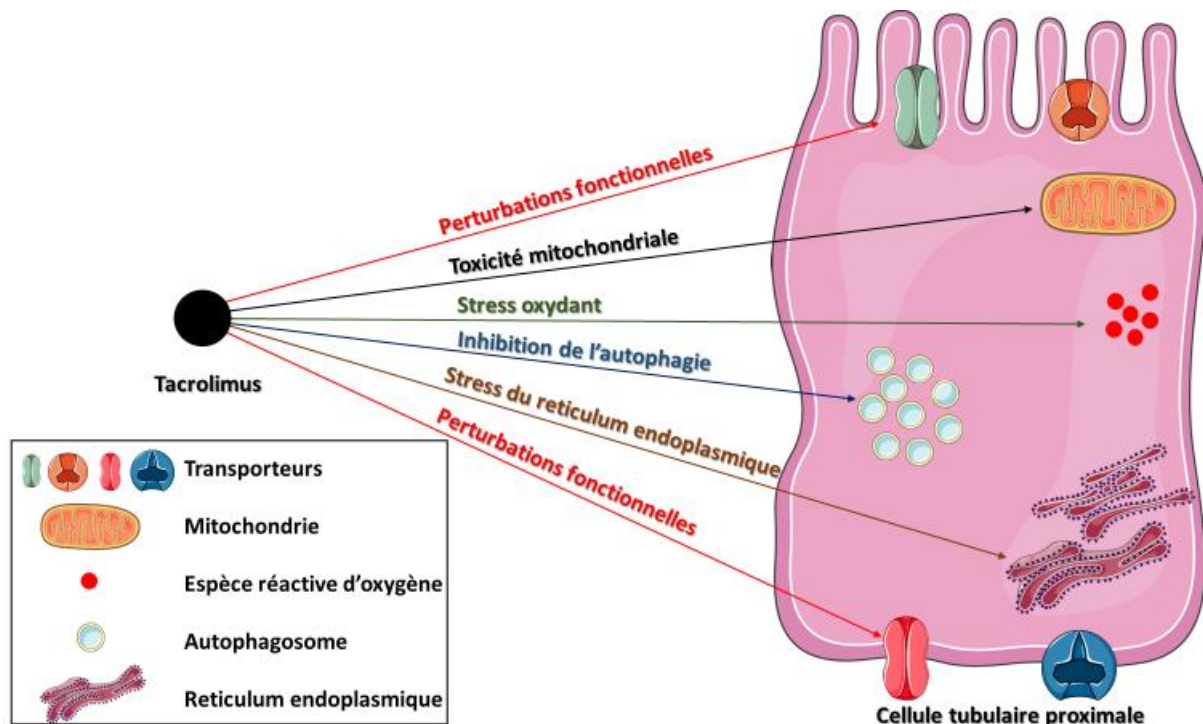
### **I.3.2.2.5. Autophagie**

L'autophagie est un mécanisme de protection et de survie cellulaires qui consiste à dégrader des organites intracellulaires pour en recycler les composants. Il est décrit, dans la littérature, que le tacrolimus est capable de perturber l'autophagie chez différents types cellulaires tels que les cellules bêta-pancréatiques et les cellules neuronales (94,95). Dans les tubules proximaux, le tacrolimus est également capable d'interférer avec ce processus vital. Une étude effectuée par Zheng *et al.* sur des rats traités pendant 4 semaines avec 1.5 mg/kg/j de TAC par voie sous-cutanée a montré une augmentation du nombre des corps autophagiques (vésicules autophagiques, vésicules autophagiques destructrices et auto-lysosomes) au niveau des cellules tubulaires, ainsi qu'une augmentation des marqueurs d'autophagie LC3B I et II et de la beclin-1. De plus, des cellules HK-2 exposées à 50  $\mu$ g/ml (62,2  $\mu$ M) de TAC pendant 24h ont également montré une augmentation de l'expression de LC3B I et II et de la beclin-1, ainsi qu'une activation de la voie PI3K/AKT. Un co-traitement des cellules par la L-carnitine, connue pour ses effets néphroprotecteurs, a diminué l'activation de la voie PI3K/AKT, le stress oxydant et les marqueurs d'autophagie (96). Une étude similaire réalisée par Lim *et al.* sur des souris traitées par 1,5 mg/Kg/j de TAC pendant 4 semaines par voie intrapéritonéale, a montré une augmentation des corps autophagiques et des marqueurs d'autophagie (ATG5, LC3B-I et II, beclin-1) au niveau du cortex rénal (97). De plus, le TAC diminuait l'expression des protéines lysosomiales LAMP-2A et cathepsine B, ainsi que celle du TFEB, un facteur de transcription impliqué dans la biogenèse des lysosomes. Les souris co-traitées par la protéine klotho ont montré une diminution de ces effets. L'étude mécanistique sur des HK-2 incubées avec 60  $\mu$ g/ml (74,6  $\mu$ M) de TAC pendant 12h a montré les mêmes effets. De plus, l'étude a montré que le TAC induisait une surexpression et une phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), capable d'inhiber la translocation nucléaire de la TFEB. Les auteurs ont finalement proposé que le TAC diminuait la translocation nucléaire de la TFEB par l'intermédiaire de la GSK3 $\beta$ , diminuant ainsi l'expression des protéines

lysosomiales et par la suite la clairance des autophagosomes. Klotho est capable de diminuer la toxicité de TAC par une diminution de l'expression de la GSK3 $\beta$  (97).

### I.3.2.2.6. Perturbations fonctionnelles

Les cellules tubulaires proximales sont des cellules hautement spécialisées avec une grande capacité de transport apico-basal et baso-apical. Cette capacité est maintenue par un réseau riche de transporteurs, canaux et pompes, ainsi qu'un passage sélectif par transport transcellulaire. Une étude menée sur des cellules RPTEC/TERT1 par Secker *et al.* (98) a montré une perturbation temporaire (pendant 8 jours) de la mesure de la résistance électrique transépithéliale suite à l'exposition des cellules à 50  $\mu$ M de TAC pendant 14 jours, témoignant d'une perturbation de l'intégrité de l'épithélium. De plus, le TAC inhibait le transport d'eau dépendant de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>/ATPase. Par contre, le transport de l'Asp<sup>-</sup>, un substrat anionique des transporteurs ACT et MAT, était augmenté (98).

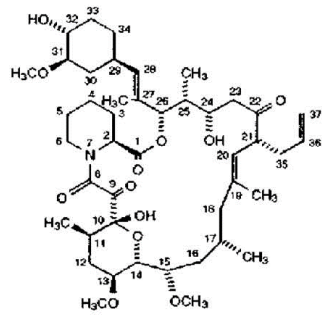


**Figure 11.** Schéma récapitulant les mécanismes de toxicité du tacrolimus au niveau des cellules tubulaires proximales

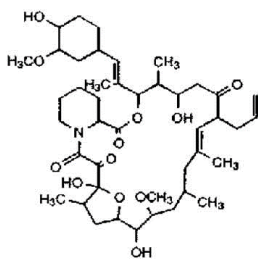
#### I.4. Métabolites du tacrolimus

Les métabolites du tacrolimus ont fait l'objet de plusieurs études visant à décrire leur structure ainsi que leurs implications dans les effets thérapeutiques ou toxiques du tacrolimus. A l'instar de nombreux xénobiotiques, le tacrolimus subit un métabolisme hépatique par le biais des cytochromes P450 3A (en particulier 3A4 et 3A5), capables d'effectuer des déméthylations et des hydroxylations.

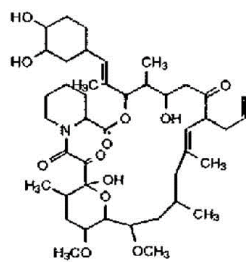
Ces études ont été menées via des systèmes de métabolisation *in vitro* basés sur l'utilisation de microsomes hépatiques d'origine animale ou humaine. L'une des premières études de caractérisation des métabolites par spectrométrie de masse a montré l'existence d'au minimum 9 métabolites pour le tacrolimus, caractérisés par une simple ou une double déméthylation en combinaison ou non avec une simple, double ou triple hydroxylation (99). Une autre étude RMN a décrit la structure de 8 métabolites (100,101). Quatre métabolites de première génération ont été caractérisés, dont trois nommés M-I, M-II et M-III sont déméthylés en position 13, 15, et 31 respectivement, et un nommé M-IV hydroxylé en position 12. Quatre autres métabolites, dits de deuxième génération, sont caractérisés par une double déméthylation en positions 15-31, 13-31 et 13-15 (M-V, M-VI et M-VII, respectivement) ou par une déméthylation en position 31 et une double hydroxylation en positions 19 et 22 (M-VIII) (Figure 12). Chez les patients traités par tacrolimus, les métabolites déméthylés, di-déméthylés, hydroxylés et déméthylés-hydroxylés ont été détectés dans le sang et dans l'urine (102–104). M-I est le métabolite majoritairement trouvé dans le sang, tandis que M-II est détecté en faible quantité (105). M-I est généré par les CYP 3A5 et 3A4, mais le CYP3A5 est capable d'en générer une quantité supérieure. M-II est surtout formé par le CYP3A5 et M-III par le CYP 3A4 (106). Hormis le métabolisme hépatique et intestinal par l'action des CYP, le microbiote intestinal est capable également de dégrader le tacrolimus en un métabolite détecté dans les fèces, formé par réduction de la fonction cétone en fonction alcool au niveau du C9 (Figure 13) (107).



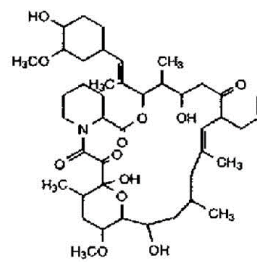
Tacrolimus



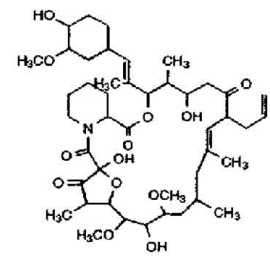
M-I



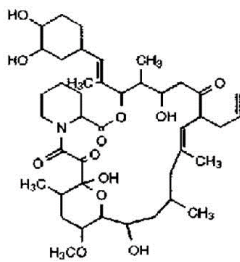
M-II



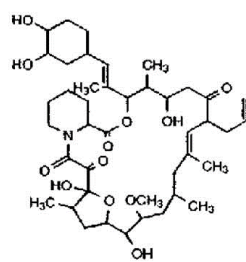
M-III



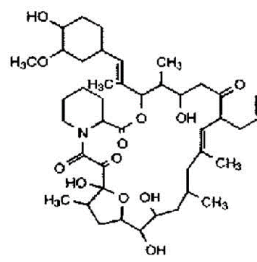
M-IV



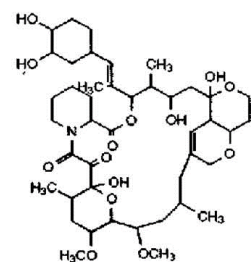
M-V



M-VI



M-VII



M-VIII

Figure 12. Les structures du tacrolimus et de ses métabolites décrites par Iwasaki et al. (142).

M1

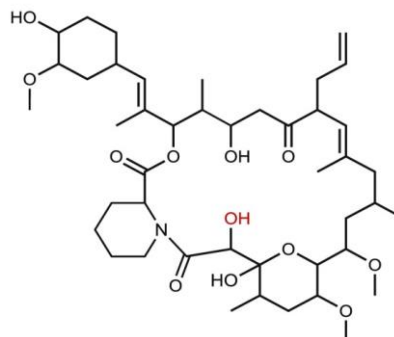


Figure 13. Structure du métabolite du tacrolimus généré par le microbiote intestinal, décrite par Guo et al. (107).

L'activité immunosuppressive des métabolites a été étudiée sur des systèmes cellulaires et d'interaction protéique *in vitro*. Une première étude effectuée par Christians *et al.* a montré la capacité d'un métabolite déméthylé de tacrolimus à inhiber la prolifération cellulaire des lymphocytes de rat stimulés par la concanavaline A. Cette inhibition était moins efficace que celle du tacrolimus à des concentrations équivalentes (108). Une deuxième étude effectuée par Tamura *et al.* (109) sur des métabolites purifiés a montré que seul le M-II était capable d'avoir une activité immunosuppressive équivalente à celle du TAC en réaction lymphocytaire mixte (MLR). M-II était capable de former le complexe FKBP12-calcineurin-calmoduline, malgré sa faible capacité à se lier à la FKBP12 (14,2% de celle du TAC). À l'inverse, M-III était capable de se lier à FKBP-12 avec une affinité comparable à celle du TAC, sans pour autant aboutir à une formation efficace du complexe capable d'induire une activité immunosuppressive. M-I avait une faible fixation à la FKBP12, une faible capacité de former le complexe et une très faible activité immunosuppressive (109).

L'implication des métabolites dans les effets indésirables du tacrolimus a été peu explorée. Pourtant, quelques observations cliniques ont montré l'intérêt d'étudier ces effets. *In vivo*, des études de pharmacocinétique/pharmacodynamie effectuées chez des transplantés traités par tacrolimus ont lié certains polymorphismes génétiques et les concentrations sanguines des métabolites à l'apparition de la toxicité du tacrolimus. Une étude effectuée par Yanagimachi *et al.* chez 33 patients traités par tacrolimus a montré que le polymorphisme de CYP3A5\*1, qui augmente l'activité du CYP 3A5, était lié à l'apparition de neurotoxicité (110). De plus, Zegarska *et al.* ont fait le lien entre la concentration sanguine de M-III et l'apparition d'une néphrotoxicité ou d'une myélotoxicité chez 81 transplantés rénaux (111). Ils ont également montré dans une étude effectuée sur 63 transplantés rénaux qu'il existait une relation entre le rapport des concentrations de M-I/tacrolimus et l'apparition d'une myélotoxicité ou d'une hépatotoxicité (112). Kuypers *et al.* ont effectué une étude prospective de 5 ans chez 95 transplantés rénaux traités par tacrolimus et ont établi un lien entre les polymorphismes CYP3A4\*1/CYP3A5\*1 et CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1 et l'apparition d'une néphrotoxicité (113). D'autres études ont démontré l'effet des métabolites d'une façon indirecte en étudiant la relation entre le rapport concentration sanguine/dose administré (C/D), ou inversement, avec l'apparition de certaines toxicités. Nütgen *et al.* ont constaté que le ratio C/D faible des métaboliseurs rapides était associé à une augmentation du risque de rejet aigu et une diminution de la fonction du greffon (114). Une autre étude effectuée par Egeland *et al.* a montré que le rapport D/C élevé, trouvé chez les métaboliseurs rapides, était associé au développement de la fibrose interstitielle et de lésions d'atrophie tubulaire (115).

## **I.5. Hypothèse de travail et objectifs**

La littérature concernant la néphrotoxicité du tacrolimus montre que les mécanismes de cette toxicité sont complexes et encore mal compris. De plus les données sur la potentielle implication des métabolites du tacrolimus dans la toxicité, mais aussi dans une perte partielle d'efficacité, du tacrolimus sont de plus en plus nombreuses suite à la démocratisation de la pharmacogénétique et à l'utilisation de la spectrométrie de masse dans le suivi thérapeutique.

Par conséquent, les objectifs fixés pour ce travail ont été les suivants :

- Etudier les mécanismes de toxicité du tacrolimus par une double approche de protéomique non ciblée et de métabolomique (ciblée mais large), avec confirmation par RT-qPCR d'ARN messagers ciblés.
- Etudier l'activité pharmacologique des métabolites du tacrolimus.

## Chapitre II. Travaux personnels

---

Mes travaux personnels dans cette thèse se focalisent dans la première partie sur l'étude des mécanismes de la néphrotoxicité du tacrolimus en appliquant et validant des approches métabolomiques et protéomiques, et, dans la deuxième partie, à l'étude des effets pharmacologiques des métabolites de tacrolimus comme compétiteurs du tacrolimus. Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme de deux articles :

- Premier article : des cellules de types LLC-PK1 ont été choisies comme modèle de cellules du tube proximal rénal et exposées à une dose non toxique mais élevée de tacrolimus. L'étude métabolomique intra- et extra-cellulaire a été effectuée par méthode ciblée mais large et l'étude des protéines intracellulaires par méthode non ciblée. Les ARNm codant certaines de ces protéines ont été quantifiés par RT-qPCR.
- Deuxième article : Les métabolites du tacrolimus ont été produits *in vitro* par des microsomes hépatiques humains, puis caractérisés par microLC couplée à la spectrométrie de masse haute résolution de type QTOF. Une éventuelle compétition a été recherchée entre le tacrolimus et ses métabolites sur l'activité de la calcineurine *in vitro* et sur la réaction lymphocytaire mixte entre lymphocytes de volontaires sains *ex vivo*. Les résultats de ces expériences ont été reproduits par modélisation *in silico*. Une étude pharmacogénétique/pharmacocinétique effectuée chez des transplantés rénaux a permis de valider la structure des métabolites du tacrolimus et d'objectiver les concentrations sanguines de ces métabolites dans deux groupes de patients, métaboliseurs lents et métaboliseurs rapides.

## II.1. Travail personnel 1 : Etude multi-omique de la néphrotoxicité du tacrolimus

### II.1.1. Résumé :

Le but de cette étude est d'élucider les mécanismes subcellulaires impliqués dans la néphrotoxicité du tacrolimus par une approche multi-omique, de protéomique non ciblée et de métabolomique large mais ciblée, permettant de discriminer un large éventail de voies potentiellement impliquées dans cette toxicité. Des cellules LLC-PK1 différenciées ont été exposées à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  de tacrolimus pendant 24h. Puis, des analyses métabolomiques intra- et extra-cellulaires ainsi qu'une analyse protéomique intracellulaire ont été effectuées.

Les analyses métabolomiques intracellulaires ont montré une perturbation de différentes voies métaboliques tels que le cycle de Krebs, le cycle de l'urée et le métabolisme des acides aminés. La quantité d'autres métabolites importants, antioxydants et acide folique, variait également. Les analyses métabolomiques extracellulaires ont montré surtout un impact sur le métabolisme des bases pyrimidiques, des acides aminés et sur le cycle d'urée, ainsi qu'une variation de la quantité de pyruvate, de lactate et de cystine. Les analyses protéomiques intracellulaires, quant à elles, ont montré une diminution de l'expression de plusieurs protéines telles que la phosphoénolpyruvate kinase cytoplasmique (PCK-1). Une diminution de l'expression des gènes codants pour PCK-1 et fructose 1,6-bisphosphatase 1 (FBP1), mesurée par RT-qPCR, a été constatée.

Dans leur globalité, ces résultats montrent que le tacrolimus est capable d'impacter différents processus métaboliques au niveau des cellules proximales. Nos résultats sur le stress oxydant concordent avec ceux de la littérature. Les cellules exposées au tacrolimus présentent une diminution intracellulaire de la quantité de glutathion, de glutathion oxydé et de  $\gamma$ -glutamylcystéine, ainsi qu'une augmentation de la consommation de cystine extracellulaire, un précurseur de la cystéine, témoignant de l'augmentation du stress oxydant. La diminution de la quantité de folate intracellulaire suggère également une augmentation du stress oxydant. Le métabolisme énergétique est également perturbé par le tacrolimus, avec une augmentation de la quantité des intermédiaires du cycle de Krebs et une diminution du lactate. Ceci peut être expliqué par une activation du cycle de Krebs causée par l'augmentation du stress oxydant ou du stress du réticulum endoplasmique. Une accumulation des intermédiaires peut également être à l'origine de l'augmentation observée. Celle-ci pourrait être causée par la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que par la diminution de l'expression de PCK-1. En effet PCK-1, responsable de transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, est capable d'impacter le cycle de Krebs. De plus, PCK-1 et FBP1 sont



des enzymes limitantes dans la voie de la néoglucogénèse. Leur diminution d'expression suggère que le tacrolimus est capable de diminuer la néoglucogénèse. De plus, le métabolisme des lipides est potentiellement impacté à cause de la diminution de la quantité intracellulaire de L-carnitine, acide aminé essentiel pour le transport des lipides du cytoplasme vers l'espace mitochondrial. Concernant le dérèglement du cycle de l'urée, il peut être lié à l'augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs puisque que les deux voies sont liées par le fumarate. L'accumulation intracellulaire de la putrescine, un métabolite toxique de l'ornithine, peut aussi être liée à un problème d'élimination par les transporteurs membranaires.

Cette étude multi-omique sur les cellules tubulaires proximales montre qu'une exposition aiguë au tacrolimus induit des modifications de l'état énergétique cellulaire, du métabolisme du glucose ainsi qu'une augmentation du stress oxydant et une perturbation de différentes voies métaboliques. Ces modifications constatées à court terme pourraient être impliquées dans la néphrotoxicité chronique du tacrolimus, mais aussi favoriser les troubles du métabolisme glucidique, un autre effet indésirable attribuable au tacrolimus.

## **II.1.2. Article 1: A multi-omics study to assess tacrolimus toxicity in proximal tubular cells**

Hassan AOUD<sup>1</sup>, Quentin FAUCHER<sup>1</sup>, François-Ludovic SAUVAGE<sup>1</sup>, Emilie PINAULT<sup>1</sup>, Claire-Cécile BARROT<sup>1</sup>, Helene ARNION<sup>1</sup>, Pierre MARQUET<sup>1,2\*</sup>, Marie ESSIG<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> *INSERM U1248 IPPRITT, Univ. Limoges, F-87000 Limoges*

<sup>2</sup> *Department of Pharmacology and Toxicology, CHU Limoges, Limoges, France*

<sup>3</sup> *APHP, Ambroise Paré Hospital, Nephrology Departement, 92100 Boulogne Billancourt, France*

### **II.1.2.1. Abstract**

Tacrolimus, prescribed to a majority of transplanted patients is associated with nephrotoxicity, the mechanism of which remains unclear. This study aims to evaluate the impact of tacrolimus on proximal tubular cells using a multi-omics approach. LLC-PK1 cells were exposed to 5  $\mu\text{M}$  of tacrolimus for 24h. Intracellular proteins and metabolites, and extracellular metabolites were extracted and analysed by LC-MS/MS. The transcriptional expression of PCK-1, FBP1 and FBP2 was measured using RT-qPCR. In our cell model, tacrolimus impacted different metabolic pathways including urea cycle (e.g., citrulline, ornithine) ( $p < 0.0001$ ), amino acid metabolism (e.g., valine, isoleucine, aspartic acid) ( $p < 0.0001$ ) and pyrimidine metabolism ( $p < 0.01$ ). In addition, it induced oxidative stress ( $p < 0.01$ ) shown by a decrease in total cell glutathione quantity and impacts cell energy through an increase in Krebs cycle intermediates (e.g., citrate, aconitate, fumarate) ( $p < 0.01$ ) and a down-regulation of PCK-1 ( $p < 0.05$ ) and FBP1 ( $p < 0.01$ ), key enzymes in gluconeogenesis. Apart from glucose synthesis, gluconeogenesis is an important process in kidney mediated acid-base balance control. The observed variations found using this multi-omics approach clearly establish a dysregulation of energy production in epithelial cells of the renal tubule, and potentially of their functions, that can be implicated in tacrolimus chronic nephrotoxicity.

### **II.1.2.2. Introduction**

Tacrolimus is a widely used immunosuppressive drug for preventing graft rejection after solid organ transplantation and treating autoimmune diseases (116) . It has a narrow therapeutic range between 4-15 ng/ml in whole blood and is known to entail acute and chronic nephrotoxicity. Acute nephrotoxicity linked to high tacrolimus blood level ( $>20$  ng/ml) is caused by hemodynamic perturbations and is reversible (60). In contrast, chronic nephrotoxicity is an irreversible decline of kidney function characterized by interstitial fibrosis and tubular atrophy, that could appear along time even in patients exposed to (low) pharmacological levels of tacrolimus.

The mechanism of tacrolimus nephrotoxicity is still not well understood. Many studies were conducted on proximal tubular cells and linked nephrotoxicity either to a mitochondrial toxicity characterized by functional and structural perturbation of the mitochondria (80–84,117), or to increased oxidative stress caused by an increase of intracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels or a decrease in MnSOD, an antioxidant enzyme (88,89). Autophagy is also found to be disrupted in cells exposed to tacrolimus with an accumulation of autophagy vesicles in the cytoplasm (96,97). Furthermore, cells exposed to tacrolimus were also found to lose some transporter-related functions (98).

In this study, we employed a multi-omics screening of intracellular and extracellular contents of LLC-PK1 cells incubated with tacrolimus in order to understand its toxicity on the proximal tubule. We found that tacrolimus is able to induce the oxidative stress and to affect the urea cycle and energy metabolism, as suggested by increased concentrations of intermediates of the citric acid cycle and down-regulation of PCK-1 and FBP1, limiting enzymes in gluconeogenesis. In addition, tacrolimus was able to affect the metabolism of purine bases.

### **II.1.2.3. Materials and methods**

#### **II.1.2.3.1. Chemicals and reagents**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-Ham's F12 (1:1, 31331), Fetal Bovine Serum (10500), 1 M HEPES (15630), 7.5 % Sodium bicarbonate (25080), 10,000 UI/mL Penicillin/Streptomycin (15140), Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (14190), Superscript II RT (180064022, Invitrogen™) and BCA protein assay KIT (23225, Pierce™) were purchased from ThermoFisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Sodium selenite (S5261), insulin (I4011), triiodothyronine (T6397) and dexamethasone (D4902), apo-transferrin human (T1147), desmopressin (V1005), tacrolimus (F4679), 2-isopropylmalic acid (333115), DTT (1.4-Dithiothritol) (D0632), Urea (U5378), Iodoacetamide (I1149), AmiconUltra-0.5 centrifugal filter (UFC5010) DNase I Kit (AMPD1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). NucleoSpin® RNA/Protein extraction kit (740933.50) was purchased from Macherey-Nagel (Hoerd, France). Sequencing grade modified trypsin (V5111), RNasin® ribonuclease inhibitor (N2511), random primers (C118A) and MTS (G3581) were obtained from Promega (Courtaboeuf, France). QuantiFast® SYBER® Green PCR Kit (204054) was purchased from Qiagen. HLB oasis 3cc 60mg cartridges (WAT094226) were obtained from Water (saint Quentin en Yvelines, France).

#### **II.1.2.3.2. Cell culture condition**

LLC-PK1 (Lilly Laboratories Porcine Kidney-1) porcine proximal tubule cells (ATCC-CL-101, ATCC, Manassas, VA) were expanded in 75 cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> and passed once confluence was reached. Culture medium consisted in a 1:1 DMEM-Ham's F12 mix supplemented with 5 % FBS, 15 mM HEPES, 0.1 % Sodium bicarbonate, 100 UI/mL Penicillin / Streptomycin and 50 nM Sodium selenite. LLC-PK1 cells were cultured between passage 7 and passage 20.

LLC-PK1 were seeded in 6-well plates and expanded up to sub-confluence in the routine cell culture medium. Seeded LLC-PK1 sustained serum starvation and were fed with hormonally defined (25 µg/mL insulin, 11 µg/mL transferrin, 50 nM triiodothyronine, 0.1 µM dexamethasone, 0.1 µg/mL desmopressin) fresh medium to engage epithelial differentiation,

for 24 hours. After differentiation, two treatment conditions were applied for 24h *i.e.*, i) ethanol 0.5% (control), or ii) tacrolimus 5  $\mu$ M. For intracellular metabolomics investigations, 3 independent experiments were performed in triplicate, and 4 independent experiments were performed in triplicate for the extracellular metabolomics study, while for the proteomics study, 6 independent experiments were performed in singlicate.

