

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Ecole Doctorale Science-Technologie-Santé ED 258**

Faculté de Médecine

Année 2004

N° 100C

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Science Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Aurélie Prémaud

Le 9 novembre 2004

**PHARMACOCINETIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE  
PHARMACOLOGIQUE DU MYCOPHENOLATE MOFETIL  
DANS LE TRAITEMENT ANTI-REJET DE GREFFE**

Thèse dirigée par Dr. Annick ROUSSEAU et Pr. Pierre MARQUET

**Jury :**

**Rapporteurs**

**Pr. Yvon LEBRANCHU, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Tours)**

**Dr. Nicolas SIMON, Maître de Conférences-Praticien Hospitalier (Marseille)**

**Examineurs**

**Dr. Jean DEBORD, Praticien Hospitalier Attaché (CHU Limoges)**

**Pr. Yannick LE MEUR, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Limoges)**

**Dr. Annick ROUSSEAU, Maître de Conférences, HC (Université de Limoges)**

**Pr. Pierre MARQUET, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Limoges)**

**Membres invités**

**Pr. Eric THERVET, Professeur- Praticien Hospitalier (INSERM Paris)**

**Dr. Saik URIEN, Directeur de recherche (INSERM Paris)**

# REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont aux personnes “sans qui rien ne serait arrivé”, aux personnes qui m’ont encadrée, guidée, encouragée et soutenue durant ces trois années de thèse. Merci Annick Rousseau pour ta patience, ta disponibilité, ta bonne humeur et tes conseils qui m’ont été précieux tant sur le plan professionnel que personnel. Merci Pierre Marquet pour votre confiance, votre bienveillance, votre rigueur scientifique et votre expérience.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre qui, en m’accueillant au sein du Service de Pharmacologie et de Toxicologie du CHU de Limoges, m’a permis de réaliser, dans d’excellentes conditions, l’ensemble de mes travaux de recherche.

J’adresse mes remerciements à Monsieur Yvon Lebranchu et Monsieur Nicolas Simon qui ont accepté d’être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Monsieur Eric Thervet et Monsieur Saik Urien qui ont bien voulu participer au jury de soutenance de ce mémoire.

J’exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Jean Debord sans qui une grande partie de ce travail n’aurait pu aboutir. Merci de compter parmi les membres de ce jury de thèse.

Je remercie Messieurs les néphrologues Yann Le Meur et Jean Christophe Szelag avec qui nous avons collaboré durant ces trois dernières années. Merci Monsieur Le Meur d’avoir accepté de participer au jury de soutenance de cette thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaborées et qui nous ont permis de mener à bien l’ensemble de ces travaux.

J’exprime mes vifs remerciements à mes “collègues” doctorants ainsi qu’à tous les membres du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges qui m’ont soutenue et/ou supportée durant toutes ces années.

Un grand merci à Xav, littéraire confirmé, pour le temps qu’il a consacré à la relecture de ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m’ont entourée durant ces trois dernières années et qui ont, chacune à leur façon, contribué au bon déroulement de cette thèse: mes parents, mon frère ainsi que tous mes ami(e)s et proches.

Enfin ma dernière pensée, mais non la moindre, est pour Vincent : merci d’être là.

## Résumé

Le but de ce travail était d'étudier la pharmacocinétique (PK) de l'acide mycophénolique (AMP, métabolite actif du mycophénolate mofétil, Cellcept®) chez des patients transplantés rénaux afin de développer des outils d'ajustement individuel de la posologie du mycophénolate mofétil. Une méthode de chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), spécifique et sensible, a été développée et validée pour le dosage de l'AMP et de son métabolite principal l'AMP-phenyl-glucuronide. L'analyse non-compartmentale a mis en évidence une grande diversité des profils de concentration individuels obtenus lors d'essais cliniques chez des patients transplantés rénaux *de novo* ou stables, et l'effet du délai post-transplantation sur leur évolution. L'utilisation d'une ou deux distribution(s) Gamma pour décrire la phase d'absorption du médicament a permis, grâce au logiciel MMF® développé dans l'équipe (Dr. Jean Debord), la modélisation efficace de ces profils complexes d'AMP, présentant fréquemment un deuxième pic de concentration d'intensité très variable. Une étude PK de population a également été réalisée par une approche paramétrique en une étape (NONMEM) afin de quantifier les variabilités inter- et intra- individuelles et d'identifier les covariables pouvant expliquer une partie de ces variabilités. Sur la base des modèles PK développés avec le logiciel MMF®, nous avons mis au point et validé des estimateurs bayésiens permettant de prédire les paramètres PK individuels au moyen de trois prélèvements sanguins. En parallèle, des équations estimant l'AUC<sub>0-12h</sub> de l'AMP à partir d'un nombre limité de concentrations sanguines ont été élaborées par régression linéaire multiple. Ces travaux ont fourni les outils nécessaires au Suivi Thérapeutique Pharmacologique du Cellcept® basé sur l'AUC<sub>0-12h</sub> de l'AMP dans la prévention du rejet aigu de greffe rénale, outils actuellement utilisés dans une étude clinique multicentrique.

Mots clés: immunosuppresseur, pharmacocinétique, suivi thérapeutique pharmacocologique, pharmacocinétique de population.

## Abstract

The aim of our work was to study the pharmacokinetics (PK) of mycophenolic acid (MPA, the active metabolite of mycophenolate mofetil, Cellcept®) in renal transplant patients and to develop relevant tools for mycophenolate mofetil dose adjustment. A specific and sensitive liquid chromatography tandem-mass spectrometry method was developed and validated for the determination of MPA and its major metabolite MPAG (mycophenolic acid phenyl-glucuronide) in plasma. Large variations in MPA plasma concentration-time profiles were found in populations of *de novo* and stable renal transplant recipients. Pharmacokinetic models using one or two Gamma distribution(s), developed using in-house program (MMF®, Dr. Jean Debord), accurately described the various types of MPA absorption profiles, frequently presenting a second concentration peak of variable intensity. A population PK study using the NONMEM program was also performed in order to evaluate inter- and intra-individual variability and to determine the effects of different covariates on drug disposition. Bayesian estimators based on the PK models developed using the MMF® program allowed accurate estimation of individual PK parameters using only three MPA plasma concentrations. Limited sampling strategies for MPA AUC<sub>0-12h</sub> estimation by multiple linear regression were also developed. This study has provided relevant tools for therapeutic drug monitoring of Cellcept® based on MPA AUC<sub>0-12h</sub> in the prevention of acute rejection. These tools are currently used in a multi-center clinical trial.

Keywords: immunosuppressive drugs, pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring, population pharmacokinetic.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETAT DE L'ART .....</b>	<b>14</b>
<b>I.PHARMACOLOGIE DE L'AMP .....</b>	<b>15</b>
<b>I.1.MÉCANISME D'ACTION.....</b>	<b>16</b>
<b>I.2.UTILISATION THÉRAPEUTIQUE.....</b>	<b>17</b>
I.2.1.PLACE DU MMF EN TRANSPLANTATION RÉNALE.....	17
I.2.2.INDICATIONS.....	18
I.2.3.ADMINISTRATION.....	18
<b>I.3.EFFETS INDÉSIRABLES .....</b>	<b>19</b>
I.3.1.TROUBLES DIGESTIFS.....	20
I.3.2.TROUBLES HÉMATOLOGIQUES.....	20
I.3.3.TROUBLES INFECTIEUX.....	21
I.3.4.LYMPHOMES ET TUMEURS MALIGNES.....	21
<b>I.4.PHARMACOCINÉTIQUE.....</b>	<b>22</b>
I.4.1.CARACTÉRISTIQUES PHARMACOCINÉTIQUES DE L'AMP.....	22
I.4.1.1. Absorption et distribution.....	22
I.4.1.2. Métabolisme et excrétion.....	22
I.4.1.3. Profils pharmacocinétiques.....	25
I.4.2.PHARMACOCINÉTIQUE DE L'AMP CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX ET VARIABILITÉ PHARMACOCINÉTIQUE.....	26
I.4.2.1. Pharmacocinétique de l'AMP chez des patients adultes transplantés rénaux stables...26	
I.4.2.2. Evolution de la pharmacocinétique de l'AMP en fonction du délai post-transplantation .....	26
I.4.2.3. Influence de l'insuffisance rénale.....	28
I.4.2.4. Insuffisance hépatique.....	30
I.4.2.5. Pharmacocinétique de l'AMP dans les populations pédiatriques.....	30
I.4.2.6. Immunosuppresseurs associés.....	31
I.4.2.6.1. Inhibiteurs de la calcineurine.....	31
I.4.2.6.2. Sirolimus.....	32
I.4.2.6.3. Corticostéroïdes.....	33

I.4.2.7. Autres interactions pharmacocinétiques.....	34
I.4.3. MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE DE L'AMP.....	36
<b><u>II. SUIVI THÉRAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE (STP) DE L'AMP.....</u></b>	<b>38</b>
<b>II.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE STP.....</b>	<b>38</b>
II.1.1. DÉFINITION.....	38
II.1.2. PRÉ-REQUIS POUR LE STP.....	38
II.1.3. INDIVIDUALISATION DE POSOLOGIE.....	39
<b>II.2. REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE STP DU MMF.....</b>	<b>39</b>
II.2.1. ÉTUDES DE LA RELATION CONCENTRATIONS/EFFICACITÉ.....	40
II.2.1.1. Transplantation rénale.....	40
II.2.1.2. Transplantation cardiaque.....	42
II.2.1.3. Transplantation hépatique.....	43
II.2.2. ÉTUDES DE LA RELATION CONCENTRATIONS/EFFETS INDÉSIRABLES.....	44
II.2.2.1. Transplantation rénale.....	44
II.2.2.2. Transplantation hépatique.....	46
II.2.3. INDEX THÉRAPEUTIQUES DE L'AMP.....	46
<b>II.3. RÉALISATION DU STP DE L'AMP.....</b>	<b>47</b>
II.3.1. PRÉLÈVEMENTS SANGUINS.....	47
II.3.2. MÉTHODE DE DOSAGE DE L'AMP.....	48
II.3.3. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'EXPOSITION À L'AMP.....	49
II.3.3.1. Régression linéaire multiple.....	50
II.3.3.2. Estimation bayésienne.....	50
<b><u>DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.....</u></b>	<b>52</b>
<b><u>I. PROTOCOLES DE RECHERCHE CLINIQUE ET BASE DE DONNÉES.....</u></b>	<b>53</b>
<b>I.1. PRIMOCINE.....</b>	<b>53</b>
<b>I.2. STABLOCINE.....</b>	<b>54</b>
<b>I.3. CINESIREN.....</b>	<b>54</b>
<b>I.4. DONNÉES DE LA RCCT (RANDOMIZED CONCENTRATION CONTROLLED TRIAL).....</b>	<b>55</b>
<b>I.5. DONNÉES D'UNE ÉTUDE DE PHARMACOCINÉTIQUE DE L'AMP CHEZ DES PATIENTS AFRO-AMÉRICAINS ET CAUCASIENS.....</b>	<b>55</b>
<b>I.6. GROUPE INDÉPENDANT DE PATIENTS.....</b>	<b>56</b>
<b>I.7. DESCRIPTION DE LA BASE DE DONNÉES GLOBALE.....</b>	<b>56</b>

<b><u>II.COMPARAISON DES MÉTHODES ANALYTIQUES POUR LE DOSAGE DE L'AMP</u></b> .....	<b>58</b>
<b>II.1. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM POUR LE DOSAGE PLASMATIQUE DE L'AMP ET DE L'AMPG ET COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE EMIT (DADE-BEHRING) POUR LA MESURE DE CONCENTRATIONS D'AMP CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX TRAITÉS PAR L'ASSOCIATION MMF ET CICLOSPORINE.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.COMPARAISON DES TECHNIQUES LC-MS/MS ET EMIT POUR LE DOSAGE DE L'AMP CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX RECEVANT DU MMF ASSOCIÉ À DU SIROLIMUS.....</b>	<b>60</b>
II.2.1.MÉTHODE.....	60
II.2.2.RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	60
<b>II.3.DISCUSSION SUR LA COMPARAISON DES TECHNIQUES ANALYTIQUES POUR LE DOSAGE DE L'AMP..</b>	<b>63</b>
<b><u>III.ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE DE L'AMP</u></b> .....	<b>67</b>
<b>III.1.ANALYSE NON-COMPARTMENTALE.....</b>	<b>67</b>
III.1.1.MÉTHODE.....	67
III.1.1.1. Indices d'exposition.....	67
III.1.1.2.Statistiques.....	67
III.1.2.CINÉTIQUES D'AMP CHEZ DES PATIENTS RECEVANT DE LA CICLOSPORINE.....	67
III.1.2.1.Données de la RCCT (van Gelder et al., Transplantation 1999).....	67
III.1.2.2. Données Primocine .....	69
III.1.2.2.1.Profils de concentration.....	69
III.1.2.2.2. Indices d'exposition.....	69
III.1.2.3. Données Stablocine.....	74
III.1.2.3.1.Profils pharmacocinétiques.....	74
III.1.2.3.2.Indices d'exposition.....	75
III.1.2.4. Données issues d'un groupe indépendant de patients.....	79
III.1.2.5. Données de l'étude afro-américaine/caucasienne.....	82
III.1.3.CINÉTIQUES D'AMP CHEZ DES PATIENTS RECEVANT DU SIROLIMUS.....	83
III.1.4.DISCUSSION SUR L'ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE DE L'AMP SELON UNE APPROCHE NON-COMPARTMENTALE.....	86
<b>III.2.MODÉLISATION DES PHARMACOCINÉTIQUES INDIVIDUELLES PAR RÉGRESSION NON-LINÉAIRE.....</b>	<b>87</b>
III.2.1.PRINCIPE.....	87
III.2.2. DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MODÈLES UTILISANT LA DISTRIBUTION GAMMA.....	87
III.2.2.1. Modélisation pharmacocinétique.....	91

III.2.2.2. Résultats.....	91
III.2.2.3. Discussion.....	92
III.2.3. MODÉLISATION DES PHARMACOCINÉTIQUES INDIVIDUELLES DES PATIENTS SOUS SIROLIMUS.....	93
III.2.3.1. Matériel et méthode.....	93
III.2.3.1.1. Patients.....	93
III.2.3.1.2. Modèles pharmacocinétiques.....	93
III.2.3.1.3. Statistiques.....	93
III.2.3.2. Résultats.....	94
III.2.4. DISCUSSION SUR LA MODÉLISATION DES PHARMACOCINÉTIQUES INDIVIDUELLES D'AMP .....	96
<b>III.3. ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION.....</b>	<b>98</b>
III.3.1. BUT.....	98
III.3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	98
III.3.2.1. Données de population.....	98
III.3.2.2. Méthodologie NONMEM.....	98
III.3.2.2.1. Construction du modèle structural.....	99
III.3.2.2.2. Analyse de l'influence des covariables sur les paramètres pharmacocinétiques....	103
III.3.2.2.3. Validation du modèle final.....	106
III.3.3. RÉSULTATS.....	106
III.3.3.1. Modèle de base.....	106
III.3.3.2. Etude de l'influence des covariables avec le modèle basé sur une absorption fractionnée.....	111
III.3.3.2.1. Analyse univariée.....	111
III.3.3.2.2. Analyse multivariée.....	113
III.3.3.3. Modèle final "absorption fractionnée".....	114
III.3.3.4. Validation du modèle final "absorption fractionnée".....	117
III.3.4. DISCUSSION SUR LE MODÈLE DE PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION.....	119

**IV. ESTIMATION DE L'AUC D'AMP À PARTIR D'UN NOMBRE LIMITÉ DE PRÉLÈVEMENTS SANGUINS..... 126**

<b>IV.1. ESTIMATION PAR RÉGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE .....</b>	<b>126</b>
IV.1.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE PAR RÉGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE.....	126
IV.1.2. RECHERCHE DE LA MEILLEURE STRATÉGIE DE PRÉLÈVEMENTS LIMITÉS.....	126
IV.1.2.1. Matériel et Méthode.....	126
IV.1.2.1.1. Patients.....	126



IV.1.2.1.2. Recherche des meilleures stratégies de prélèvements limités, détermination des équations correspondantes et validation.....	127
IV.1.2.2. Résultats.....	128
IV.1.2.2.1. Meilleures stratégies de prélèvements limités et équations de régression linéaire multiple.....	128
IV.1.2.2.2. Validation des modèles.....	130
IV.1.2.3. Discussion sur les meilleures stratégies obtenues.....	131
IV.1.3. MISE AU POINT DE MODÈLES UTILISANT UNE STRATÉGIE DE PRÉLÈVEMENTS LIMITÉS COMMUNE.....	133
IV.1.3.1. Matériel et méthode.....	133
IV.1.3.2. Résultats.....	134
IV.1.3.2.1. Stratégie commune pour les données des études Primocine et Stablocine.....	134
IV.1.3.2.2. Stratégie commune pour les données des études RCCT et Afro-américaine/caucasienne.....	136
IV.1.4. DISCUSSION SUR LA MÉTHODE D'ESTIMATION PAR RÉGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE.....	137
<b>IV.2. MÉTHODE BAYESIENNE.....</b>	<b>138</b>
IV.2.1. PRINCIPE DE L'ESTIMATION BAYESIENNE.....	138
IV.2.2. MISE AU POINT D'ESTIMATEURS BAYESIENS : APPROCHE EN DEUX ÉTAPES.....	139
IV.2.2.1. Principe de l'approche en deux étapes.....	139
IV.2.2.2. Mise au point d'estimateurs bayesiens pour la détermination de l'exposition à l'AMP chez des patients transplantés rénaux, à différentes périodes post-greffe. ....	140
IV.2.2.3. Evaluation des estimateurs bayesiens dans un groupe indépendant de patients.....	142
IV.2.2.4. Estimation des AUC0-12 par méthode bayésienne.....	142
IV.2.2.5. Résultats.....	142
IV.2.3. DISCUSSION SUR L'ESTIMATION PAR MÉTHODE BAYESIENNE .....	144
<b><u>CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>146</u></b>
BIBLIOGRAPHIE.....	149

## Liste des abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché  
AMP : acide mycophénolique  
AMPaG : acyl-glucuronide de l'acide mycophénolique  
AMPG : phényl-glucuronide de l'acide mycophénolique  
AUC : aire sous la courbe (area under the curve)  
 $C_0$  : concentration résiduelle  
 $C_{max}$  : concentration maximale  
 $C_t$  : concentration au temps t  
CL/F : clairance totale apparente  
CMV : cytomégalovirus  
CsA : ciclosporine  
CV : coefficient de variation  
DV : concentration observée (dependant variable)  
FO : méthode d'approximation de premier ordre (first order)  
FOCE : algorithme d'estimation (first order conditionnal estimation)  
HPLC-UV : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet  
IMPDH : inosine monophosphate deshydrogénase  
IPRED : concentration individuelle prédite par estimation bayésienne (individual prediction)  
LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse  
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem  
MMF : mycophénolate mofétil  
PK : pharmacocinétique  
PRED : concentration prédite par le modèle (prediction)  
RNL : régression non-linéaire  
RMSE : précision (root mean squared prediction error)  
ROC: receiver operating characteristic  
STP : suivi thérapeutique pharmacologique  
 $T_{max}$  : horaire auquel la concentration maximale est atteinte  
 $V_c/F$ : volume apparent de distribution dans le compartiment central  
WRES : residu pondéré (weighted residue)

# INTRODUCTION

La greffe d'organe est pratiquée depuis plus d'un demi siècle. Au fil du temps, des progrès impressionnants ont été réalisés dans le domaine de la médecine et de la chirurgie, et la transplantation est de mieux en mieux maîtrisée.