#### **II.1.2.3.3. Viability test**

Cells were seeded in 96-well plates at 25,000 cells/well for 24h, then differentiated for 24h and treated with either 0.5% ethanol (control) or 5 $\mu$ M tacrolimus. Culture medium, with and without tacrolimus, was changed every 24h. Viability was assessed using the MTS test according to the manufacturer's instruction. Measurement of the absorbance was performed on PerkinElmer EnSpire® Multimode Plate Reader.

Viability was also assessed using flow cytometry. Briefly, cells were cultured in 6-well plates at 500,000 cells/well. After treatment, as described above, cells were washed twice with PBS and detached with trypsin EDTA. Cells were then washed twice with PBS and stained with annexin 5/7AAD. Reading was performed on a BD LSRFortessa™ flow cytometer.

#### **II.1.2.3.4. Metabolomics study**

##### **II.1.2.3.4.1. Sample preparation**

Extraction of intracellular metabolites was based on a previously published method (118). Treated and control cells were washed twice with ice cold PBS and then lysed using 3 ml of a mixture of methanol/water 80%/20% volume spiked with 2-isopropylmalic acid at a concentration of 500 nM (internal standard) and incubated for 20 minutes at -80°C. Every well was then scrapped using cell scrapper, cell lysates transferred to 5 ml Eppendorf tubes and centrifuged at 20,000 g for 5 min at 4°C. One milliliter of each supernatant was then transferred into a 1.5 ml Eppendorf tube and evaporated to dryness in a vacuum concentrator. The extract was then solubilized with 50  $\mu$ L of MiliQ water and transferred to a vial for mass spectrometry analysis.

The culture medium of treated cells was collected and centrifuged at 3,000 g for 1 minute at room temperature to eliminate cell debris. Then, 100  $\mu$ L of the supernatant were added 200  $\mu$ L of acetonitrile and 20  $\mu$ L of internal standard (2-isopropylmalic acid [0.5 mmol/L]). After homogenization, samples were centrifuged at room temperature for 15 minutes at 15,000 g. The supernatant therefore was then diluted 1/10 in ultrapure water and transferred to a vial for mass spectrometry analysis.

#### **II.1.2.3.4.2. Metabolomics LC-MS/MS analysis**

Three  $\mu\text{L}$  of the suspended extracts were injected into the analytical system. Mass spectrometry analyses were performed using a LCMS-8060 (Shimadzu) tandem mass spectrometer and the LC-MS/MS "Method Package for Cell Culture Profiling Ver.2" (Shimadzu). The mass transitions of additional compounds were added after infusing the pure substances in the mass spectrometer. For each transition analyzed, only well-defined chromatographic peaks were considered. Area under the curve of every metabolite was normalized to the area under the curve of the internal standard (2-isopropylmalic acid).

#### **II.1.2.3.4.3. Data analysis and statistics**

In every experiment, treated samples were normalized by the corresponding control. MetaboAnalyst 5.0 computational platform ([www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml](http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml)) was used for all statistical analyses. Univariable analysis was performed using the t-test; P-values were corrected for multiple testing using the False Discovery Rate (FDR) method. Multivariate exploration and unsupervised analysis by Principal Component Analyses (PCA) were performed.

#### **II.1.2.3.5. Proteomics study**

##### **II.1.2.3.5.1. Sample preparation**

For intracellular proteomics, treated and control cells were washed twice with ice cold PBS and then extracted with the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein extraction kit following manufacturer's instructions. The extracts were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

For intracellular proteomics, protein content was estimated using the BCA protein assay following manufacturer's instruction. After that, 50  $\mu\text{g}$  of proteins were diluted in Q.S 200  $\mu\text{L}$  of 8 M urea followed by 20  $\mu\text{L}$  of 50 mM DDT and the samples were then incubated at  $56^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes. Next, 20  $\mu\text{L}$  of 100 mM iodoacetamide were added and the samples incubated in the dark for 20 minutes. The reduced samples were transferred to an Amicon ultra-centrifugal filter and centrifuged at 14,000g for 15 minutes. After the first centrifugation, the samples were washed twice by 8 M urea and then twice with 25 mM of ammonium bicarbonate. Digestion was performed inside the filter by adding 10  $\mu\text{L}$  of a solution of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of trypsin and the mixture was incubated for 3h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Peptides were recovered by centrifuging the Amicon filter at 14,000 g for 15 minutes, then by washing it with 100  $\mu\text{L}$  of 1.5 M NaCl, then inverting it inside the tube and finally centrifuging at 1,000g for 2 minutes. Solid Phase Extraction (SPE) of the peptides was performed using OASIS<sup>®</sup> HLB cartridges (Waters) preconditioned with 3 mL of methanol and 3 ml of water/formic acid 0.5%. After loading the diluted sample, a first wash was performed using 3 ml of water/formic acid 0.5% and a second with water/methanol

5%/formic acid 0.5%. The column was then dried for 15 minutes and the elution was achieved with 3 ml of a mixture of acetonitrile/water (70/30, v/v). The eluate was then evaporated under nitrogen and the dry residue was dissolved in 100 µl of water/acetonitrile/trifluoroacetic acid (TFA) (98/2/0.05, v/v/v). The sample was then filtered on a spin filter 0.22 µm (Agilent) and analyzed by mass spectrometry.

#### II.1.2.3.5.2. Proteomics MicroLC-MS/MS analysis

The peptides resulting from protein digestion were analysed by microLC-MS/MS using a nanoLC 425 liquid chromatography system in the micro-flow mode (Eksigent, Dublin, CA), coupled to a quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600+, Sciex, Framingham, MA) operated in the high-sensitivity mode. Reverse-phase LC was performed in a trap-and-elute configuration using a trap column (C18 Pepmap100 cartridge, 300 µm i.d. x 5 mm, 5µm; Thermo Scientific) and a C18 analytical column (ChromXP, 150 x 0.3 mm i.d., 120Å, 3 µm; Sciex) with the following mobile phases: loading solvent (water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 98/2/0.05 (v/v)), solvent A (0.1% (v/v) formic acid in water) and solvent B (water/acetonitrile/formic acid 5/95/0.1% (v/v)). All samples were loaded, trapped and desalted using a loading solvent flowrate of 10 µL/min for 5 minutes. Chromatographic separation was performed at a flow rate of 3 µL/min as follows: initial, 5% B, increased to 25% in 145 min, then to 95% B in 10 min, maintained at 95% for 15 min, and finally, decreased to 5% B for re-equilibration.

One µg of each sample (equivalent protein content) was first subjected to data-dependent acquisition (DDA) to generate the SWATH-MS spectral library. MS and MS/MS data were continuously recorded with up to 30 precursors selected for fragmentation from each MS survey scan. Precursor selection was based upon ion intensity, whether or not the precursor had been previously selected for fragmentation (dynamic exclusion). Ions were fragmented using rolling collision energy. All DDA mass spectrometer files were searched using ProteinPilot software v.5.0.1 (Sciex) and the Paragon algorithm. Data were analyzed with the following parameters: cysteine alkylation with iodoacetamide, digestion by trypsin and no special factors. The search was conducted using a rapid identification effort of a UniProt database (June 2018 release) containing non-redundant proteins of *Sus scrofa*. The output of this search was used as the reference spectral library.

For sample analysis, the equivalent of 1 µg protein content was injected in the analytical system and subjected to data-independent acquisition (DIA) using 60 variable swath windows over the 400-1250 *m/z* range. For these experiments, the mass spectrometer was operated in such a way that a 50-ms survey scan (TOF-MS) was acquired and subsequent MS/MS experiments were performed on all precursors using an accumulation time of 120 ms per swath window for a total cycle time of 7.3 s. Parent ions were fragmented using rolling collision energy

corresponding to the  $m/z$  range window. DIA samples were processed using PeakView v.2.1 (Sciex) with SWATH v.2.0 module and the reference spectral library generated above. Spectral alignment and targeted data extraction were performed using an extraction window of 15 min and the following parameters: Protein identity confidence > 99% with maximum of 10 peptides per protein and 5 fragments per peptide with 10 ppm error tolerance. Shared and modified peptides were excluded.

#### **II.1.2.3.5.3. Data analysis and statistics**

Statistical analysis of proteomics data analyses was performed using R. First of all, each batch of treated and control cells was normalized classically (center and scale). Second, delta values were computed from normalized data.

For each protein  $i$ ,  $Delta_i = \ln\left(\frac{treated_i}{control_i}\right)$

Third, proteins with  $delta < \ln(0.8)$  or  $> -\ln(0.8)$ , reflecting a decrease and increase of 20% of protein expression respectively and identified using more than 2 peptides, were considered as differentially expressed.

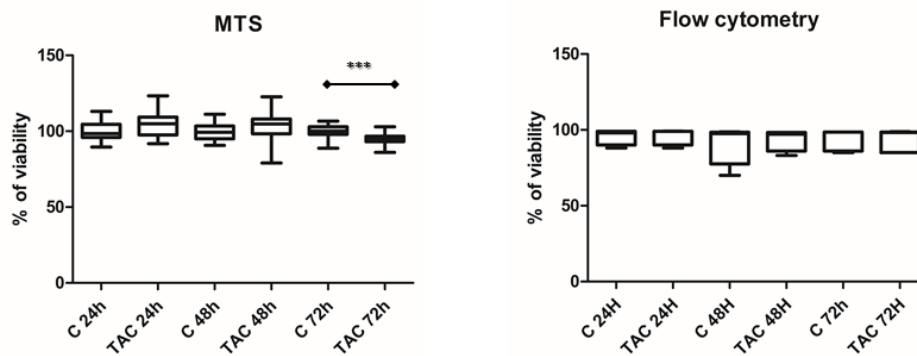
#### **II.1.2.3.6. RT-qPCR**

RNA and proteins (used for the proteomic study) were extracted using the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein extraction kit (Macherey-Nagel). RNA quantification was performed using a Nanodrop<sup>®</sup> spectrophotometer (ND-1000). To eliminate residual DNA, samples were treated with DNase I Kit (sigma AMPD1). One  $\mu\text{g}$  of RNA was then reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using Superscript II RT, random primers and RNasin<sup>®</sup> ribonuclease inhibitor (Promega N2511). All these steps were carried out following the manufacturer's instructions. For qPCR reaction, a mix was prepared for each sample containing 40 ng of cDNA, 2  $\mu\text{L}$  of a mix of forward and reverse primers (final concentration for every primer: 400 nM), 12.5  $\mu\text{L}$  of QuantiFast<sup>®</sup> SYBER<sup>®</sup> Green PCR Kit and q.s. 25  $\mu\text{L}$  RNase-free water. The reaction was performed on a Rotor Gene Q (Qiagen) using the following program: 5 minutes at 95°C followed by 45 cycle of 10s at 95°C, 30s at 60°C. Acquisition was done in green. Fold-change was calculated ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) and statistical analysis was performed using paired t-test using Prism 5.0 software.



## II.1.2.4. Results

### II.1.2.4.1. Cell viability

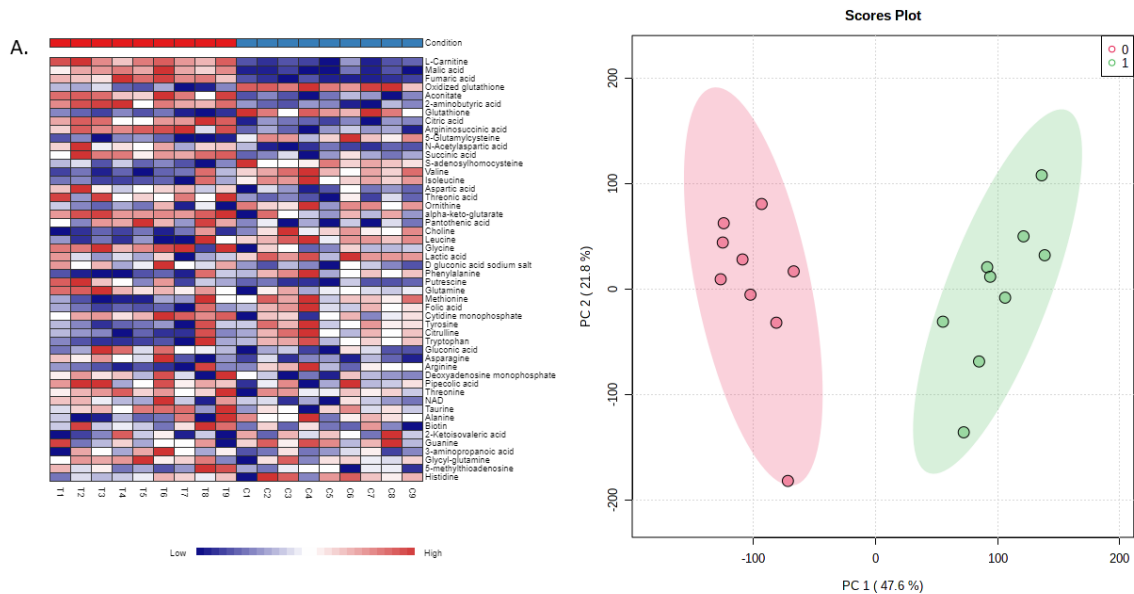


**Figure 1:** LLC-PK1 viability after incubation with 0.5% ethanol (control (C)) or 5µM of tacrolimus (TAC) for 24h, 48h and 72h, assessed using the MTS viability assay (n=18, left graph) and annexin 5/ 7AAD staining (n=5, right graph). Graphs represent the % of cell viability with tacrolimus as compared to control for each incubation duration. Statistical analysis with the t-test. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Cell viability was not affected after 24h and 48h of treatment with 5 µM of tacrolimus. At 72h, the MTS test showed a significant decrease of 5 % ( $p=0.0003$ ) in cell viability while flow cytometry analysis did not show any difference (Figure 1).

### II.1.2.4.2. Metabolomics study

#### II.1.2.4.2.1. Intracellular metabolomics



**Figure 2:** Multivariate exploration of intracellular metabolites variations after 24h tacrolimus exposure (n=9). A. Heatmap clustering distinguishing the control condition (C) from tacrolimus treated cells (T), based on all metabolites detected by LC-MS/MS. B. PCA scores plot showing complete separation between groups 0 and 1 with principal components PC1 describing 47.6% of the variation and PC2, 21.8% (0 (red circles): 0.5% ethanol (control); 1 (green circles): tacrolimus 5µM).

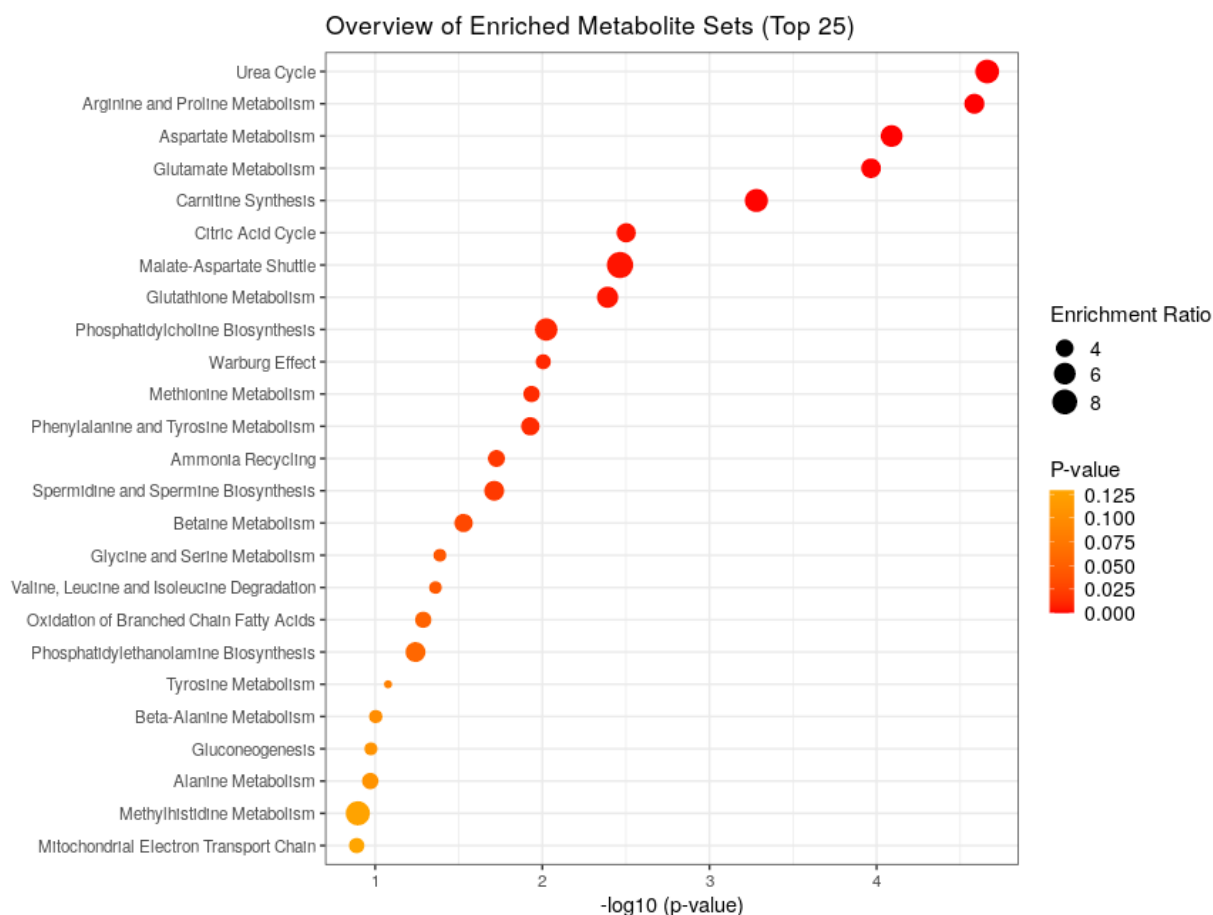
Seventy-nine metabolites were detected by LC-MS/MS and heat-map analysis clearly discriminated the two conditions (controls or tacrolimus). Principal component analysis neatly separated them into the two experimental conditions, controls or tacrolimus treated cells, 47.6% of the variation being explained by the first component and 21.8% by the second (Figure 2).

Univariate analysis (t-test) showed that 20 of these metabolites were significantly increased and 15 significantly decreased ( $p$ -value<0.05 and FDR<0.05) (table 1). Most of these metabolites were amino acids, citric acid cycle intermediates, urea cycle intermediates and antioxidant reaction intermediates.

Enrichment pathway analysis of these 35 metabolites confirmed that tacrolimus induces changes in the urea cycle, in the amino acid metabolism, in the citric acid cycle, and in glutathione metabolism (Figure 3).

**Table 1:** Fold-change of Intracellular metabolites significantly modified by tacrolimus exposure (n=9) (p-value<0.05)

Metabolite	Fold-change	P-value (T-test)	FDR
L-Carnitine	1.7425	8.9464e-11	7.0677e-09
Malic acid	1.4603	2.2221e-10	8.7772e-09
Fumaric acid	1.383	3.5883e-10	9.4491e-09
Aconitate	1.4654	7.0907e-08	1.235e-06
2-aminobutyric acid	1.2619	7.8167e-08	1.235e-06
Glutathione	0.26167	1.526e-07	2.0093e-06
Citric acid	1.4012	1.8841e-07	2.1264e-06
Argininosuccinic acid	1.4044	8.0989e-07	7.9976e-06
γ-Glutamylcysteine	0.38874	2.4983e-06	2.193e-05
N-Acetylaspartic acid	1.4012	5.9313e-06	4.6858e-05
Succinic acid	1.2442	9.4702e-06	6.8013e-05
Oxidized glutathione	0.53446	1.206e-05	7.9393e-05
S-adenosylhomocysteine	0.67941	2.2869e-05	0.00013898
Valine	0.78981	0.0001452	0.00081935
Isoleucine	0.8245	0.00018176	0.00095725
Aspartic acid	1.2697	0.00044392	0.0021918
Threonic acid	1.3235	0.00055436	0.0025761
Ornithine	0.80762	0.00067636	0.0029685
Oxoglutaric acid	1.2475	0.0008545	0.0035529
Pantothenic acid	1.0773	0.00099844	0.0037844
Choline	0.88625	0.001006	0.0037844
Leucine	0.85471	0.00139	0.0049616
Glycine	1.1806	0.0014445	0.0049616
Lactic acid	0.95114	0.001715	0.0056453
D gluconic acid sodium salt	1.1862	0.001793	0.005666
Phenylalanine	0.89058	0.0025434	0.0077046
Putrescine	1.2476	0.0026332	0.0077046
Glutamine	1.3081	0.0042679	0.012042
Methionine	0.90562	0.0048398	0.013184
Folic acid	0.84262	0.0055765	0.014685
Cytidine monophosphate	1.1084	0.0061877	0.015769
Tyrosine	0.89841	0.0077896	0.019231
Citrulline	0.84895	0.009764	0.023375
Tryptophan	0.89982	0.010347	0.02404
Gluconic acid	1.1258	0.013037	0.029427
Asparagine	1.2753	0.02567	0.05633
Arginine	0.87285	0.034574	0.073094
Deoxyadenosine monophosphate	1.077	0.035159	0.073094

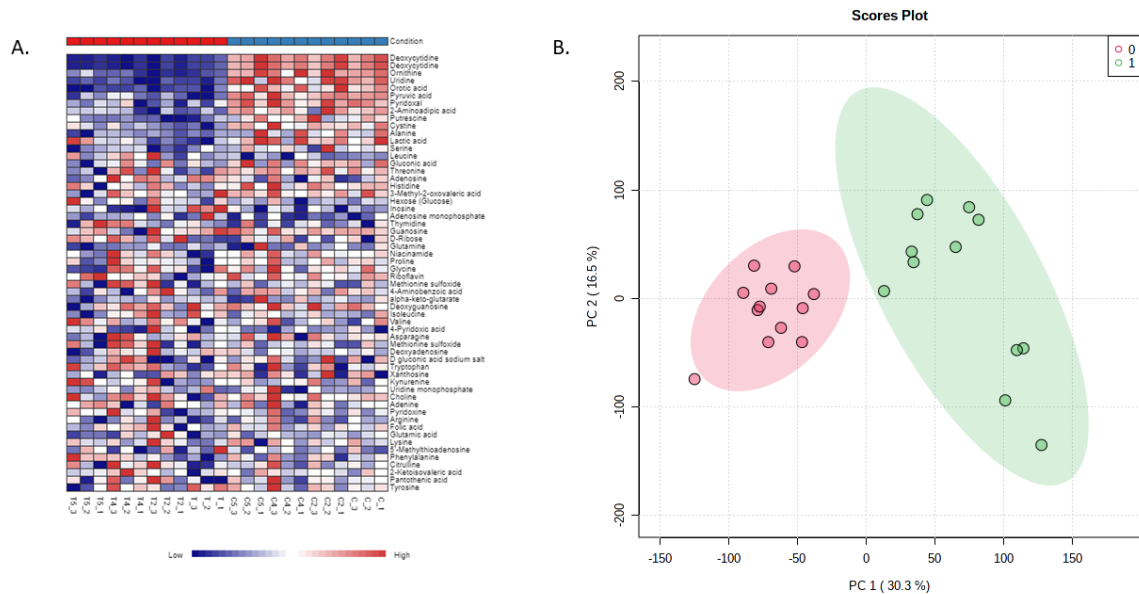


**Figure 3:** Dot plot of pathway enrichment analysis based on the intracellular concentrations of metabolites significantly modified in tacrolimus treated cells as compared to control (table 1).

#### II.1.2.4.2.2. Extracellular metabolomics

Fifty-nine metabolites were detected by LC-MS/MS analysis and, as for intracellular metabolites, heat-map analysis clearly discriminated the two conditions (controls or tacrolimus). PCA also separated them neatly by means of the first two principal components, 30.3% of the variation being explained by the first and 16.5% by the second (Figure 4).

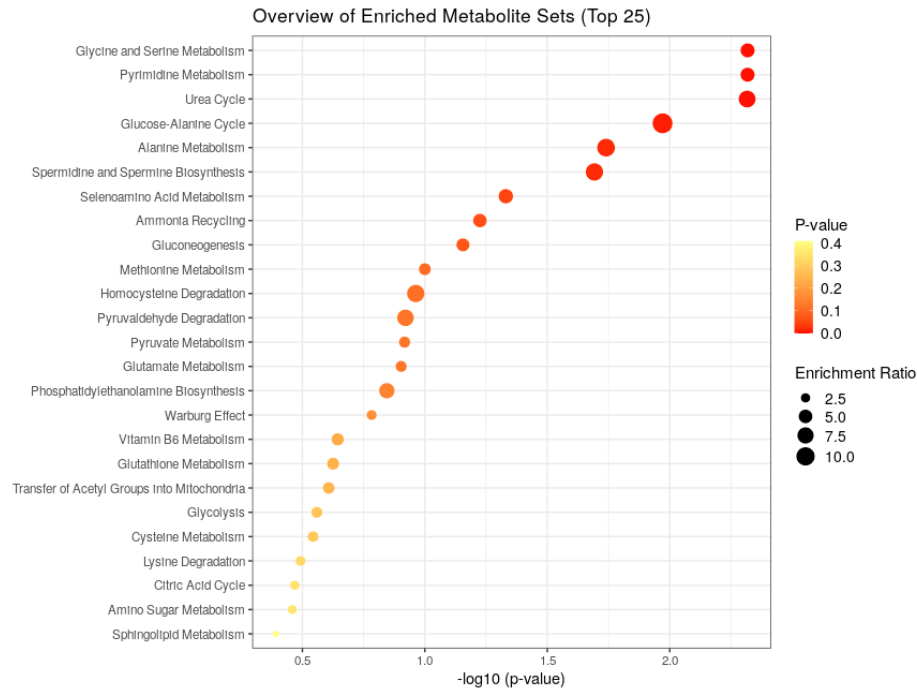
Out of the 59 metabolites detected in the extracellular medium, 17 were found to be significantly modified ( $p$ -value  $< 0.05$  and  $FDR < 0.05$ ) by tacrolimus exposure including amino acids, citric acid cycle intermediates and purine and pyrimidine bases (Figure 4 and Table 2). Enrichment pathway analysis confirmed that the pathways significantly impacted are those of the urea cycle, amino acid metabolism, pyrimidine and glutathione metabolism (Figure 5).



**Figure 4:** Multivariate exploration of extracellular metabolites variations after 24h exposure to tacrolimus (n=12). A. Heatmap clustering distinguishing control condition (C) and tacrolimus treated cells (T), based on all metabolites detected by LC-MS/MS analysis. B. PCA scores plot showing complete separation between groups 0 and 1 with principal component PC1 describing 30.3% of the variation and PC2, 16.5% (0 (red circles): 0.5% ethanol (control); 1 (green circles): tacrolimus 5µM for 24h).

**Table 2:** Fold-change of extracellular metabolites significantly modified by tacrolimus exposure (n=12) (C.M.: culture media, N.D.: not detected, D: detected).