Le rejet de la greffe a constitué un obstacle majeur aux premières transplantations et reste aujourd'hui leur principale complication. Ce phénomène résulte de la réaction du système immunitaire vis-à-vis du greffon considéré comme étranger par l'organisme receveur. Le rejet aigu survient essentiellement au cours des trois premiers mois suivant la greffe, ou à n'importe quel moment si le traitement prescrit n'a pas été suivi correctement ou n'est pas adapté. Ce rejet résulte de l'activation des mécanismes de défense immunitaire due à l'identification des cellules du greffon comme agents étrangers. Les lymphocytes envahissent ainsi le greffon et le détruisent. Ce rejet se traduit par des signes fonctionnels et cliniques, et une prise en charge rapide permet d'enrayer efficacement la réaction immunologique. Le rejet chronique survient généralement après six mois de greffe, il évolue lentement au cours des années et diminue la durée de vie des greffons. Il est lié à une inflammation au niveau du greffon qui provoque une fibrose des vaisseaux, dont les parois s'épaississent lentement. L'irrigation devient insuffisante et les fonctions de l'organe se détériorent. Le rejet chronique est la principale cause d'échec des greffes.

Toutefois, le pronostic des greffes a été largement amélioré durant ces vingt dernières années grâce à la découverte et au développement de médicaments immunosuppresseurs permettant de prévenir le rejet. Ces médicaments agissent à différents niveaux sur les réactions immunitaires pour en limiter l'expansion. Cependant à doses excessives, l'utilisation de ces médicaments est associée à la survenue d'effets indésirables, parfois sévères. Ceci a généré un intérêt particulier pour la recherche de moyens d'optimiser les effets thérapeutiques tout en diminuant les effets indésirables. Une de ces méthodes d'optimisation consiste à surveiller les concentrations sanguines du médicament et à adapter les posologies de façon à maintenir ses concentrations dans une zone statistiquement optimale, dite fourchette thérapeutique. Les bénéfices du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) ont été démontrés pour la ciclosporine et le tacrolimus et le STP est aujourd'hui considéré comme indispensable à la bonne utilisation de ces médicaments.

L'introduction du mycophénolate mofétil (MMF ; Cellcept®) dans le domaine de la transplantation a constitué une avancée supplémentaire. Des études ont montré que le MMF permettait une amélioration de la survie du greffon rénal en diminuant la fréquence des rejets aigus et, à plus long terme, en réduisant la dysfonction chronique du greffon ; il a ainsi largement remplacé l'azathioprine (Imurel®). Actuellement, le MMF est administré à doses

quotidiennes fixes, identiques pour tous les patients. Cependant les cliniciens sont parfois confrontés à des problèmes de tolérance du médicament conduisant à la diminution de la dose ou à l'arrêt du traitement, pouvant compromettre la survie du greffon.

Un intérêt particulier est actuellement porté sur la pharmacocinétique (PK) de l'acide mycophénolique (AMP ; métabolite actif du MMF), qui constitue un facteur déterminant des effets du médicament, et de nombreux critères sont en faveur du STP du MMF. En effet, des relations entre l'exposition au médicament et l'incidence du rejet aigu, et entre les concentrations d'AMP et la survenue de certains effets indésirables ont été mises en évidence. D'autre part, la PK de l'AMP est caractérisée par une importante variabilité inter-individuelle. Enfin, les concentrations plasmatiques d'AMP peuvent être fortement influencées par l'administration concomitante de médicaments associés. Cependant, l'intérêt clinique du STP de l'AMP n'a pas encore été formellement démontré en terme de morbi/mortalité ; il est actuellement en cours d'évaluation dans deux études multicentriques, l'une française (APOMYGRE ; promoteur : CHU de Limoges), l'autre internationale (FDCC = fixed dose versus concentration controlled trial ; promoteur : Laboratoires ROCHE).

Le STP requiert la connaissance de la PK du médicament. Les études PK de l'AMP basées sur une analyse compartimentale sont peu nombreuses et seule l'étude de Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) incluait des patients dans la période post-transplantation précoce. Cette étude a mis en évidence la complexité des profils PK observés pendant les premières semaines suivant la greffe et montrait que les modèles PK classiques (notamment les modèles basés sur une absorption et une élimination d'ordre 1) étaient inadaptés. L'état actuel des connaissances suggère que l'obtention d'une exposition efficace et stable au(x) traitement(s) immunosuppresseur(s) le plus tôt possible est déterminante pour la survie du greffon. En conséquence, il semble utile de disposer de modèle(s) pharmacocinétique(s) pertinents afin de développer des stratégies pour l'estimation des paramètres PK individuels et le calcul des doses à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins.

Les objectifs de notre travail étaient :

- de mettre au point et valider des méthodes analytiques permettant le dosage de l'AMP et de son principal métabolite ;
- de développer des modèles PK structuraux adaptés à la description des profils de concentration plasmatique de l'AMP chez des patients transplantés rénaux quelle que soit la période post-greffe considérée et de décrire les paramètres PK de l'AMP et leur évolution au cours du temps chez ces patients;

- de développer des outils logiciels permettant l'ajustement individuel de la posologie en vue d'optimiser le traitement par MMF.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé dans la perspective d'une application du STP de l'AMP en routine clinique.

La première partie de cette thèse présente une revue de littérature sur des généralités concernant la PK de l'AMP et son STP.

La deuxième partie porte sur nos travaux personnels.

Dans un premier temps, la méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem mise au point pour le dosage de l'AMP et de son principal métabolite est décrite et comparée à d'autres techniques analytiques existantes.

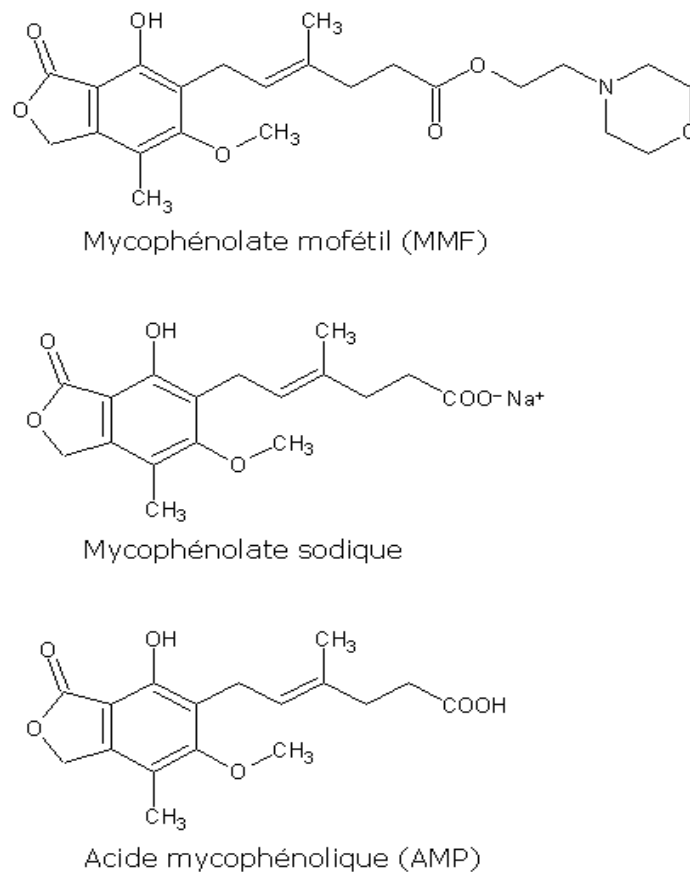
Dans un deuxième temps les résultats de l'analyse PK de l'AMP chez les greffés rénaux, réalisée selon différentes approches à partir des résultats de plusieurs essais cliniques sont présentés: une approche non-compartmentale, une approche compartmentale par modélisation des PK individuelles et une étude de PK de population de l'AMP.

La dernière partie du travail présente les estimateurs bayesiens développés selon une approche classique "en deux étapes" et intégrés dans des outils logiciels dédiés à l'adaptation de posologie du MMF quelque soit le délai post-greffe.

# **PREMIERE PARTIE : ETAT DE L'ART**

# I. Pharmacologie de l'AMP

L'acide mycophénolique (AMP, figure 1), produit de fermentation de plusieurs souches de *Penicillium* (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998), possède des propriétés immunosuppressives mises à profit en transplantation d'organes. Deux formes médicamenteuses ont été développées pour améliorer la biodisponibilité de ce produit. La première forme mise sur le marché est le mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept®) ou morpholinoéthyl-ester de l'AMP (figure 1). Après administration orale, cette pro-drogue est rapidement hydrolysée en AMP dans le tube digestif et absorbée dans l'estomac. Récemment, une formulation gastro-résistante (comprimés pelliculés) du mycophénolate sodique (figure 1) (Myfortic®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Après administration orale, l'enrobage gastro-résistant du principe actif permet la libération et l'absorption du mycophénolate dans l'intestin grêle et non dans l'estomac. L'objectif d'une telle formulation était d'offrir une meilleure tolérance gastro-intestinale relative à l'exposition au médicament, mais cet avantage n'a pas été cliniquement démontré pour l'instant (Marquet, La Lettre du Pharmacologue 2004).



**Figure 1 :** Structures chimiques de l'acide mycophénolique, du mycophénolate mofétil et du mycophénolate sodique.

## I.1. Mécanisme d'action

L'AMP agit par inhibition réversible et non-compétitive de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH), enzyme clé de la voie de synthèse *de novo* des nucléotides puriques (Ransom , Ther Drug Monit 1995 ; Shaw et al. Ther Drug Monit 1995; Fulton et Markham, Drugs 1996; Allison et Eugui, Immunopharmacology 2000). L'IMPDH catalyse la réaction de transformation de l'IMP (inosine monophosphate) en GMP (guanosine monophosphate), substrat essentiel pour la synthèse d'ADN et d'ARN. Il existe deux voies de synthèse des nucléotides puriques : la voie *de novo* et la voie dite de sauvetage (figure 2). Contrairement à d'autres types de cellules pouvant recourir à l'une ou à l'autre de ces voies, les lymphocytes B et T utilisent préférentiellement la voie *de novo* pour la synthèse des nucléotides puriques. De plus, l'AMP inhibe préférentiellement l'isoforme-2 de l'IMPDH exprimée sélectivement dans les lymphocytes activés (Carr et al., J Biol Chem 1993). L'AMP exerce donc spécifiquement son action sur les cellules des lignées lymphocytaires (B et T) dont il bloque la prolifération à un stade tardif. A cette inhibition sélective de la prolifération des lymphocytes s'associent d'autres propriétés plus spécifiques telles que l'inhibition de la



production d'anticorps, l'inhibition de la glycosylation et de l'expression des molécules d'adhésion, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses qui font de l'AMP un immunosuppresseur particulièrement intéressant (Fulton et Markham, *Drugs* 1996 ; Ransom, *Ther Drug Monit* 1995 ; Allison et Eugui, *Immunopharmacology* 2000).

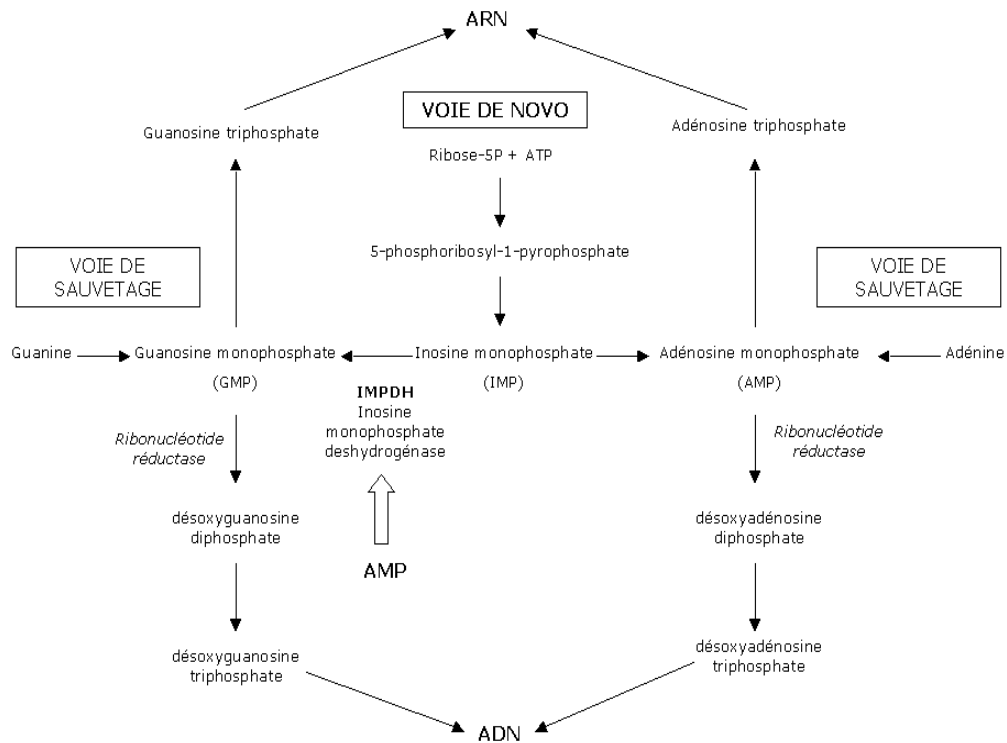


Figure 2 : Schéma des voies de synthèse des bases puriques. D'après Allison et Eugui. (*Clin Transplantation* 1993)

## I.2. Utilisation thérapeutique

### I.2.1. Place du MMF en transplantation rénale

Trois grands essais multicentriques réalisés chez des adultes ayant bénéficié d'une greffe rénale ont montré que l'administration de doses fixes de 2 et 3g/jour de MMF associées à la ciclosporine (CsA) et aux corticostéroïdes pendant les 6 premiers mois post-transplantation, réduisait de façon significative l'incidence des épisodes de rejet aigu (prouvé par biopsie) et les échecs du traitement (perte du greffon, décès ou interruption prématurée de la prise du médicament), comparé à un régime identique incluant l'azathioprine (Imurel®) ou un placebo à la place du MMF (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, *Lancet* 1995 ; Sollinger, *Transplantation* 1995 ; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group ; *Transplantation* 1996).

Des études à 1 an (Halloran et al., *Transplantation* 1997) et 3 ans post-greffe ont confirmé l'efficacité du MMF en terme de survie du greffon (Mathew, *Transplantation* 1998 ; European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, *Transplantation* 1999 ; US

Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group, Am J Kidney Dis 1999). Ainsi le mycophénolate mofétil a largement remplacé l'azathioprine dans le traitement immunosuppresseur de la greffe rénale.

### 1.2.2. Indications

Cellcept® a obtenu une AMM pour l'utilisation suivante (Le dictionnaire Vidal 2004) : "Cellcept® est indiqué, en association à la CsA et aux corticoïdes, pour la prévention des rejets aigus de greffon chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe rénale, cardiaque ou hépatique".

L'efficacité du MMF a également été étudiée en transplantation pulmonaire (Palmer et al., Transplantation 2001).

Même si cela constitue une utilisation hors AMM, Cellcept® est fréquemment administré en association avec le tacrolimus, l'efficacité de ce régime immunosuppresseur ayant été montrée en transplantation rénale (Roth et al., Transplantation 1998 ; Shapiro et al., Transplantation 1999 ; Squifflet et al., Transplantation 2001) et hépatique (Jain et al., Transplant Proc 2001 ; Klupp et al., Transplant Proc 1999). L'utilisation du MMF en association avec le sirolimus a fait également l'objet d'études cliniques (Kreis et al., Transplantation 2000). Enfin, son effet sur la prévention du rejet chronique de greffe rénale fait également l'objet d'investigations (Ojo et al., Transplantation 2000 ; Meier-Kriesche et al., Am J Transplant 2003).

### 1.2.3. Administration

En transplantation rénale, la dose initiale de MMF doit être administrée par voie orale dans les 72 heures suivant la greffe, en association avec un autre immunosuppresseur (CsA ou tacrolimus, tous deux inhibiteurs de la calcineurine) et des corticostéroïdes. Un traitement d'induction par anticorps (polyclonal anti-lymphocytaire ou monoclonal anti-récepteur de l'interleukine 2) peut également lui être associé. La posologie recommandée pour la prévention du rejet de greffe rénale est de 2 à 3 g/jour en 2 prises en association avec la CsA et des corticoïdes.

Trois grandes études pivot (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, Lancet 1995 ; Sollinger, Transplantation 1995 ; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group ; Transplantation 1996) ont évalué l'efficacité du MMF chez des transplantés rénaux pour deux posologies prédéfinies de 2 et 3 g/jour. Ces études ont montré que la dose de 3g/jour était moins bien tolérée, avec une incidence plus importante des effets indésirables imputables au MMF. La posologie de 2g/jour de MMF a donc été définie comme optimale par le laboratoire ROCHE, car présentant le meilleur rapport bénéfice/risque.

En transplantation cardiaque, le traitement doit être initié dans les 5 jours suivant la greffe, la dose quotidienne recommandée étant de 3g (1,5g deux fois par jour).

En transplantation hépatique, Cellcept® est administré par voie intraveineuse pendant les quatre premiers jours suivant la greffe puis par voie orale dès qu'il peut être toléré. La dose recommandée est 1,5g deux fois par jour per os.

D'autres modes d'utilisation du MMF sont envisagés. Le MMF a parfois été utilisé seul, ou en association à des doses réduites de ciclosporine ou de tacrolimus en prévention de la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine à distance des greffes rénales, cardiaques et hépatiques (Abramowicz D et al., Transplant Proc 2000). Une étude multicentrique, randomisée ouverte, actuellement en cours en France (l'étude DICAM), a pour but d'évaluer, chez des patients transplantés rénaux à partir de la deuxième année de greffe, l'efficacité sur la fonction rénale d'un traitement d'entretien par bithérapie visant à diminuer les doses de CsA en association avec le MMF.

Le MMF en association avec de la CsA ou du tacrolimus a permis l'arrêt précoce des corticoïdes chez des transplantés hépatiques, diminuant ainsi la survenue de certaines complications métaboliques (Stegall et al., Transplantation 1997).

Initialement, l'ajustement de posologie est réputé inutile pour cet immunosuppresseur et il n'est toujours pas officiellement préconisé. Des modifications de la posologie peuvent toutefois être proposées, sur critères cliniques uniquement.

### **I.3. Effets indésirables**

Les données concernant la tolérance clinique du Cellcept® sont issues de trois grandes études randomisées, contrôlées, en double aveugle, comparant différents régimes immunosuppresseurs incluant du MMF (à la dose de 2g ou 3g par jour), de l'azathioprine ou un placebo dans la prévention du rejet aigu de greffe rénale (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, Lancet 1995 ; Sollinger, Transplantation 1995 ; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, Transplantation 1996). L'incidence des effets indésirables était élevée dans chacun des groupes de traitement, mais globalement plus faible dans l'étude européenne. Celle-ci comparait la trithérapie CsA/corticoïdes/MMF à la bithérapie CsA/corticoïdes + placebo. Les études tricontinentale et américaine comparaient les protocoles de tri- ou quadri-thérapie utilisant le MMF aux protocoles classiques incluant l'azathioprine ; leurs données ont été combinées dans la suite de cette analyse (Cellcept, 1996).

Les principaux effets indésirables attribuables au MMF sont d'ordre digestif, hématologique et infectieux (Fulton et Markham, Drugs 1996).

### 1.3.1. Troubles digestifs

Dans l'étude européenne, l'incidence des effets indésirables gastro-intestinaux était plus importante dans les groupes de traitement incluant le MMF (45,5% et 52,5% respectivement pour les doses de 2 et 3g par jour) comparés au groupe de traitement incluant le placebo (41,6%). La diarrhée constituait le principal effet secondaire ; son incidence était identique entre le groupe de traitement associant du MMF à 2 g/jour et celui associant un placebo (12,7%), mais était plus élevée dans le groupe associant du MMF à 3 g/jour (15,6%). Des nausées (4,2 à 6,3%) et des vomissements (2,4 à 3,8%) étaient plus fréquemment rapportés dans les groupes incluant du MMF que dans le groupe placebo (respectivement 2,4 et 1,2%). La fréquence des douleurs abdominales était comparable entre les groupes de traitement (respectivement 10,8%, 11,5% et 11,3% pour les groupes placebo, MMF 2g et MMF 3g).

Les événements gastro-intestinaux les plus fréquents dans les études américaine et tricontinentale étaient (dans l'ordre décroissant): diarrhée, douleurs abdominales, nausées, vomissements, constipation et dyspepsie. L'apparition de diarrhée était plus fréquente dans les groupes sous MMF (28 à 31,5% à 2g et 31 à 37,3% à 3g) que dans les groupes sous azathioprine (17 à 23,8%). Il semblerait également que les patients traités par MMF étaient plus sujets aux vomissements (10,7% à 2g et 13,3% à 3g) que ceux traités par l'azathioprine (7,4%). L'incidence des douleurs abdominales (comprise entre 21,2 et 24,5%) ne différait pas sensiblement entre les groupes de traitement. Les autres événements digestifs étaient rapportés chez moins de 25% des patients et n'étaient pas plus fréquents chez ceux traités par Cellcept®. Globalement, la plupart des effets indésirables gastro-intestinaux apparaissaient au-delà de 30 jours suivant le début du traitement chez les patients recevant du MMF et dans le premier mois chez les patients recevant de l'azathioprine.

### 1.3.2. Troubles hématologiques

Le MMF entraîne des désordres sanguins de type leucopénie, anémie, thrombocytopénie, anémie hypochrome.

Dans l'étude européenne, la survenue de leucopénie et d'anémie était plus fréquente dans le groupe de patients recevant du MMF. Cellcept® occasionnait 10,9% de leucopénie à la dose de 2g et 13,8% à la dose de 3g, contre 4,2% chez les patients sous placebo. 4,2% et 6,8% des patients recevant respectivement 2 et 3g de MMF présentaient une anémie contre 1,8% des patients recevant un placebo. L'incidence des thrombocytopénies était légèrement supérieure sous placebo (4,8% versus 4,2% et 3,1% avec du MMF à 2 et 3g).

Les deux études comparant MMF et azathioprine ont montré que l'incidence de leucopénie et d'anémie hypochrome était accrue dans le groupe recevant 3g de MMF (respectivement 32,4% et 11,5%) par rapport aux groupes recevant 2g de MMF (21,1% et 6,8%) ou de l'azathioprine (24,2% et 8,6%). L'incidence des autres désordres

hématologiques tels que l'anémie (22,7 à 23,9%), la thrombopénie (7,9 à 12,6%) et l'hyperleucocytose (6,3 à 9,7%) était comparable entre les différents groupes de traitement.

### 1.3.3. Troubles infectieux

La sensibilité aux infections (opportunistes, bactériennes ou virales) est augmentée chez les patients transplantés recevant un traitement immunosuppresseur.

Dans l'étude européenne, l'incidence de virémie ou syndrome à cytomégalovirus (CMV) était comparable entre les groupes de patients recevant 2g/jour (15,8%), 3g/jour (15,0%) de MMF, ou du placebo (13,3%). En revanche, les infections invasives à CMV étaient plus fréquentes dans le groupe MMF 3g/jour (6,9%) que dans les groupes MMF 2g/jour (3,0%) et placebo (2,4%) (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, Lancet 1995). L'influence du MMF sur l'augmentation du développement d'infections invasives à CMV chez des patients transplantés rénaux porteurs du virus a également été rapportée par ter Meulen et al. (Nephrol Dial Transplant 2000). De plus, les patients traités par MMF avaient plus souvent développé des infections à herpes simplex (14,5% avec 2g et 11,3% avec 3g) et à herpes zoster (6,7% avec 2g et 5% avec 3g) que les patients sous placebo (respectivement 6% et 1,8% pour herpes simplex et herpes zoster).

Dans les études américaine et tricontinentale, une virémie ou syndrome à CMV était rapporté chez 11 à 12% des patients dans chacun des trois groupes. Le pourcentage de patients ayant présenté une infection invasive à CMV était plus important dans le groupe traité par 3g/jour de MMF (10,9%) que dans le groupe recevant 2g/jour de MMF (8%) ou de l'azathioprine (6,1%). L'incidence d'infections à herpes simplex (16,7-19,1%) et à herpes zoster (5,2-6,1%) était comparable entre tous les groupes de traitement.

L'étude tricontinentale rapportait la survenue d'une infection généralisée chez 15 à 19% des patients dans les trois groupes de traitement ainsi que la survenue d'infections urinaires chez 42% des patients sous 3g de MMF, 41% des patients sous 2g de MMF et 35% des patients sous azathioprine (non significatif).

### 1.3.4. Lymphomes et tumeurs malignes

Les patients recevant un traitement immunosuppresseur comportant plusieurs produits en association, dont le Cellcept®, sont exposés à un risque accru de lymphome ou autres tumeurs malignes, notamment cutanées.

A un an suivant la transplantation, l'incidence globale des tumeurs dans les trois études cliniques contrôlées (européenne, américaine et tricontinentale) était de 1,8% dans le groupe placebo, 4,2% dans le groupe azathioprine et respectivement 4,8% et 3,2% dans les groupes MMF à 2 et 3g/jour (Cellcept, 1996). Des lymphomes et syndromes lymphoprolifératifs étaient survenus avec une fréquence de 0,6 et 1% chez les patients recevant respectivement 2 et 3g/jour de MMF, de 0,3% chez les patients recevant de

l'azathioprine et de 0% chez les patients sous placebo. 4 et 1,6% des patients traités respectivement par 2 et 3g/jour de MMF et 2,4% des patients traités par azathioprine ont développé un cancer cutané non mélanomateux. Enfin d'autres tumeurs malignes sont survenues chez 0,8 et 1,4% des patients sous 2 et 3 g/jour de MMF et chez 1,8% des patients sous azathioprine.

Globalement la survenue de cancer semblait plus importante chez les patients sous MMF mais le peu de cas recensés ne permettait pas de conclure quant à la significativité des résultats.

## **I.4. Pharmacocinétique**

### **I.4.1. Caractéristiques pharmacocinétiques de l'AMP**

#### **I.4.1.1. Absorption et distribution**

Après administration orale, le MMF est rapidement et massivement absorbé. Il subit une hydrolyse précoce et complète en AMP (substance active) par désestérification dans le tube digestif ; le MMF n'est pas mesurable dans le plasma après une administration orale (Fulton et Markham, *Drugs* 1996 ; Bullingham et al., *Clin Pharmacokinet* 1998). La biodisponibilité totale moyenne de l'AMP, évaluée chez 12 volontaires sains par le ratio des aires sous la courbe (AUC) obtenues après administrations orale et intraveineuse de MMF a été estimée à 94,1% ( $\pm 16,2\%$ ) (Bullingham et al., *J Clin Pharmacol* 1996). Dans le sang, l'AMP est contenu à 99,9% dans le plasma (Nowak et Shaw, *Clin Chem* 1995), ce qui fait du plasma le milieu de choix pour le dosage de l'AMP. Chez 12 volontaires sains, son volume apparent de distribution moyen était de 3,6 L/kg (Fulton et Markham, *Drugs* 1996). Des valeurs de volume de distribution dans le compartiment central de 98L chez des patients greffés *de novo* (Shum et al., *Br J Clin Pharmacol* 2003) et de 36L chez des patients greffés stables (Le Guellec et al., *Clin Pharmacokinet* 2004) ont été rapportées à l'issue d'analyses de pharmacocinétique de population.

L'AMP est fortement lié aux protéines plasmatiques et plus particulièrement à l'albumine. Aux concentrations plasmatiques usuelles d'AMP, le taux de fixation protéique moyen est de 97,5% (Shaw et al., *Ther Drug Monit* 1995 ; Bullingham et al., *Transplant Proc* 1996 ; Fulton et Markham, *Drugs* 1996 ; Bullingham et al., *Clin Pharmacokinet* 1998). Plusieurs facteurs tels que les concentrations d'albumine ou la fonction rénale, peuvent influencer la liaison de l'AMP aux protéines plasmatiques. Selon une étude *in vitro* réalisée par Nowak et Shaw (*Clin Chem* 1995), seule la fraction libre serait disponible pour inhiber l'IMPDH et serait donc responsable de l'effet pharmacologique du MMF.

#### **I.4.1.2. Métabolisme et excrétion**

Le métabolisme de l'AMP est essentiellement hépatique et rénal et il implique des mécanismes de phases I et II (figure 3).

Le métabolisme de phase I, minoritaire, fait intervenir un cytochrome P450 (principalement les isoformes CYP 3A et 2C) pour donner un métabolite M3 (Shipkova et al., Br J Pharmacol 1999) récemment identifié à Limoges par Picard et al. (Ther Drug Monit 2004) comme étant le 6-O-desméthyl de l'AMP. Ce métabolite serait secondairement glucuro-conjugué.

L'AMP est principalement métabolisé par des mécanismes de phase II impliquant 2 types d'enzymes :

- les UDP-glucuronosyltransférases, qui catalysent la formation de l'AMP- $\beta$ -phenyl-glucuronide (ou AMPG ; métabolite majoritaire inactif, fixé à l'albumine à 82%) et de l'AMP-acyl-glucuronide (ou AMPaG ; métabolite minoritaire actif (Schütz et al., Clin Chem 1999 ; Shipkova et al., Ther Drug Monit 2002))
- *les UDP-glucosyltransférases, qui catalysent la formation de l'AMP- $\beta$ -phenyl-glucoside (inactif) (Schütz et al., Clin Chem 1999) et d'un autre glucoside de l'AMP, supposé être l'AMP-acyl-glucoside. L'activité de ce dernier n'a fait l'objet d'aucune publication.*

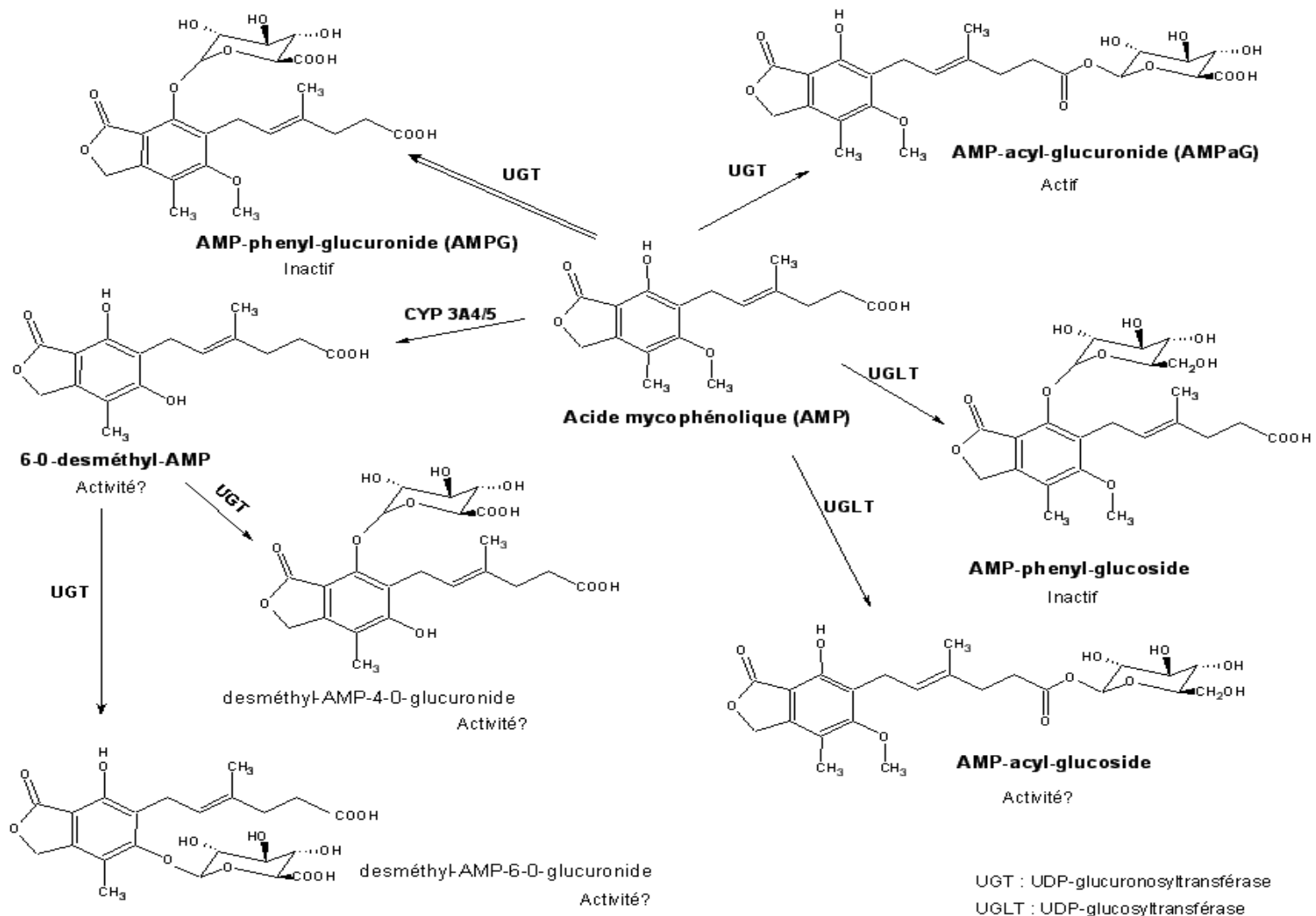


Figure 3 : Voies métaboliques de l'AMP. D'après Shipkova et al. (Br J Pharmacol 1999) et Picard et al. (Ther Drug Monit 2004).



Les métabolites glucuro-conjugués et gluco-conjugués sont excrétés par voie biliaire. Dans l'intestin, l'AMPG est partiellement déconjugué par la flore bactérienne et réabsorbé sous forme d'AMP, donnant lieu à un cycle entérohépatique se traduisant par un rebond sur les courbes des concentrations en fonction du temps (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998). Le cycle entérohépatique a été étudié au moyen de la cholestyramine, substance qui exerce son action thérapeutique en se fixant de manière non spécifique aux acides biliaires, ainsi qu'aux médicaments acides ou aux métabolites conjugués. L'administration de cholestyramine chez des volontaires sains recevant oralement une dose unique de MMF provoquait une diminution moyenne de la valeur de l'AUC d'AMP totale de 37% (10 à 61%, n=12), ce qui témoignait de l'importance de la contribution du cycle entérohépatique dans la PK de l'AMP (Bullingham et al. Clin Pharmacokinet 1998).

La valeur de l'AUC est la résultante du métabolisme hépatique de l'AMP et de son cycle entérohépatique. Ces processus peuvent être plus ou moins affectés au cours de certaines pathologies, faisant ainsi varier la biodisponibilité apparente totale du médicament.

93% de la dose de MMF administrée est éliminée par voie urinaire, majoritairement sous forme d'AMPG et minoritairement sous forme d'AMP et d'AMPaG, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. 6% de la dose est éliminée dans les fèces.

Après l'administration orale de 1,5g de MMF chez 12 volontaires sains, les valeurs moyennes de demi-vie d'élimination et de clairance apparente étaient respectivement 17,9h ( $\pm 6,5$ h) et 193 mL/min ( $\pm 48$  mL/min) (Bullingham et al., J Clin Pharmacol 1996). Une clairance moyenne de  $27,5 \pm 1,3$  L/h a été rapportée chez 10 patients greffés rénaux pendant le premier mois suivant la transplantation (Johnson et al. Clin Pharmacol Ther 1999). Chez des patients greffés rénaux stables, des valeurs de clairance apparente comprises entre 7,95 et 25,3 L/h (médiane=16,5 L/h) ont été décrites (Le Guellec et al., Clin Pharmacokinet 2004).

#### 1.4.1.3. Profils pharmacocinétiques

Après l'administration d'une dose unique de MMF par voie orale à des volontaires sains à jeun, la courbe des concentrations d'AMP en fonction du temps présente une augmentation rapide pour atteindre un pic environ 1 h après la prise. Ce pic est suivi d'une diminution rapide des concentrations et souvent d'un deuxième pic, qui apparaît généralement dans les 6 à 12h suivant l'administration. La présence de ce deuxième pic, également observé après l'administration de MMF par voie intraveineuse (Bullingham et al., J Clin Pharmacol 1996) est donc, au moins en partie, attribuable au cycle entérohépatique de l'AMPG décrit précédemment. Chez ces mêmes patients, une variabilité inter-individuelle modérée des indices d'exposition à l'AMP a été rapportée avec des coefficients de variation (CV) inférieurs à 50%, les plus faibles ayant été observés sur l'AUC (25 à 30%).

Les concentrations plasmatiques d'AMPG suivent la même évolution que celles de l'AMP avec un maximum retardé par rapport à celui de l'AMP. Les valeurs de concentrations d'AMPG sont élevées et les AUC totales sont 4 à 6 fois supérieures à celles de l'AMP.

#### I.4.2. Pharmacocinétique de l'AMP chez des patients transplantés rénaux et variabilité pharmacocinétique

##### I.4.2.1. Pharmacocinétique de l'AMP chez des patients adultes transplantés rénaux stables

Dans la revue de littérature concernant la PK de l'AMP, Bullingham et al. (Clin Pharmacokinet 1998) ont rapporté que chez 10 patients ayant reçu une greffe rénale depuis plus de 3 mois (ayant une fonction rénale stable), les valeurs moyennes des indices d'exposition de l'AMP ( $C_{\max} = 29,7 \pm 14,2$  mg/L ;  $T_{\max} = 1,2 \pm 0,8$  h ;  $AUC_{0-12} = 52,1 \pm 17,7$  mg.h/L) obtenus après administration orale d'une première dose de MMF (1,5g) étaient comparables aux valeurs moyennes observées chez 36 sujets sains ayant reçu une dose unique de 1,5g ( $C_{\max} = 32,8 \pm 8,2$  mg/L ;  $T_{\max} = 0,9 \pm 0,4$  h ;  $AUC_{0-12} = 51,5 \pm 15,1$  mg.h/L). En revanche, les concentrations d'AMPG étaient en moyenne deux fois plus importantes chez les transplantés rénaux ( $AUC_{0-12} = 420 \pm 140$  mg.h/L versus  $234 \pm 87$  mg.h/L chez les sujets sains). Cette différence pourrait être attribuée aux troubles de la fonction rénale liés à la greffe, les concentrations d'AMPG dépendant directement de la filtration glomérulaire.