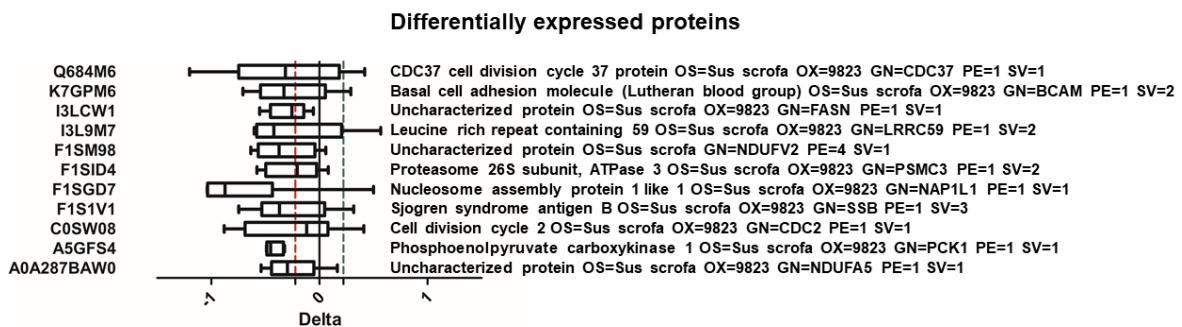
Metabolite	Fold-change	P-value (T-test)	FDR	Native C.M.	Interpretation
Deoxycytidine	0.36552	1.12E-15	6.47E-14	N.D	Secretion
Cytidine	0.38697	2.27E-12	6.57E-11	N.D	Secretion
Ornithine	0.64299	1.36E-10	2.63E-09	N.D	Secretion
Uridine	0.47507	2.41E-09	2.94E-08	N.D	Secretion
Orotic acid	0.4276	2.53E-09	2.94E-08	N.D	Secretion
Pyruvic acid	0.80938	6.15E-09	5.95E-08	D	Secretion
Pyridoxal	0.86522	2.81E-07	2.33E-06	D	Secretion
2-Amino adipic acid	0.74831	1.88E-05	0.00013647	N.D	Secretion
Putrescine	0.72803	3.09E-05	0.000199	D	Secretion
Cystine	0.84703	5.47E-05	0.00031711	D	Uptake
Alanine	0.78346	0.0006475	0.003414	D	Secretion
Lactic acid	0.91772	0.0036161	0.017478	N.D	Secretion
Serine	0.87821	0.0088553	0.039508	D	Secretion
Leucine	1.0455	0.018112	0.075034	D	Uptake
Gluconic acid	0.88113	0.023577	0.091165	D	Uptake
Threonine	0.9359	0.028988	0.10508	D	Uptake



**Figure 5:** Dot plot of pathway enrichment analysis based on extracellular concentrations of metabolites significantly modified in tacrolimus treated cells as compared to controls (table 2).

### II.1.2.4.3. Intracellular proteomics

A total of 846 proteins were identified and quantified over the 6 replicates. Only proteins identified using more than 2 peptides were retained. Eleven proteins were found to be differentially expressed and all of them were down-regulated (figure 6).

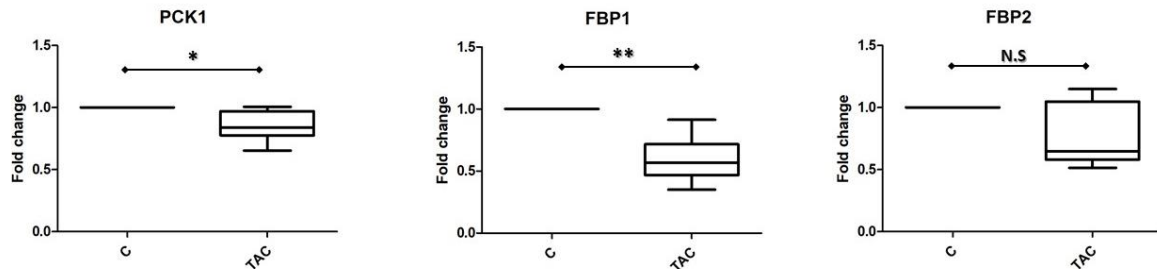


**Figure 6:** Intracellular concentrations of proteins modified after 24h exposure to 5µM of tacrolimus, as determined by SWATH proteomics analysis (n=6 independent experiments). Proteins with a mean delta > ln(0.8) or < -ln(0.8) were considered to be differentially expressed.

Two of them are involved in anabolic processes (gluconeogenesis: Phosphoenolpyruvate carboxykinase “A5GFS4”, Fatty acid synthesis: fatty acid synthase “I3LCW1”), and two others are subunits of the complex 1 involved in the mitochondrial membrane respiratory chain (NADH

dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 “A0A287BAW0”, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 “F1SM98”). In our study we will focus on PCK-1.

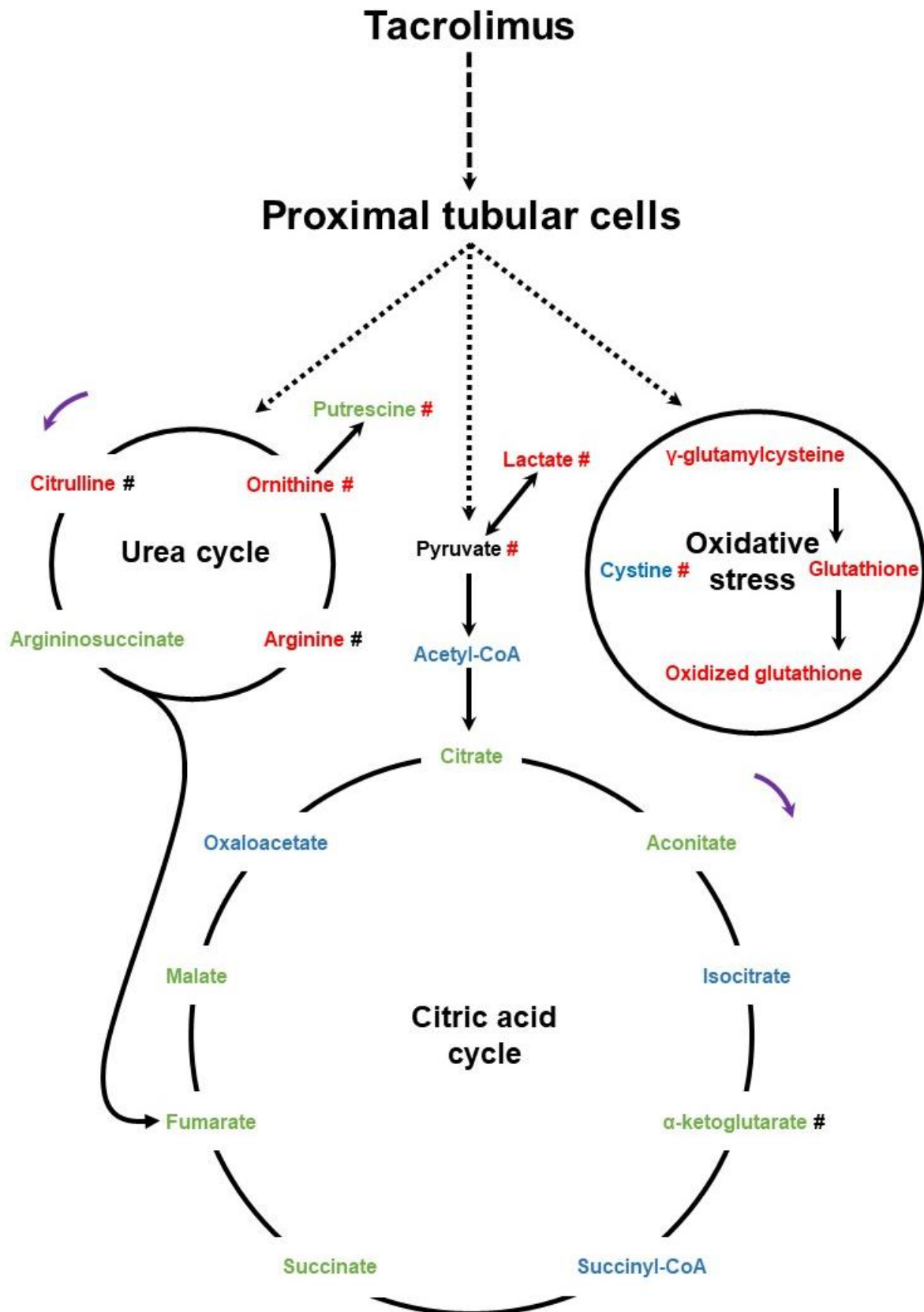
#### II.1.2.4.4. Intracellular transcriptomics



**Figure 7:** Effect of tacrolimus exposure on the mRNA levels of PCK1, FBP1 and FBP2 in proximal tubular cells.

Fold-change of PCK1, FBP1 and FBP2 mRNAs in cells exposed to tacrolimus 5 $\mu$ M (TAC) with respect to the control (C, exposed to 0.5% ethanol). Targeted gene mRNA signals were normalized to the signal of GAPDH mRNA used as housekeeping gene. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  by student  $t$ -test ( $n=6$  independent experiments).

Downregulation of *PCK-1* mRNA was confirmed by RT-qPCR ( $p=0.0329$ ). FBP1, a limiting enzyme in gluconeogenesis was also significantly downregulated ( $p=0.0031$ ), while the decrease of FBP2, the other limiting enzyme in gluconeogenesis, was not significant (Figure 7).



**Figure 8:** Main metabolomic pathways modulated by tacrolimus. Metabolites in the intracellular (name) and extracellular (marked with #) spaces are presented. Decreased metabolites are colored in green, increased metabolites in red, metabolites normally expressed in black and those not detected in blue. Purple arrows show cycle directions



### II.1.2.5. Discussion

This study of the effects of tacrolimus on a porcine cell line suggests that tacrolimus increases the oxidative stress, perturbs the cell energy metabolism and downregulate gluconeogenesis in proximal tubular cells.

As summarized in figure 8, the intracellular metabolomics study clearly showed increased oxidative stress through a decrease of the total content of intracellular glutathione (including glutathione, oxidized glutathione and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine) in tacrolimus treated cells. In addition, the lower level of cystine found in the culture medium of tacrolimus treated cells (Figure 4A, Table 2) suggests an increased uptake of this important source of cysteine for glutathione synthesis. Furthermore, intracellular metabolomics show increased folate consumption (Table.1), which can be closely related to the oxidative stress. In fact, folic acid is known to be a free radical scavenger. Additionally, folate metabolism is a major source of NADPH, a cofactor of glutathione reductase in charge of the regeneration of glutathione from oxidized glutathione (119). These results are consistent with other studies demonstrating that tacrolimus toxicity is mediated by an oxidative stress (88,117) and it validates our experimental setting.

Besides oxidative stress induction, tacrolimus altered the citric acid cycle, as clearly shown by intracellular increase of different citric acid cycle intermediates (Table 1, figure 3 and figure 8). This increase can be caused by an accumulation of the metabolites or an increase of the citric acid cycle flux. This can be linked to different intracellular events, found in our analysis, that occur simultaneously such as the oxidative stress, the down-regulation of PCK1.

As for folic acid metabolism, the citric acid cycle is a major source of NADPH, which is generated by isocitrate dehydrogenase and malic enzyme and is essential to reduce oxidative stress. In this case, the increase of the citric acid cycle intermediates may be considered as a response to the oxidative stress (Figure 8). It may suggest increased glycolysis which is also essential to produce NADPH. Unfortunately, our method did not target any glycolysis intermediate that may have helped us to confirm this hypothesis or not. In contrast, oxidative stress can reduce the activity of some citric acid enzymes like aconitase, oxoglutarate dehydrogenase and succinic dehydrogenase that may also result in citric acid cycle intermediate accumulation (120). In addition, the stress of the endoplasmic reticulum, which may be implicated in tacrolimus nephrotoxicity, can increase the citric acid cycle flux mediated by the redox metabolites (121). Lactic acid was also decreased in the intracellular space and was less excreted to the culture medium (table 2), which is in favor of an impaired citric acid flux. Monitoring citric acid cycle intermediates during tacrolimus treatment using labelled citric acid could help to determine whether tacrolimus causes an accumulation of the metabolites or an increase of the citric acid cycle flux (122).

Proteomics analysis showed differently expressed proteins with PCK-1 being the major down regulated protein (Figure. 6). PCK-1 is a limiting enzyme in the process of gluconeogenesis that converts oxaloacetate to phosphoenolpyruvate. A decrease in the activity of this enzyme may cause an accumulation of citric acid intermediate metabolites by limiting the transformation of oxaloacetate. In fact, PKC-1  $-/-$  mice showed a tenfold increase in malate level in the liver as compared to controls (123). In addition, a study performed on a hepatic cell line and in mice showed that tacrolimus decreased the hepatic expression of PCK-1 (124). This effect was also seen in a primary culture of human beta pancreatic cells exposed to tacrolimus (125). At the kidney level, a study conducted in rats treated with tacrolimus found a downregulation of *PCK-1* mRNA (126). Given the difficulties encountered to find antibodies against porcine proteins, we chose to strengthen our proteomics results by measuring the expression of the corresponding mRNAs. In our model, RT-qPCR showed that *PCK-1* mRNA was down-regulated when cells were exposed to tacrolimus (Figure 7), in line with the above-mentioned studies, thus validating our proteomics findings. In order to investigate if tacrolimus affects only PCK-1 or if it has an impact on the whole gluconeogenesis process, mRNA expression of FBP1 and FBP2, two other limiting enzymes in the gluconeogenesis process, was investigated showing that tacrolimus significantly down-regulates FBP1, and maybe also FBP2 although it did not reach statistical significance (Figure 7). This suggests that tacrolimus impacts the whole gluconeogenesis process and reduces glucose synthesis. This may appear as contradictory with the fact that tacrolimus induces diabetes in patients. In fact, tacrolimus diabetogenic effect is probably mediated by its impact on insulin secretion and activity and not on glucose catabolism. In addition, a study conducted in mice treated with tacrolimus showed decreased glycemia after 16h of fasting as compared to controls, confirming that tacrolimus affects gluconeogenesis(124). All these findings and arguments converge to highlight the effect of tacrolimus on gluconeogenesis. Kidneys have gluconeogenesis capacity and play a role in glucose homeostasis, which may have a systemic impact on patients treated with tacrolimus, but more than this, glucose metabolism deregulation in tubular cells, as suggested by down regulation of PCK1, FBP1 and possibly FBP2, may play a role in tacrolimus nephrotoxicity. In addition, PCK-1 downregulation can impact the acid-base balance. PCK-1 was upregulated in proximal tubular cells in case of acidosis and increased the transformation of oxaloacetate to phosphoenolpyruvate and  $\text{HCO}_3^-$ (127,128). The latter is released in the blood stream to regulate the acid-base disorder. In addition, tacrolimus lowered the capacity to regulate induced metabolic acidosis in a murine model (129). This was partially explained by some alteration of renal acid-base transport proteins. PCK-1 downregulation by tacrolimus can be a complementary explanation to this impaired response to metabolic acidosis. Furthermore, PCK-1 is upregulated during intracellular acidosis induced by hypokalemia *in*

*in vitro* (130). Downregulation of PCK-1 can impact intracellular pH regulation and induce direct toxicity on proximal tubular cells.

Metabolites of the urea cycle were differently impacted by tacrolimus (figure 8). Aspartate, arginosuccinate and fumarate levels were increased in treated cells, while the levels of arginine and two of its products in the cycle, citrulline and ornithine, were decreased. On top of the intracellular variations, cells treated with tacrolimus released less ornithine. These results suggest that the urea cycle activity is increased by tacrolimus, which may be linked through fumarate with the increased citric acid cycle flux. In addition, intracellular putrescine, a product of ornithine, increases while its excretion in the extracellular media decreases. This suggests a perturbation of the transporter-dependent secretion of putrescine that accumulates in the intracellular space, or an increase of its synthesis from ornithine. The accumulation of putrescine can lead to cytotoxicity (131,132).

L-carnitine is an essential metabolite for lipid metabolism. It acts by transporting lipids from the extra- to the intra-mitochondrial space. It is also responsible for the balance between free and esterified CoA, formed by the degradation of Acetyl Co-A (133). In consequence, it can be found in free and bound forms. The increased level of L-carnitine in tacrolimus treated cells can be caused by an upregulation of its synthesis as a response to the increased citric acid cycle flux so as to transport fatty acids into the mitochondria. However, this can be also explained by an increase of its free form caused by a deficiency in carnitine acylation. In both cases, this variation is linked to a perturbation in the intracellular energy metabolism.

All of the metabolomic and proteomic variations described above support deregulations of the energy metabolism induced by tacrolimus in tubular proximal cells. These cells, in respect to their functions involving a large number of energy-dependent transports, can be largely impacted by perturbations of energy metabolisms, which may be root mechanisms in the tubular toxicity of tacrolimus. In addition, PCK-1 downregulation can have an impact beyond the energy metabolism and may affect specific tubular functions such as glycemia regulation and acid-base balance.

It is worth mentioning that the tacrolimus concentration used in this study was much higher than trough tacrolimus blood concentration found in treated patients (typically 4-15 ng/ml). However, the concentration used (5 $\mu$ M), did not show any cytotoxic effect after 24h incubation and it is at the lower end of the concentrations reported in the literature when investigating tacrolimus nephrotoxicity *in vitro*, which can be up to 74  $\mu$ M (84,88,89,91,93,97,117). Even toxicity findings made at this relatively high concentrations could be validated in animal models of chronic tacrolimus nephrotoxicity (84,97). This suggests that our results, obtained at intermediate concentrations, may raise pertinent hypotheses regarding tacrolimus toxicity pathways. Because tacrolimus nephrotoxicity (apart from its vasoconstrictive properties) is a delayed and chronic process, its *in vitro* exploration would require either a very long incubation

time, which is hardly feasible, or higher concentrations of tacrolimus, which we chose, still avoiding cytotoxic concentrations. There is no example in the literature we know of that employed a different strategy.

Finally, it is worth mentioning that the variations reported here were observed at 24h incubation and that a more detailed kinetics (more time points) might allow better understanding of tacrolimus underlying mechanisms.

#### **II.1.2.6. Perspective**

This study suggests that tacrolimus is able to affect renal tubular cell metabolism at different levels through different mechanisms. The mechanism responsible for the down-regulation of gluconeogenesis limiting enzymes has still to be characterized. One hypothesis is that tacrolimus downregulates PCK-1 via the inhibition of P38MAPK. In fact, tacrolimus is known to inhibit P38MAPK in lymphocytes and P38MAPK is involved in the regulation of PCK-1 expression in proximal tubular cells (134,135).

The next step will be to investigate if the deregulation of the citric acid cycle is induced by gluconeogenesis dysregulation, increased oxidative stress, increased glycolysis or combination of these. For this, a first experiment will be to use gluconeogenesis enzyme inhibitors in non-treated cells and compare their metabolomic profile to controls and tacrolimus treated cells. A second one will be to compare the metabolomic profile and expression of glycolysis enzymes in cells exposed to tacrolimus combined or not with an antioxidant, such as N-acetylcysteine.

#### **II.1.2.7. Conclusion**

This multi-omics study on a proximal tubular cell line shows that acute tacrolimus exposure induces modifications in the energy and glucose metabolism, an increase of the oxidative stress, a perturbation of different metabolic pathways and possibly of gluconeogenesis that impact glycemia regulation and intra-extracellular acid-base balance. These short-term modifications might be implicated in tacrolimus chronic nephrotoxicity.

## II.2. Travail personnel 2 : Effets pharmacologiques des métabolites du tacrolimus

### II.2.1. Résumé

Les origines de la variabilité de l'efficacité thérapeutique et de la toxicité du tacrolimus ne sont pas totalement élucidées. L'implication des métabolites du tacrolimus dans ces réponses au tacrolimus est probablement sous-estimée. Les premières études sur l'activité immunosuppressive des métabolites *in vitro* avaient montré qu'ils sont inactifs, excepté le M-II, mais que certains métabolites conservaient la capacité de fixation à la FKBP12, comme le M-III. Certaines études cliniques ont montré que la concentration des métabolites pouvait être liée à l'apparition d'une certaine toxicité, tout comme le faible rapport concentration sanguine/dose et l'allèle CYP3A5\*1 trouvés chez les métaboliseurs rapides.

Les objectifs de cette étude sont : (i) de vérifier la nature des métabolites du tacrolimus, par spectrométrie de masse haute résolution, *in vitro* après production par des microsomes hépatiques humains (HLM) et en clinique chez des patients transplantés rénaux traités par tacrolimus et (ii) d'étudier leurs activités pharmacologiques, en tant que compétiteurs potentiels capables de diminuer l'activité immunosuppressive du tacrolimus, sur des modèles *in vitro* rationalisés par de la modélisation *in silico*.

Dans le but de caractériser les métabolites, une étude cinétique de métabolisation du tacrolimus a été effectuée en utilisant des HLM. L'analyse du milieu d'incubation a démontré la présence de 3 isomères du tacrolimus à  $t=0$ , isomères qui diminuent avec le temps, contrairement à un composé encore jamais décrit, caractérisé par le même  $m/z=826.4$  mais avec un temps de rétention différent de celui du tacrolimus. De plus on a vu apparaître quatre métabolites déméthylés avec le  $m/z=812,4$ , quatre métabolites di-déméthylés à  $m/z=798,4$  et deux métabolites tri-déméthylés à  $m/z=784,4$ . Afin de caractériser les métabolites, les spectres de fragmentation à haute résolution ont été interprétés pour élucider chaque fragment. Le nouveau composé présente un spectre de fragmentation similaire à celui du tacrolimus mais avec des fragments supplémentaires. Le tacrolimus était fragmenté par deux voies de fragmentations, A et B. Le nouveau composé est également fragmenté suivant les voies A et B mais les fragments supplémentaires par rapport au tacrolimus suivent une troisième voie de fragmentation noté voie C. L'apparition de la voie C pourrait s'expliquer par le fait que le nouveau composé est un tacrolimus présentant une ouverture du cycle pyrane et un diol géminale au niveau du C10. Nous avons appelé ce composé *open-ring* tacrolimus. L'étude de la fragmentation des métabolites déméthylés (à l'exception de M-II) di-déméthylés et tri-déméthylés a montré qu'ils se fragmentent comme l'*open-ring* tacrolimus et non pas comme le tacrolimus. Ceci suggère que les métabolites du tacrolimus ont également une structure ouverte.

Malgré ce changement structural, la structure des métabolites reste très proche de celle du tacrolimus. La capacité des métabolites déméthylés à fixer la FKBP12 (comme cible primaire du tacrolimus) a été alors étudiée *in silico* en utilisant des calculs de dynamique moléculaire. Les résultats des simulations ont montré que tous les métabolites déméthylés, que leur structure soit « ouverte » ou « fermée », sont capables de se fixer à la FKBP12 sur les mêmes résidus et avec la même énergie libre de liaison que le tacrolimus.

En se basant sur ces résultats et sur les arguments cliniques d'un effet possible des métabolites sur l'efficacité et la toxicité du tacrolimus, nous avons supposé que les métabolites du tacrolimus étaient capables d'entrer en compétition avec le tacrolimus au niveau de sa cible pharmacologique. Afin de valider cette hypothèse, une expérience a été effectuée sur des cellules LLC-PK1 transfectées par un gène codant pour la luciférase dont l'expression dépend de l'activité de la calcineurine via la translocation de la NFAT. Les cellules ont été stimulées par la PMA / ionomycine (des activateurs de la voie de calcineurine) en présence et absence du tacrolimus et de ses métabolites. Les résultats ont montré que ces métabolites sont capables de diminuer l'inhibition de la calcineurine par le tacrolimus. Des simulations de dynamique moléculaire plus poussées ont permis d'expliquer ces résultats. Ces simulations, concernant les complexes calcineurine-FKBP12-tacrolimus/métabolites, ont montré que tous les métabolites, comme le tacrolimus, sont capables de former un complexe avec la calcineurine et la FKBP12. Par contre la structure du complexe présente une différence : le tacrolimus et les métabolites à cycle fermé forment un premier type de complexe provoquant une inhibition de la déphosphorylation de NFAT par encombrement stérique du site phosphatase de la calcineurine, tandis que les métabolites à cycle ouvert forment un complexe plus lâche au niveau de liaison entre la FKBP12 et la calcineurine pouvant causer l'exposition du site catalytique de la calcineurine. Ceci pourrait expliquer le maintien d'une activité normale de la calcineurine vis-à-vis de la déphosphorylation de la NFAT. Afin de vérifier l'impact des métabolites sur l'inhibition de la réponse immunitaire, un test MLR a été effectué à partir de cultures primaires de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) humaines en présence du tacrolimus et de ses métabolites. Les résultats ont montré que les métabolites sont capables de diminuer l'activité inhibitrice du tacrolimus vis-à-vis de la prolifération des PBMC stimulés. Cet effet est trouvé lors de l'utilisation d'une concentration de 0.5 ng/ml de tacrolimus, permettant d'avoir une concentration intracellulaire équivalente à celle trouvée chez les patients traités. En revanche, à une concentration supérieure de tac (1 ng/ml) les métabolites ne modifient pas l'activité inhibitrice du TAC.

L'étude des métabolites dans le sang des patients transplantés rénaux a montré la présence du M-I et du M-III avec les fragments spécifiques de la voie de fragmentation C trouvés lors des analyses des métabolites générés *in vitro*. Ceci démontre que les métabolites ont une structure ouverte *in vivo* et *in vitro*. Par contre le M-II n'a pas été détecté. La cinétique des

métabolites sur les deux populations : (i) métaboliseurs lents homozygotes pour le génotype CYP3A5\*3 et (ii) métaboliseurs rapides homozygotes ou hétérozygotes pour le CYP3A5\*1 a montré que pour une même concentration sanguine de tacrolimus, les métaboliseurs rapides sont exposés à plus de M-I que les métaboliseurs lents 1 mois après le début du traitement. Par contre, les métaboliseurs lents ont été plus exposés au M-III seulement à J-7 après le début de traitement. De plus le rapport M-I/Tacrolimus a tendance à augmenter avec le temps. Cette étude a montré que les métabolites du tacrolimus ont potentiellement une structure légèrement différente du tacrolimus qui leur permet de se fixer aux cibles pharmacologiques du tacrolimus sans avoir la même activité immunosuppressive. L'effet direct de cette interaction est une diminution de l'effet immunosuppresseur du tacrolimus par une compétition au niveau de la FKBP12 et de la formation du complexe avec la calcineurine. Ceci peut également augmenter la concentration intracellulaire libre du tacrolimus, capable de se lier à d'autres cibles telles que les autres FKBP présentes dans le milieu intracellulaire, ce qui pourrait éventuellement participer à certains types de toxicité du tacrolimus. Ces effets anti-thérapeutique et éventuellement toxiques seraient plus importants chez les patients métaboliseurs rapides, qui présente une concentration plus élevée des métabolites, et augmenteraient au cours du temps chez tous les patients traités.

## **II.2.2. Article 2 : Potential Pharmacological Effects of Tacrolimus Metabolites**

Hassan Aouad,<sup>1</sup> Francois-Ludovic Sauvage,<sup>1</sup> H el ene Arnion,<sup>1</sup> Florent Di Meo,<sup>1</sup> Marie Essig,<sup>2</sup> Pierre Marquet<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> *INSERM U1248 IPPRITT, Univ. Limoges, F-87000 Limoges*

<sup>2</sup> *APHP, Ambroise Par e Hospital, Nephrology Departement, 92100 Boulogne Billancourt, France*

<sup>3</sup> *Department of Pharmacology and Toxicology, CHU Limoges, Limoges, France*

**\* Author correspondence**



### II.2.2.1. Summary

Tacrolimus is a widely used immunosuppressor in solid organ transplantation. This article highlights the possible pharmacodynamic interactions between tacrolimus and its metabolites that can affect its immunosuppressive activity.

### II.2.2.2. Abstract

Tacrolimus has been used in solid organ transplantation as an immunosuppressor for more than 25 years. Despite early investigations of tacrolimus metabolites, their role remains unclear even though some new studies suggest their possible implication in tacrolimus toxicity. In this study, we began by an investigation of tacrolimus metabolites structures using high resolution mass spectrometry that suggested an open-ring structure for the majority of the metabolites. Then, we investigated the possibility of a pharmacodynamic interaction *in vitro*, *in silico* and *ex vivo*. Molecular dynamics simulation demonstrated that tacrolimus metabolites are able to fix FKBP12 and to form the complex with calcineurin with a slight overall structural change. In addition, *in vitro* and *ex vivo* experiments demonstrated that metabolites are able to reduce tacrolimus capacity to decrease NFAT nuclear translocation and to inhibit lymphocytes proliferation. Together, those observations suggest a possible pharmacodynamic interaction between tacrolimus and its metabolites that can reduce its efficacy.