Plusieurs études ont rapporté une importante variabilité inter-individuelle de la PK de l'AMP chez des patients transplantés rénaux stables (Bullingham et al., Transplant Proc 1996 ; Brunet et al., Transplant Int 2000, Le Guellec et al., Clin Pharmacokinet 2004).

##### I.4.2.2. Evolution de la pharmacocinétique de l'AMP en fonction du délai post-transplantation

Des études PK réalisées dans les premières semaines suivant la greffe chez des patients transplantés rénaux ont rapporté l'existence d'une importante variabilité intra- et inter-individuelle de la PK de l'AMP (Weber et al., J Am Soc Nephrol 1998 ; Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999; Wollenberg et al., Transplant Proc 1998 ; Shaw et al., Ther Drug Monit 2000).

Chez les transplantés rénaux, les caractéristiques PK diffèrent entre la période post-transplantation dite "précoce" (premier mois suivant la transplantation) et la période dite "stable" (3 mois après la greffe). En effet, pour des doses équivalentes de MMF, les valeurs d'AUC et de  $C_{\max}$  de l'AMP observées durant la période précoce sont 30 à 50% plus faibles que celles observées en période stable, l'augmentation de ces valeurs se faisant progressivement, sur plusieurs mois (Shaw et al., Ther Drug Monit 1995 ; Fulton et Markham, Drugs 1996 ; Pirsch et Sollinger, Ther Drug Monit 1996; Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998 ; Weber et al., Ther Drug Monit 1999).

L'origine de cette évolution n'est pas clairement établie mais plusieurs facteurs sont probablement en cause. Un défaut d'absorption du MMF en période post-transplantation immédiate chez des transplantés rénaux a été exclu puisqu'il a été montré que les valeurs d'AUC de l'AMP obtenues après administration orale de MMF étaient comparables à celles obtenues après l'administration d'une dose équivalente de MMF par voie intraveineuse (Bullingham et al., J Clin Pharmacol 1996 ; Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998; Shaw et al., Ther Drug Monit 1995). En revanche, l'augmentation de l'exposition à l'AMP pourrait s'expliquer par une diminution de sa clairance avec le temps. Plusieurs mécanismes impliquant des modifications de la fixation protéique et des interactions médicamenteuses ont ainsi été décrits.

Dans la période précoce suivant la greffe, certains facteurs tels que le retard de la prise du greffon ou des concentrations plasmatiques d'albumine faibles, pourraient être à l'origine d'une altération de la fixation de l'AMP aux protéines plasmatiques et ainsi, de l'augmentation de la fraction libre d'AMP. Ces perturbations se corrigeraient progressivement avec la reprise de la fonction rénale et la stabilisation de l'albuminémie. Ainsi, l'augmentation de la fixation protéique en période stable jouerait probablement un rôle dans l'évolution de la clairance de l'AMP. En effet, la diminution de la fraction libre d'AMP serait associée à une diminution du volume de distribution et de la clairance hépatique de l'AMP libre et engendrerait ainsi une augmentation des concentrations d'AMP total (Shaw et al., Ther Drug Monit 1995 ; Weber et al., Ther Drug Monit 1999). Une corrélation inverse entre l'évolution de la fraction libre d'AMP et les AUC<sub>0-12</sub> d'AMP au cours des trois premiers mois post-greffe a été mise en évidence chez des adultes ( $r=-0,506$  ;  $p<0,001$ ) (Kuypers et al., Ther Drug Monit 2003) et chez des enfants ( $r=-0,61$ ,  $p<0,02$ ) (Weber et al., Ther Drug Monit 1999) transplantés rénaux. Ces observations semblent en faveur de l'implication de la réduction de la fraction libre d'AMP dans la diminution du métabolisme de l'AMP en période stable.

La modulation de l'activité des glucuronyl-transférases par administration concomitante de médicaments et plus particulièrement de glucocorticoïdes pourrait également être impliquée. En effet, les glucocorticoïdes seraient des inducteurs des glucuronyl-transférases et la diminution de leurs doses avec le temps pourrait réduire le métabolisme de l'AMP et induire une augmentation des concentrations d'AMP (Cattaneo et al., Kidney Int 2002).

Enfin, la diminution des doses de CsA au cours du temps pourrait contribuer à la modification de la PK de l'AMP. En effet, il semblerait que la CsA abaisse les concentrations plasmatiques de l'AMP en agissant au niveau du cycle entérohépatique par inhibition de l'excrétion de l'AMPG des hépatocytes vers la bile (van Gelder et al., Ther Drug Monit 2001 ; van Gelder et al., Transplant Proc 2001). La CsA bloquerait le transport des métabolites conjuguées par inhibition de la P-glycoprotéine ou P-gp (van Gelder et al., Ther Drug Monit 2001, Sawamoto et al., J Heart Lung transplant 2001) et du MRP2 (multidrug resistance protein 2) (Shipkova et al., Ther Drug Monit 2001; Kobayashi et al., J Pharmacol Exp Ther 2004), tous

deux exprimés au niveau des membranes apicales des hépatocytes (Chan et al., Eur J Pharm Sci 2004). Une expérience récente a décrit la médiation du transport de l'AMPG par les MRP2 (Sallustio et al., Clin Exp Pharmacol Physiol 2004), mais aucune preuve que l'AMPG est un substrat de la P-gp n'a été apportée. Il se pourrait donc que la CsA agisse essentiellement par le biais des transporteurs MRP2. Ainsi, la diminution des doses de CsA pourrait être associée à une intensification du cycle entérohépatique et induire une augmentation des concentrations d'AMP.

#### 1.4.2.3. Influence de l'insuffisance rénale

Une étude comparative a été menée entre des sujets sains ayant une fonction rénale normale avec un taux de filtration glomérulaire supérieur à 80 mL/min/1,73m<sup>2</sup> et différents groupes de patients transplantés rénaux à l'état stable, présentant des fonctions rénales variables avec des taux de filtration glomérulaire allant de 80 à moins de 25 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1998). Tous les patients avaient reçu oralement une dose unique de 1g de MMF. Cette étude a montré que l'altération de la fonction rénale s'accompagnait d'une diminution de la C<sub>max</sub> d'AMP mais qu'elle influençait peu la clairance de l'AMP. La production d'AMPG était inchangée, ce qui s'accorde avec le fait que le foie soit le site prédominant du métabolisme de l'AMP. En revanche, la clairance de l'AMPG était positivement corrélée au taux de filtration glomérulaire (r<sup>2</sup>=0,905). Le rein étant la principale voie d'excrétion de l'AMPG, l'insuffisance rénale serait associée à une accumulation de ce métabolite. L'AUC moyenne d'AMPG chez les sujets ayant une fonction rénale normale était 3 à 5 fois plus faible que chez les patients présentant un taux de filtration glomérulaire <25 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (respectivement 287 ± 47 versus 1411 ± 608 µg.h/mL ; p<0,05).

Cette même étude incluait un groupe de 6 patients dialysés. Les pertes d'AMP et d'AGMP étaient négligeables sous hémodialyse (moins de 10% de la dose administrée) ce qui est cohérent avec la forte fixation protéique de ces deux molécules (respectivement 97% et 82% pour l'AMP et l'AMPG). En revanche, il semblerait que l'AMPG soit davantage éliminé lorsque les concentrations initiales sont importantes, ce qui pourrait s'expliquer par une saturation des sites de fixation protéique de l'AMPG (Bullingham et al., Clin Pharmacokinetics 1998). Aucun ajustement particulier des doses de MMF n'est préconisé dans le cas d'insuffisance rénale et/ou d'hémodialyse.

Si l'altération de la fonction rénale affecte peu la PK de l'AMP total, elle influence fortement la PK de la fraction libre d'AMP. Chez des patients transplantés rénaux souffrant d'une insuffisance rénale chronique et ayant une clairance de la créatinine <20 mL/min, les AUC d'AMP libre étaient deux fois plus importantes que celles d'un groupe contrôle de patients greffés stables avec une clairance de la créatinine <50 mL/min (Meier-Kriesche et al., Ther Drug Monit 2000). Chez 8 patients transplantés présentant un retard à la reprise de fonction du greffon, l'AUC d'AMPG, d'AMP libre et la fraction libre d'AMP ont été étudiées 1, 7, 14, 21 et 28 jours après le début du traitement par MMF (1,5g deux fois par jour). Les valeurs d'AUC

d'AMPG et d'AMP libre ainsi que la fraction libre d'AMP étaient maximales à 7 jours et diminuaient ensuite parallèlement aux taux sériques de créatinine, témoins d'une amélioration de la fonction rénale. Le taux de fixation protéique à 28 jours demeurait inférieur à la normale (Shaw et al., J Clin Pharmacol 1998 ; Meier-Kriesche et al., Ther Drug Monit 2000). Enfin, des études menées chez des adultes (Kuypers et al., Ther Drug Monit 2003) et chez des enfants (Weber et al., Ther Drug Monit 1999) transplantés rénaux au cours des trois premiers mois suivant la greffe ont mis en évidence des corrélations inverses entre la fraction libre d'AMP et le taux de filtration glomérulaire (respectivement  $r=-0,604$ ,  $p<0,001$  et  $r=-0,38$ ,  $p<0,05$  chez les adultes et les enfants). Les AUC<sub>0-12</sub> d'AMP libre étaient également inversement corrélées au taux de filtration glomérulaire ( $r=-0,691$ ,  $p<0,001$  et  $r=-0,49$ ,  $p<0,01$  chez les adultes et les enfants respectivement). L'insuffisance rénale est donc associée à une diminution de la fixation protéique de l'AMP induisant une augmentation des concentrations d'AMP libre. Plusieurs phénomènes pourraient être impliqués dans cette diminution de la fixation de l'AMP à l'albumine :

- la compétition entre l'AMP et l'AMPG pour la fixation sur l'albumine. *In vitro*, Nowak et Shaw (Clin Chem 1995) ont mis en évidence une augmentation de la fraction libre d'AMP de 1,26% à 3,57% en ajoutant des concentrations croissantes d'AMPG (de 0 à 800 mg/L) dans un pool plasmatique contenant de l'AMP. Ainsi la fixation de l'AMP à l'albumine serait sous la dépendance des concentrations respectives d'AMP et d'AMPG. L'accumulation d'AMPG générée par une altération de la fonction rénale induirait une moindre fixation de l'AMP sur ses sites de liaison à l'albumine et l'augmentation de sa fraction libre (Kaplan et al., J Clin Pharmacol 1999 ; Meier-Kriesche HU et al., Ther Drug Monit 2000). D'autres travaux (Morissette et al., Ther Drug Monit 2001) ont montré que le taux de fixation protéique de l'AMP mesuré dans le sérum de patients transplantés rénaux ne présentant pas d'insuffisance rénale était comparable à celui mesuré dans des sérums vierges surchargés avec de l'AMP à une concentration pharmacologique ( $98,5\pm 0,43\%$  contre  $98,3\pm 0,73\%$ ). Les auteurs concluaient que chez des patients greffés rénaux ayant une fonction rénale normale et recevant un traitement immunosuppresseur standard, l'AMPG ne déplaçait pas l'AMP de ses sites de fixation à l'albumine. Cependant, en théorie il existe toujours une compétition entre deux acides faibles pour la fixation à l'albumine, résultant ici en un équilibre "normal" fraction libre/ fraction liée de l'AMP.
- des facteurs physiologiques liés à la fonction rénale tels que la concentration d'albumine, l'urémie ou le pH plasmatique (Kaplan et al., J Clin Pharmacol 1999 ; Meier-Kriesche et al., Ther Drug Monit 2000 ; Weber et al., J Am Soc Nephrol 1998). Les travaux de Nowak et Shaw (Clin Chem 1995) ont montré que le taux d'albumine intervenait directement sur la fraction d'AMP liée avec une diminution de la fraction libre d'AMP de  $53,3\pm 2\%$  à  $0,92\pm 0,05\%$  pour des concentrations croissantes

d'albumine de 0,67 à 69 g/L. Une hypoalbuminémie occasionnée par une mauvaise fonction rénale pourrait ainsi participer à la diminution de la fixation protéique. Une étude récente (Atcheson et al., Ther Drug Monit 2004) réalisée chez 42 transplantés rénaux traités par un régime immunosuppresseur incluant du MMF (2g/jour) a montré que le pourcentage d'AMP libre était corrélé avec les concentrations d'albumine ( $p < 0,0001$ ). Cette étude a permis de définir une valeur seuil des concentrations d'albumine de 31 g/L en dessous de laquelle étaient associées des fractions d'AMP libre élevées ( $\geq 3\%$ ).

#### 1.4.2.4. Insuffisance hépatique

La PK de l'AMP et de son métabolite (l'AMPG) a été étudiée chez 18 patients présentant une cirrhose hépatique avec insuffisance hépatique de sévérité variable (faible, modérée ou sévère) et 6 patients contrôles (individus sains) après administration d'une dose unique de 1g de MMF (Parker et al., J Clin Pharmacol 1996, Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998). Aucune variation significative des indices d'exposition de l'AMP et de l'AMPG en fonction du degré de sévérité de l'insuffisance hépatique n'a été mise en évidence. En revanche, la clairance urinaire de l'AMPG chez les patients avec une insuffisance hépatique sévère était deux fois plus élevée que celle observée chez les patients des autres groupes. Les auteurs suggéraient qu'une insuffisance hépatique sévère induirait une altération de la glucuroconjugaison hépatique de l'AMP et, en compensation, une augmentation de la glucuroconjugaison rénale. Une autre hypothèse peut également être proposée. En effet, la diminution des taux plasmatiques d'albumine observée en cas d'insuffisance hépatique sévère pourrait être à l'origine d'une augmentation de la fraction libre d'AMPG se traduisant par une augmentation de sa filtration glomérulaire.

#### 1.4.2.5. Pharmacocinétique de l'AMP dans les populations pédiatriques

Les profils PK observés chez des enfants transplantés rénaux après administration orale de MMF sont comparables à ceux obtenus chez les adultes (Weber et al., Ther Drug Monit 1999 ; Jacqz-Aigrain et al., Pediatr Nephrol 2000). Une étude PK menée dans la période précoce (3 premières semaines) suivant une greffe rénale a montré que les valeurs d'AUC de l'AMP total observées chez des enfants ayant reçu 600 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle de MMF étaient comparables à celles observées chez des adultes ayant reçu 1g de MMF (Weber et al., J Am Soc Nephrol 1998). Comme chez l'adulte, la PK de l'AMP chez l'enfant est caractérisée par une importante variabilité intra- et inter-individuelle et les valeurs d'AUC augmentent avec la période post-transplantation (Weber et al. Ther Drug Monit 1999 ; Jacqz-Aigrain, Pediatr Nephrol 2000 ; Weber et al., J Am Soc Nephrol 2002). Chez 17 enfants transplantés rénaux traités par MMF (600 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle deux fois par jour) ayant fourni des cinétiques 7, 21 jours, 3 et 6 mois après la greffe, les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP total à 3 mois (médiane = 65,1 mg.h/L, intervalle : 32,6-114 mg.h/L) étaient deux fois plus élevées qu'à 3 semaines (médiane = 32,4 mg.h/L, intervalle : 13,9-57 mg.h/L) (Weber et al., Ther Drug Monit

1999). Une diminution de 35% de la fraction libre d'AMP était parallèlement observée en période stable alors que l'AUC<sub>0-12</sub> de l'AMP libre ne différait pas significativement en fonction du délai post-greffe.

#### I.4.2.6. Immunosuppresseurs associés

##### I.4.2.6.1. Inhibiteurs de la calcineurine

Le MMF est classiquement administré en association avec un inhibiteur de la calcineurine (tacrolimus ou CsA) et des corticoïdes, dans les semaines qui suivent la transplantation. L'existence d'interactions pharmacocinétiques entre l'AMP et les traitements immunosuppresseurs concomitants a été décrite.

Smak Gregoor et al. (Nephrol Dial Transplant 1999) ont montré que les concentrations résiduelles d'AMP étaient significativement plus faibles chez des patients recevant un traitement incluant du MMF (1g deux fois par jour), de la CsA et de la prednisone que chez des patients recevant seulement du MMF (à même posologie) et de la prednisone ( $1,98 \pm 0,12$  mg/L versus  $4,38 \pm 0,40$  mg/L,  $p < 0,0001$ ). De plus, cette même équipe a étudié l'influence de l'arrêt de la CsA chez des patients greffés rénaux stables sous trithérapie immunosuppressive (MMF, CsA et prednisone) et a mis en évidence une augmentation significative des taux résiduels d'AMP chez ces patients par rapport aux patients dont le traitement initial avait été maintenu (Smak Gregoor et al., Transplantation 1999). Les auteurs ont alors suggéré une interaction PK entre la CsA et l'AMP, résultant en une augmentation de l'exposition à l'AMP. D'autres études ont décrit une influence de la CsA sur la PK de l'AMP et de ses métabolites (Pou et al., Ther Drug Monit 2001 ; van Gelder et al., Ther Drug Monit 2001 ; Shipkova et al., Ther Drug Monit 2001). Une corrélation négative et significative ( $r^2 = 0,23$ ,  $p < 0,02$ ) entre les AUC d'AMP normalisées par la dose et les AUC de CsA a également été décrite chez des enfants transplantés rénaux (Filler et al., Ther Drug Monit 2001).

Les résultats d'une étude menée par Zucker et al. (Transplant Proc 1997) ont montré que la PK de l'AMP était différente en fonction de l'immunosuppresseur associé. En effet, pour les mêmes doses de MMF administrées, les concentrations résiduelles et les valeurs de l'AUC de l'AMP total obtenues chez des patients transplantés rénaux recevant du tacrolimus étaient significativement plus élevées que celles obtenues chez les patients recevant de la CsA. En revanche, les concentrations d'AMPG étaient plus faibles chez les patients traités par tacrolimus ce qui laissait envisager la possibilité d'un effet inhibiteur du tacrolimus sur la conjugaison de l'AMP en AMPG. Par la suite, la même équipe a montré, *in vitro*, que le tacrolimus était un inhibiteur compétitif puissant des UDP-glucuronosyltransférases (Zucker et al., Ther Drug Monit 1999). Ces résultats semblaient expliquer les plus fortes concentrations d'AMP observées lorsque le MMF était administré avec le tacrolimus qu'avec la CsA. Cependant les auteurs ont conclu à une interaction entre le tacrolimus et l'AMP en comparant les concentrations plasmatiques mesurées chez des patients recevant un traitement associant

soit de la CsA soit du tacrolimus mais ils n'ont fait état d'aucune comparaison avec un groupe "contrôle" de patients ne recevant que du MMF. Une autre étude (Filler et al., *Pediatr Nephrol* 2000) portant sur 3 groupes d'enfants transplantés rénaux traités par l'association CsA/MMF/corticostéroïdes (n=15), tacrolimus/MMF/corticostéroïdes (n=14) ou MMF/corticostéroïdes (n=13) a décrit des AUC d'AMP normalisées par la dose significativement supérieures chez les enfants sous tacrolimus ( $0,122 \pm 0,038 \mu\text{g.h.m}^2/\text{mL.mg}$ ) comparées à celles observées chez les enfants sous CsA ( $0,067 \pm 0,037 \mu\text{g.h.m}^2/\text{mL.mg}$ ;  $p < 0,002$ ) et chez les enfants ne recevant pas d'inhibiteur de la calcineurine ( $0,084 \pm 0,031 \mu\text{g.h.m}^2/\text{mL.mg}$ ;  $p < 0,002$ ). Il est à noter que les variabilités intra-groupes étaient élevées.

Les travaux de van Gelder et al. (*Ther Drug Monit* 2001) réalisés sur le rat ont montré que les concentrations d'AMP et d'AMPG étaient comparables selon que le MMF était administré seul ou en association avec le tacrolimus. En revanche, la présence de CsA induisait une diminution des concentrations d'AMP et une augmentation de celles d'AMPG. Les profils PK de l'AMP obtenus dans le groupe recevant de la CsA ne décrivaient pas de second pic de concentration, contrairement au groupe recevant un placebo et au groupe recevant du tacrolimus. L'impact de la CsA sur le cycle entérohépatique a été mis en évidence en comparant les valeurs des  $AUC_{0-2h}$  et des  $AUC_{2-24h}$  entre les différents groupes. Les valeurs des  $AUC_{2-24h}$  mesurées dans le groupe recevant de la CsA étaient deux fois plus faibles que celles mesurées dans le groupe recevant du MMF seul alors que les valeurs des  $AUC_{0-2h}$  étaient similaires. L'hypothèse d'une interaction de la CsA au niveau du cycle entérohépatique par inhibition de l'excrétion de l'AMPG des hépatocytes vers la bile serait la plus probable (van Gelder et al., *Ther Drug Monit* 2001 ; van Gelder et al. *Transplant Proc* 2001). Les mécanismes supposés de cette interaction ont déjà été décrits dans le paragraphe I.4.2.2.

Ainsi, il est admis que la CsA diminue l'exposition à l'AMP mais l'influence du tacrolimus sur les concentrations d'AMP reste controversée.

#### I.4.2.6.2. Sirolimus

La littérature fait état de peu d'études concernant la pharmacocinétique de ces deux immunosuppresseurs associés et aucune interaction n'est clairement établie.

Dans une étude multicentrique prospective, randomisée, incluant deux groupes de patients greffés rénaux traités soit par l'association MMF/CsA/corticostéroïdes (n=38) soit par l'association MMF/sirolimus/corticostéroïdes (n=40), les concentrations résiduelles d'AMP, mesurées au cours des 3 premiers mois suivant la greffe, étaient significativement plus élevées pendant les 5 premières semaines chez les patients sous sirolimus ( $p < 0,05$ ) (Kreis et al., *Transplantation* 2000). Les valeurs précises des concentrations résiduelles d'AMP n'étaient pas rapportées mais l'analyse du graphique présentant leur évolution au cours du temps suggérait une tendance à l'augmentation des concentrations résiduelles d'AMP dans le groupe CsA



durant les 40 premiers jours post-greffe (approximativement de 1,5 mg/L à 3 mg/L) alors qu'elles semblaient constantes dans le groupe sirolimus (fluctuations entre 3,5 et 4,5 mg/L).

Des travaux récents ont montré que, pour des mêmes doses de MMF, l'exposition à l'AMP serait supérieure chez des patients sous sirolimus comparés à des patients sous CsA. Une étude réalisée chez 45 adultes transplantés rénaux comparait deux groupes de patients traités par sirolimus ou CsA et MMF (1g deux fois par jour), daclizumab, corticostéroïdes. A 1 et 6 mois post-greffe, les AUC<sub>0-12</sub> observées chez les patients sous CsA (32,4±18,6 mg.h/L et 40,1±11,3 mg.h/L, respectivement à 1 et 6 mois) étaient réduites par rapport à celles observées chez les patients traités par sirolimus (49,2±18,9 mg.h/L et 67,8±25,9 mg.h/L, respectivement à 1 et 6 mois) mais aucune donnée statistique n'était donnée (Pescovitz et al., Am J Transplant 2004). Une deuxième étude comparait la PK de l'AMP chez 70 transplantés rénaux traités par sirolimus, MMF (1g deux fois par jour) et corticostéroïdes avec celle observée chez 18 patients recevant de la CsA, du MMF et des corticostéroïdes à différents délais post-greffe (15, 30, 60 et 90 jours). L'exposition à l'AMP était significativement supérieure dans le groupe sirolimus à toutes les périodes post-greffe considérées (Büchler et al., Am J Transplant 2004).

Ainsi, les plus fortes concentrations d'AMP observées chez les patients sous sirolimus comparés aux patients sous CsA peuvent en partie s'expliquer par l'interaction de la CsA avec l'AMP, responsable d'une diminution de l'exposition à l'AMP.

#### I.4.2.6.3. Corticostéroïdes

Un effet inducteur des corticoïdes sur l'activité des UDP-glucuronosyltransférases hépatiques a été décrit au cours d'études réalisées sur microsomes de rats (Zhu et al., Biochem Pharmacol 1996) et sur cultures d'hépatocytes isolés (Mc Millan et al., Mutat Res 1991). Les effets de la diminution des doses de corticoïdes au cours du temps sur la PK de l'AMP et de l'AMPG ont été étudiés chez des transplantés rénaux traités par un régime immunosuppresseur associant du MMF et de la CsA (Cattaneo et al., Kidney Int 2002). Les valeurs d'AUC/dose d'AMP observées à 1 mois suivant la greffe étaient significativement plus faibles que celles observées à 6 mois, période à laquelle les patients recevaient de faibles doses de corticoïdes. Enfin, l'arrêt des corticoïdes s'accompagnait d'un abaissement de la clairance apparente de l'AMP et des concentrations résiduelles d'AMPG résultant en une augmentation de l'exposition à l'AMP. Il semblerait donc que les corticostéroïdes influent sur la PK de l'AMP par modulation de sa glucuro-conjugaison. Toutefois, la baisse des posologies de corticoïdes coïncide avec la baisse des doses de ciclosporine, l'amélioration fonctionnelle du greffon et l'augmentation des concentrations plasmatiques d'albumine. Il est donc très difficile de conclure quant au rôle propre des corticoïdes ou de mettre en place un essai clinique permettant de répondre à cette question.

#### I.4.2.7. Autres interactions pharmacocinétiques

L'effet de la prise de nourriture sur la PK de l'AMP a été étudié chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et ayant reçu une dose unique de 2g de MMF (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998). L'administration d'un repas standard contenant 46,5% de matières grasses induisait un allongement du  $T_{max}$  (supérieur à 1h) et une diminution de la  $C_{max}$  d'environ 25% sans aucune modification de la valeur de l' $AUC_{0-24}$ . Les valeurs de  $C_{max}$  et d' $AUC_{0-24}$  d'AMPG étaient quant à elles respectivement augmentées de 30% et 14% par rapport à une administration à jeun.

L'administration d'un traitement antiacide (contenant des hydroxydes de magnésium et hydroxydes d'aluminium) chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde provoquait une diminution de l'absorption digestive d'une dose unique de 2g de MMF. La  $C_{max}$  de l'AMP était abaissée de 37% et son AUC était inférieure de 15% à celle observée sans antiacide. Les concentrations d'AMPG présentaient une réduction comparable (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998; Fulton et Markham, Drugs 1996).

L'administration concomitante d'une dose unique de MMF (1g) et d'aciclovir chez des sujets sains n'a conduit à aucune modification de la PK de l'AMP (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998; Gimenez et al., Clin Pharmacokinet 2004) mais une étude a décrit une augmentation d'environ 10% des valeurs d'AUC de l'AMPG (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998). Une étude récente a montré que les  $AUC_{\infty}$  d'AMPG étaient réduites de 12% après l'administration de doses uniques de 1g de MMF et de 2g de valaciclovir (pro-drogue de l'aciclovir) chez des sujets sains (Gimenez et al., Clin Pharmacokinet 2004). Ces modifications pharmacocinétiques sont minimes et ne sont pas considérées comme cliniquement significatives. Les paramètres PK de l'AMP et de l'AMPG observés chez des patients greffés rénaux stables après l'administration d'une dose unique de 1,5 mg de MMF par voie orale n'étaient pas modifiés par l'administration concomitante de ganciclovir (5mg/kg, voie intraveineuse) (Wolfe et al., Pharmacotherapy 1997). En cas d'insuffisance rénale, il se pourrait que les antiviraux et l'AMPG entrent en compétition au niveau de la sécrétion tubulaire entraînant ainsi l'augmentation de leurs concentrations plasmatiques.

Certains médicaments réduiraient la quantité d'AMP disponible pour la réabsorption digestive en interrompant le cycle entérohépatique, comme la cholestyramine qui piège l'AMPG dans la lumière digestive (Fulton et Markham, Drugs 1996). Ainsi, chez un volontaire sain, un pré-traitement de 4 jours par la cholestyramine provoque une diminution de l'AUC d'AMP de 37% (10 à 61%) après administration d'une dose unique de MMF (Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998). Le métronidazole, quant à lui agirait par inhibition des bactéries anaérobies intestinales qui déconjuguent l'AMPG en AMP (Shaw et al., Ther Drug Monit 2000).

Une étude, réalisée *in vitro* sur des microsomes humains de foie et de rein, a mis en évidence l'effet inhibiteur de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la glucuro-

conjugaison de l'AMP (Vietri et al., Eur J Clin Pharmacol 2000) mais aucune interaction *in vivo* n'a été décrite.

Aucune interaction médicamenteuse impliquant les cytochromes P450 (voie mineure du métabolisme de l'AMP) n'a été rapportée.

### I.4.3. Modélisation pharmacocinétique de l'AMP

La plupart des études rapportées dans la littérature décrivent la PK de l'AMP selon une approche non-compartmentale. Les valeurs des indices d'exposition ( $AUC$ ,  $C_0$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ) et des paramètres PK (clairance apparente, volume apparent de distribution, demi-vie) sont estimées au moyen de formules simples à partir des valeurs des concentrations mesurées. Mais cette analyse est limitée.

Une autre approche consiste à décrire les différents aspects de la pharmacocinétique d'un médicament au moyen d'un modèle PK, défini par un ensemble d'équations mathématiques. Le modèle PK permet de mieux connaître le comportement cinétique d'un médicament et de mieux en quantifier les différentes étapes ; il peut être utilisé pour prédire ce comportement et essayer d'ajuster la prescription. La littérature fait état de peu de modèles capables de décrire la PK de l'AMP.

Dans la période stable suivant une greffe rénale, des profils classiques sont généralement observés, avec un pic initial de concentration entre 20min et 2h, très souvent suivi d'un pic secondaire situé entre 6h et 11h après l'administration du MMF, lié au cycle entérohépatique. Un modèle de circulation entérohépatique a été décrit pour l'AMP par Funaki (J Pharm Pharmacol 1999). Ce modèle était constitué de trois compartiments représentant l'intestin, la vésicule biliaire et le reste de l'organisme (compartiment central). Le rebond entérohépatique était décrit en considérant un relargage biliaire vers l'intestin sous forme de bolus. Ce modèle a servi à l'analyse PK de l'AMP (mise en œuvre dans le logiciel NONMEM) à partir de profils PK issus de patients transplantés rénaux stables et de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. L'auteur rapportait une bonne adéquation entre les valeurs de concentrations observées et celles estimées par le modèle et précisait que le deuxième pic imputable au cycle entérohépatique de l'AMPG était bien défini. Cependant, cette étude ne fournissait aucune valeur de biais ni de précision de l'estimation et six exemples seulement (sur 270 cinétiques disponibles) de l'ajustement du modèle aux valeurs expérimentales étaient montrés. L'évaluation de la performance de ce modèle semble donc difficile.

Pour décrire la PK de l'AMP chez des patients transplantés rénaux stables, Le Guellec et al. (Clin Pharmacokinet 2004) ont envisagé des modèles à un ou deux compartiments avec absorption d'ordre 0 ou 1. Un modèle à deux compartiments avec une absorption d'ordre 0 a été retenu pour l'analyse PK car il permettait le meilleur ajustement aux données expérimentales. Cependant, la composante additive de l'erreur résiduelle était élevée, certains profils n'étaient pas correctement modélisés et le modèle ne permettait pas de décrire le deuxième pic de concentration observé chez certains patients.

Des études cliniques menées dans les premières semaines suivant la greffe ont montré que les cinétiques plasmatiques d'AMP en fonction du temps étaient assez complexes et instables (Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999, Shum et al., Br J Clin Pharmacol 2003).

Les profils PK présentait des délais d'absorption variables, des processus d'absorption parfois complexes avec un ou plusieurs pics de concentration et des profils PK atypiques étaient également rapportés. L'équipe de Tett (Shum et al., Br J Clin Pharmacol, 2003) a mené une analyse PK de population chez des patients transplantés rénaux au cours du premier mois post-greffe. Devant la complexité des profils PK observés, de nombreux modèles ont été testés. Des modèles à un, deux et trois compartiments ont été considérés. Différentes approches ont été envisagées pour décrire le processus d'absorption de l'AMP : modèles avec absorption d'ordre 1 avec et sans "temps de latence" (ou lagtime), modèles avec absorption dépendante du temps tels que Emax et la loi de Weibull, modèle avec absorption "séquentielle" constituée de deux phases d'absorptions d'ordre 1 successives. Deux modèles décrivant une clairance dépendante du temps et un modèle de cycle entérohépatique de l'AMPG ont également été testés. Finalement, c'est un modèle à deux compartiments avec une absorption d'ordre 1 et un temps de latence qui décrivait le mieux les données expérimentales. La plupart des autres modèles testés ne donnaient pas de résultats satisfaisants en terme d'amélioration de l'ajustement et de stabilité. Cette étude a mis en évidence la grande diversité des profils PK de l'AMP observés dans les premières semaines suivant la transplantation et la difficulté de les modéliser. Les auteurs ont suggéré le recours à des modèles plus complexes pour décrire convenablement le comportement PK de l'AMP.

En résumé, deux modèles PK ont été développés et "validés" pour l'analyse PK de l'AMP chez des patients greffés rénaux stables mais aucun modèle n'est actuellement disponible pour décrire précisément la pharmacocinétique de l'AMP au cours de la période post-transplantation précoce (1<sup>er</sup> mois). Or, l'exposition à l'AMP durant cette phase initiale est déterminante en terme d'efficacité du traitement immunosuppresseur (Kiberd et al., Am J Transplant 2004). Il semble donc nécessaire de mettre au point des modèles performants pour la modélisation PK de l'AMP durant cette période précoce et de développer des outils visant à optimiser l'administration de ce médicament.

## II. Suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de l'AMP

### II.1. Généralités sur le STP

#### II.1.1. Définition

La dernière définition du STP proposée par l'Association Internationale de Suivi Thérapeutique et de Toxicologie Clinique (l'IATDMCT) est la suivante : "le STP est une spécialité clinique pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose des médicaments pour lesquels le bénéfice clinique du STP a été démontré dans la population générale ou dans une population particulière. Il repose sur des informations pharmacogénétiques, démographiques et cliniques *a priori* et/ou sur la mesure *a posteriori* des concentrations sanguines de médicaments (suivi pharmacocinétique) ou des composés endogènes de substitution ou des paramètres biologiques d'effet (suivi pharmacodynamique)" (Marquet, Communication personnelle 2003).

Les deux buts principaux du STP sont :

- de diminuer le taux d'échecs thérapeutiques, liés à une mauvaise observance ou à une dose insuffisante ;
- de réduire la fréquence des effets indésirables et/ou toxiques des médicaments liés à une dose excessive.

#### II.1.2. Pré-requis pour le STP

Le STP d'un médicament est justifié si :

- sa relation concentration-effet pharmacologique est meilleure que sa relation dose-effet,
- sa relation dose-concentration présente une grande variabilité inter-individuelle,
- il présente une zone thérapeutique étroite,
- sa réponse pharmacologique est difficilement accessible par une mesure de l'effet,
- il présente des interactions médicamenteuses.

De plus, il est préférable que sa variabilité intra-individuelle à court terme soit faible ou modérée.

### II.1.3. Individualisation de posologie

L'individualisation de posologie consiste à ajuster les doses de médicament administré à chaque patient. Ainsi, pour obtenir l'effet thérapeutique maximal d'un médicament sans risque de toxicité, il est nécessaire de déterminer le schéma posologique optimal (dose et horaire d'administration) qui permettra de maintenir les concentrations du médicament dans une zone définie.

Les conditions nécessaires à la réalisation de l'adaptation posologique d'un médicament sont de disposer : (i) des objectifs cliniques en termes de fenêtre thérapeutique ; (ii) de modèles performants pour décrire son comportement PK ; (iii) de méthodes fiables pour déterminer son meilleur index d'exposition (Iliadis, Informatique et santé 1989).

## II.2. Revue de littérature sur le STP du MMF

Lors de l'introduction du MMF sur le marché, l'administration d'une dose quotidienne fixe de MMF pour tous les patients était recommandée et aucun STP particulier n'était préconisé. Cependant, plusieurs arguments aujourd'hui remettent en cause ce schéma d'administration : les cliniciens sont confrontés à des problèmes de tolérance du médicament, responsables soit de diminution de doses soit d'arrêt de traitement ; l'utilisation du MMF chez les enfants requiert souvent un ajustement des doses ; l'association du MMF avec d'autres immunosuppresseurs que la CsA ainsi que les stratégies récentes de diminution de l'exposition aux anti-calcineurines à long terme, rendent nécessaire la prise en compte de l'exposition individuelle.

De plus, l'AMP répond à la plupart des critères qui justifient le recours au STP. Une importante variabilité inter-individuelle de la PK de l'AMP a été rapportée chez des adultes (Shaw et al., J Clin Pharmacol 2000 ; Weber et al., J Am Soc Nephrol 1998 ; Wollenberg et al., Transplant Proc 1998 ; Bulingham et al., Clin Pharmacokinet 1998) et chez des enfants (Weber et al., Ther Drug Monit 1999) transplantés rénaux, ainsi que chez des patients greffés cardiaques (Meiser et al. J Heart Lung Transplant 1999, DeNefrio et al., J Heart Lung Transplant 2000) ou hépatiques (Jain et al., J Clin Pharmacol 2001). Pour des doses fixes de MMF, il a été montré que l'AUC de l'AMP pouvait varier d'un facteur de 1 à 10 (Shaw et al. J Clin Pharmacol 2000). Le MMF présente des interactions médicamenteuses, notamment avec les immunosuppresseurs qui lui sont associés, responsables de modification de l'exposition à l'AMP. L'efficacité du MMF se quantifie par l'incidence des rejets aigus et sa tolérance par la survenue d'effets indésirables qui lui sont propres. Il convient donc d'ajuster la dose avant que de tels événements ne surviennent. Enfin, de nombreuses études ont été conduites afin d'évaluer la relation entre les concentrations plasmatiques d'AMP et la fréquence de survenue de rejets aigus et/ou d'effets indésirables, en vue de définir la zone thérapeutique de ce médicament.

## II.2.1. Etudes de la relation concentrations/efficacité

Plusieurs travaux ont étudié la relation entre les indices d'exposition à l'AMP et l'efficacité, en terme d'incidence de rejet aigu, du traitement par MMF en transplantation rénale, cardiaque et plus récemment en transplantation hépatique.