### II.2.2.3. Introduction

In the field of pharmacology, the role of drug metabolites in the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) is not always fully explored in the preclinical or clinical assessment of the parent drug, besides their action on the drug target and their toxic effects in animal models.

Tacrolimus has been used for more than two decades in solid organ transplantation and in the treatment of autoimmune diseases(116). Tacrolimus binds the intra-cellular FKBP proteins, particularly FKBP12. The tacrolimus-FKBP12 complex inhibits calcineurin (CN) which is a Ca<sup>++</sup>/Calmodulin (Ca)-dependent serine-threonine protein phosphatase. In T-cells, the binding of the Tacrolimus-FKBP12 complex to calcineurin inhibits the calcineurin-mediated dephosphorylation of NFAT, which in turn precludes NFAT translocation to the nucleus and T-cell activation.

The thermodynamics of Tacrolimus binding to FKBP12 (56,136–138) as well as the supramolecular arrangement of the Tacrolimus-FKBP12-CN assembly(139,140)have been investigated in different species. The binding of Tacrolimus-FKBP12 to CN does not functionally impair the phosphatase activity for small ligands(141). This suggests that

Tacrolimus-FKBP12 inhibits NFAT dephosphorylation through sterical hindrance, not by specific binding in the enzymatic pocket.

Tacrolimus metabolites were identified more than 25 years ago using *in vitro* metabolization by liver microsomes. Several metabolites were identified (99–101), although with large structural variability across reports, probably depending on the structural resolution of the techniques employed. Four first-generation metabolites are formed after single O-demethylation or hydroxylation: 13-O-demethyl-tacrolimus (M-I), 31-O-demethyl-tacrolimus (M-II), 15-O-demethyl-tacrolimus (M-III), and 12-hydroxy-tacrolimus (M-IV). These metabolites can secondarily undergo either O-demethylation or hydroxylation producing four second-generation metabolites: 15,31-O-demethyl-tacrolimus (M-V), 13,31-O-demethyl-tacrolimus (M-VI), 13,15-O-demethyl-tacrolimus (M-VII) and M-VIII formed after rearrangement of the 19,37-dihydroxy-31-O-demethyl-tacrolimus(142).

Tacrolimus metabolites were detected in blood, bile and urine (102,104,143,144). In blood, M-I is the demethylated metabolite mostly found, and M-II is only occasionally detected at low concentrations(105,145,146). Previous studies showed that M-I did not bind FKBP12 nor suppressed the immune response *in vitro* (mixed lymphocytes reaction, MLR). M-II was the only metabolite found to inhibit MLR, despite suggested weaker binding to FKBP12 to that of tacrolimus. For instance, Tamura *et al.* found out that M-II exhibited 14.2% of tacrolimus binding activity (109). Finally, the highest affinity for FKBP12 was observed for M-III which surprisingly showed no inhibitory activity in MLR assay (109). However, these results regarding FKBP12 binding by M-II are in contrast with more recent structural investigations. Indeed, recent studies demonstrated that tacrolimus binding mode to FKBP12 relies on pipicolate moiety which is not modified upon metabolization(137,138) .

Some studies have linked the blood concentration of tacrolimus metabolites to the apparition of different toxicities. For instance, M-III concentration was associated with nephrotoxicity and myelotoxicity(111). The M-I/tacrolimus ratio was correlated with myelotoxicity and hepatotoxicity (112). In addition, low tacrolimus blood concentration/dose ratio was linked to the development of IFTA(115) and acute nephrotoxicity(114) .

The hypothesis of a possible pharmacodynamics competition between tacrolimus and its metabolites has never been thoroughly investigated. Only one report concluded to the absence of competition between M-III and tacrolimus in concanavalin A stimulated lymphocytes assay and calcineurin complex formation assay (109). However, phase I metabolites generally have close structural similarity with their parent drugs, which suggests that some might act as antagonists of, or partial agonists with competitive binding to, the drug target. Such interactions between tacrolimus and its metabolites might explain the lower efficacy or higher toxicity of tacrolimus in certain patients, including maybe intensive metabolizers despite “normal” tacrolimus blood concentration(113).

Pharmacogenetics (PG) and therapeutic drug monitoring have been largely developed over the past two decades leading to improved efficacy and reduced toxicity of tacrolimus-based immunosuppressive regimens. Many genetic factors were identified to modulate tacrolimus pharmacokinetics (PK) such as CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 polymorphisms(116). However, pharmacogenetic polymorphisms only explain a part of between-patient variability in the therapeutic (prevention of rejection) and toxic effects of tacrolimus (147,148).

In the present study, the structure of tacrolimus metabolites in *in vitro* and *in vivo* samples has been resolved using high resolution mass spectrometry, showing some results at odds with previous literature. More importantly, we investigated possible interactions between tacrolimus and its metabolites, *in silico* (by means of molecular dynamics) and *in vitro*. We report for the first time a pharmacodynamic competition between tacrolimus and its metabolites that may have an impact on the drug immunosuppressive activity and may represent a source of between-patient variability in drug response.

#### **II.2.2.4. Results**

##### **II.2.2.4.1. Metabolic profiles of tacrolimus under microsome conditions**

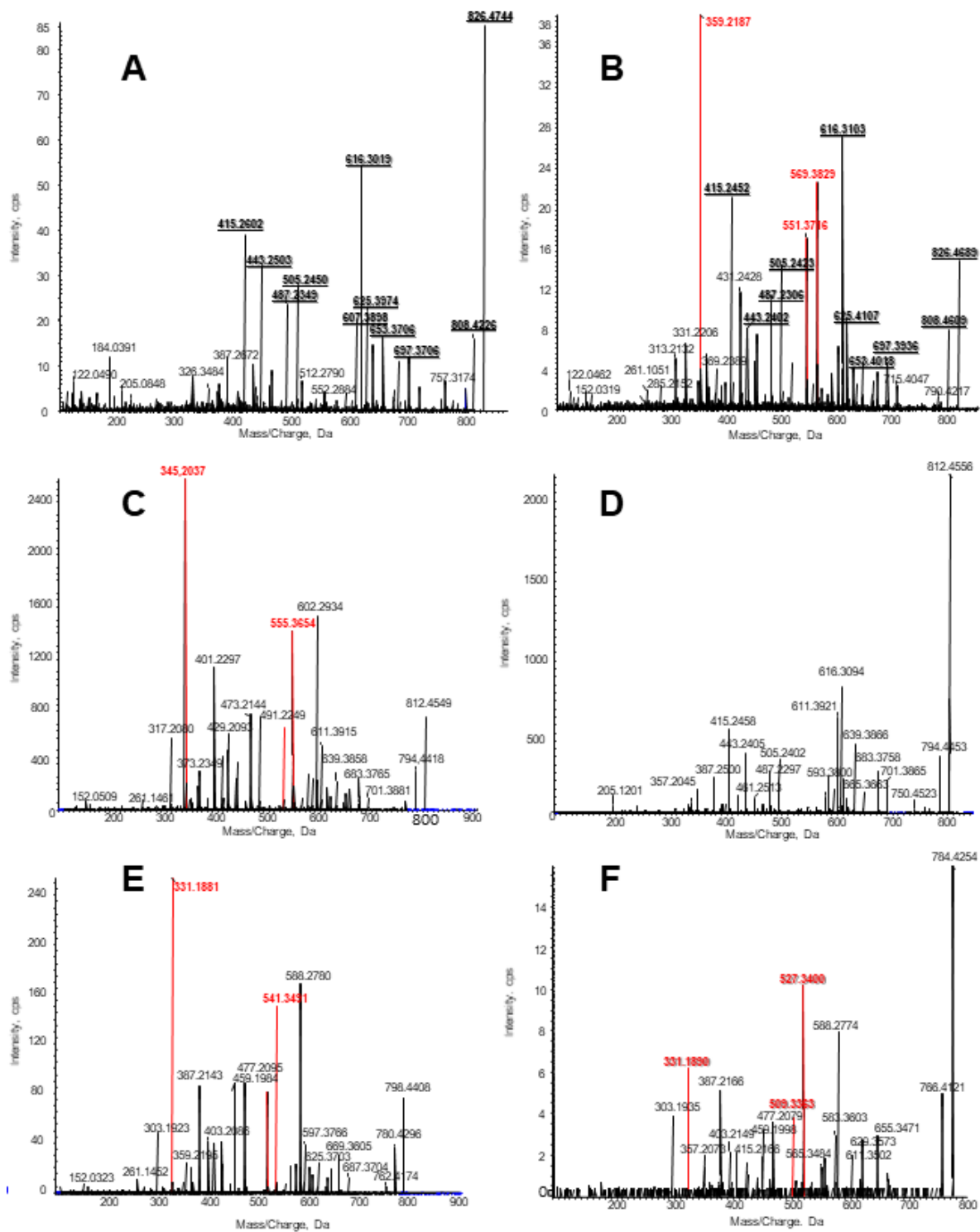
Tacrolimus and metabolites were first analysed by means of micro-LC coupled to high resolution mass spectrometry (micro-LC-HRMS) focusing on the detection of demethylated products. Tacrolimus in the incubation media without microsomes (namely blank 2) was analyzed by monitoring its sodium adduct at  $m/z = 826.4$ , revealing three peaks with close retention times ( $t = 20.0$  min,  $20.4$  min and  $20.9$  min) (Supplemental Data\*1A) and similar fragmentation patterns. Interestingly, after the incubation of tacrolimus with human liver microsomes (HLM), a fourth peak with the same  $m/z$  was observed at  $t = 16.5$  min, whose fragmentation pattern contains identical fragments to that of tacrolimus and some specific fragments. This suggests that this fourth peak is a more hydrophilic isomer of tacrolimus. (Supplemental Data\*1B).

Using these analytical conditions, different metabolites were also observed with different  $m/z$  ratios corresponding to mono-, di- and tri-demethylated tacrolimus sodium adducts, respectively for  $m/z = 812.4$ ,  $798.4$  and  $784.4$  (Figure .1). Particular attention was paid to mono-demethylated metabolites (dT) since they were the most abundant. According to the literature, demethylation can occur on C-13, C-31 and C-15 positions leading to M-I, M-II and M-III respectively(100). Micro-LC-HRMS acquisition runs were thus searched for peaks exhibiting the parent ion ( $m/z = 812.4$ ) and specific fragments for M-I/M-III ( $m/z = 602.3$ ) and M-II ( $m/z = 616.3$ ) as found by Dai et al.(106). Four peaks were observed with the fragment  $m/z = 602.3$ , that were assigned to M-I and M-III suggesting two isoforms for each, as already proposed for

M-I (142). It is worth mentioning that M-II was observed only after increasing tacrolimus and microsomes concentrations in the metabolization experiment (Figure.1). Finally, four and two peaks were observed for di- and tri-demethylated tacrolimus sodium adducts, respectively.

#### **II.2.2.4.2. High resolution mass spectrometry reveals new structures for tacrolimus metabolites.**

Enhanced Product Ion (EPI) spectra were thus investigated in order to decipher structures of tacrolimus and metabolites, supported by the literature. Surprisingly, the fourth tacrolimus peak (the new isomer) EPI spectrum suggests a significantly different fragmentation than the other tacrolimus isoforms; seven additional fragments being observed, with the most abundant at  $m/z = 569.3829$ ,  $551.3716$  and  $359.2193$  (Figure 1).



**Figure 1.** Enhanced Product Ion spectra obtained after incubation of tacrolimus with Human Liver Microsomes at **(A)** 21.05 min for Tacrolimus (Precursor Ion: m/z 826.5) ; **(B)** 16.02 min open-ring (Precursor Ion: m/z 826.5) ; **(C)** 17.60 min a mono-demethyl-tacrolimus metabolite (M-I) (Precursor Ion: m/z 812.5) ; **(D)** 20.30 min a mono-demethyl-tacrolimus metabolite (M-II) (Precursor Ion: m/z 812.5) ; **(E)** 15.49 min a di-demethyl-tacrolimus metabolite (Precursor Ion: m/z 798.5) and **(F)** a tri-demethyl-tacrolimus metabolite (Precursor Ion: m/z 784.5). Most abundant specific fragments and their respective m/z are in red.

Three distinct fragmentation pathways can thus be hypothesized based on the fragments observed for tacrolimus, its new isomer and its metabolites. Pathways A and B are shared by all compounds and initiated by a loss of  $C_6H_9NO$  for the pathway A and a loss of  $C_{13}H_{22}O_2$  /  $C_{12}H_{20}O_2$  (for M-II) for the pathway B. Pathway C, only observed for the new isomer, M-I and M-III, is characterized by a supplemental loss of  $C_{11}H_{15}NO_6$  (Figure 2 and supplemental data 2), thus confirming a shared backbone structure significantly different from that of tacrolimus. *In silico* fragmentation analyses as well as the fragmentation pattern proposed by Dai *et al.* (106) indicated that only the structural rearrangement from tetrahydropyranyl opening with geminal diol moiety at C10 (open-ring structure) can explain the fragmentation pathway C (Figure 2). In contrast, the EPI spectrum of M-II does not exhibit pathway C fragments. In other words, M-II is not expected to adopt the aforementioned open ring structure.

#### **II.2.2.4.3. Kinetics of tacrolimus metabolism**

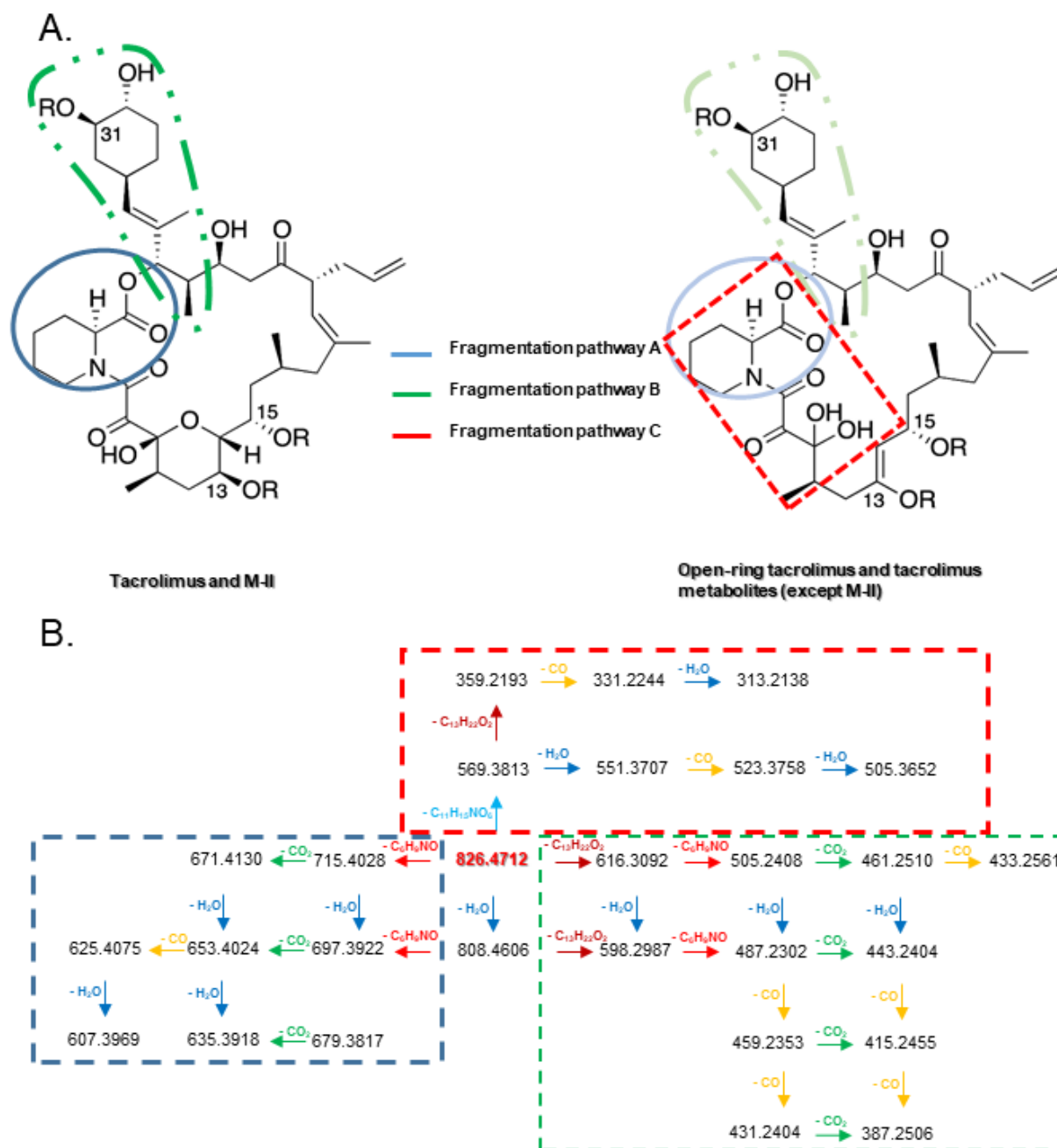
Kinetics study of tacrolimus metabolism were performed to assess time evolution of tacrolimus as well as its mono-demethylated metabolites. The normalized kinetics profiles of tacrolimus exhibits a decrease over time while the open-ring tacrolimus abundance increased over the first 20 min and then slowly decreased. Open-ring tacrolimus is thus expected to be a metabolization product, or intermediate. Likewise, the mono-demethylated tacrolimus kinetic profiles exhibited a maximum abundance at  $t = 20$  min and then decreased over time (Supplemental Data\*3). The kinetic profiles of M-I and open-ring tacrolimus did not exhibit significant difference.

#### **II.2.2.4.4. Analysis of patient blood samples reveals the presence of open-ring tacrolimus metabolites**

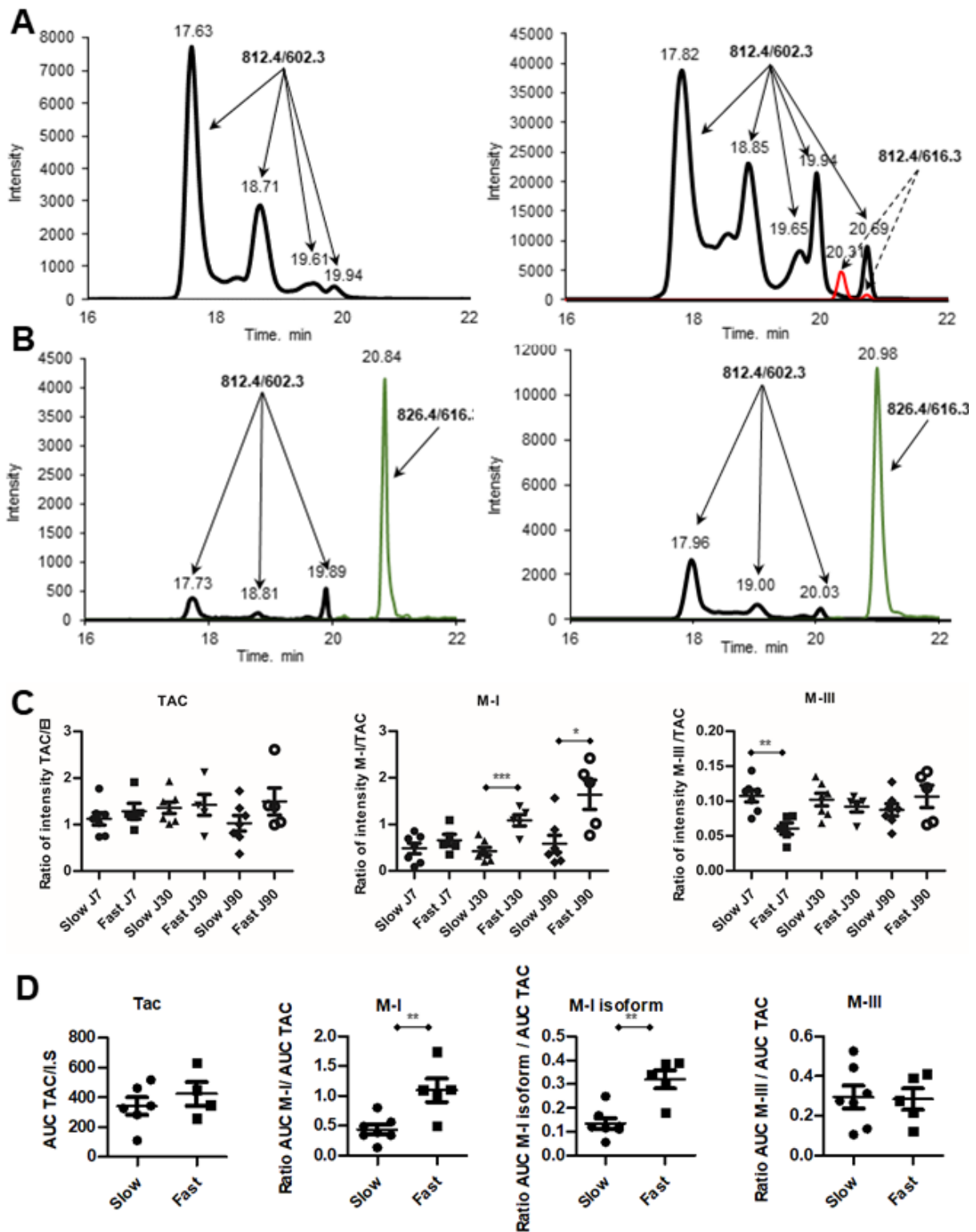
The presence and structure of tacrolimus metabolites were investigated in blood samples from patients treated with tacrolimus, using High Resolution Mass Spectrometry in the Multiple Reaction Monitoring (MRM<sup>HR</sup>) so as to obtain high sensitivity and high specificity. M-I, its isomer and M-III were observed *in vivo* in all blood samples, while M-II was never detected. The EPI spectra and retention times of M-I and M-III in patient blood were the same as those observed in *in vitro* experiments (Figure 3A and 3B), which means that they had an open-ring structure. In contrast, open-ring tacrolimus was not observed.

Furthermore, blood samples from patients carrying at least one active CYP3A5\*1 allele ( $n = 5$ ) or not ( $n = 7$ ) were considered separately to assess the impact of the CYP3A5 polymorphism on the PK profiles of tacrolimus metabolites. Three months after transplantation, extensive metabolizers exhibited higher exposure to M-I and its isomer, while the area under “the concentration vs. time” curve ( $AUC_{0-9h}$ ) of tacrolimus and that of M-III were similar in both

groups. This translated into a higher M-I/tacrolimus AUC ratio in extensive metabolizers (Figure 3C). In addition, analysis at Tmax pointed out that M-I exposure increased over time in this patient group (Figure 3D).



**Figure 2.** (A) Developed formula, proposed fragmentation pathways and (B) fragmentation intermediates of tacrolimus and open-ring tacrolimus.



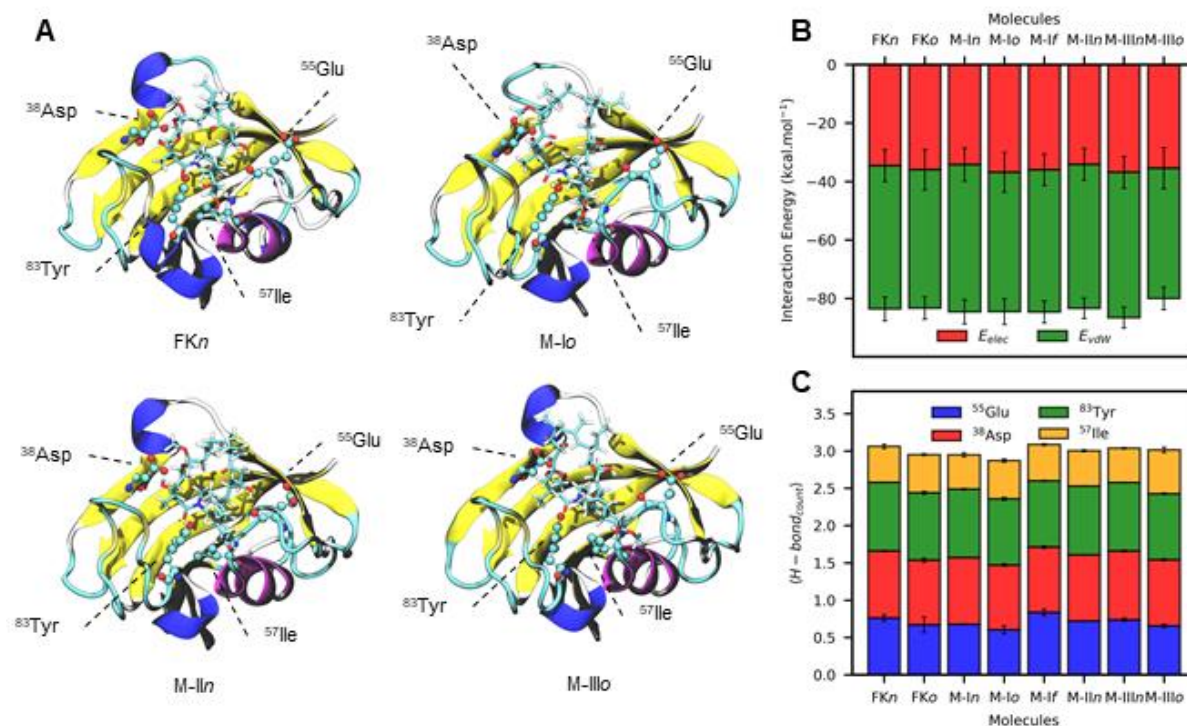
**Figure 3.** Tacrolimus metabolites measurement in the blood of transplant patients and comparison to in vitro findings. (A) Left chromatogram represents the demethylated metabolites found in the incubation media of the condition 1 of metabolization (M-I, M-III and their respective isomers), and right chromatogram represent the demethylated metabolites found in the incubation media of the condition 2 of metabolization (M-I, M-III and their respective isomers in black, M-II and its isomer in red). (B) Typical chromatogram of tacrolimus metabolites in patients' blood (black tacrolimus dimethyl-metabolites, green tacrolimus). Left: slow metabolizers, right: fast metabolizer. (C) Measurement of tacrolimus and the ratio of metabolites/tacrolimus levels at T<sub>max</sub> in transplanted patients' blood 7-, 30- and 90-days post transplantation. (D) AUC of tacrolimus and AUC metabolites/AUC Tacrolimus ratio in the blood of transplant patients 90 days after the transplantation.