### II.2.1.1. Transplantation rénale

L'étude pilote ayant montré une relation significative entre l'AUC de l'AMP et la survenue de rejet aigu en transplantation rénale a été menée par Takahashi et al. (Transplant Proc 1995). Cette étude prospective incluait 32 patients d'origine japonaise receveurs d'une première greffe rénale et répartis en 3 groupes selon la dose de MMF qui leur était administrée (1, 2 ou 3g par jour). Tous recevaient de la CsA et des stéroïdes en traitements associés. Cette étude a mis en évidence une relation entre la dose de MMF administrée et l'incidence de rejet aigu dans les 3 mois qui suivaient la transplantation. Un épisode de rejet a été observé chez 75%, 44% et 20% des patients recevant respectivement 1, 2 et 3g/jour de MMF. Une relation entre les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP mesurées à 3 semaines post-greffe et l'incidence des épisodes de rejet a été montrée : les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> inférieures à 40 mg.h/L étaient associées à une incidence de rejet plus élevée (13 patient sur 19) que les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> ≥ 40 mg.h/L (1 patient sur 12). La méthode analytique utilisée pour le dosage de l'AMP n'était pas précisée.

Une étude en double aveugle, prospective, randomisée avec contrôle de la concentration a été réalisée chez des patients greffés rénaux pour évaluer la relation entre des valeurs d'AUC d'AMP pré-déterminées et le risque de rejet aigu 6 mois après la transplantation (Hale et al., Clin Pharmacol Ther 1998 ; van Gelder et al., Transplantation 1999). Les patients recevaient un régime immunosuppresseur associant de la CsA, de la prednisone et du MMF à des doses quotidiennes adaptées de façon à obtenir des valeurs d'AUC cible d'AMP définies. Ainsi les patients étaient répartis en 3 groupes : AUC basse (16,1 mg.h/L), AUC intermédiaire (32,2 mg.h/L) et AUC haute (60,6 mg.h/L). Ces valeurs d'AUC avaient été choisies sur la base de précédentes études, pour diminuer l'incidence de rejet de respectivement 5%, 49% et 89% par rapport au taux de rejet "habituel", sous MMF. L'ajustement des doses de MMF était réalisé à partir des valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> (concentrations d'AMP mesurées par HPLC-UV et AUC déterminées par la méthode des trapèzes jusqu'à 21 jours et par régression linéaire multiple au-delà) obtenues 3, 7, 11, 21 et 28 jours et 8, 12, 16 et 20 semaines après le début du traitement. Pendant les 6 mois de suivi, 27 patients sur 150 (18%) ont présenté un épisode de rejet aigu prouvé par biopsie, soit 27,5% dans le groupe AUC basse, 14,9% dans le groupe AUC intermédiaire et 11,5% dans le groupe AUC haute. L'incidence était plus élevée dans le groupe AUC basse que dans les groupes AUC intermédiaire et haute combinés (p=0,043). L'étude par régression logistique des facteurs liés au rejet retrouvait une relation significative avec la médiane des valeurs individuelles de ln(AUC<sub>0-12</sub>) (p<0,001) et avec celle de ln(C<sub>0</sub>) (p<0,01), mais pas avec la dose quotidienne moyenne de MMF (p=0,082).



Pillans et al. (Clin Biochem 2001) ont conduit une étude rétrospective chez 27 adultes transplantés rénaux traités par de la CsA, de la prednisolone et du MMF (2g/jour) visant à rechercher une relation entre les valeurs d'AUC d'AMP mesurées durant la première semaine suivant la transplantation et la survenue de rejet aigu dans le premier mois. 12 patients (44%) avaient présenté un rejet aigu prouvé par biopsie. Les AUC d'AMP (déterminées en HPLC-UV) observées chez les patients sans rejet ( $35,1 \pm 2,18$  mg.h/L) étaient significativement plus élevées que celles obtenues chez les patients avec rejet ( $27,6 \pm 1,98$  mg.h/L ;  $p=0,02$ ). En revanche, les concentrations résiduelles d'AMP ne différaient pas significativement entre les 2 groupes ( $p=0,21$ ). L'incidence de rejet aigu était deux fois moins importante chez les patients avec une AUC d'AMP  $>30$  mg.h/L et une concentration résiduelle médiane de CsA  $>175$   $\mu$ g/L (27%) que chez ceux avec une AUC d'AMP  $<30$  mg.h/L et une concentration résiduelle médiane de CsA  $<175$   $\mu$ g/L (56%).

Une étude prospective récente a montré que l'exposition à l'AMP à 3 jours post-greffe était prédictive du rejet aigu de greffe, chez 94 adultes transplantés rénaux traités par de la CsA, du MMF (1g deux fois par jour), de la prednisone avec ( $n=72$ ) ou sans basiliximab (Kiberd et al., Am J Transplant 2004). Au cours des 3 premiers mois suivant la greffe, 14 patients (soit 15%) avaient présenté un épisode de rejet aigu. L'analyse de courbes "receiver operating characteristic" (ROC) a montré que les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> ( $p=0,007$ ) et de C<sub>2</sub> ( $p=0,025$ ) d'AMP à J3 étaient prédictives de l'incidence de rejet aigu. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 82% et 64% pour une AUC<sub>0-12</sub> de 22 mg.h/L mesurée par HPLC-UV. La même analyse limitée aux 72 patients recevant du basiliximab a montré des résultats comparables avec une valeur seuil de l'AUC<sub>0-12</sub> de 24,9 mg.h/L (sensibilité 86% et spécificité 68%).

Une étude rétrospective menée chez des patients greffés rénaux a suggéré l'existence d'une relation entre les concentrations résiduelles d'AMP (déterminées par EMIT) et la survenue de rejet aigu (Krumme et al., Transplant Proc 1998). Sur les 48 patients inclus (traités par l'association MMF, CsA et méthylprednisolone), 18 avaient présenté un rejet aigu dans les 2 mois suivant la transplantation. Chez ces patients, les taux résiduels d'AMP étaient significativement plus faibles que chez les patients exempts de rejet ( $1,55 \pm 0,48$  mg/L versus  $2,1 \pm 0,62$  mg/L ;  $p<0,05$ ).

Dans une étude prospective incluant 27 patients greffés rénaux stables traités par de la CsA et de la prednisone, la CsA a été remplacée par du MMF (2g/jour) à 1 an post-transplantation (Smak Gregoor et al., Transpl Int 2000). Les patients étaient ainsi suivis pendant une année durant laquelle deux réductions de dose de MMF (à successivement 1,5g et 1g/jour) ont été effectuées à 4 mois d'intervalle. Les valeurs médianes des concentrations résiduelles d'AMP (mesurées en EMIT) diminuaient significativement avec les doses de MMF : 4,3 mg/L (0,95-15,5 mg/L) avec 2g/jour, 3 mg/L (0,73-7,8 mg/L) avec 1,5g/jour ( $p=0,0002$ ) et 2,3 mg/L (0,6-6,63 mg/L) avec 1g/jour ( $p=0,01$ ). La deuxième réduction de dose a été associée

à la survenue d'épisode de rejet aigu chez 3 patients. Aucune relation significative entre les taux résiduels d'AMP et l'incidence de rejet aigu n'a été mise en évidence dans cette étude.

Une étude a également été réalisée dans une population de 54 enfants transplantés rénaux recevant un régime immunosuppresseur associant du MMF (600mg/m<sup>2</sup> deux fois par jour), de la CsA et de la méthylprednisolone (Weber et al., J Am Soc Nephrol 2002). La PK de l'AMP (AMP total et fraction libre) était étudiée dans la période précoce (7 et 21 jours) et tardive (3 et 6 mois) suivant la greffe par mesure des concentrations en HPLC-UV. 17 patients avaient présenté un épisode de rejet aigu dans les 6 mois post-transplantation. Sur les 14 enfants qui avaient présenté un rejet dans la période précoce, 10 avaient des valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP total <33,8 mg.h/L. Ainsi, des valeurs d'AUC inférieures à 33,8 mg.h/L étaient associées à un risque de rejet aigu de 41% contre 14% pour des valeurs supérieures à cette valeur seuil. L'analyse de courbes ROC a montré que l'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP total et le C<sub>12</sub> (concentration à T12h) étaient prédictives de la survenue d'épisodes de rejet aigu. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 75% et 64,3% pour une AUC<sub>0-12</sub> d'AMP total de 33,8 mg.h/L et de 83,3% et 64,3% pour une C<sub>12</sub> de 1,2 mg/L. En revanche, la fraction libre d'AMP n'était pas prédictive du risque de rejet aigu.

Ces résultats ont montré l'existence d'une relation entre les AUC<sub>0-12</sub> et/ou, plus rarement, les concentrations résiduelles d'AMP et l'efficacité du traitement par MMF chez des transplantés rénaux. Cependant, l'AUC<sub>0-12</sub> présente une valeur prédictive plus forte de l'incidence de survenue d'épisodes de rejet aigu. Ainsi le risque de rejet de greffe rénale serait augmenté pour des valeurs d'AUC mesurées par chromatographie liquide inférieures à 22 à 33,8 mg.h/L, selon les études.

#### II.2.1.2. Transplantation cardiaque

L'apport du suivi des concentrations résiduelles d'AMP en terme d'amélioration de l'efficacité a également été démontré en transplantation cardiaque. Meiser et al. (J Heart Lung Transplant 1999) ont étudié la relation entre les taux résiduels d'AMP et le risque de rejet chez 45 patients transplantés cardiaques traités par MMF, tacrolimus et corticostéroïdes. L'étude a été menée en deux phases : la première phase, rétrospective, incluait 15 patients (suivis pendant 696±62 jours) recevant une dose quotidienne fixe de 2g de MMF et la deuxième phase (prospective) incluait 30 autres patients (suivis pendant 436±88 jours) pour lesquels les doses de MMF étaient ajustées de façon à obtenir une concentration résiduelle d'AMP (mesurée par EMIT) comprise entre 2,5 et 4,5 mg/L. Au cours de la phase I, 66,7% des patients ont présenté un rejet. L'incidence des rejets était nulle chez les patients avec des concentrations d'AMP moyennes >3mg/L et elle était maximum chez les patients avec les concentrations d'AMP les plus faibles. Durant la deuxième phase, seulement 10% (n=3) des patients ont présenté un rejet, les taux résiduels d'AMP chez ces patients étaient de 0,7 mg/L, 1,3 mg/L et 0,9 mg/L, malgré les ajustements de posologie.

Une autre étude, rétrospective, a été conduite chez 215 patients transplantés cardiaques recevant soit du tacrolimus (11%) soit de la CsA (89%) associé à du MMF adapté sur la base des taux résiduels d'AMP (mesurés en EMIT), avec une zone cible de 2 à 4 mg/L (Yamani et al., Transplantation 2000). Les concentrations résiduelles obtenues ont été divisées en 3 groupes selon la période post-greffe à laquelle elles avaient été collectées : 0 à 6 mois (groupe I, n=140), 6 à 12 mois (groupe II, n=90) et plus de 12 mois (groupe III, n=71). Dans la première année suivant la greffe, l'incidence de rejet était significativement plus faible chez les patients présentant des concentrations résiduelles d'AMP  $\geq 2$ mg/L que chez ceux présentant des concentrations résiduelles  $< 2$  mg/L (groupe I : 8,8% versus 14,9% ;  $p=0,05$  et groupe II : 4,2% versus 11,3% ;  $p=0,05$ ). En revanche, aucune différence significative de l'incidence de rejet aigu n'était observée selon que les concentrations résiduelles d'AMP soient  $\geq 2$ mg/L (11,3%) ou  $< 2$ mg/L (11,7%) chez les patients du groupe III. Les auteurs ont montré qu'au cours des 6 premiers mois, l'incidence de rejet aigu était réduite significativement (de 15,4% à 3,6%,  $p=0,002$ ) pour des concentrations résiduelles d'AMP  $\geq 2$ mg/L et des concentrations résiduelles de CsA ou de tacrolimus situées dans les cibles thérapeutiques.

DeNofrio et al. (J Heart Lung Transplant 2000) ont étudié la relation entre les concentrations d'AMP total et libre (mesurées par HPLC-UV) et l'incidence de rejet chez 38 patients transplantés cardiaques traités par MMF (2g/jour), CsA et prednisone. Les patients étaient répartis en 3 groupes selon le grade de leur rejet évalué par biopsie dans les  $300 \pm 278$  jours suivant la greffe : grade 0 (n=22), grade 1 (n=13) et grade 2/3 (n=3). Chez les patients présentant un rejet de grade 2/3, les AUC d'AMP total ( $26,1 \pm 6,6$  mg.h/L) et d'AMP libre ( $0,49 \pm 0,11$  mg.h/L) étaient plus faibles que chez les patients présentant un rejet de grade 0 ( $42,8 \pm 14$  mg.h/L,  $p > 0,05$  et  $0,81 \pm 0,25$  mg.h/L,  $p < 0,05$  respectivement pour l'AMP total et libre) ou de grade 1 ( $51,7 \pm 17,5$  mg.h/L,  $p < 0,05$  et  $0,95 \pm 0,34$  mg.h/L,  $p < 0,05$  respectivement pour l'AMP total et libre). Les concentrations résiduelles d'AMP tendaient à être réduites chez les patients avec un rejet de grade 2/3 par rapport aux autres patients mais les différences n'étaient pas significatives. Les valeurs des AUC de CsA ne différaient pas significativement entre les groupes.

### II.2.1.3. Transplantation hépatique

Récemment, des résultats concernant l'intérêt du suivi des concentrations résiduelles d'AMP en transplantation hépatique ont été rapportés (Tredger et al., Liver Transpl 2004). L'étude incluait 147 adultes et 63 enfants transplantés hépatiques traités par du MMF, des glucocorticoïdes et du tacrolimus ou de la ciclosporine. Les doses de MMF, dont le délai d'introduction était très variable, étaient ajustées de façon à maintenir des concentrations résiduelles comprises entre 1 et 5 mg/L. 2501 valeurs concentrations résiduelles d'AMP mesurées par la méthode EMIT ont été obtenues à l'issue de l'étude. Chez les adultes, 10 épisodes de rejet aigu sont survenus après 2,5 mois suivant la greffe (médiane = 43 mois). Les

taux résiduels d'AMP étaient significativement plus faibles que ceux mesurés chez les patients n'ayant pas présenté de rejet (valeurs médianes : 0,5 versus 1,4 mg/L,  $p < 0,001$ ). Neuf des épisodes étaient associés à des concentrations résiduelles d'AMP  $< 1$  mg/L. Chez les enfants, 3 épisodes de rejet aigu ont été dénombrés ; ils étaient associés à des valeurs de concentrations résiduelles d'AMP  $< 0,5$  mg/L. Les auteurs ont donc établi à 1 mg/L la limite inférieure de la zone thérapeutique des concentrations résiduelles d'AMP en greffe hépatique. En revanche, les doses de MMF ne différaient pas significativement entre les deux groupes de patients.

## II.2.2. Etudes de la relation concentrations/effets indésirables

### II.2.2.1. Transplantation rénale

Au cours de l'étude multicentrique de type "concentration-contrôlée" menée par van Gelder et al. (Transplantation, 1999) décrite précédemment (§ II.2.1.1), la survenue d'effets indésirables a conduit à des sorties d'étude chez 7,8 % des patients (4/51) dans le groupe AUC basse, 23,4% des patients (11/47) dans le groupe AUC intermédiaire et 44,2% des patients (23/52) dans le groupe AUC haute. Des effets indésirables gastro-intestinaux ont été responsables de l'arrêt du traitement chez 15 des 38 patients sortis prématurément de l'étude ; 12 patients sur ces 15 appartenaient au groupe AUC haute. La régression logistique a montré que la dose quotidienne moyenne de MMF pour la comparaison entre les patients ayant achevé l'étude et ceux l'ayant quittée (en raison de décès ou de survenue d'effets indésirables) avait une influence significative ( $p < 0,0001$ ). Aucun résultat significatif n'a été mis en évidence avec la médiane des valeurs de  $\ln(C_0)$  ( $p = 0,512$ ), la médiane des  $\ln(C_{\max})$  ( $p = 0,876$ ) ou la médiane des  $\ln(AUC_{0-12})$  d'AMP ( $p = 0,434$ ).

Dans l'étude de Pillans et al. (Clin Biochem 2001) évoquée précédemment (§ II.2.1.1.), les valeurs d'AUC d'AMP étaient significativement plus faibles chez les patients ayant souffert d'effets indésirables gastro-intestinaux ( $n = 4$ ) que chez les patients indemnes de complication digestive ( $23,7 \pm 2,43$  mg.h/L versus  $33,2 \pm 1,73$  mg.h/L,  $p = 0,04$ ) alors que les concentrations résiduelles de CsA étaient comparables entre les deux groupes de patients ( $p = 0,24$ ). Cette étude ne fournissait aucune donnée supplémentaire sur la toxicité du MMF.

Dans l'étude de Kiberd et al. (Am J Transplant 2004), des effets indésirables ont conduit à réduire les doses de MMF chez 27 patients (soit 29%). L'exposition à l'AMP, en terme d' $AUC_{0-12}$  n'était pas prédictive de la survenue d'événements indésirables.

D'autres travaux portaient sur la relation entre les concentrations résiduelles d'AMP ( $C_0$ ) et la survenue d'effets indésirables chez des patients greffés rénaux. L'étude de Smak Gregoor et al. (Transplant Proc 1998) portant sur 15 patients transplantés rénaux traités auparavant par de la CsA et de la prednisone et recevant du MMF et de la prednisone (sans CsA) depuis au moins 2 semaines, a montré que les concentrations résiduelles moyennes d'AMP (dosées par EMIT) étaient plus élevées chez les 7 patients qui avaient présenté des effets indésirables (anémie, perte de cheveux) que chez les 8 patients sans effets indésirables ( $4,43 \pm 0,38$  mg/L

versus  $2,62 \pm 0,32$  mg/L ;  $p < 0,001$ ). Hübner et al. (Arzneimittelforschung 2000) ont étudié rétrospectivement 234 données de concentrations résiduelles d'AMP (mesurées par EMIT) obtenues à partir de 30 patients greffés rénaux. Les patients étaient traités par trithérapie incluant de la CsA, de la méthylprednisolone et du MMF. Une dose de 2g/jour de MMF était administrée initialement puis cette dose était adaptée sur des critères cliniques et sur la base des taux résiduels mesurés par EMIT, mais la stratégie d'adaptation posologique n'était pas explicite. Les valeurs des concentrations résiduelles étaient supérieures chez les patients qui avaient souffert d'effets indésirables ( $n=13$ ) par rapport aux patients avec absence d'événements indésirables ( $n=17$ ) ( $2,13 \pm 1,35$  mg/L vs  $1,53 \pm 0,67$  mg/L ;  $p < 0,001$ ). Les doses de MMF étaient comparables entre les deux groupes et les taux résiduels de CsA ne différaient pas entre les patients.

Une autre étude a rapporté que les effets indésirables étaient liés aux valeurs de la concentration d'AMP mesurée 30 minutes après la prise orale de MMF ( $C_{30}$ ) (Mourad et al., Clin Chem 2001). Cette étude prospective incluait 31 adultes transplantés rénaux traités par CsA, MMF et stéroïdes. La dose de MMF initiale était de 1g deux fois par jour, puis elle était adaptée sur des critères de tolérance du médicament. La PK de l'AMP a été étudiée dans la phase précoce (moyenne=8 jours ; intervalle 3-26 jours) suivant la greffe et 3 mois après. Au cours des 3 premiers mois, des événements indésirables étaient survenus chez 21 patients. Chez ces patients, les valeurs de  $C_{min}$  et d' $AUC_{0-12}$  étaient augmentées par rapport aux 10 patients ne présentant pas d'effets indésirables mais seule la différence entre les  $AUC_{0-12}$  était significative ( $62,10 \pm 21,07$  mg.h/L versus  $39,80 \pm 15,29$  mg.h/L ;  $p=0,0005$ ). Chez les patients ayant reçu 2g/jour de MMF durant toute la durée de l'étude, les  $C_{30}$  étaient plus élevées dans le groupe avec effets indésirables ( $32,99 \pm 12,59$  mg/L versus  $7,45 \pm 5,4$  mg/L ;  $p < 0,0001$ ) et cet indice était le plus significativement lié à la survenue des effets indésirables.