#### II.2.2.4.5. MD simulations of FKBP12 binding

To assess possible competition between tacrolimus and metabolites regarding FKBP12 binding, Molecular Dynamics (MD) simulations of binary [ligand-FKBP12] complexes were performed, considering tacrolimus and all possible metabolites as ligands in order to establish structure-property relationship. For sake of clarity, tacrolimus and open-ring tacrolimus are labelled FK $n$  and FK $o$  in which “ $n$ ” and “ $o$ ” stands for normal and open-ring, respectively. Likewise, both forms were modelled for M-I and M-III (i.e., M-I $o$ /M-I $n$  and M-III $n$ /M-III $o$ ). M-II was considered only adopting closed-ring form (M-II $n$ ). Finally, FKBP12 binding to the tetrafuranyl form of M-I suggested by tamura *et al.* was also investigated (109). Root-mean square deviations (RMSD) of FKBP12 backbone were monitored (see Supplemental Data\*4) showing no significant structural difference with respect to X-ray structure(149) regardless of ligand. RMSD calculations with respect to the average structure from [FK $n$ -FKBP12] simulations were also calculated (see Supplemental Data\*4), ranging from  $0.58 \pm 0.08$  to  $0.68 \pm 0.09$  Å. This depicts a noteworthy global conservation of FKBP12 structure regardless of bound ligand (See e.g., FK $n$ , M-I $o$ , M-II $n$  and M-III $o$  complexes in Figure 4.A). In other words, demethylation, tetrapyranyl ring opening (FK $o$ , M-I $o$  and M-III $o$ ) or rearrangement (M-I $f$ ) are unlikely to modify FKBP12 binding mode with respect to closed-ring structures (FK $n$ , M-I $n$ , M-II $n$  and M-III $n$ ). These results are in agreement with calculated non-covalent interaction energies between ligands and FKBP12 which exhibit similar values for all systems (Figure 4.B).

Absolute binding free energies were calculated at both 293 K (20°C) and 310 K (37°C). Robustness of this approach was confirmed by comparing theoretical and experimental results for FK $n$ -FKBP12 bound system (150). Binding free energies calculated in the present study (Table 1) are very similar to those obtained either experimentally or from previous theoretical studies(137), within the estimated chemical accuracy of alchemical methods (i.e.,  $\pm 2.2$  kcal.mol<sup>-1</sup>)(151). Calculated binding free energies considering all ligands were all very similar, ranging from  $-10.4 \pm 2.4$  to  $-11.8 \pm 2.2$  kcal.mol<sup>-1</sup>. This suggests that all molecules have the same likelihood to bind FKBP12 *in vitro* or *in vivo* (i.e., at 293 and 310 K, respectively).



**Figure 4.** (A) Structures of FKBP12 bound to tacrolimus (FKn, upper left), open structure M-I (M-Io, upper right), M-II (M-IIn, lower left) and open structure M-III (M-IIIn, lower right). Representative snapshots were extracted from 3 x 110 ns (N,P,T) MD simulations. Ligands and key FKBP12 binding residues are respectively depicted using ‘Balls and sticks’ and ‘Licorice’ representations. (B) Calculated Lennard-Jones (green) and Coulombic (red) non-covalent interaction energies (kcal.mol<sup>-1</sup>) between FKBP12 and tacrolimus or its metabolites. Standard deviations were calculated separately for Lennard-Jones and Coulombic terms over 3 x 110 ns MD simulations from three replicas. (C) Average H-bond count between FKBP12 key binding residues and tacrolimus and its metabolites. Standard deviations were separately calculated for each H-bond partner over 3 x 110 ns MD simulations from three replicas.

**Table 1.** [FKBP12-ligand] Binding free energies calculated at 293K and 310K obtained by means of softcore alchemical calculations.

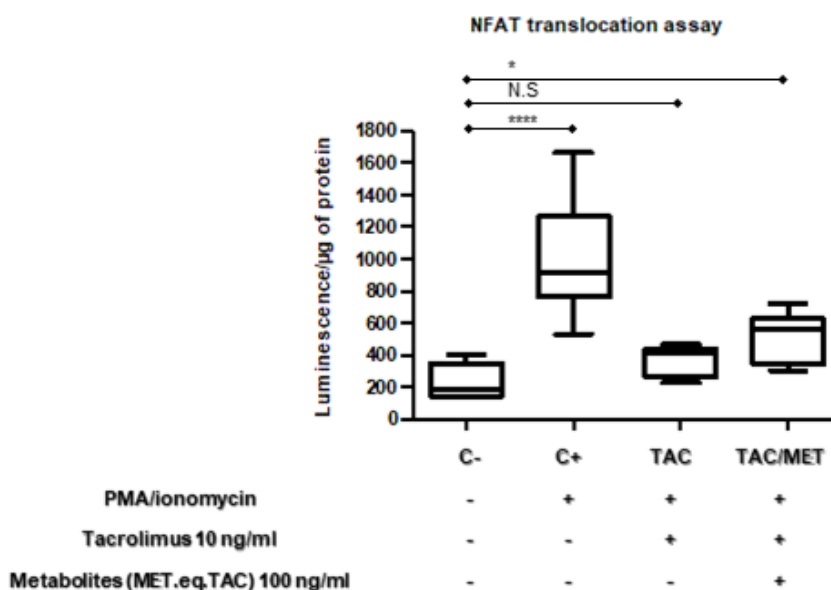
Molecules		293K (20°C)		310K (37°C)
		$\Delta G_{\text{theo}}$	$\Delta G_{\text{exp}}$	$\Delta G_{\text{theo}}$
Closed form	Tacrolimus	-11.1 ± 1.2	-12.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	-7.8 ± 2.0
	M-I	-11.2 ± 2.2	-	-8.3 ± 2.0
	M-II	-11.4 ± 2.1	-	-8.2 ± 1.9
	M-III	-11.8 ± 2.2	-	-8.5 ± 1.9
Open form	Tacrolimus	-10.4 ± 2.4	-	-7.2 ± 2.4
	M-I	-11.1 ± 2.4	-	-8.0 ± 2.1
	M-III	-11.6 ± 2.1	-	-8.5 ± 1.9
Furanyl form	M-I	-11.4 ± 2.5	-	-8.1 ± 2.4

These results were explained by similar binding mode involving mostly pipecolate moiety. Structural analyses stressed out the key role of <sup>38</sup>Asp, <sup>55</sup>Glu, <sup>57</sup>Ile and <sup>82</sup>Tyr in H-bond binding between FKBP12 and ligands (Figure 4A&C). H-bond network is maintained by an average of 3.00 ± 0.07 H-bonds between ligands and these residues, in which <sup>82</sup>Tyr, <sup>38</sup>Asp, <sup>55</sup>Glu and <sup>57</sup>Ile contribute for ca. 30.2, 28.8, 24.5 and 16.5 %, respectively. These results are in agreement

with previous studies(137,138) showing that pipicolate is mandatory for tacrolimus binding while the demethylation sites (i.e., C-13, C-31 and C-15) are not interacting with FKBP12 residues.

#### II.2.2.4.6. Luciferase-based NFAT translocation assays suggest a pharmacodynamic interaction between tacrolimus and its metabolites

LLC-PK1/NFAT were stimulated with PMA/ionomycin, which are known to be activators of CN pathway. This resulted in a significant increase of luciferase activity indicating -higher- NFAT translocation to the nucleus, as compared with the negative control. In the presence of tacrolimus at 10 ng/ml, PMA/ionomycin stimulated cells presented a decrease of luciferase activity with respect to the positive control and no significant difference with the negative control, in agreement with tacrolimus intracellular mechanism of action. PMA/ionomycin stimulated cells exposed to a mixture of tacrolimus at 10 ng/ml and its metabolites at 100 ng/ml MET.eq.TAC (metabolite equivalent tacrolimus) exhibited intermediate luciferase activity as compared to that of tacrolimus and positive control with a significant higher luciferase activity compared with negative control. (Figure 5).



**Figure 5.** Luminescence normalized to total protein content reflecting the nuclear translocation of NFAT in cell stimulated with PMA/ionomycin in the presence and absence of tacrolimus and tacrolimus metabolites. Data pooled from 3 independent experiments with n=3 in each one.

#### II.2.2.4.7. MD simulations exhibit plausible dynamics of CN-FKBP-ligand complex depending on tacrolimus and metabolite structures

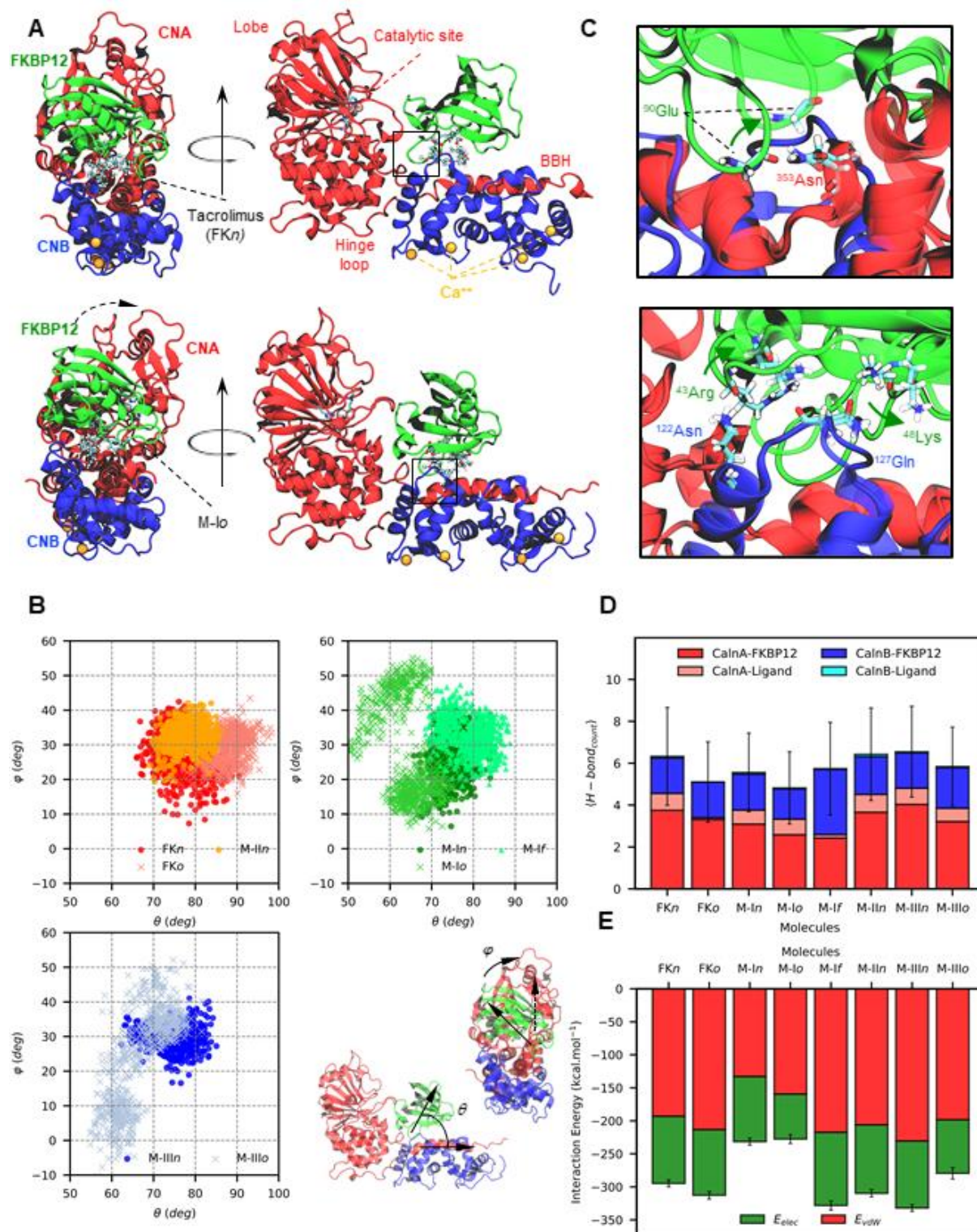
MD simulations of CN-FKBP12-ligand complexes were performed in order to provide structural hints on FKBP12-ligand binding to CNs. Based on X-ray structures,(139–141) CN-FKBP12-ligand systems included CNA, CNB and FKBP12 bound to tacrolimus or its metabolites. It is

worth mentioning that only the N-terminal and CNB-binding helix of CNA were modelled. The auto-inhibitory domain and auto-inhibitory segment were not included, assuming an active CN model(141). Systems also included four Ca<sup>++</sup> ions bound to CNB. Given the system size, three replicas were performed for 1 ms long (*N,P,T*) MD simulations each. Structures were aligned to the CNA backbone and RMSDs were monitored for CNA&B and FKBP12 separately along simulations. While FKBP12 structure remained stable along simulations regardless of ligand, RMSD calculations revealed higher structural variability for CNs (Supplemental Data\*4), suggesting that MD simulations might populate different regions of the CN conformational space. Analyses were performed over the last 400ns of the simulations when RMSDs were stable, ensuring sufficient sampling for further structural analysis.

Supramolecular arrangements of FKBP12-ligand with CNs were different depending on tacrolimus and metabolite structures. From visual inspections of trajectories, open-ring structures (i.e., FK*n*, M-Io, M-IIIo) slightly deviate from close ring structures (i.e., FK*n*, M-In, M-If, M-II*n* and M-III*n*). Simulations show that a larger twist between FKBP12 and the CNA lobe, suggesting rocking motion around BBH similar to single residue variant FKBP12-CN systems in fungi (139). Ligand-dependent FKBP12 supramolecular variabilities were assessed by principal component analysis (PCA) based on trajectories from FK*n*-bound simulations. Shortly, CNs-FK*n*-FKBP12 trajectories were aligned to CNB-CAN BBH domains, and PCA was calculated for backbone FKBP12 coordinates to picture its rocking motion around BBH. Other ligand trajectories (i.e., FKo, M-In, M-Io, M-If, M-II*n*, M-III*n* and M-IIIo) were then projected on the FK*n* PC1 *versus* PC2 space; PC1 and PC2 contributing for 59.4 and 23.3 % to the global structural variability, respectively (Supplemental Data\*4). Projections confirmed higher variabilities for the open-ring structures, while M-In, M-II*n* and M-III*n* snapshots were more localized. Finally, these findings are in agreement with the two-dimensional distributions of FKBP12-CNA twist angle and FKBP12-BBH closing angle (Figure.6). Such observations might be explained by different H-bond networks between FKBP12-Ligand and CNA&B (See Figure 5C&D). For instance, simulations with FK*n* stressed out that <sup>353</sup>Asn<sub>CNA</sub>-<sup>90</sup>Glu<sub>FKBP12</sub>, <sup>368</sup>Lys<sub>CNA</sub>-<sup>55</sup>Glu<sub>FKBP12</sub>, <sup>122</sup>Asn<sub>CNB</sub>-<sup>43</sup>Arg<sub>FKBP12</sub> and <sup>127</sup>Gln<sub>CNB</sub>-<sup>48</sup>Lys<sub>FKBP12</sub> H-bonds maintained interactions between FKBP12 and CNA&B.

H-bond fractions in simulations of the open-ring metabolites, or open-ring tacrolimus, were smaller than with corresponding closed structures. Nevertheless, only M-Io systems exhibited lower H-bond count than tacrolimus, suggesting significantly looser binding between FKBP12 and CNs. This was confirmed by calculating the global non-covalent interaction energies between FKBP12 and CNs for which M-In and M-Io are significantly less favorable than the other systems. Interestingly, FKBP12 <sup>88</sup>His was shown to be crucial for CN binding(139,152).The distance between the cyclohexanyl moiety of tacrolimus or its metabolites and <sup>88</sup>His<sub>FKBP12</sub> was measured, showing that ring opening was associated with a

broader ligand-<sup>88</sup>His distance distribution than with close-ring ligands. Less contacts between ligands and <sup>88</sup>His in turn lead to a higher flexibility of 80s loop (Supplemental Data\*4). Such flexibility was suggested to be associated with a lower CN inhibition (139).



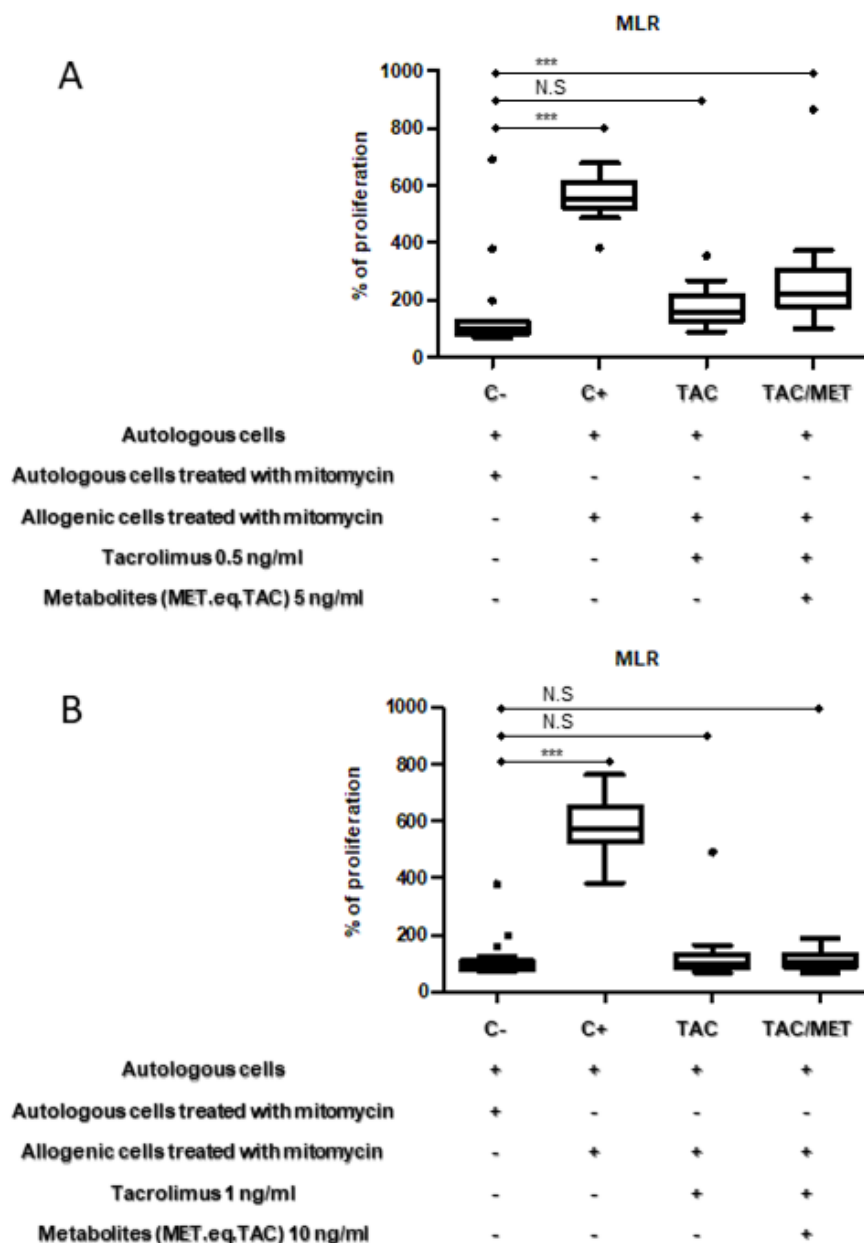
**Figure 6. (A)** Structures of CN-FKBP12 bound to tacrolimus (FKn, top) and open structure M-I (M-lo, bottom) with front- and side-views. CNA, CNB and FKBP12 were depicted in red, blue and green, respectively. Fe-, Zn- and Ca-atoms were represented using VDW spheres. Ligand are shown using

'Balls and Sticks' representations. Final snapshots were extracted from 3 x 1 ms (N,P,T) MD simulations. **(B)** 3D-distributions of  $q$  and  $j$  angles for tacrolimus and M-II-bound systems (upper left), M-I-bound systems (upper right) and M-III-bound systems (lower left). Normal, open and tetrahydrofuranyl (only for M-I) structures were plotted using sphere and cross, respectively.  $q$  and  $j$  angles were defined to respectively represent rocking motion and closing angle between CNA BBH domain and FKBP12 (lower right). Distributions were calculated using the last 400 ns MD simulations in three replicas per systems. **(C)** Superimposition of both tacrolimus and M-Io-bound CN-FKBP12 systems focusing on key H-bond displacement at CNA- (top) and CNB-FKBP12 (bottom) interfaces, M-Io-bound system being depicted in transparent. **(D)** Average H-bond counts between FKBP12-Ligand and CN partners, in which contributions from CNA-FKBP12 (red), CNA-Ligand (pink), CNB-FKBP12 (blue) and CNB-Ligand (cyan) pairs are reported. Standard deviations were calculated using the last 400 ns MD simulations in three replicas per systems. **(E)** Calculated Lennard-Jones (green) and Coulombic (red) non-covalent interaction energies (kcal.mol<sup>-1</sup>) between FKBP12-Ligand pair and CAN&B pair. Standard deviations were calculated separately for Lennard-Jones and Coulombic terms over the last 400 ns MD simulations in three replicas per systems.

#### **II.2.2.4.8. Mixed lymphocyte reaction (MLR) experiments support the hypothesis of a competition between tacrolimus and its metabolites**

Proliferation of lymphocyte in contact with other allogeneic lymphocytes was assessed in order to monitor the activation of the immune response in basal conditions, and then in the presence of tacrolimus and/or its metabolites. Two different concentrations were used, 0.5 ng/mL and 1 ng/mL for tacrolimus or 5 ng/ml and 10 ng/ml for MET.eq.TAC, respectively. The immune response was inhibited by tacrolimus alone at both concentrations. In lymphocytes exposed to 0.5 ng/mL tacrolimus and 5 ng/mL MET.eq.TAC, proliferation was higher than with 0.5 ng/mL tacrolimus alone, but still lower than in the positive control (Figure 7A). It is also worth mentioning that the modulation of tacrolimus activity was not observed in cells exposed to the higher concentrations of tacrolimus and metabolites, (1 ng/mL tacrolimus and 10 ng/mL MET.eq.TAC) (Figure 7B).

When incubating PBMCs from two different healthy donors with 0.5 ng/ml tacrolimus, the intracellular concentrations of tacrolimus were 74.5 and 60.4 pg/million cells and 16.8 and 17.6 ng/million cells after 1h and 7 days of incubation, respectively



**Figure 7.** Cell proliferation was assessed during MLR experiment in the presence and absence of tacrolimus and tacrolimus metabolites using MTS test. **(A)** Cells were treated with 0.5 ng/ml and 5 ng/ml of tacrolimus and tacrolimus metabolites (MET.eq.TAC) respectively. Data were pooled from 4 independent experiments n=6 in each experiment. **(B)** Cells were treated with 1 ng/ml and 10 ng/ml of tacrolimus and tacrolimus metabolites (MET.eq.TAC) respectively. Data were pooled from 3 independent experiments n=6 in each experiment.

### II.2.2.5. Discussion

This translational study shows for the first time that tacrolimus metabolites, many of which exhibit an open-ring structure never described before and found to have high level in fast metabolizers patients treated with tacrolimus, compete with tacrolimus for NFAT translocation to the nucleus and immunosuppressive activity ex vivo.

Tacrolimus is widely used as an immunosuppressant drug in organ transplantation. Even though tacrolimus PK, PD and PG have been largely documented over the past 25 years (116),

the potential effects of its metabolites had been incompletely explored. In the present study, using high-resolution mass spectrometry we characterized tacrolimus metabolites generated by incubation with HLM as well as extracted from patient blood, and we described their relative concentrations, over time and over post-transplantation periods, as well as depending on the CYP3A5\*1/\*3 polymorphism, in kidney transplant patients treated with tacrolimus. In a second time, we investigated the pharmacological role of tacrolimus metabolites as direct competitors to tacrolimus immunosuppressive activity by a translational approach. Competition with tacrolimus for FKBP12 binding was investigated by computational (MD) approaches. The effect of the metabolites on the intracellular response to tacrolimus was assessed: (i) *in silico* through the modeling of the calcineurin-FKBP12-metabolite supramolecular assembly; (ii) *in vitro* by measuring NFAT translocation in the nucleus of a cell model; and (iii) *ex vivo* through MLR studies.

The literature is rich in studies investigating tacrolimus metabolite structures, and it mainly reports simple demethylation and tetrahydropyranyl rearrangement(109,153). Several studies used low-resolution MS of ammonium adducts which is relevant for tacrolimus quantitation, but yields poorly informative fragmentation and no specific fragment to discriminate between metabolites(105,145,154). In the present study, we used for the first-time high-resolution MS of sodium adducts of tacrolimus and its metabolites, giving us the capability to differentiate fragments with minute difference. For instance, two distinct fragments ( $C_{25}H_{38}NaO_9^+$  and  $C_{32}H_{50}NaO_3^+$ ,  $m/z = 505.2408$  and  $505.3652$ , respectively) were elucidated through their EPI full spectrum as fragments belonging in two distinct fragmentation pathways. Interestingly, the latter fragment was specific of the open-ring tacrolimus which showed a higher polarity than the previously described isoforms. Based on this high-resolution spectra and fragmentation pathways we found that 13- and 15-demethyltacrolimus (i.e., M-I and M-III, respectively) also have an open-ring conformation of the tetrahydropyranyl moiety with geminal-diol function in the position C-10 (Figure 2). M-II was experimentally obtained under the “normal” closed-ring form but only when tacrolimus was in excess during microsome incubation. The metabolic reaction kinetics clearly suggested that CYP450 was responsible for ring opening since open-ring tacrolimus was not observed at  $t_0$ . To explain this structure differences between metabolites, we hypothesize that concerted regioselective dealkylation and ring-opening by CYP450 could only happen if tacrolimus tetrahydropyranyl moiety is oriented in close contact with the reactive Fe=O catalytic site. It is important to note that the structures elucidated using NMR in a few studies suggest reliable metabolite structures(100,101,153) that differ from our results. Discrepancies might be explained by alternative *in vitro* production protocols, including the use of animal liver microsomes and purification protocols (100,153). Nevertheless, closed as well as open ring forms of tacrolimus, M-I and M-III were detected and confirmed in patient



blood by comparing their EPI spectra and retention time with those obtained from *in vitro* experiments. Interestingly, open-ring M-I was the major metabolite in blood.

We investigated whether the open-ring metabolites could act as competitors for the parent drug, since the literature is not rich in this matter. The immunosuppressive activity of tacrolimus metabolites was reported in different articles. For instance, Lhoëst *et al.* (155) reported that M-III tautomer exhibited an immunosuppressive activity while Tamura *et al.*(109) reported that the only immunosuppressive metabolite was M-II. Besides, Tamura *et al.* (1994) showed that M-III, which had high affinity to FKBP12 in their study, was not associated with reduced tacrolimus immunosuppressive activity(109).

In the present study, the structure-property relationships regarding FKBP12 binding was established through computational experiments. MD simulations suggest that FKBP12 can bind both closed and open ring tacrolimus metabolites. Specifically, alchemical calculations showed almost identical free energy binding (Table 1) for the closed form of tacrolimus and the open forms of M-I and M-III. This is consistent with the fact that the tetrahydropyranyl moiety is not involved in FKBP12 binding as shown through X-ray crystallographic structures (140,149) and by recent theoretical works (136–138). This opens the possibility of *in situ* competition between tacrolimus and its metabolites for FKBP12 binding.

CN inhibition by tacrolimus was shown to be decreased in the presence of a cocktail of its metabolites, as shown by partial restoration of NFAT nuclear translocation in LLC-PK1/NFAT cells. MD simulations on the supramolecular complex made of CNA, CNB, FKBP12 and either tacrolimus or metabolites were performed. The FKBP12-tacrolimus complex was found to inhibit CN activity by binding to the CNA BBH domain. Structural investigations showed that complexes with the open-ring M-I and M-III exhibited higher rocking FKBP12 motion around CNA BBH, and lower interaction energies between CN and FKBP12 when bound to the open-ring M-I. Such looser binding was already suggested in fungus CN systems in which FKBP12 variants with a single mutation (e.g. p.His88Phe) were shown to be more flexible. This structural variability is associated with longer distances between ligand and His88 which is crucial for supramolecular assembly(139).