Au cours de leur étude chez les enfants, Weber et al. (J Am Soc Nephrol 2002) se sont intéressés à la relation entre les concentrations d'AMP libre et la survenue d'événements indésirables. Des valeurs élevées d' $AUC_{0-12}$  d'AMP libre étaient associées à une augmentation du risque d'apparition de leucopénie et/ou de troubles infectieux attribuables au MMF. L'analyse de courbes ROC a montré que l' $AUC_{0-12}$  d'AMP libre et la  $C_{max}$  d'AMP libre étaient prédictives de la survenue d'effets indésirables infectieux et/ou leucopénie en période précoce et en période stable. En période précoce, la valeur seuil d' $AUC_{0-12}$  d'AMP libre de 0,4 mg.h/L serait prédictive de la survenue de troubles infectieux et/ou d'une leucopénie avec une sensibilité de 92,3% et une spécificité de 61%. Les concentrations d'AMP totale n'étaient pas corrélées à la survenue de ces effets indésirables. Enfin, aucune relation entre les concentrations libres d'AMP et la survenue de diarrhée ou de thrombocytopénie n'a été rapportée.

Ces observations concernant le rôle prédictif de l'AMP libre sont à rapprocher de l'observation de Kaplan et al. (Transplantation 1998) qui avaient décrit une leucopénie sévère

associée à une insuffisance rénale chez un patient transplanté du pancréas recevant 0,75 g de MMF deux fois par jour. Les concentrations d'AMP total, d'AMP libre et d'AMPG avaient été mesurées par HPLC. Ce patient présentait une valeur d'AUC d'AMP total "normale", soit 36,8 mg.h/L, mais la fraction libre d'AMP et l'AUC d'AMP libre étaient élevées (respectivement 13,8% et 5,1 mg.h/L). L'AUC d'AMPG était également élevée (5899 mg.h/L). Un autre cas de toxicité sévère (digestive et hématologique) associée à une AUC<sub>0-6</sub> d'AMP libre élevée (2,3 mg.h/L) a été rapporté chez un patient 5 jours après avoir reçu une greffe rénale. Chez ce patient, la concentration sanguine de CsA à 2 heures (837 µg/L) ainsi que l'AUC<sub>0-6</sub> d'AMP total (12,6 mg.h/L) étaient faibles comparées aux valeurs généralement observées durant cette période post-greffe et l'exposition à l'AMPG était élevée (AUC<sub>0-6</sub> = 1317 mg.h/L) (Mudge et al., Ther Drug Monit 2004). En revanche, Kuypers et al. (Ther Drug Monit 2003), au cours d'une étude réalisée chez 33 patients adultes transplantés rénaux traités par l'association MMF/tacrolimus, n'ont pas réussi à montrer de relation significative entre les effets indésirables survenus dans la première année suivant la greffe et l'exposition à l'AMP libre.

En résumé, il a été montré que la survenue d'effets indésirables gastro-intestinaux pouvait être liée à la dose de MMF ou, plus rarement à la concentration résiduelle, à l'AUC<sub>0-12</sub> voire à la C<sub>30</sub> d'AMP. Il semblerait que les concentrations d'AMP libre soient prédictives de l'incidence des événements hématologiques et infectieux, au moins chez l'enfant.

#### II.2.2.2. Transplantation hépatique

Dans l'étude menée par Tredger et al. (Liver Transpl 2004) chez les transplantés hépatiques, l'incidence des effets indésirables n'a été évaluée que chez les 147 adultes. Les principaux événements indésirables recensés étaient d'ordres gastro-intestinaux, infectieux et hématologiques. Le risque relatif de survenue de tels effets indésirables était trois fois plus important pour des valeurs de concentrations résiduelles d'AMP comprises entre 3 et 4 mg/L et au-delà, avec une fréquence de survenue égale à 60% pour des valeurs >3 mg/L.

Les études réalisées chez les transplantés cardiaques ne faisaient pas état des relations entre les concentrations d'AMP et les effets indésirables.

#### II.2.3. Index thérapeutiques de l'AMP

Une liste de recommandations et de directives médicales définissant les bases fondamentales nécessaires à la pratique du STP du MMF a été formulée pour la première fois en 1998 lors d'une conférence de consensus (Shaw et al., Clin Biochem 1998). Il avait alors été conseillé de maintenir des valeurs d'AUC d'AMP supérieures à 20 mg.h/L chez des adultes, en période précoce suivant la transplantation. Par la suite, des nouvelles valeurs cibles ont été proposées sur la base d'études cliniques supplémentaires (Shaw et al., Ther Drug Monit 2000). Les zones thérapeutiques de 30 à 60 mg.h/L pour les valeurs d'AUC d'AMP total et de 1 à 3,5 mg/L pour les concentrations résiduelles d'AMP, l'HPLC-UV étant la méthode d'analyse de

référence, ont été proposées pour la période précoce suivant une greffe rénale ou cardiaque lorsque le MMF est administré en association avec la CsA et des corticostéroïdes. Les études qui ont montré qu'une valeur d'AUC de l'AMP inférieure à 30 mg.h/L était associée à une augmentation de l'incidence de rejet aigu justifient cette valeur seuil (van Gelder et al., Transplantation 1999 ; Pillans et al., Clin Biochem 2001 ; Weber et al., J Am Soc Nephrol 2002). En revanche, la limite supérieure semble difficile à définir précisément car la relation entre les valeurs d'AUC d'AMP et le risque de toxicité n'est pas clairement établie. L'étude multicentrique concentration-contrôlée avait montré que l'incidence des événements indésirables était la plus élevée dans le groupe AUC haute (60,6 mg.h/L) mais elle n'était pas corrélée significativement aux valeurs de concentrations d'AMP (van Gelder et al., Transplantation 1999). Oellerich et al. (Ther Drug Monit 2000) ont mentionné que la valeur de 60 mg.h/L était voisine du 95<sup>ème</sup> percentile de la distribution des AUC d'AMP mesurées chez les patients qui n'avaient présenté aucune complication liée au traitement par MMF. Enfin, aucune donnée n'est disponible pour déterminer si des valeurs d'AUC supérieures à cette limite sont associées à une diminution de l'incidence de rejet aigu. Cette valeur de 60 mg.h/L n'est donc pas forcément rigoureuse sur le plan scientifique mais il paraît prudent de ne pas maintenir des valeurs d'AUC supérieures. En revanche, à l'issue d'études réalisées dans des populations pédiatriques, il a été montré que l'AUC d'AMP libre était un bon prédicteur du risque de toxicité (Oellerich et al., Ther Drug Monit 2000 ; Weber et al., J Am Soc Nephrol 2002). L'incidence des effets indésirables serait alors augmentée pour des valeurs d'AUC d'AMP libre  $\geq 0,6$  mg.h/L. Ainsi, dans certaines circonstances où la fixation protéique est perturbée (ex. insuffisance rénale, hypoalbuminémie, urémie, hyperbilirubinémie) l'AUC de l'AMP libre pourrait être prise en compte (Oellerich et al., Ther Drug Monit 2000 ; Atcheson et al., Ther Drug Monit 2004 ; Mudge et al., Ther Drug Monit 2004).

Ces cibles concernant l'association AMP/ciclosporine et d'autres valeurs doivent être définies dans le cas d'autres associations, notamment avec tacrolimus. Récemment, Kuypers et al. (Clin Pharmacol Ther 2004) ont suggéré de définir une fenêtre thérapeutique combinant les données PK de l'AMP et du tacrolimus. Ainsi, lors d'une étude prospective incluant 100 patients greffés rénaux *de novo* traités par MMF et tacrolimus, l'incidence de rejet aigu à J7 était plus faible pour des AUC<sub>0-12</sub> de tacrolimus >150 ng.h/mL et des AUC<sub>0-12</sub> d'AMP >45 mg.h/L (7,7%). Si l'une, l'autre ou aucune valeur cible n'était atteinte, l'incidence de rejet augmentait non significativement de 15 à 26,3%.

## **II.3. Réalisation du STP de l'AMP**

### **II.3.1. Prélèvements sanguins**

Le dosage du MPA s'effectue dans le plasma. Les prélèvements sanguins sont réalisés dans des tubes EDTA puis le plasma est séparé par centrifugation et stocké. Les prélèvements sont stables 8 heures à température ambiante, 96h à +4°C et 11 mois à -20°C (Bullingham et

al., Clin Pharmacokinet 1998). Des études de stabilité ont montré que le stockage pendant une semaine à température ambiante d'échantillons plasmatiques surchargés en AMPG ou provenant de patients traités par MMF induisait une augmentation significative des concentrations d'AMP par déconjugaison de l'AMPG. Aucune augmentation des concentrations d'AMP n'était observée à +4°C et -20°C. Les concentrations d'AMPG étant beaucoup plus élevées que celles d'AMP, elles n'étaient pas réduites significativement (Shipkova et al., Clin Chem 1999). Quelles que soient les conditions de stockage (température ambiante, +4°C ou -20°C), les concentrations d'AMPaG ne sont pas stables et diminuent progressivement avec le temps. Seule une acidification des échantillons plasmatiques (pH 2,5) semble pouvoir éviter cette dégradation (Shipkova et al., Clin Chem 2000).

Il a été montré *in vitro* que c'est la fraction libre qui serait responsable de l'effet immunosuppresseur (Nowak et Shaw, Clin Chem 1995) mais les concentrations d'AMP libre représentent un faible pourcentage du MPA total (1 à 2%) et leur dosage nécessite une étape supplémentaire d'isolement de la forme libre par ultracentrifugation (Streit et al., Clin Chem 2004 ; Atcheson et al., J Chromatogr B 2004) ou dialyse à travers une membrane (Mandla et al., Ther Drug Monit 2003). Le suivi des concentrations d'AMP libre ne peut constituer une méthode de référence pour le STP du MMF en routine mais peut être utile dans certaines circonstances particulières.

### II.3.2. Méthode de dosage de l'AMP

Les méthodes de référence pour la mesure des concentrations d'AMP sont des méthodes de chromatographie liquide couplées à la spectrophotométrie ultraviolet (HPLC-UV), à la spectrométrie de masse (LC-MS) ou à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Ces techniques sont sensibles, plus ou moins spécifiques et permettent de doser simultanément l'AMP et ses métabolites. Le dosage de l'AMP par de telles techniques sera traité ultérieurement dans la deuxième partie "travaux personnels" (§ II.1). Des méthodes chromatographiques en particulier par LC-MS/MS permettant de doser les faibles concentrations d'AMP libre ont également été développées (Shipkova et al., Clin Chem 1998 ; Mandla et al., Ther Drug Monit 2003 ; Streit et al., Clin Chem 2004 ; Atcheson et al., J Chromatogr B 2004).

Il existe aussi une méthode d'analyse immuno-enzymatique très largement utilisée aujourd'hui en routine pour le dosage de l'AMP. Cette technique (EMIT®) fait intervenir un anticorps monoclonal anti-AMP qui présente une réactivité croisée avec l'AMPaG, métabolite plus ou moins actif de l'AMP (Schütz et al., Transplant Proc 1998(a); Shipkova et al., Br J Pharmacol 1999). Ce phénomène expliquerait en grande partie l'erreur systématique observée entre les concentrations mesurées par EMIT et celles mesurées par HPLC. La comparaison entre les techniques analytiques a fait l'objet d'un chapitre dans la deuxième partie de cette thèse intitulée "travaux personnels" (§ II).



Certaines études ont suggéré que l'EMIT pourrait constituer une méthode de choix pour le dosage de l'AMP dans le cadre du STP car elle était plus rapide, automatisée, et fournissait un meilleur reflet de "l'immunosuppression" en dosant le métabolite actif de l'AMP. Dans cette perspective, Weber et al. (Clin Chem 2002) proposaient une modification de la fenêtre thérapeutique de l'AMP ( $AUC_{0-12}$  entre 35 et 70 mg.h/L et  $C_0$  entre 1,3 et 4,5 mg/L) quand celui-ci était dosé avec la méthode EMIT.

Cependant, des réserves sont à émettre concernant l'implication de l'AMPaG dans l'efficacité immunosuppressive du MMF. En effet, lors de précédents travaux, Schütz et al. (Clin Chem 1999) avaient mis en évidence l'activité inhibitrice concentration dépendante de l'AMPaG sur l'IMPDH-II (enzyme recombinante) avec un pouvoir inhibiteur comparable à celui de l'AMP. La multiplication des essais avait tout de même montré que l'effet inhibiteur de l'AMPaG était très variable. Récemment, la même équipe a montré que le pouvoir inhibiteur de l'AMPaG pour l'IMPDH-II était 4 à 6 fois plus faible que celui de l'AMP : les valeurs des constantes d'inhibition  $K_i$  étaient respectivement égales à 53,8 nM et 8,1 nM pour l'AMPaG et l'AMP (Armstrong et al., Clin Exp Pharmacol Physiol 2004). Avec des concentrations correspondant en moyenne à 10% de celles d'AMP, il semblerait donc que l'AMPaG ne contribue que très faiblement à l'activité immunosuppressive du MMF. Son dosage (par le biais de la méthode EMIT) ne paraît donc pas justifié.

### II.3.3. Méthodes de détermination de l'exposition à l'AMP

L' $AUC_{0-12}$  a été définie comme meilleur index d'exposition et indice de choix pour le STP du MMF puisqu'elle présentait une valeur prédictive supérieure à celle de  $C_0$ , de  $C_{max}$  ou de la dose de MMF, en terme de probabilité de rejet aigu de greffe (Shaw et al., Clin Biochem 1998 ; Nicholls, Clin Biochem 1998). Mais le calcul de l'AUC complète à partir d'un nombre important de prélèvements sanguins et dans un intervalle de temps relativement long (12h) est difficilement réalisable en routine clinique (coûteux et contraignant). Il est donc apparu nécessaire de proposer des stratégies visant à réduire le nombre de prélèvements pour l'estimation de l'AUC. Deux grands types de méthodes peuvent être utilisées pour estimer une AUC à partir d'un nombre limité de concentrations sanguines : la méthode par régression linéaire multiple et la méthode bayésienne.

### II.3.3.1. Régression linéaire multiple

De nombreuses stratégies de prélèvement et équations de régression linéaire multiple ont été proposées pour estimer l'AUC de l'AMP (Schütz et al., *Transplant Proc* 1998(b) ; Johnson et al., *Clin Pharmacol Ther* 1999 ; Filler et al., *Ther Drug Monit* 2000 ; Yeung et al., *Transplant Proc* 2001 ; Le Guellec et al., *Eur J Clin Pharmacol* 2002). Ces stratégies divergeaient d'une étude à l'autre en terme d'horaires de prélèvement et pouvaient donner lieu à des résultats moins satisfaisants lorsqu'elles étaient appliquées par d'autres équipes (Willis et al., *Ther Drug Monit* 2000 ; Taylor et al., *Ther Drug Monit* 2001). De plus, cette approche est limitée par la nécessité de respecter les horaires de prélèvements définis (à  $\pm 5$  min), ce qui peut parfois être incompatible avec la pratique clinique en routine. Enfin, les équations ne fournissent qu'un chiffre qui ne permet pas de juger de l'adéquation entre l'AUC estimée et les valeurs de concentrations mesurées.

### II.3.3.2. Estimation bayésienne

La méthode d'estimation bayésienne présente l'avantage d'une plus grande souplesse dans le respect des horaires de prélèvements que les stratégies de prélèvements limités utilisant la régression linéaire multiple, ce qui est plus compatible avec la pratique clinique. De plus, elle permet d'estimer les paramètres PK du patient et de reconstituer la totalité de la courbe de la concentration en fonction du temps ce qui fournit un précieux indice de l'adéquation entre l'AUC estimée et les valeurs de concentrations mesurées.

Le seul estimateur bayésien rapporté à ce jour pour l'estimation de l'exposition à l'AMP a été développé au moyen d'une approche populationnelle (Le Guellec et al., *Clin Pharmacokinetics* 2004). Cet estimateur bayésien a été mis au point chez 70 patients transplantés rénaux stables traités par MMF et CsA, associés ou non à des corticostéroïdes. 20 sujets avaient fourni des cinétiques riches (10 points) et les 50 autres avaient fourni des cinétiques dites "pauvres" (4 points) comportant systématiquement des prélèvements à T0 et T2h. Les concentrations d'AMP étaient mesurées par la méthode EMIT. L'estimateur bayésien mis au point permettait, à partir de 3 prélèvements réalisés à 20min, 1h et 3h après la prise du traitement, l'estimation de l'AUC d'AMP avec un biais de 7,7% (0,43%-15,1%) et une précision de 12,4%.

En conclusion, même si de plus en plus d'arguments suggèrent l'intérêt de la mesure systématique des concentrations d'AMP pour améliorer la prise en charge du patient (Cox et Ensom, *Ther Drug Monit* 2003 ; Shaw et al., *Ther Drug Monit* 2001), il n'existe encore aucune preuve scientifique de l'apport du STP du MMF. Des études prospectives, randomisées, nationale (APOMYGRE) et internationale (FDCC) comparant des patients traités par des doses fixes de MMF et des patients bénéficiant d'un STP sont actuellement en cours et devraient permettre de répondre à la pertinence clinique d'une telle stratégie.



# **DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS**

# I. Protocoles de recherche clinique et base de données

L'étude pharmacocinétique de l'AMP a été réalisée à partir de profils de concentrations obtenus exclusivement chez des patients transplantés rénaux. La plupart de ces données sont issues de 5 études de recherche biomédicale de phase IV brièvement décrites ci-dessous : Primocine, Stablocine, Cinesiren, RCCT et étude afro-américaine/caucasienne. Les trois premières études avaient reçu l'agrément du CCPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale) du Limousin. Tous les patients ont été inclus dans les études cliniques après avoir reçu la lettre d'information au patient et donné leur consentement éclairé par écrit.

## I.1. Primocine

L'étude PRIMOCINE, réalisée en collaboration entre les CHU de Reims et de Limoges (ce dernier étant le promoteur), visait à étudier les paramètres PK de l'AMP et de la CsA utilisés en association dans une population de patients greffés rénaux pendant le premier mois post-greffe, pour l'adaptation de posologie de ces deux immunosuppresseurs. Cette étude incluait 25 patients adultes ayant bénéficié d'une première greffe rénale et recevant un traitement immunosuppresseur associant de la CsA (Néoral®), du MMF (Cellcept®) et des corticoïdes (Solupred®). La posologie quotidienne de la CsA et du MMF était répartie en deux prises égales à 12h d'intervalle. Le MMF était prescrit à la dose initiale de 2g/jour, qui pouvait par la suite être adaptée sur des critères cliniques en fonction du rapport efficacité/tolérance. Les doses de CsA étaient adaptées pour chaque patient de façon à maintenir la concentration résiduelle ( $C_0$ ) dans une fourchette comprise entre 150 et 250 ng/mL à J3 et J7, et entre 150 et 200 ng/mL à J30. Les corticostéroïdes étaient administrés selon le schéma standardisé suivant : 250 mg avant et après la greffe, 1 mg/kg pendant une semaine puis décroissance progressive (0,5 mg/kg à J7, 0,3 mg/kg à J30). Enfin, un traitement d'induction par des sérums antilymphocytaires (globulines antilymphocytaires Fresenius, Lymphoglobuline, thymoglobuline) ou des anticorps monoclonaux (Simulect® ou Xenapax®) était systématiquement administré à ces patients dans les premiers jours suivant la greffe, et ce, aux doses jugées nécessaires par le clinicien. Des cinétiques complètes ont été réalisées chez chaque patient 3 jours (J3), 7 jours (J7) et 30 jours (J30) après le début du traitement. Les séries comprenaient 11 prélèvements à J3 et J7 et 10

prélèvements à J30, effectués juste avant la prise (concentration résiduelle  $C_0$ ) et 20 min, 40 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4, 6h, 9h (J30) après la prise du médicament, ainsi qu'à 12h à J3 et J7.