It is important to note that the ability of FKBP12 to bind CN systems is not affected in the presence of open-ring tacrolimus metabolites. Nevertheless, previous works showed that CN can still dephosphorylate small substrates in the presence of FKBP12 and tacrolimus(141). This suggests that CN inhibition is due to steric hindrance of the catalytic pocket by the FKBP12-tacrolimus complex. Based on the present results, we hypothesize that NFAT may displace FKBP12 from the CN system when it is bound to open-ring M-I due to the higher flexibility of FKBP12 and its looser binding to the CNA BBH domain. NFAT translocation experiment and MD simulations are thus in favour of a competition between tacrolimus and its metabolites, that play the role of antagonists of tacrolimus activity. This was confirmed by 7-

day *ex vivo* MLR experiments in which a cocktail of metabolites partly antagonized tacrolimus immunosuppressive activity at 0.5/5 ng/mL tacrolimus/metabolites, leading to partly restored PBMC proliferation.

However, tacrolimus activity on the MLR after 7 days of incubation was not antagonized by the metabolites at 1/10 ng/mL tacrolimus/metabolites. This might be explained by an increased intracellular accumulation of tacrolimus at 1 ng/mL over 7 days. Unfortunately, we did not measure intracellular tacrolimus concentration after incubation at 1 ng/ml. At 0.5ng/ml, tacrolimus concentration in PBMC after 7 days of incubation was on average 17.2 pg/ million cells, which is in the range of concentrations found in PBMC of treated patients (9.6-80.4 pg/ million cells)(156). In contrast, after 1h incubation of PBMC at the same concentration, the average intracellular tacrolimus concentration was 67.45 pg/million cells. This is almost identical to the results obtained by another group (157), who found 82.5 pg of tacrolimus/million cells in the same conditions, and close to the average concentration in PBMC of transplant patients at Tmax as reported in two other papers (i.e., 68.3 and 78.1 ng/million cells) (158) (156). Interestingly, after 1h incubation with 1 ng/ml tacrolimus the same group (157) found 208.9 pg/million cells, i.e. a more than proportional increase with respect to 0.5 ng/mL tacrolimus, which is consistent with our hypothesis that the intracellular metabolite/tacrolimus concentration ratio is lower at this higher concentration level and the competitive potential of the metabolites is less. Unfortunately, we were not able to determine the intracellular concentrations of the metabolites in our experiments.

Another potential consequence of this competition for FKBP12 binding is that the presence of the metabolites can increase the availability of free tacrolimus to bind other targets (e.g., FKBP52 (159)), possibly favouring off-target adverse effects. This is particularly true in extensive metabolizers, who have higher circulating concentrations of tacrolimus metabolites and in whom tacrolimus immunosuppressive activity might also be reduced. In this study, we were unable to decipher which metabolites pharmacodynamically compete with tacrolimus because of the unavailability of purified metabolites. However, based on its larger abundance in patient blood and the metabolization medium and MD simulation results, M-I is likely to be the most important competitor. We determined tacrolimus and its main metabolites in the blood of kidney transplanted patients over 9h post-dose and found that extensive metabolizers exhibited higher concentrations of M-I, while the concentration of M-III were not different from that in poor metabolizers, in agreement with previous reports(146,160). M-II was always undetectable, consistent with previous reports that it was not detected or only detected at very low concentrations (105,111,145,146,161). Interestingly, the M-I/tacrolimus concentration ratio we observed at Tmax [0.18-2.42] was very close to the concentration ratio (2.2) found in our *in vitro* and *ex vivo* experiment media, after incubating cells with a mixture of metabolites and

tacrolimus in a theoretical amount ratio of 10 (the overall metabolite amount being inferred from the TAC amount totally metabolized into its metabolites).

### **II.2.2.6. Conclusion/concluding remarks**

To our knowledge, this is the first study that pointed out a possible interaction between tacrolimus and its metabolites, which can potentially reduce its efficacy. This is especially important in case of extensive metabolizers and patients receiving CYP3A inducers. We propose that tacrolimus metabolites should be measured in patient blood along with tacrolimus, using an appropriate and specific analytical method, in order to establish more accurate PK/PD relationships, and possibly to predict in whom or in which occasions tacrolimus efficacy may be lowered (and toxicity potentially increased) and finely adjust treatment.

### **II.2.2.7. Materials and methods**

#### **II.2.2.7.1. Chemicals**

Organic solvents and reagents were of analytical grade. Acetonitrile (ACN) and NADPH (N1630) were obtained from Merck (Molsheim, France), trifluoroacetic acid and formic acid from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Pools of human liver microsomes from 50 donors (HMMCPL) were obtained from Gibco. ROQ QuEChERS salt  $MgSO_4/NaCl$ ,  $Na_2HCitrate/Na_3Citrate$  (AH0-9043) were purchased from Phenomenex. Deionized water was prepared on a Direct-Q laboratory plant (Millipore, Molsheim, France). Tacrolimus (F467), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (P1585), ionomycin calcium salt (I0634), insulin (I4011), Triiodothyronine (T6397), dexamethasone (D4902), desmopressin (V2013), Sodium selenite (S5261) and transferrin (T1147) were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) and  $^{13}C$ -D<sub>2</sub>-Tacrolimus (TACD) from TRC (Toronto, Canada). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Ham's F12 (DMEM-F12 1:1, #31331, Gibco), fetal bovine serum (FBS, 10500), HEPES (15630), Sodium bicarbonate (25080), 10 000 UI/mL Penicillin/Streptomycin (15140), 0.05% Trypsin-EDTA (25300-054) Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, 14190) were purchased from Gibco and RPMI 1640 Medium with UltraGlutamine™ and with HEPES (BE12-115F/U1) from Lonza. Luciferase assay system (E4030) was obtained from Promega.

#### **II.2.2.7.2. Tacrolimus metabolism**

Tacrolimus metabolism kinetics study was done by incubating 1  $\mu$ M of tacrolimus with 0.5 mg/ml HLM at a concentration of 1  $\mu$ M for 0, 1, 5, 10, 20, 30 minutes, 1h, 2h and 2.5h with 3 mM of NADPH (condition 1). The reaction was performed in a Tris-HCl Mg buffer (0.1M/ 10mM) at 37°C with agitation. The reaction was stopped by adding 1 ml of glacial acetonitrile to 200

µl of sample. Two samples were prepared as controls, a blank reaction media without tacrolimus (Blank 1) and a solution containing tacrolimus and NADPH in Tris-HCl Mg buffer without microsomes (Blank 2). TACD was also metabolized in the same condition for 30 minutes. 75 µM of tacrolimus was also metabolized using 5 mg/ml of HLM in the presence of 22 mM of NADPH in Tris-HCl Mg buffer (0.1M / 10 mM) (condition 2).

#### **II.2.2.7.3. Extraction of tacrolimus and metabolites from incubation media**

Tacrolimus and metabolites were extracted from 200 µl of microsomes incubation supernatant by adding 1 ml of ACN and 20 µL of TACD as internal standard (I.S) (final concentration 20 ng/ml), vortexing for 1 min and leaving to stand for 10 minutes at -20°C. QuEChERS salts were then added and the mix was vortexed for 1 min and centrifuged at 10°C for 15 min at 13000g. The supernatant was then recovered and evaporated to dryness under nitrogen at 40°C. The extract was then solubilized with 200µl of ACN/water (90/10, v/v) with 0.1% formic acid and kept at -80°C until analysis. Before mass spectrometry analysis, the sample was diluted to 1/2 using an acetonitrile/water (2/98, v/v) mixture with 0.05% TFA.

#### **II.2.2.7.4. Analysis of clinical samples**

##### **II.2.2.7.4.1. Blood sampling**

Patient blood was obtained from sample collected in the IMPACT study. The IMPAKT study (EudraCT number: 2016-004197-17, NCT: 03076151) was sponsored by the University Hospital of Limoges and complied with the legal requirements of the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice and the International Conference on Harmonization guidelines. The protocol received approval from the Independent Ethics Committee (12/08/2016) and authorization from the French National Agency for Medicines and Health Products Safety (04/26/2017). For our study blood samples at 0min, 20min, 40min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h after 3 months of the transplantation was obtained for 5 fast metabolizers, homozygous and heterozygous for CYP3A5\*1, and from 7 slow metabolizers, homozygous for CYP 3A5\*3. Only Tmax samples was obtained 7 and 30 days after the transplantation.

##### **II.2.2.7.4.2. Tacrolimus and metabolites extraction**

Tacrolimus and metabolites were extracted from 2 ml of blood by adding 2 ml of MiliQ water, 5.45 ml of methanol, 1.41 ml of zinc sulfate (50 mg/ml) and 200 µL of internal standard (TACD at 200 ng/ml). The tubes were vortex-mixed for 5 minutes at maximum speed and then left to stand for 5 minutes before being centrifuged at 5000 g for 5 minutes. Supernatants were collected and solid phase extraction was done using OASIS HLB 3ml 60mg cartridges. The cartridges were activated by 3 ml of methanol and then 3 ml of MiliQ water, loaded with

supernatants, washed once with 5% methanol/95% MilliQ water and then eluted with 3 ml of methanol into glass tubes. Methanol was evaporated to dryness under nitrogen gas at 40°C and the extract was then solubilized with 200 µl of ACN/water (90/10, v/v) with 0.1% formic acid. Before mass spectrometry analysis sample was diluted 1/2 using acetonitrile/water (2/98, v/v) with 0.05% TFA.

#### **II.2.2.7.5. High resolution mass spectrometry analysis**

##### **II.2.2.7.5.1. Micro HPLC-Q-TOF**

Chromatographic separation was performed using an Eksigent Ekspert nanoLC425 system (Sciex, Villebon, France) equipped with: a thermostated column compartment, a ten-port micro-switching valve and a thermostated microwell plate autosampler with a six-port micro-switching valve. Sample extracts were injected and concentrated on a trapping column packed with C18 PepMap 100 (0.5 cm×300 µm i.d., Thermo Scientific, Villebon, France) using solvent A, a mixture of acetonitrile/water (2:98, by volume) with 0.05% TFA, delivered at 10 µl/min. The trapping column was switched on-line with the analytical column, an Eksigent HALO™ C<sub>18</sub> 2,7 µm, 90Å (50 mm×0.5 mm i.d., Sciex, Villebon, France) after 3 min loading time. The chromatographic separation was performed at 60°C and a constant flow rate of 10 µl/min using a 30 min curvilinear gradient of solvent C, a mixture of acetonitrile/water (95:5, by volume) with 0.1% FA in solvent B, an aqueous solution containing 0.1% FA, programmed as follows: 0–0.5 min, 5% C; 0.5-18.5 min, 5% to 50% C; 18.5–20.5 min, 50% to 95% C; 20.5–24.5 min, 95% C; 24.5-25 min, 95% to 5% C, equilibration with 5% C.

Mass spectrometry detection was performed using a high-resolution Q-TOF mass spectrometer (TripleTOF® 5600+, Sciex, Concord, Canada) equipped with a DuoSpray ion source and operated in the positive ionization mode. A beta-galactosidase solution was used for internal calibration every four samples. The source conditions were as follows: temperature, 200 °C; declustering potential (DP), 100 eV; curtain gas (CUR), 30 units; ion source gas (GS1), 10 units; and ion-spray voltage floating, 5.5 kV. All MS parameters were controlled by Analyst® TF 1.7 (Sciex). Data were processed with PeakView® 2.1 software (Sciex).

##### **II.2.2.7.5.2. MRM<sup>HR</sup> acquisitions**

In the 'survey scan' mode, m/z ratios were again scanned from m/z 780 and 880 in the single TOF MS mode with an accumulation time of 200 ms. The dependent scans were product ion scans at m/z 784.4, 798.4, 812.4, 826.4 and 829.4 from m/z 100 to 2000 in the high sensitivity mode, using a collision energy of 60 eV, CE spread of 20 eV and accumulation time of 225

ms, respectively for tri-, di- and mono-demethylated tacrolimus, tacrolimus (and its isoforms) and TACD.

### II.2.2.7.5.3. Fragment's identification and molecular structures elucidation

Fragmentation of tacrolimus form C and of the demethylated metabolites were compared with that of tacrolimus step-by-step. Using *in silico* mass fragmentations by Mass Frontier<sup>TM</sup> 8.0 (Thermo Scientific), theoretical mass of the investigated fragment was compared with the mean mass observed in order to determine its most likely structural formula.

### II.2.2.7.6. Modelling of FKBP12 and calcineurin complexes

#### II.2.2.7.6.1. System preparations

Two types of complexes were considered, namely [*ligand*-FKBP12] and [*ligand*-FKBP12-CNA&B] in which every tacrolimus and metabolite forms were considered. For sake of readability, tacrolimus and its metabolites are named using a three-letter code in which the two first stands for the molecule (i.e., FK, M-I M-II and M-III as mentioned above) and the last refers to as the form of macrolide ring structure, namely *n*, *o* and *f* respectively for the "normal" (*n*) structure, opened (*o*) tetrahydropyranyl form and tetrahydrofuranlyl (*f*) ring (only for M-I). FK<sub>n</sub>, FK<sub>o</sub>, M<sub>I</sub><sub>n</sub>, M<sub>I</sub><sub>o</sub>, M<sub>I</sub><sub>f</sub>, M<sub>II</sub><sub>n</sub>, M<sub>III</sub><sub>n</sub> and M<sub>III</sub><sub>o</sub> were all considered to provide a robust structure-property relationship for both FKBP12 and CN binding.

Molecules were built using the Avogadro software (162) using FK<sub>n</sub> structure from PDB under the code 1FKJ (149) as original template. Relative stabilities were assessed at the density functional theory (DFT) M06-2X/6-31+G(d,p) level (163). FKBP12 structure was obtained from the X-ray crystallography resolved structure available in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>, PDB) under the code: 1FKJ(149) (<https://www.rcsb.org/structure/1FKJ>). Structures of Calcineurin A (*b*-Isoform) and B were obtained from structure resolved by X-ray crystallography and available in the PDB using the code 4OR9, (<https://www.rcsb.org/structure/4OR9>). The C-terminal domain (residues 388 to 524) was not modelled assuming a non-autoinhibited conformation, i.e., without the autoinhibitory segment nor the autoinhibitory domain (141). Protonation states of titrable residues (Arginine, Histidine, Lysine, Aspartate and Glutamate) for FKBP12, CNA and CNB at pH = 7.4 were assessed using the H++ server(164). Histidine protonation states were visually checked to ensure H-bond networking with surrounding residues as well as for CNA A Fe-Zn metal center coordination. Co-crystallized water available with the PDB structures were conserved. Binary complexes involving FKBP12 and ligand were built based on 1FKJ PDB structure by superimposing pipercolate moieties onto co-crystallized FK<sub>n</sub> coordinates. CN complexes (i.e., with FKBP12, *b*-isoform of Calcineurin A and calcineurin B) were built using

the crystallized bovine structure available in the PDB under the code 1TCO as structural template (140) (<https://www.rcsb.org/structure/1TCO>).

#### **II.2.2.7.6.2. Molecular dynamics simulations**

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using both the CPU- and GPU implement of PMEMD in the Amber18 package(165,166). Tacrolimus and its metabolites were first optimized at the DFT M06-2X/6-31G(d) for which frequency analyses did not exhibit imaginary frequencies using the Gaussian09 software(167). AM1-BCC charges were assigned to the ligand using the Antechamber module in Amber18 package(165). Parameters for bonded and Lennard-Jones (LJ) interactions were obtained from Generalized Amber Force Field v2 (GAFF2)(166). Forcefield files are available on request. All systems were solvated in cubic box with a buffer distance of 12 Å. The Amber protein force field FF14SB was used for describing FKBP12 and calcineurins. Systems were neutralized using KCl salt (at 0.15 M) to mimic intracellular compartment. Systems were all first minimized using a 4-step protocol in which water oxygen atoms were first minimized, then H-atoms, then water molecules and finally the whole system. Systems were then thermalized from 0 to 320 K during 250 ps at constant volume, using a 0.5 fs integration time. Densities were first equilibrated for 200 ps at 310 K and 1 atm using 1 fs integration time using the CPU-version of PMEMD code. Then, Densities were equilibrated for 10 ns at 310 K and 1 atm using 2 fs integration time. Temperature and pression were maintained along MD simulations using respectively a Langevin thermostat (using a frequency collision at 1.0 and 5.0 ps<sup>-1</sup> for equilibration and production runs) and Berendsen barostat (pressure coupling set up at 1.0 ps). Production MD simulations of binary and quaternary complexes were respectively carried out for 110 ns and 1 μs using 3 replicas for each system. Analysis were performed using Pytraj and CPPtraj modules of AmberTools19&20. 3D pictures and plots were rendered using VMD 1.9.3(168) pyplot respectively. A total of 26.64 ms unbiased MD simulations were carried out considering 8 ligands and three replicas for FKBP12 (2.64 μs) and CNs (24 μs) systems.

#### **II.2.2.7.6.3. Absolute binding free energy calculations**

For each FKBP12-ligand system, 6 snapshots were extracted from MD trajectories (*i.e.*, 2 per replica) in order to assess binding free energies by alchemical calculations. FKBP12-ligand structures were then solvated in octahedral water box in which minimum distance between system atoms and box edges were set at 8.0 Å. Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> were solvated to match 0.154 mM NaCl concentration. Likewise, standalone ligands were solvated in octahedral distance boxes with buffer distances of 8 Å. Free energy calculations were performed using softcore potential thermodynamic integrations implemented in Amber20 (169). The so-called

“concerted transformation” was used to smoothly switch off both nonbonded Lennard-Jones and Coulombic terms (169). Both 293 and 310K temperatures were considered to mimic experiment setups(138) and in situ conditions, respectively. Simulations protocols inspired from Zou *et al.* (151) was applied to both solvated and protein-bound ligand systems. Within the alchemical lambda-schedule frameworks, water and ions were first minimized. Systems were then smoothly thermalized to either 293 or 310 K over 100 ps in (N,V,T) ensemble with a 1 fs integration timestep, in which protein and ligand H-atoms were maintained using 100 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> positional restraints. Systems were then equilibrated in a multistep fashion consisting of 100, 250, 100, 100 and 100ps (N,P,T) MD simulations; positional restraints being applied on heavy atoms ( steps 1 and 2 using 100 and 10 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> force constants, respectively) or protein backbone atoms (steps 3, 4 and 5 using 10, 1 and 0.1 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> force constants). Alchemical production runs were then performed for 16 ns in (N,P,T) ensemble. To preclude ghost effect while  $\lambda$ -scheduling is close to 1.0, Boresh restraints were used between ligand N, C-14 and C-32 atoms and Ca-atoms of <sup>38</sup>Asp, <sup>48</sup>Lys and <sup>83</sup>Gly residues.  $\lambda$ -Windows used in the present study were defined as follows: 0.00922, 0.04794, 0.11505, 0.20634, 0.31608, 0.43738, 0.56262, 0.68392, 0.79366, 0.88495, 0.95206 and 0.99078 enabling the use of Gaussian quadrature formulas to integrate  $\langle \partial V / \partial \lambda \rangle$  over  $\lambda$  as recommended in Amber manual. Absolute binding free energy and standard deviations were obtained from 6 independent runs.

#### **II.2.2.7.7. Pharmacodynamic competition between tacrolimus and its metabolites**

##### **II.2.2.7.7.1. Production and purification of a cocktail of tacrolimus metabolites**

7.5  $\mu$ M of tacrolimus was incubated with 2.5 mg/ml HLM with 11 mM of NADPH for 45 minutes in a Tris-HCl Mg buffer (0.1M/ 10mM) at 37°C with agitation (final ethanol concentration 1%). Metabolites were then extracted by agitating for 1 h a mix of 2 volume of ethyl acetate for 1 volume of incubation media. Ethyl acetate is the collected and undergo vacuum evaporation at 30°C. Residue was then resolubilized with 1.5% of the initial reaction volume of ethanol. This solution was considered to be equivalent of 500  $\mu$ M of tacrolimus metabolites. The same process was done to prepare the blank solution.

##### **II.2.2.7.7.2. *In vitro* Luciferase-based NFAT translocation assays**

LLC-PK1 cells stably transfected with NFAT luciferase reporter vector (LLCPK-1/NFAT) was used to assess NFAT nuclear translocation in presence and absence of tacrolimus and its metabolites. LLC PK-1/NFAT were expanded in 75 cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> and passed once confluence was reached. The culture medium consisted of DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplemented with 5 % FBS, 15 mM HEPES, 0.1 % Sodium bicarbonate, 100



UI.mL<sup>-1</sup> Penicillin / Streptomycin and 50 nM Sodium selenite. LLCPK-1/NFAT were seeded in a 12-well plate (200000 cells/well) and, after 24h of proliferation, sustained serum starvation in the presence of hormonally defined fresh medium (25 µg.mL<sup>-1</sup> insulin, 11 µg.mL<sup>-1</sup> transferrin, 50 nM triiodothyronine, 0.1 µM dexamethasone, 0.1 µg.mL<sup>-1</sup> desmopressin) to engage epithelial differentiation, for 24 hours. Differentiated LLCPK-1/NFAT were exposed for 24h to four different conditions: negative control (1 % ethanol), positive control (PMA 10 ng/ml, ionomycin 1µM, and 1% ethanol), Tacrolimus (PMA 10 ng/ml, ionomycin 1µM and tacrolimus 10 ng/ml) and Tacrolimus + metabolites (PMA 10 ng/ml, ionomycin 1µM, tacrolimus 10 ng/ml and the metabolites at the equivalent concentration of 100 ng/ml (MET.eq.TAC). The luciferase assay was performed following manufacturer instruction. Normalisation to total protein content was done using BCA protein assay. Luminescence and absorbance reading was done using PerkinElmer Enspire® multimode reader.

#### **II.2.2.7.7.3. *Ex vivo* mixed lymphocyte reaction**

PBMC from two different healthy volunteers were separated from blood from blood collected in heparinized blood container using ficoll gradient. PBMC were then washed three times with RPMI 1640 Medium with UltraGlutamine™ and with HEPES (Lonza) supplemented with 100 UI.mL<sup>-1</sup> Penicillin / Streptomycin. PBMC from donor “A” were used as effector cells and PBMC from the donor “B” as stimulator cells. A sufficient number of PBMC from the two donors was incubated with 25 µg/ml of mitomycin C for 45 minutes at 37°C and 5%CO<sub>2</sub> to be used as stimulator cells. Cells were then washed and counted and then seeded in flat bottomed 96 well plate with a ratio of 200000 responder cells/100000 stimulator cells in culture media containing 10% of filtered (0.22 µm filter) and heat inactivated (at 56°C for 1 hour) serum of patient A. Four different conditions were prepared for every experiment: negative control (donor A responder cells incubated with donor A stimulator cells), positive control (donor A responder cells incubated with donor B stimulator cells), tacrolimus (donor A responder cells incubated with donor B stimulator cells with 0.5 or 1 ng/ml of tacrolimus), tacrolimus + metabolites (donor A responder cells incubated with donor A stimulator cells with 0.5 ng/ml of tacrolimus and 5 ng/ml equivalent of metabolites (MET.eq.TAC) or 1 ng/ml of tacrolimus and 10 ng/ml equivalent of metabolites (MET.eq.TAC). Ethanol concentration was 0.5% in all conditions. Proliferation was assessed using MTS and absorbance reading was done using PerkinElmer Enspire® multimode reader

#### **II.2.2.7.7.4. Analysis of tacrolimus accumulation in PBMC *ex vivo***

PBMC were purified as explained before from the blood of two healthy volunteers. PBMC were incubated in RPMI 1640 Medium with UltraGlutamine™ and HEPES (Lonza) supplemented with 100 UI.mL<sup>-1</sup> Penicillin / Streptomycin, 10% human serum and 0.5 ng/ml of tacrolimus for

1h and 7 days. After the incubation cells were washed twice with cold culture media (centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C), resuspended and counted using CELL-DYN Emerlad analyser. A volume corresponding to 10 million cells was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C and cells pellet were solubilized in 100 µL of blood. Extraction and analysis were performed using a validated LC-MS/MS method. Briefly, the 100 µL of blood was mixed with 200 µl of a mixture 70% methanol, 30% zinc sulfate (50g/L) (v/v) with internal standard (TACD) at 10 ng/ml and centrifuged at 13000 rpm for 10 min. Supernatant was then transferred to a vial and 20 µL were injected.

#### **II.2.2.7.7.5. Statistical analysis**

The data are shown as mean  $\pm$  SEM, and, unless otherwise indicated, all the presented data are representative results of at least three independent repeats. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5, and the statistics were analyzed by T-test or one way ANOVA followed by Dunnet multiple comparison test. Differences were considered to be significant at  $0.01 \leq P \leq 0.05$  and are indicated by\*; those at  $0.001 \leq P \leq 0.01$  are indicated by\*\*; those at  $0.0001 \leq P \leq 0.001$  indicated by\*\*\*

Regarding MD simulations, data are shown as average  $\pm$  standard deviations (STD). Structural analyses (RMSD, H-bond counting, coulombic and vdW interaction energies) were performed using 400ns (100ns) for CN-FKBP12-Ligand (FKBP12-ligand) MD trajectories and taking snapshots every 100 ps from MD simulations, providing 12 000 data point per system accounting three independent replicas. PCA analyses were performed including three replicas per system into one dataset. The covariance matrix of each protein C $\alpha$  coordinates was calculated along the last 400 ns MD simulations of the FK $n$  bound system, extracting the most important motion elements (PC1 and PC2). Other trajectories were then transformed in order to align FKBP12 partner to the one of the FK $n$ -bound systems. Trajectories were then projected onto the FK $n$  conformational space obtained according to PC1xPC2 of FK5-bound system. Statistical analyses of alchemical binding free energies were calculated using six independent replicas from six different starting geometries.

#### **II.2.2.7.8. Acknowledgments**

##### **II.2.2.7.8.1. Author's contribution**

*Participated in research design: Aouad, Di Meo, Essig, Marquet.*

*Conducted experiments: Aouad, Sauvage, Di Meo, Arnion*

*Contributed new reagents or analytic tools: Aouad, Sauvage, Arnion*

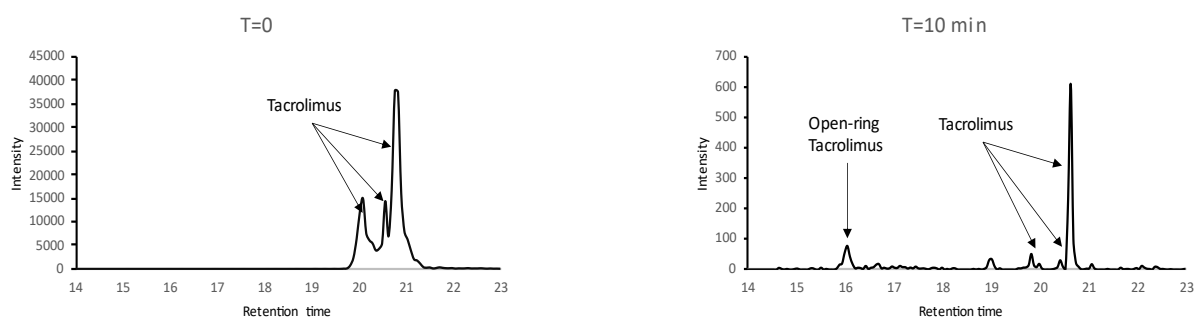
Performed data analysis: Aouad, Sauvage, Di Meo.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Aouad, Sauvage, Di Meo, Marquet.

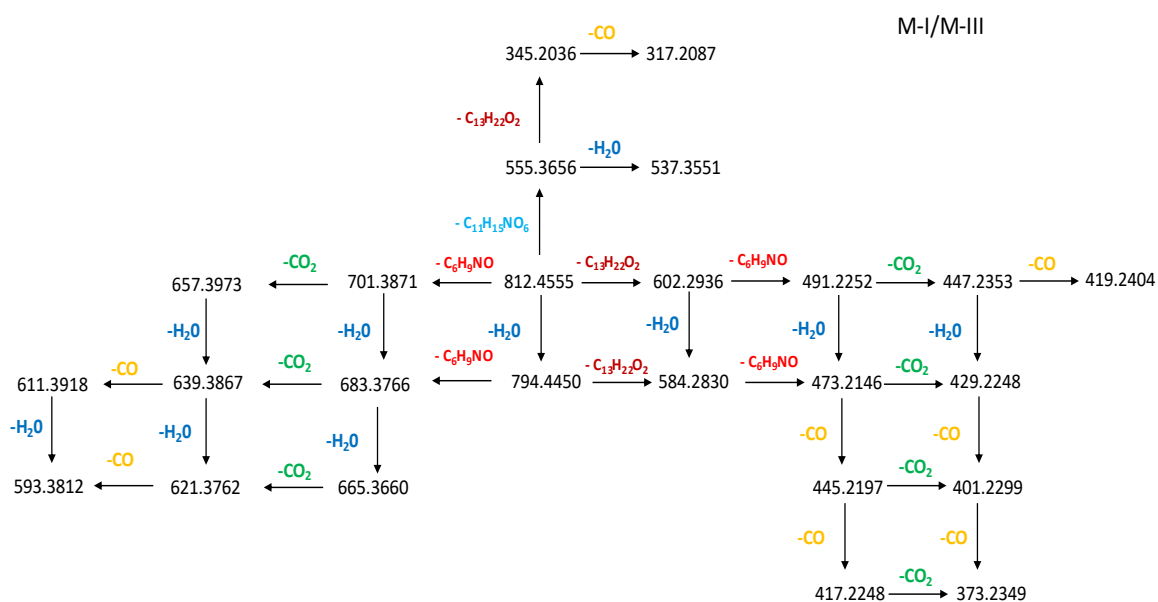
## II.2.2.7.8.2. Disclosures

This work was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and to the French regulation. Biological samples were obtained from the Biological Resource Center of the Limoges University Hospital (CRBioLim; <http://www.crbiochim.fr/>) authorized by the French Ministry of Research with the reference AC-2016-2758. The Institutional Review Board of the Limoges University Hospital gave its approval on 11/05/2021 with the reference 465-2021-121.

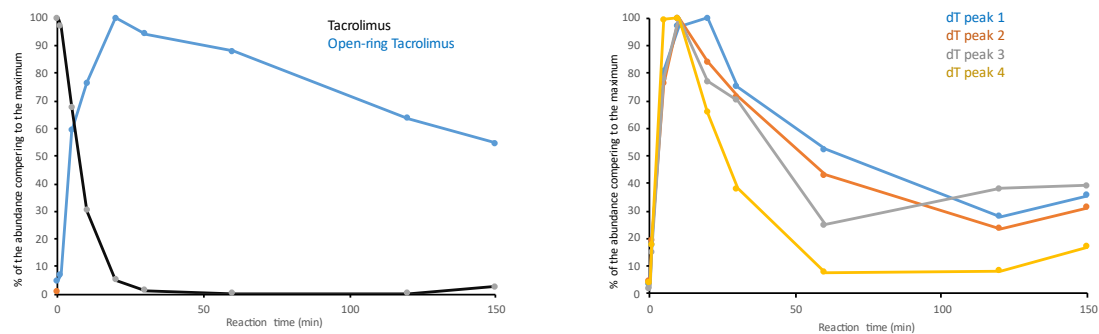
## II.2.2.7.9. Supplemental data



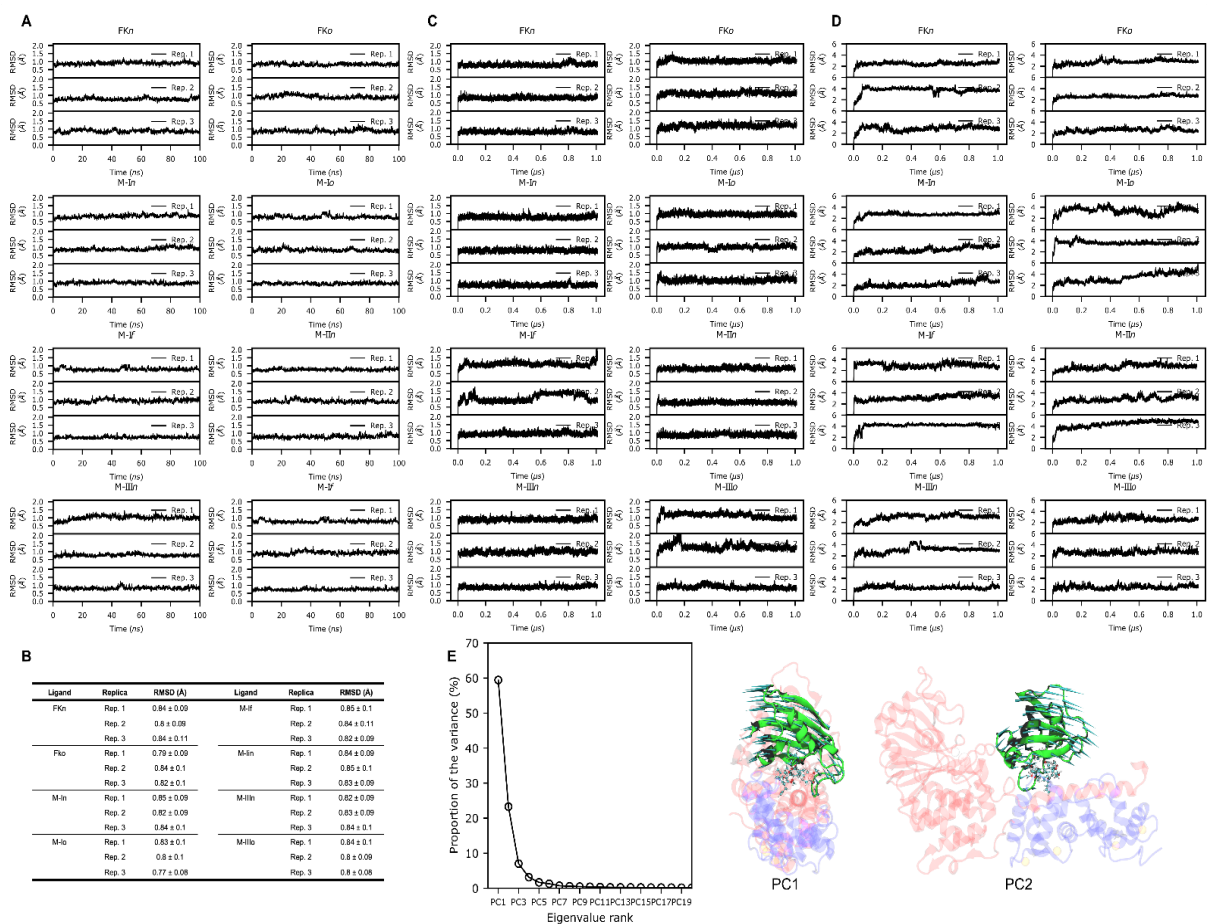
**Supplemental figure 1:** Typical chromatogram obtained after tacrolimus incubation with human liver microsomes at T=0 and T=10 mins when monitoring ions at  $m/z=826.4$



**Supplemental data 2:** Fragmentation intermediates of M-I and M-III.



### Supplemental data 3: Kinetic profiles of the different forms of tacrolimus and desmethylated metabolites



**Supplemental data 4:** (A) FKBP12 Replica-dependent root-mean-squared deviations (RMSD) over 100 ns (N,P,T) MD simulation time for FKBP12-Ligand simulations. RMSD were calculated on backbone atoms using the initial model as reference. (B) FKBP12 RMSD averages over 100 ns (N,P,T) MD simulation time for FKBP12-Ligand simulations. RMSD were calculated on backbone atoms using the X-ray structure (PDB ID: 1FKJ) as reference. (C) FKBP12 and (D) CNAB RMSDs over 1000 ns (N,P,T) MD simulation time for CNAB-FKBP12-Ligand simulations. RMSD were calculated on backbone atoms using the initial model as reference. (E) Proportion of the variance

obtained for each Eigenvalue during the principal component analysis (PCA). PCA was first performed on FKBP12 C-alpha coordinates using FKBP12-FKn trajectories in which CNA was RMSF-fitted in order to measure structural variability of FKBP12 rocking on CNA BBH domain (see main text). (E) PC1 and PC2 structural representations from PCA. FKBP12 main structural variabilities are depicted in green cones.

## Chapitre III. Discussion, conclusion et perspective

---

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de la thématique de l'unité qui étudie la pharmacologie des immunosuppresseurs à l'aide d'approches et des techniques innovantes telles que la protéomique, la métabolomique et la spectrométrie de masse haute résolution. Les travaux présentés dans cette thèse se sont intéressés spécifiquement à la néphrotoxicité, la pharmacodynamie et la pharmacocinétique du tacrolimus, un immunosuppresseur de la famille des inhibiteurs de la calcineurine largement utilisé.

### III.1. Discussion et conclusion : Étude multi-omique de la néphrotoxicité du tacrolimus

Les approches -omiques permettent d'effectuer des analyses à haut débit, ciblées ou non, c'est-à-dire pour ces dernières sans émettre d'hypothèse à priori, contrairement aux approches traditionnelles d'investigations mécanistiques dans lesquelles des hypothèses doivent être impérativement émises avant de planifier des expériences pour les tester. Dans le domaine de la toxicologie, les études de sécurité des médicaments, lors du développement ou après la commercialisation, consistent généralement en : (i) un panel de tests de screening à haut débit visant des mécanismes de toxicité fréquents ou déjà décrits pour des molécules semblables ou de la même famille pharmacologique ; ou (ii) des expériences spécifiques effectuées suite à des hypothèses émises pour expliquer des toxicités constatées chez des animaux, des volontaires sains ou des patients traités. Ces tests représentent toujours un élément important, fondamental et puissant pour étudier la toxicité médicamenteuse, toutefois ils restent insuffisants pour élucider tous les mécanismes possibles de toxicité médicamenteuse. Les approches -omiques peuvent être complémentaires aux études de toxicité classiques. Elles permettent de découvrir des effets et des mécanismes toxiques inattendus, qui peuvent n'être liées ni au mécanisme d'action pharmacologique du médicament, ni aux manifestations cliniques qui résultent souvent d'enchaînements complexes d'évènements intracellulaires et inter-organes. L'étude multi-omique effectuée dans notre étude illustre l'importance de ces approches : bien que le tacrolimus soit une molécule connue depuis plus de 30 ans avec des manifestations cliniques et histologiques rénales bien décrites, son mécanisme de toxicité complet reste inconnu et plusieurs effets trouvés sur notre modèle cellulaire n'avaient pas été décrits jusqu'alors.

Toutefois, ces approches sont imparfaites et présentent des limites qu'il faut prendre en considération lors de l'interprétation des résultats. Concernant la protéomique, l'espèce d'origine du modèle cellulaire utilisé est importante pour l'interprétation des résultats, dépendante de la richesse des bases de données. Dans le cas de notre étude, les cellules LLC-PK1 adoptées comme modèle d'épithélium des tubules proximaux au sein de notre laboratoire, sont des cellules porcines pour lesquelles les bases de données de protéines

restent beaucoup moins riches que celle des cellules humaines (49 792 protéines dont « 1 438 validées », contre 196 200 protéines dont « 20 396 validées »). Cependant ces cellules sont l'un des modèles les plus utilisés pour étudier la néphrotoxicité médicamenteuse avec un caractère épithélial bien différencié et un temps de culture raisonnable. Ce problème reste par contre temporaire et sera résolu avec le développement des bases de données. De plus, toutes les analyses -omiques basées sur la spectrométrie de masse font face à la problématique d'analyse d'un grand nombre de molécules avec des propriétés physicochimiques très variées. Ceci représente un grand challenge pour la séparation par chromatographie tout en limitant la capacité de détecter toutes les molécules présentes dans les échantillons et d'en effectuer une bonne quantification, surtout pour les protéines. Le fait de coupler les résultats de plusieurs types d'analyses omiques peut diminuer l'impact de ce problème en permettant d'avoir des informations complémentaires sur des événements intracellulaires. Les analyses protéomiques effectuées dans notre étude n'ont pas montré que le tacrolimus avait un impact sur le stress oxydant, par contre les résultats métabolomiques ont montré clairement la présence d'un stress oxydant intracellulaire. De plus les analyses protéomiques ont mis en évidence un impact du tacrolimus sur la gluconéogenèse, dont aucun intermédiaire n'était détecté dans les analyses métabolomiques (métabolites non inclus dans la méthode d'analyse ciblée). Ces deux exemples témoignent de l'intérêt d'effectuer des études multi-omiques.

L'utilisation de cette approche nous a permis de confirmer certains résultats déjà décrits dans la littérature concernant la toxicité du tacrolimus, tels que le stress oxydant. En plus, elle nous a permis de mettre en évidence que le tacrolimus affecte le processus de la gluconéogenèse par une diminution de l'expression de différentes enzymes limitantes (PCK-1, FBP1). A notre connaissance, l'effet direct de l'inhibition de cette voie sur les tubules proximaux et leurs fonctionnalités reste inconnu. Par contre, les cellules tubulaires proximales sont connues pour avoir une grande capacité de gluconéogenèse et pour être impliquées dans la régulation de la glycémie. Cette dernière est médiée majoritairement par la réabsorption du glucose filtré mais également par la gluconéogenèse qui peut contribuer jusqu'au 25% du glucose relargué dans le corps dans la phase post absorptive (170). La diminution de la gluconéogenèse semble contradictoire avec le fait que le tacrolimus favorise l'apparition d'un diabète non-insulino-dépendant, puisque l'impact de la gluconéogenèse serait surtout important lors du jeûne. En effet une étude effectuée chez des souris traitées par tacrolimus a montré que le tacrolimus diminuait la glycémie lors du jeûne (124). Ceci implique que, contrairement à ce qui est observé dans le cas de diabète de type II, les reins ne sont pas impliqués par une augmentation de gluconéogenèse dans l'hyperglycémie induite par le tacrolimus (170). Par contre, cette diminution de la gluconéogenèse pourrait impacter la capacité des cellules tubulaires à répondre à une acidose. En effet l'acidose peut causer l'activation de la

gluconéogenèse dans les tubules proximaux afin d'augmenter le catabolisme de glutamine et glutamate et de générer des ions ammonium  $\text{NH}_4^+$ , relargués dans l'urine, et des ions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$  secrétés dans le sang (127,128). Ceci pourrait également impacter la capacité des cellules tubulaires proximales à réguler leur pH intracellulaire et causer une toxicité directe par acidose intracellulaire. De plus, la diminution de la gluconéogenèse pourrait représenter l'une des sources de perturbation du cycle de Krebs. Cette perturbation peut être également causée par le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique et la toxicité mitochondriale causés par le tacrolimus. L'impact au niveau du cycle du Krebs est un évènement qui peut être étroitement lié à la néphrotoxicité du tacrolimus, surtout que les cellules tubulaires rénales ont une activité glycolytique faible et sont sensibles à ce type de perturbation énergétique. D'autres événements sont potentiellement importants tels que la perturbation de cycle de l'urée et l'accumulation toxique de la putrescine.

Notre étude a été effectuée avec une concentration de tacrolimus élevée par rapport à celle trouvée chez les patients traités par tacrolimus, mais qui reste dans la marge basse par rapport aux concentrations utilisées dans la littérature, pendant une durée de 24h qui est une durée faible par rapport à la période écoulée entre le début du traitement et l'apparition de la néphrotoxicité chez les patients traités. Il sera intéressant de valider ces résultats avec des concentrations plus faibles et un temps d'exposition plus long.

### **III.2. Discussion et conclusion : Effets pharmacologiques des métabolites du tacrolimus**

L'impact pharmacologique des métabolites du tacrolimus a été sous-estimé pendant longtemps, les premières études effectuées après la découverte du tacrolimus ayant minimisé leur rôle. Le développement de la pharmacogénétique et la démocratisation du suivi thérapeutique effectué par le dosage de la concentration sanguine du tacrolimus par spectrométrie de masse ont permis de proposer une adaptation de posologie dans le but d'obtenir des concentrations dans la fourchette thérapeutique étroite du tacrolimus. Ceci a permis à plusieurs études de montrer que la population des métaboliseurs rapides présente plus de risque d'avoir des évènements indésirables au niveau du greffon rénal que celle des métaboliseurs lents(113,115,171). Toutefois, d'autres n'ont pas constaté de différence entre les deux populations(172,173).

Dans notre étude, on a pu démontrer que les métabolites du tacrolimus sont capables d'entrer en compétition avec le tacrolimus en diminuant sa capacité à inhiber la calcineurine et à exercer son effet immunosuppresseur. Nos investigations effectuées par spectrométrie de masse haute résolution et modélisation moléculaire *in silico* suggèrent que ce phénomène est causé par le fait que les métabolites ont une structure proche de celle du tacrolimus, mais



avec une ouverture du cycle pyrane et un diol géminale en position C10. Cette structure ouverte permet potentiellement aux métabolites de se fixer au niveau de la FKBP12 et de former le complexe avec la calcineurine sans l'inhiber, d'autant plus que l'inhibition par le tacrolimus est une inhibition stérique et non pas fonctionnelle. Ce phénomène de compétition ne peut pas être expliqué avec la structure précédemment décrite pour ces métabolites, c'est-à-dire une structure à cycle fermé qui causerait la formation de complexes avec la FKBP12 et la calcineurine similaires à ceux du tacrolimus. Bien que l'ouverture du cycle pyrane ait déjà été évoquée précédemment, la structure que nous proposons ici est différente, et surtout différente des structures à cycle fermé le plus souvent publiées(153). Cette différence de résultats peut être attribuée à la différence analytique (extraction, solubilisation et approche analytique LC-HRMS vs RMN) mais également à la complexité d'interprétation des spectres RMN publiés en raison de la présence de plusieurs carbones asymétriques au niveau des métabolites.

L'interaction entre le tacrolimus et ses métabolites a été démontrée sur deux modèles cellulaires différents, renforçant la confiance dans ces résultats *in vitro*. Cet effet prend une importance particulière lorsqu'on considère que les métaboliseurs rapides sont exposés à plus de métabolites, principalement le M-I qui est également le métabolite majoritaire *in vitro*. Cette interaction peut donc possiblement avoir lieu *in vivo* chez les patients traités par tacrolimus. Toutefois, les résultats actuels obtenus avec un mélange des métabolites ne permettent pas de préciser avec certitude les métabolites impliqués dans cette interaction, même si le M-I est majoritaire.

La présence de cette interaction pharmacodynamique ouvre la porte à plusieurs mécanismes possibles dans lesquels les métabolites seraient capables d'impacter l'efficacité et la toxicité du tacrolimus. Dans le milieu intracellulaire, les métabolites pourraient occuper les sites de liaison du tacrolimus à la FKBP12 et former un complexe avec la calcineurine sans affecter son activité phosphatase. Ceci diminue l'efficacité du tacrolimus à inhiber cette voie et à induire une immunosuppression, ce qui peut exposer les patients à un risque augmenté d'épisodes de rejet de greffe. D'autre part, la fixation des métabolites à la FKBP12, en plus du tacrolimus, pourrait inhiber d'avantage cette enzyme et induire une toxicité liée à cette inhibition. De plus, du fait de cette interaction, la fraction libre du tacrolimus pourrait être plus élevée dans les cellules des métaboliseurs rapides, favorisant sa fixation sur d'autres cibles intracellulaires potentielles telles que les FKBP52 ce qui peut engendrer des toxicités indépendantes de son mécanisme d'action pharmacologique (effet *off-target*). Par exemple, le tacrolimus est capable de se fixer au niveau de la FKBP52 et de perturber l'homéostasie calcique intracellulaire (159). De plus, vue la structure très proche du tacrolimus et de ses métabolites, une interaction est possible au niveau des transporteurs d'efflux, tels que la P-gp, ce qui causerait une accumulation du tacrolimus ou de ses métabolites (en fonction de leur affinité respective pour

le transporteur) au niveau cellulaire ou systémique, potentiellement majorant la toxicité de l'un ou de l'autre.

### III.3. Perspective

Malgré les résultats intéressants que nous avons pu obtenir tout au long de ce travail, les réponses finales aux questions posées restent loin d'être claires. Dans le but de trouver des réponses plus robustes et pour clarifier le mécanisme de néphrotoxicité du tacrolimus et l'importance des métabolites, plusieurs expériences peuvent être envisagées.

Concernant la néphrotoxicité, l'utilisation de concentrations plus faibles de tacrolimus, équivalentes aux concentrations pharmacologiques, sur une durée plus longue est une option intéressante. Ceci n'est pas envisageable avec notre modèle actuel, du fait de l'impossibilité de garder plus longtemps ces cellules en culture. Par contre d'autres modèles cellulaires sont actuellement disponibles tels que les cellules hRPTEC/TERT qui sont des cellules tubulaires humaines qui peuvent être cultivées sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines. De plus, ce sont des cellules humaines dont l'utilisation est plus adaptée aux approches -omiques puisqu'elles permettent d'utiliser des bases de données humaines beaucoup plus riches, surtout pour les approches protéomiques non ciblées. En plus de la protéomique et la métabolomique, d'autres approches omiques peuvent être également appliquées telles que la transcriptomique et la lipidomique.

En ce qui concerne les métabolites du tacrolimus plusieurs expériences complémentaires peuvent être envisagées. Concernant la structure des métabolites, une réanalyse par RMN peut être envisagée dans le but de confronter les résultats de la spectrométrie de masse et de la RMN afin de valider cette structure par deux techniques analytiques différentes. En ce qui concerne l'activité des métabolites, les tests de mesure de l'activité de la calcineurine et la MLR devront être réalisés avec des métabolites purifiés à des concentrations bien définies. En plus, la technique MLR pourra être optimisée en utilisant des tests de prolifération plus sensibles tels que la cytométrie en flux et la mesure de plusieurs marqueurs tels que l'interleukine 2. En plus du dosage de tacrolimus et de ses métabolites dans le sang total, leur accumulation intra-lymphocytaire pourrait également être mesurée chez des métaboliseurs lents ou rapides afin de vérifier s'ils s'accumulent davantage dans les PBMC des seconds. Ces résultats seront alors confrontés aux concentrations intra-lymphocytaire *in vitro* afin d'estimer leur effet sur la réponse immunitaire.

A l'issue de cette thèse la toxicité spécifique des métabolites et leur participation à la réponse thérapeutique au tacrolimus moins mal connue qu'elle ne l'était. Pour approfondir ces questions, le schéma expérimental utilisé pour étudier la néphrotoxicité du tacrolimus pourra être reproduit avec chacun de ses métabolites purifiés, pour investiguer leur toxicité propre, et en co-incubation avec le tacrolimus pour vérifier s'ils potentialisent sa propre toxicité.



## Références bibliographiques

---

1. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):193–7.
2. R W. Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis. *Nature*. 1914 Jan;92(2307):549–50.
3. Field FH, Franklin JL. *Electron Impact Phenomena: And the Properties of Gaseous Ions*. Academic Press; 2013. 577 p.
4. Munson MSB, Field FH. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *J Am Chem Soc*. 1966 Jun 1;88(12):2621–30.
5. Devienne FM, Roustan J-C. 'Fast atom bombardment'—A rediscovered method for mass spectrometry. *Org Mass Spectrom*. 1982 Apr 1;17(4):173–81.
6. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem*. 1984 Sep 1;88(20):4451–9.
7. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 1987 Sep 24;78:53–68.
8. Karas M, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem*. 1988;60(20):2299–301.
9. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989 Oct 6;246(4926):64–71.
10. Karas M, Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev*. 2003 Feb;103(2):427–40.
11. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev*. 2009 Apr 1;44(3):210–30.
12. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol*. 2016;919:157–69.
13. Savaryn JP, Toby TK, Kelleher NL. A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics*. 2016 Sep;16(18):2435–43.
14. Shi Y, Xiang R, Horváth C, Wilkins JA. The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A*. 2004 Oct 22;1053(1):27–36.
15. Duong V-A, Park J-M, Lee H. Review of Three-Dimensional Liquid Chromatography Platforms for Bottom-Up Proteomics. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(4):1524.
16. Pergande MR, Cologna SM. Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. *Proteomes*. 2017 Mar;5(1):4.
17. Oliveira BM, Coorsen JR, Martins-de-Souza D. 2DE: The Phoenix of Proteomics. *J Proteomics*. 2014 Jun 2;104:140–50.

18. Tran JC, Doucette AA. Gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis: an electrophoretic method for broad molecular weight range proteome separation. *Anal Chem*. 2008 Mar 1;80(5):1568–73.
19. Smith LM, Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods*. 2013 Mar;10(3):186–7.
20. Gregorich ZR, Ge Y. Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities. *PROTEOMICS*. 2014;14(10):1195–210.
21. Toby TK, Fornelli L, Kelleher NL. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu Rev Anal Chem*. 2016;9(1):499–519.
22. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem Rev*. 2013 Apr 10;113(4):2343–94.
23. Tholey A, Becker A. Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events - Methods, applications and perspectives. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2017 Nov 1;1864(11, Part B):2191–9.
24. Tsiatsiani L, Heck AJR. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J*. 2015;282(14):2612–26.
25. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005 Jun 1;382(3):669–78.
26. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2004 Jul 15;76(14):4193–201.
27. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002 Sep 15;74(18):4741–9.
28. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Sep 1;4(9):1265–72.
29. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2002 May;1(5):376–86.
30. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *PROTEOMICS*. 2015 Sep 1;15(18):3175–92.
31. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Dec 1;3(12):1154–69.
32. Ow SY, Salim M, Noirel J, Evans C, Rehman I, Wright PC. iTRAQ Underestimation in Simple and Complex Mixtures: “The Good, the Bad and the Ugly.” *J Proteome Res*. 2009 Nov 6;8(11):5347–55.
33. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem*. 2003 Apr 1;75(8):1895–904.

34. Qu Z, Meng F, Bomgardner RD, Viner RI, Li J, Rogers JC, et al. Proteomic Quantification and Site-Mapping of S-Nitrosylated Proteins Using Isobaric IodoTMT Reagents. *J Proteome Res.* 2014 Jul 3;13(7):3200–11.
35. DeSouza LV, Taylor AM, Li W, Minkoff MS, Romaschin AD, Colgan TJ, et al. Multiple Reaction Monitoring of mTRAQ-Labeled Peptides Enables Absolute Quantification of Endogenous Levels of a Potential Cancer Marker in Cancerous and Normal Endometrial Tissues. *J Proteome Res.* 2008 Aug 1;7(8):3525–34.
36. Yang Q, Zhang A, Miao J, Sun H, Han Y, Yan G, et al. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Adv.* 2019 Nov 13;9(64):37245–57.
37. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLOMICS. *Mass Spectrom Rev.* 2007;26(1):51–78.
38. Ren J-L, Zhang A-H, Kong L, Wang X-J. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Adv.* 2018 Jun 19;8(40):22335–50.
39. Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden YV, Eeckhaut AV. Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis.* 2019 Dec;11(24):2297–318.
40. Takeo E, Sasano R, Shimma S, Bamba T, Fukusaki E. Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography–mass-spectrometry-based metabolomics. *J Biosci Bioeng.* 2017 Dec 1;124(6):700–6.
41. Luo M-D, Zhou Z-W, Zhu Z-J. The Application of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Untargeted Metabolomics: from Separation to Identification. *J Anal Test.* 2020 Jul 1;4(3):163–74.
42. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987 Sep;40(9):1249–55.
43. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987 Sep;40(9):1256–65.
44. Todo S, Demetris AJ, Ueda Y, Imventarza O, Okuda K, Casavilla A, et al. Canine kidney transplantation with FK-506 alone or in combination with cyclosporine and steroids. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19(5 Suppl 6):57–61.
45. Todo S, Ueda Y, Demetris JA, Imventarza O, Nalesnik M, Venkataramanan R, et al. Immunosuppression of canine, monkey, and baboon allografts by FK 506: with special reference to synergism with other drugs and to tolerance induction. *Surgery.* 1988 Aug;104(2):239–49.
46. Murase N, Todo S, Lee PH, Lai HS, Chapman F, Nalesnik MA, et al. Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506 alone or with cyclosporine. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19(5 Suppl 6):71–5.
47. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet Lond Engl.* 1989 Oct 28;2(8670):1000–4.

48. Black CK, Termanini KM, Aguirre O, Hawksworth JS, Sosin M. Solid organ transplantation in the 21st century. *Ann Transl Med.* 2018 Oct;6(20):409.
49. Drug Approval Package: Protopic (tacrolimus) NDA #050777 [Internet]. [cited 2020 Oct 16]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2000/50777\\_protopic.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/50777_protopic.cfm)
50. Magro F, Cordeiro G, Dias AM, Estevinho MM. Inflammatory Bowel Disease – Non-biological treatment. *Pharmacol Res.* 2020 Oct 1;160:105075.
51. Tullus K, Webb H, Bagga A. Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents. *Lancet Child Adolesc Health.* 2018 Dec 1;2(12):880–90.
52. Radhakrishnan J, Cattran DC. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines—application to the individual patient. *Kidney Int.* 2012 Oct 2;82(8):840–56.
53. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology.* 2016 Jul 26;87(4):419–25.
54. PubChem. Tacrolimus [Internet]. [cited 2021 Jul 23]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445643>
55. Cantrell D. Signaling in Lymphocyte Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 6;7(6):a018788.
56. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12–FK506–calcineurin complex. *Nature.* 1995 Dec;378(6557):641–4.
57. Borel JF, Kis ZL, Beveridge T. The History of the Discovery and Development of Cyclosporine (Sandimmune®). In: Merluzzi VJ, Adams J, editors. *The Search for Anti-Inflammatory Drugs: Case Histories from Concept to Clinic* [Internet]. Boston, MA: Birkhäuser Boston; 1995. p. 27–63. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9846-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9846-6_2)
58. Zhang X, Lin G, Tan L, Li J. Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: Pharmacogenetic considerations. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun 1;102:107–14.
59. Shrestha BM. Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant.* 2017 Feb;15(1):1–9.
60. Böttiger, Brattström, Tydén, Säwe, Groth. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(3):445–8.
61. Moutabarrik A, Ishibashi M, Fukunaga M, Kameoka H, Takano Y, Kokado Y, et al. FK506 mechanism of nephrotoxicity: stimulatory effect on endothelin secretion by cultured kidney cells. *Transpl Int.* 1992;5(S1):S93–7.
62. Goodall T, Kind CN, Hammond TG. FK506-induced endothelin release by cultured rat mesangial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 Suppl 3:S482-485.

63. Textor SC, Burnett JC, Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, et al. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int.* 1995 May 1;47(5):1426–33.
64. Uchida J, Miura K, Yamanaka S, Kim S, Iwao H, Nakatani T, et al. Renal Endothelin in FK506-Induced Nephrotoxicity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn J Pharmacol.* 1998;76(1):39–49.
65. Mitamura T, Yamada A, Ishida H, Fujihira S, Ohara K, Noguchi H, et al. Tacrolimus (FK506)-induced nephrotoxicity in spontaneous hypertensive rats. *J Toxicol Sci.* 1994 Nov;19(4):219–26.
66. Textor SC, Wiesner R, Wilson DJ, Porayko M, Romero JC, Burnett JC, et al. Systemic and renal hemodynamic differences between FK506 and cyclosporine in liver transplant recipients. *Transplantation.* 1993 Jun;55(6):1332–9.
67. Akita K, Dusting GJ, Hickey H. Suppression of Nitric Oxide Production by Cyclosporin a and Fk506a in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1994;21(3):231–3.
68. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. Potentiation by Nitric Oxide of Cyclosporin A and FK506-Induced Apoptosis in Renal Proximal Tubule Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec 1;11(12):2315–23.
69. Nakatani T, Uchida J, Asai T, Yoshimura R, Kim T, Miura K, et al. Effect of tacrolimus on the gene expression of renin and endothelin in the rat kidney. *Transplant Proc.* 2001 May 1;33(3):2296–7.
70. Prókai Á, Csohány R, Sziksz E, Pap D, Balicza-Himer L, Boros S, et al. Calcineurin-inhibition Results in Upregulation of Local Renin and Subsequent Vascular Endothelial Growth Factor Production in Renal Collecting Ducts. *Transplantation.* 2016 Feb;100(2):325–33.
71. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Iqbal M, Nadeem A, Al-Shahrah OA, et al. Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Dec 1;16(4):1329–36.
72. Hošková L, Málek I, Kautzner J, Honsová E, Dokkum RPE van, Husková Z, et al. Tacrolimus-induced hypertension and nephrotoxicity in Fawn-Hooded rats are attenuated by dual inhibition of renin–angiotensin system. *Hypertens Res.* 2014 Aug;37(8):724–32.
73. Randhawa PS, Starzl TE, Demetris AJ. Tacrolimus (FK506)-Associated Renal Pathology. *Adv Anat Pathol.* 1997 Jul;4(4):265–76.
74. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity.* *Am J Kidney Dis.* 2017 May 1;69(5):e21–2.
75. Farouk SS, Rein JL. The Many Faces of Calcineurin Inhibitor Toxicity—What the FK? *Adv Chronic Kidney Dis.* 2020 Jan 1;27(1):56–66.
76. Snanoudj R, Royal V, Elie C, Rabant M, Girardin C, Morelon E, et al. Specificity of Histological Markers of Long-Term CNI Nephrotoxicity in Kidney-Transplant Recipients Under Low-Dose Cyclosporine Therapy. *Am J Transplant.* 2011;11(12):2635–46.



77. Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, Sethi S, et al. The Histology of Solitary Renal Allografts at 1 and 5 Years After Transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(4):698–707.
78. Atcherson MM, Trifillis AL. Cytotoxic effects of FK506 on human renal proximal tubule cells in culture. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 1994 Sep 1;30(9):562–7.
79. Moutabarrak A, Ishibashi M, Kameoka H, Kawaguchi N, Takano Y, Kokado Y, et al. In vitro FK506 kidney tubular cell toxicity. *Transpl Int*. 1992;5(S1):S87–92.
80. Zini R, Simon N, Morin C, Thiault L, Tillement JP. Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain. *Life Sci*. 1998;63(5):357–68.
81. Henke W, Jung K. Comparison of the effects of the immunosuppressive agents FK 506 and cyclosporin a on rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 1993 Sep 1;46(5):829–32.
82. Simon N, Morin C, Urien S, Tillement J-P, Bruguerolle B. Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria. *Br J Pharmacol*. 2003;138(2):369–76.
83. Massicot F, Martin C, Dutertre-Catella H, Ellouk-Achard S, Pham-Huy C, Thevenin M, et al. Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporin A in a renal epithelial cell line. *Arch Toxicol*. 1997 Jun 1;71(8):529–31.
84. Yu JH, Lim SW, Luo K, Cui S, Quan Y, Shin YJ, et al. Coenzyme Q10 alleviates tacrolimus-induced mitochondrial dysfunction in kidney. *FASEB J*. 2019 Aug 20;33(11):12288–98.
85. Lim SW, Shin YJ, Luo K, Quan Y, Cui S, Ko EJ, et al. Ginseng increases Klotho expression by FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase in a mouse model of tacrolimus-induced renal injury. *Aging*. 2019 Aug 10;11(15):5548–69.
86. Hisamura F, Kojima-Yuasa A, Kennedy DO, Matsui-Yuasa I. Protective Effect of Green Tea Extract and Tea Polyphenols against FK506-Induced Cytotoxicity in Renal Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(2):192–6.
87. Lee D, Lee D-S, Jung K, Hwang GS, Lee HL, Yamabe N, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against tacrolimus-induced apoptosis in renal proximal tubular LLC-PK1 cells. *J Ginseng Res*. 2018 Jan 1;42(1):75–80.
88. Zhou X, Yang G, Davis CA, Doi SQ, Hirszel P, Wingo CS, et al. Hydrogen peroxide mediates FK506-induced cytotoxicity in renal cells. *Kidney Int*. 2004 Jan 1;65(1):139–47.
89. Lim SW, Jin L, Luo K, Jin J, Shin YJ, Hong SY, et al. Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress. *Cell Death Dis*. 2017 Aug;8(8):e2972.
90. Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, et al. Suppression of NF- $\kappa$ B by Cyclosporin A and Tacrolimus (FK506) via Induction of the C/EBP Family: Implication for Unfolded Protein Response. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):7201–11.
91. González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Berzal S, Carrasco S, Fernández-Fernández B, Cannata-Ortiz P, et al. Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK,

- TLR signaling and the UPR to activate NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Nov 1;272(3):825–41.
92. Bloch J, Hazzan M, Van der Hauwaert C, Buob D, Savary G, Hertig A, et al. Donor ABCB1 genetic polymorphisms influence epithelial-to-mesenchyme transition in tacrolimus-treated kidney recipients. *Pharmacogenomics*. 2014 Dec 1;15(16):2011–24.
  93. Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Tacrolimus Modulates TGF- $\beta$  Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin Med*. 2016 May;5(5):50.
  94. Lim SW, Jin L, Luo K, Jin J, Yang CW. Ginseng extract reduces tacrolimus-induced oxidative stress by modulating autophagy in pancreatic beta cells. *Lab Invest*. 2017 Nov;97(11):1271–81.
  95. Kim D, Hwang H-Y, Kim JY, Lee JY, Yoo JS, Marko-Varga G, et al. FK506, an Immunosuppressive Drug, Induces Autophagy by Binding to the V-ATPase Catalytic Subunit A in Neuronal Cells. *J Proteome Res*. 2017 Jan 6;16(1):55–64.
  96. Zheng H, Zhang H, Zhu C, Li H, Cui S, Jin J, et al. L -C arnitine protects against tacrolimus-induced renal injury by attenuating programmed cell death via PI3K/AKT/PTEN signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Jun 17;1–11.
  97. Lim SW, Shin YJ, Luo K, Quan Y, Ko EJ, Chung BH, et al. Effect of Klotho on autophagy clearance in tacrolimus-induced renal injury. *FASEB J*. 2019;33(2):2694–706.
  98. Secker PF, Schlichenmaier N, Beilmann M, Deschl U, Dietrich DR. Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC/TERT1 cell line. *Arch Toxicol*. 2019 Jul 1;93(7):1965–78.
  99. Christians U, Kruse C, Kownatzki R, Schiebel HM, Schwinzer R, Sattler M, et al. Measurement of FK 506 by HPLC and isolation and characterization of its metabolites. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):940–1.
  100. Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, et al. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1993 Dec;21(6):971–7.
  101. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1995 Jan;23(1):28–34.
  102. Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel HM, Ernst L, et al. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients. *Clin Chem*. 1992 Oct;38(10):2025–32.
  103. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Linck A, Baumann J, Sewing KF. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clin Chem*. 1996 Sep;42(9):1426–32.
  104. Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF, et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 2000 Oct 1;748(1):41–53.

105. Dubbelboer IR, Pohanka A, Said R, Rosenborg S, Beck O. Quantification of tacrolimus and three demethylated metabolites in human whole blood using LC-ESI-MS/MS. *Ther Drug Monit.* 2012 Apr;34(2):134–42.
106. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2006 May;34(5):836–47.
107. Guo Y, Crnkovic CM, Won K-J, Yang X, Lee JR, Orjala J, et al. Commensal Gut Bacteria Convert the Immunosuppressant Tacrolimus to Less Potent Metabolites. *Drug Metab Dispos.* 2019 Mar 1;47(3):194–202.
108. Christians U, Radeke HH, Kownatzki R, Schiebel HM, Schottmann R, Sewing K-Fr. Isolation of an immunosuppressive metabolite of FK506 generated by human microsome preparations. *Clin Biochem.* 1991 Jun 1;24(3):271–5.
109. Tamura K, Fujimura T, Iwasaki K, Sakuma S, Fujitsu T, Nakamura K, et al. Interaction of tacrolimus(FK506) and its metabolites with FKBP and calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jul 15;202(1):437–43.
110. Yanagimachi M, Naruto T, Tanoshima R, Kato H, Yokosuka T, Kajiwara R, et al. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms on calcineurin inhibitor-related neurotoxicity after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant.* 2010 Dec;24(6):855–61.
111. Zegarska J, Hryniewiecka E, Zochowska D, Samborowska E, Jazwiec R, Borowiec A, et al. Tacrolimus Metabolite M-III May Have Nephrotoxic and Myelotoxic Effects and Increase the Incidence of Infections in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2016 Jun;48(5):1539–42.
112. Zegarska J, Hryniewiecka E, Zochowska D, Samborowska E, Jazwiec R, Maciej K, et al. Evaluation of the Relationship Between Concentrations of Tacrolimus Metabolites, 13-O-Demethyl Tacrolimus and 15-O-Demethyl Tacrolimus, and Clinical and Biochemical Parameters in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2018 Sep;50(7):2235–9.
113. Kuypers DRJ, Jonge H de, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 Single-nucleotide Polymorphisms Determine Long-term Tacrolimus Disposition and Drug-related Nephrotoxicity in Renal Recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(6):711–25.
114. Schütte-Nütgen K, Thölking G, Steinke J, Pavenstädt H, Schmidt R, Suwelack B, et al. Fast Tac Metabolizers at Risk—It is Time for a C/D Ratio Calculation. *J Clin Med.* 2019 May;8(5):587.
115. Egeland EJ, Reisæter AV, Robertsen I, Midtvedt K, Strøm EH, Holdaas H, et al. High tacrolimus clearance – a risk factor for development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in the transplanted kidney: a retrospective single-center cohort study. *Transpl Int.* 2019;32(3):257–69.
116. Brunet M, van Gelder T, Åsberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman L, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther Drug Monit.* 2019 Jun;41(3):261–307.

117. Lim SW, Shin YJ, Luo K, Quan Y, Cui S, Ko EJ, et al. Ginseng increases Klotho expression by FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase in a mouse model of tacrolimus-induced renal injury. *Aging*. 2019 10;11(15):5548–69.
118. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc*. 2012 May;7(5):872–81.
119. Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, Shlomi T, Thompson CB, Rabinowitz JD. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*. 2014 Jun;510(7504):298–302.
120. Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2005 Dec 29;360(1464):2335–45.
121. Gansemer ER, McCommis KS, Martino M, King-McAlpin AQ, Potthoff MJ, Finck BN, et al. NADPH and Glutathione Redox Link TCA Cycle Activity to Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *iScience*. 2020 May 22;23(5):101116.
122. Lorkiewicz PK, Gibb AA, Rood BR, He L, Zheng Y, Clem BF, et al. Integration of flux measurements and pharmacological controls to optimize stable isotope-resolved metabolomics workflows and interpretation. *Sci Rep*. 2019 Sep 23;9(1):13705.
123. Hakimi P, Johnson MT, Yang J, Lepage DF, Conlon RA, Kalhan SC, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr Metab*. 2005 Nov 21;2:33.
124. Ling Q, Huang H, Han Y, Zhang C, Zhang X, Chen K, et al. The tacrolimus-induced glucose homeostasis imbalance in terms of the liver: From bench to bedside. *Am J Transplant*. 2020;20(3):701–13.
125. Kolic J, Beet L, Overby P, Cen HH, Panzhinskiy E, Ure DR, et al. Differential Effects of Voclosporin and Tacrolimus on Insulin Secretion From Human Islets. *Endocrinology*. 2020 Nov 1;161(11):bqaa162.
126. Morris SM, Kepka-Lenhart D, Curthoys NP, McGill RL, Marcus RJ, Adler S. Disruption of renal function and gene expression by FK 506 and cyclosporine. *Transplant Proc*. 1991 Dec;23(6):3116–8.
127. Alleyne GA, Scullard GH. Renal metabolic response to acid base changes. I. Enzymatic control of ammoniogenesis in the rat. *J Clin Invest*. 1969 Feb;48(2):364–70.
128. Curthoys NP, Gstraunthaler G. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Sep;281(3):F381-390.
129. Mohebbi N, Mihailova M, Wagner CA. The calcineurin inhibitor FK506 (tacrolimus) is associated with transient metabolic acidosis and altered expression of renal acid-base transport proteins. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2009 Aug 1;297(2):F499–509.
130. Gstraunthaler G, Holcomb T, Feifel E, Liu W, Spitaler N, Curthoys NP. Differential expression and acid-base regulation of glutaminase mRNAs in gluconeogenic LLC-PK1-FBPase+ cells. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2000 Feb 1;278(2):F227–37.
131. Xie X, Tome ME, Gerner EW. Loss of Intracellular Putrescine Pool-Size Regulation Induces Apoptosis. *Exp Cell Res*. 1997 Feb 1;230(2):386–92.

132. TOME EM, FISER MS, PAYNE MC, GERNER WE. Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *Biochem J.* 1997 Dec 15;328(3):847–54.
133. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol.* 2007;581(2):431–44.
134. Vafadari R, Hesselink DA, Cadogan MM, Weimar W, Baan CC. Inhibitory Effect of Tacrolimus on p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Kidney Transplant Recipients Measured by Whole-Blood Phosphospecific Flow Cytometry. *Transplantation.* 2012 Jun 27;93(12):1245–51.
135. Feifel E, Obexer P, Andratsch M, Euler S, Taylor L, Tang A, et al. p38 MAPK mediates acid-induced transcription of PEPCK in LLC-PK1-FBPase+ cells. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2002 Oct 1;283(4):F678–88.
136. Lapelosa M, Gallicchio E, Levy RM. Conformational Transitions and Convergence of Absolute Binding Free Energy Calculations. *J Chem Theory Comput.* 2012 Jan 10;8(1):47–60.
137. General IJ, Meirovitch H. Absolute Free Energy of Binding and Entropy of the FKBP12-FK506 Complex: Effects of the Force Field. *J Chem Theory Comput.* 2013 Oct 8;9(10):4609–19.
138. Solomentsev G, Diehl C, Akke M. Conformational Entropy of FK506 Binding to FKBP12 Determined by Nuclear Magnetic Resonance Relaxation and Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry.* 2018 Mar 6;57(9):1451–61.
139. Juvvadi PR, Fox D, Bobay BG, Hoy MJ, Gobeil SMC, Venters RA, et al. Harnessing calcineurin-FK506-FKBP12 crystal structures from invasive fungal pathogens to develop antifungal agents. *Nat Commun.* 2019 Sep 19;10(1):4275.
140. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell.* 1995 Aug 11;82(3):507–22.
141. Li S-J, Wang J, Ma L, Lu C, Wang J, Wu J-W, et al. Cooperative autoinhibition and multi-level activation mechanisms of calcineurin. *Cell Res.* 2016 Mar;26(3):336–49.
142. Iwasaki K. Metabolism of Tacrolimus (FK506) and Recent Topics in Clinical Pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(5):328–35.
143. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Linck A, Baumann J, Sewing KF. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clin Chem.* 1996 Sep;42(9):1426–32.
144. Shimomura M, Masuda S, Goto M, Katsura T, Kiuchi T, Ogura Y, et al. Required transient dose escalation of tacrolimus in living-donor liver transplant recipients with high concentrations of a minor metabolite M-II in bile. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(5):313–7.
145. Chen Y-L, Hirabayashi H, Akhtar S, Pelzer M, Kobayashi M. Simultaneous determination of three isomeric metabolites of tacrolimus (FK506) in human whole blood and plasma using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2006 Jan 18;830(2):330–41.

146. Vanhove T, de Jonge H, de Loor H, Oorts M, de Hoon J, Pohanka A, et al. Relationship between In Vivo CYP3A4 Activity, CYP3A5 Genotype, and Systemic Tacrolimus Metabolite/Parent Drug Ratio in Renal Transplant Recipients and Healthy Volunteers. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2018;46(11):1507–13.
147. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Jun;87(6):721–6.
148. Shuker N, Bouamar R, van Schaik RHN, Clahsen-van Groningen MC, Damman J, Baan CC, et al. A Randomized Controlled Trial Comparing the Efficacy of Cyp3a5 Genotype-Based With Body-Weight-Based Tacrolimus Dosing After Living Donor Kidney Transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2016 Jul;16(7):2085–96.
149. Wilson KP, Yamashita MM, Sintchak MD, Rotstein SH, Murcko MA, Boger J, et al. Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1995 Jul 1;51(4):511–21.
150. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, et al. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(23):9231–5.
151. Zou J, Tian C, Simmerling C. Blinded prediction of protein–ligand binding affinity using Amber thermodynamic integration for the 2018 D3R grand challenge 4. *J Comput Aided Mol Des*. 2019 Dec 1;33(12):1021–9.
152. Futer O, DeCenzo MT, Aldape RA, Livingston DJ. FK506 Binding Protein Mutational Analysis: DEFINING THE SURFACE RESIDUE CONTRIBUTIONS TO STABILITY OF THE CALCINEURIN CO-COMPLEX \*. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18935–40.
153. Schüler W, Schmieder P, Kessler H, Christians U, Holze I, Sewing K-F, et al. Structural Investigations of 13-O-Demethyl-FK506 and Its Isomers Generated by in vitro Metabolism of FK506 Using Human-Liver Microsomes. *Helv Chim Acta*. 1993;76(6):2288–302.
154. Ono H, Suzuki Y, Kaneko T, Tanaka R, Sato F, Sato Y, et al. High-sensitivity simultaneous quantification of tacrolimus and 13-O-demethyl tacrolimus in human whole blood using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr BMC*. 2019 Sep;33(9):e4584.
155. Lhoëst G, Verbeeck RK, Maton N, Muthélet P, Latinne D. The in vitro immunosuppressive activity of the C15-demethylated metabolite of FK-506 is governed by ring- and open-chain tautomerism effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Aug;274(2):622–6.
156. Tron C, Woillard J-B, Houssel-Debry P, David V, Jezequel C, Rayar M, et al. Pharmacogenetic-Whole blood and intracellular pharmacokinetic-Pharmacodynamic (PG-PK2-PD) relationship of tacrolimus in liver transplant recipients. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230195.

157. Tron C, Allard M, Petitcollin A, Ferrand-Sorre M-J, Verdier M-C, Querzerho-Raguideau J, et al. Tacrolimus diffusion across the peripheral mononuclear blood cell membrane: impact of drug transporters. *Fundam Clin Pharmacol*. 2019 Feb;33(1):113–21.
158. Lemaitre F, Blanchet B, Latournerie M, Antignac M, Houssel-Debry P, Verdier M-C, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in liver transplant recipients: inside the white blood cells. *Clin Biochem*. 2015 Apr 1;48(6):406–11.
159. Gkika D, Topala CN, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. The immunophilin FKBP52 inhibits the activity of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2006 May 1;290(5):F1253–9.
160. Zheng S, Tasnif Y, Hebert MF, Davis CL, Shitara Y, Calamia JC, et al. Measurement and compartmental modeling of the effect of CYP3A5 gene variation on systemic and intrarenal tacrolimus disposition. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Dec;92(6):737–45.
161. Chavant A, Jourdil J-F, Jouve T, Christians U, Fonrose X, Stanke-Labesque F. A simple and easy-to-perform liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of tacrolimus and its metabolites in human whole blood. Application to the determination of metabolic ratios in kidney transplant patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2021 Apr 8;1173:122698.
162. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminformatics*. 2012;4:1–17.
163. Zhao Y, Truhlar D. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor Chem Acc Theory Comput Model Theor Chim Acta*. 2008;120(1):215–41.
164. Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(W1):W537–41.
165. D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham I, V.W.D. Cruzeiro, et al. AMBER 2018. University of California, San Francisco.; 2018.
166. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2013;3(2):198–210.
167. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 09, Revision A.02. 2009;
168. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996 Feb;14:33–8.
169. Lee T-S, Allen BK, Giese TJ, Guo Z, Li P, Lin C, et al. Alchemical Binding Free Energy Calculations in AMBER20: Advances and Best Practices for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2020 Nov 23;60(11):5595–623.
170. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2010 Feb;27(2):136–42.

171. Thölking G, Schütte-Nütgen K, Schmitz J, Rovas A, Dahmen M, Bautz J, et al. A Low Tacrolimus Concentration/Dose Ratio Increases the Risk for the Development of Acute Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity. *J Clin Med*. 2019 Oct 2;8(10).
172. Klauke B, Wirth A, Zittermann A, Bohms B, Tenderich G, Körfer R, et al. No association between single nucleotide polymorphisms and the development of nephrotoxicity after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2008 Jul;27(7):741–5.
173. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Dec;103(6):546–52.



## Etude expérimentale du mécanisme néphrotoxique du tacrolimus et des effets pharmacodynamiques de ses métabolites

---

Le tacrolimus est un immunosuppresseur de la famille des inhibiteurs de la calcineurine largement utilisé pour le traitement des patients transplantés ou souffrant de maladies auto-immunes. Le tacrolimus est caractérisé par une très forte variabilité interindividuelle et un risque d'effets indésirables graves, tels qu'une néphrotoxicité, dont les origines restent mal comprises. Ce travail se divise en deux axes principaux. Le premier a exploré le mécanisme de néphrotoxicité du tacrolimus sur la lignée cellulaire tubulaire LLC-PK1, par une double approche protéomique et métabolomique. Le deuxième a investigué la structure des métabolites du tacrolimus par spectrométrie de masse haute résolution et étudié leurs profils pharmacocinétiques chez des patients transplantés rénaux métaboliseurs lents ou rapides, ainsi que leur impact sur l'effet immunosuppresseur du tacrolimus. Cette recherche translationnelle a montré que le tacrolimus modifie différentes voies métaboliques des cellules tubulaires proximales, tels que le métabolisme énergétique et la gluconéogenèse et apporte pour la première fois des résultats expérimentaux suggérant que les métabolites du tacrolimus sont capables de diminuer l'activité immunosuppressive du tacrolimus par une interaction pharmacodynamique.

---

Mots-clés : [Tacrolimus, métabolites, néphrotoxicité, protéomique, métabolomique, spectrométrie de masse haute résolution, interaction pharmacodynamique]

## Experimental study of tacrolimus nephrotoxic mechanism and the pharmacodynamic effects of its metabolites

---

Tacrolimus is calcineurin inhibitor with immunosuppressive properties widely used for the treatment of transplant patients and patients suffering from autoimmune diseases. It is characterized by very large inter-individual variability and serious adverse effects such as nephrotoxicity, the origins of which remain poorly understood. This work is divided into two main axes. The first one explored the mechanism of tacrolimus nephrotoxicity on a LLC-PK1 renal tubular cell line using combined proteomics and metabolomics analyses. The second investigated the structure of tacrolimus metabolites by high resolution mass spectrometry and studied their 12-hour pharmacokinetic profiles in two groups of renal transplant patients, poor and extensive metabolizers, as well as their impact on the immunosuppressive effect of tacrolimus. This translational research showed that tacrolimus is able to impact different metabolic pathways in proximal tubular cells, such as energy metabolism and gluconeogenesis. Furthermore, it provides for the first-time experimental results suggesting that tacrolimus metabolites are able to decrease the immunosuppressive activity of tacrolimus through a pharmacodynamic interaction.

---

Keywords: [Tacrolimus, metabolites, nephrotoxicity, proteomics, metabolomics, high resolution mass spectrometry, pharmacodynamic interaction]