Un patient est sorti prématurément de l'essai pour des raisons médicales et n'a fourni aucune donnée PK. Chez un autre patient, les données de concentrations obtenues à J7 étaient inexploitable du fait d'erreurs dans les horaires de prise de médicament et de prélèvements ; seules les données obtenues à J3 et J30 ont pu être analysées chez ce patient.

## **I.2. Stablocine**

L'étude STABLOCINE avait pour objectif de constituer un modèle PK pour l'adaptation posologique de la CsA et du MMF utilisés en association et par voie orale, dans une population de patients greffés rénaux stables. Les deux centres investigateurs de cette étude étaient les CHU de Tours et de Limoges (ce dernier étant promoteur). Cet essai incluait des patients adultes greffés depuis au moins 3 mois, traités par l'association de Cellcept® et de Néoral®, pour lesquels la dose des deux immunosuppresseurs et les concentrations sanguines de CsA étaient stables depuis au moins un mois. Ces patients devaient avoir présenté une fonction rénale stable avec une créatininémie inférieure à 200  $\mu\text{mol/L}$  au cours du mois précédant l'inclusion dans l'étude et ne présentaient pas de critère clinique ou histologique de rejet aigu, de récurrence de la néphropathie initiale, ou d'autre atteinte rénale évolutive. La posologie quotidienne de MMF initialement fixée à 2g/jour était adaptée sur des critères cliniques en fonction du rapport efficacité/tolérance et la dose de CsA était adaptée pour chaque patient de façon à maintenir la concentration résiduelle dans une fourchette comprise entre 100 et 300 ng/mL. Un seul patient sur les 20 inclus avait reçu une dose de corticoïdes le jour où la cinétique a été effectuée. Les profils de concentrations comportaient 10 prélèvements réalisés juste avant ( $C_0$ ), puis 20 min, 40 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h et 9h après la prise de MMF.

## **I.3. Cinesiren**

L'étude CINESIREN avait pour objectif la constitution d'un modèle PK pour l'adaptation posologique du sirolimus chez des patients greffés rénaux. Cette étude a été réalisée au sein des CHU de Reims et de Limoges (ce dernier étant promoteur). Elle incluait des patients adultes ayant bénéficié d'une 1<sup>ère</sup> ou d'une 2<sup>ème</sup> greffe rénale et traités par une quadruple immunothérapie incluant: du sirolimus (dose de charge de 12 à 15 mg par jour pendant 7 jours avec suivi thérapeutique de la concentration résiduelle, qui devait être comprise entre 10 et 15 ng/mL), du MMF (2g le jour de la transplantation puis 1g matin et soir chaque jour ; la dose pouvant être adaptée sur critères cliniques uniquement), des corticostéroïdes (250 mg avant la greffe, 250 mg après, puis 1 mg/kg pendant une semaine et décroissance progressive suivant le schéma habituel du centre) et une induction par un sérum anti-lymphocytaire pendant les 5

premiers jours suivant la greffe. Des cinétiques complètes d'AMP ont été obtenues 7 et 15 jours (J7 et J15), 1 et 3 mois (M1 et M3) suivant la greffe chez 14 patients. Les 10 prélèvements étaient réalisés juste avant la prise, puis 20 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, et 9h après la prise de MMF. A M3, les données de concentration d'un patient n'ont pu être analysées du fait d'erreurs dans les horaires de prélèvements. Les données obtenues à M1 chez un patient et à M3 chez un autre n'ont pu être analysées du fait d'erreurs lors de la réalisation des prélèvements.

Huit patients ont en plus fourni des profils de concentrations complets d'AMP à deux mois post-greffe (M2).

#### **I.4. Données de la RCCT (Randomized Concentration Controlled Trial)**

Des concentrations plasmatiques d'AMP issues d'une étude multicentrique randomisée menée par van Gelder et al. (Transplantation 1999) nous ont été fournies par le laboratoire Roche.

Cette étude avait inclu 154 patients greffés rénaux qui bénéficiaient d'un suivi thérapeutique et d'une adaptation de dose du MMF de manière à atteindre une AUC cible d'AMP parmi trois : groupe "AUC basse" (16,1 mg.h/L), groupe "AUC intermédiaire" (32,2 mg.h/L) et groupe "AUC haute" (60,6 mg.h/L). Les doses initiales de MMF étaient respectivement 450 mg, 950 mg et 1700 mg deux fois par jour pour le groupe AUC basse, intermédiaire et haute. Tous les patients recevaient en plus de la CsA (adaptée sur la base des concentrations résiduelles) et des corticostéroïdes (selon le schéma d'administration propre à chaque centre participant). Seuls les profils de concentrations obtenus 3 jours (J3 ; n=131), 7 jours (J7 ; n=121) et 11 jours (J11 ; n=101) après le début du traitement ont été pris en compte dans le cadre de nos travaux. Ces profils comprenaient 8 prélèvements réalisés juste avant la prise puis 20 min, 40 min, 75 min, 2h, 3h, 6h, 8h et 12h après l'administration du MMF.

#### **I.5. Données d'une étude de pharmacocinétique de l'AMP chez des patients afro-américains et caucasiens.**

D'autres profils complets de concentrations ont été mis à notre disposition par le laboratoire Roche. Ces cinétiques étaient issues d'une étude prospective multicentrique portant sur des patients adultes afro-américains et caucasiens transplantés rénaux stables traités par du MMF (1 à 1,5 g deux fois par jour), de la CsA et des corticostéroïdes Pescovitz et al., J Am Transplant 2003). Les patients avaient bénéficié d'une greffe rénale depuis au moins 6 mois, leurs concentrations sériques de créatinine étaient  $\leq 220 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ils n'avaient pas présenté de

rejet aigu dans les 2 mois précédant l'inclusion dans l'étude et ne présentaient pas de rejet chronique. Nos travaux ont porté sur 78 cinétiques complètes de 10 prélèvements réalisés juste avant et 20 min, 40 min, 75 min et 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h après la prise de MMF. Par la suite, cette étude sera nommée étude afro-américaine/caucasienne.

## **I.6. Groupe indépendant de patients**

Des profils PK d'AMP ont été obtenus chez 5 patients greffés rénaux traités par MMF et CsA. La posologie quotidienne de MMF était initialement fixée à 2 g/jour mais pouvait être adaptée sur des critères cliniques et la dose de CsA était adaptée sur les valeurs du taux résiduel. Les patients recevaient en plus un traitement d'induction par anticorps polyclonaux antilymphocytaires ainsi que des corticoïdes.

Des profils complets (10 prélèvements) d'AMP ont été réalisés et étudiés chez 5 patients à 4 périodes post-greffe : 15 jours (J15), 1, 2 et 3 mois (respectivement M1, M2 et M3). Les concentrations d'AMP étaient mesurées juste avant la prise matinale du MMF puis 20 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h et 9h après la prise. Les données de concentrations d'un patient à M3 n'ont pu être analysées suite à des erreurs dans les horaires de prélèvement.

## **I.7. Description de la base de données globale**

Les caractéristiques des études cliniques décrites ci-dessus sont résumées dans le tableau 1.



**Tableau 1** : Principales caractéristiques de la base de données des profils de concentrations de l'AMP obtenus chez des patients greffés rénaux, traités par du mycophénolate mofétil.

	<b>IMMUNOSUPPRESSEUR ASSOCIE</b>	<b>PERIODES POST-GREFFE</b>	<b>PRELEVEMENTS REALISES</b>	<b>NOMBRE DE PROFILS</b>	<b>TECHNIQUES ANALYTIQUES</b>
PRIMOCINE	Ciclosporine	3 jours	TR, 20', 40', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h, 12h	24	LC-MS/MS
		7 jours	TR, 20', 40', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h, 12h	23	et
		30 jours	TR, 20', 40', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h	24	EMIT
STABLOCINE	Ciclosporine	Au-delà de 3 mois	TR, 20', 40', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h	20	LC/MS et EMIT
CINESIREN	Sirolimus	7 jours		14	LC-MS/MS
		14 jours	TR, 20', 30', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h	14	et
		1 mois		13	EMIT
		3 mois		13	
RCCT	Ciclosporine	3 jours		131	
		7 jours	TR, 20', 40', 75', 2h, 3h, 6h, 8h, 12h	121	HPLC-UV
		11 jours		101	
Etude Afro-américaine/ Caucasienne	Ciclosporine	Au-delà de 6 mois	TR, 20', 40', 75', 2h, 3h, 6h, 8h, 12h	78	HPLC-UV
Groupe indépendant	Ciclosporine	15 jours		5	
		1 mois		5	
		2 mois	TR, 20', 30', 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h	5	LC-MS/MS
		3 mois		4	

## II. Comparaison des méthodes analytiques pour le dosage de l'AMP

### II.1. Développement d'une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour le dosage plasmatique de l'AMP et de l'AMPG et comparaison avec la méthode EMIT (Dade-Behring) pour la mesure de concentrations d'AMP chez des patients transplantés rénaux traités par l'association MMF et ciclosporine.

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans Therapeutic Drug Monitoring.

*Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit 2004 ;26 (6) :609-19.*

#### **Abstract**

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive drug partly metabolized to MPA-glucuronide (MPAG), which is pharmacologically inactive. The currently available enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT) has been reported to overestimate MPA plasma concentration in clinical samples when compared with HPLC techniques. The aims of this study were to design and validate a specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique for the determination of MPA and MPAG using a low plasma volume and a simple sample preparation procedure; then to compare it with EMIT for the determination of MPA in plasma samples collected over an interdose interval at different posttransplantation periods (days 3, 7, and 30 and after 3 months) in 25 renal transplant recipients orally administered cyclosporine and mycophenolate mofetil twice daily, to investigate the origins of the differences between techniques. The LC-MS/MS technique developed showed limits of quantification (LOQs) of 0.1 mg/L and 1 mg/L for MPA and MPAG, respectively, and was linear, accurate, and precise from these LOQs up to 30 mg/L for MPA and 300 mg/L for MPAG. EMIT

gave similar results to LC-MS/MS for spiked quality control samples (in a synthetic matrix or in drug-free plasma) but significantly overestimated MPA levels in clinical samples: EMIT - LC-MS/MS = +61.39% +/- 57.94%, with large variations depending on patients, time elapsed since transplantation, sampling time, and concentration levels. These results confirmed the known overestimation of the EMIT assay compared with a specific method and showed that the magnitude of this overestimation depended on sampling time and time after transplantation.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=15570184](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15570184)

## **II.2. Comparaison des techniques LC-MS/MS et EMIT pour le dosage de l'AMP chez des patients transplantés rénaux recevant du MMF associé à du sirolimus.**

L'étude précédente a montré que les techniques chromatographique et immunoenzymatique n'étaient pas équivalentes pour la mesure des concentrations d'AMP dans des échantillons sanguins prélevés chez des patients traités par CsA. L'objectif de cette deuxième étude était de quantifier la surestimation de l'EMIT par rapport à la LC-MS/MS lors du dosage de l'AMP chez des patients greffés rénaux recevant du MMF et du sirolimus comme immunosuppresseur associé.

### **II.2.1. Méthode**

Les concentrations d'AMP ont été mesurées en parallèle par la méthode EMIT et par la méthode LC-MS/MS décrites précédemment, dans les échantillons plasmatiques recueillis chez 8 patients inclus dans l'étude Cinesiren. Les prélèvements sanguins avaient été effectués à J7, J15, M1, M2 et M3 après la transplantation rénale. La même méthodologie statistique que celle présentée précédemment (§ II.1.) a été employée pour comparer les données de concentrations et d'AUC d'AMP obtenues avec les deux techniques.

### **II.2.2. Résultats et discussion**

L'analyse a porté sur 389 données de concentrations obtenues à J7, J15, M1, M2 et M3 après une greffe rénale. Les valeurs des concentrations mesurées par EMIT (médiane = 6,77 mg/L, intervalle : 0,5-32 mg/L) étaient plus élevées ( $p < 0,02$ ) que celles mesurées par LC-MS/MS (médiane = 5,91 mg/L, intervalle : 0,22-27,7 mg/L). Les valeurs obtenues avec EMIT étaient corrélées significativement aux valeurs obtenues par LC-MS/MS ( $p < 0,0001$ ) avec un coefficient de détermination  $r^2 = 0,864$ . La différence moyenne entre les deux techniques (EMIT – LC-MS/MS) était de  $0,84 \pm 1,93$  mg/L ce qui correspondait à une surestimation significative de l'EMIT par rapport à la LC-MS/MS de  $18,66 \pm 26,78\%$  ( $p < 0,0001$ ). La figure 4 représente la distribution des différences relatives entre les concentrations mesurées par EMIT et LC-MS/MS  $[(EMIT - LC-MS/MS) / LC-MS/MS]$  en fonction des concentrations déterminées par LC-MS/MS, considérée ici comme la méthode de référence.

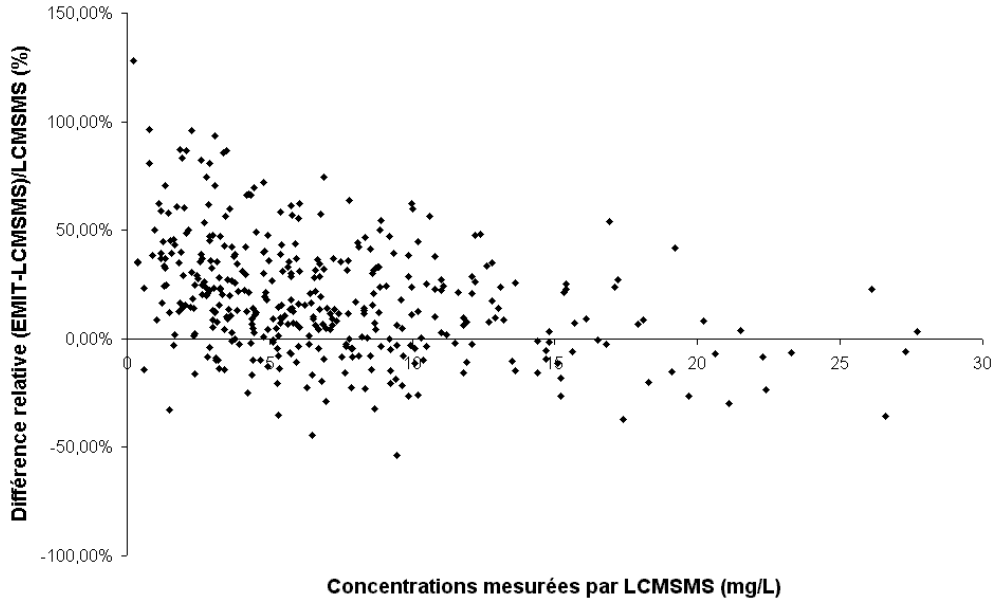


Figure 4 : Représentation graphique des différences relatives entre les concentrations d'AMP mesurées par EMIT et LC-MS/MS chez 8 patients greffés rénaux traités par l'association de MMF et de sirolimus.

L'étude des fluctuations du pourcentage de surestimation de l'EMIT en fonction du délai post-greffe a montré une diminution progressive de la surestimation entre J7 et M3 ( $p < 0,0001$ ). Les valeurs de surestimation obtenues pour chaque période sont reportées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Comparaison des concentrations mesurées par EMIT et par LC-MS/MS à différents délais post-transplantation.

Période	n	Concentrations AMP (mg/L) (médianes)		Surestimation de l'EMIT (%)	
		EMIT	LC-MS/MS	Moyenne	Intervalle
J7	79	<b>7,72</b> (1,82 – 32)	<b>6,58</b> (1,33 – 26,10)	<b>29,8 ± 22,0</b>	-26,2 ; 96,0
J15	80	<b>7,53</b> (0,50 – 28,6)	<b>6,57</b> (0,37 – 27,70)	<b>20,7 ± 26,8</b>	-29,7 ; 93,5
M1	80	<b>7,40</b> (0,50 – 18,94)	<b>6,70</b> (0,22 – 26,60)	<b>18,1 ± 25,3</b>	-35,6 ; 128,3
M2	80	<b>5,82</b> (1,44 – 19,14)	<b>5,38</b> (0,79 – 20,60)	<b>13,0 ± 30,0</b>	-37,0 ; 96,5
M3	70	<b>4,24</b> (1,01 – 22,28)	<b>3,64</b> (0,95 – 21,50)	<b>11,7 ± 25,6</b>	-53,7 ; 86,5

Aucune relation significative entre le pourcentage de surestimation de l'EMIT et l'horaire de prélèvement n'a été observée. Pourtant, la distribution des résidus (figure 4) montre que les valeurs de surestimation les plus élevées ont été obtenues pour des valeurs faibles de concentration, suggérant que certaines valeurs de  $C_0$  pourraient être surestimées approximativement de 80 à 130%.

Les valeurs moyennes d'AUC<sub>0-9</sub> mesurées par EMIT ( $60,5 \pm 29,0$  mg.h/L) étaient également significativement plus élevées que celles mesurées par LC-MS/MS ( $53,1 \pm 24,8$  mg.h/L) ce qui correspondait à un pourcentage de surestimation moyen de  $16,7 \pm 22,5\%$  ( $p < 0,001$ ). Aucune relation n'a été observée entre la surestimation de l'EMIT en terme d'AUC et la période post-greffe considérée, mais peu de valeurs d'AUC étaient disponibles pour chaque délai.

Ces résultats ont montré que les concentrations plasmatiques d'AMP mesurées par EMIT dans des échantillons prélevés chez des patients traités par sirolimus étaient, en moyenne, surestimées de  $+18,7 \pm 26,8\%$  par rapport à celles mesurées avec la méthode LC-MS/MS. La littérature ne fait état d'aucune comparaison de ce type (association MMF/sirolimus). Ce pourcentage de surestimation est plus faible que celui observé dans le cas de l'association MMF/CsA considérée précédemment. Cette différence entre les deux études pourrait être attribuée à la nature de l'immunosuppresseur associé, les techniques analytiques utilisées étant rigoureusement comparables.

## II.3. Discussion sur la comparaison des techniques analytiques pour le dosage de l'AMP

Ces études ont toutes deux conclu : à une surestimation de l'EMIT par rapport à la méthode LC-MS/MS lors du dosage de l'AMP chez des patients greffés rénaux, traités par l'association MMF/CsA ou par l'association MMF/sirolimus ; et à une diminution de cette surestimation avec le délai post-greffe. En revanche, le pourcentage moyen de surestimation observé dans le cas de l'association du MMF avec la CsA ( $+61,4 \pm 57,9\%$ ) était trois fois supérieur à celui observé dans le cas de l'association avec le sirolimus ( $+18,7 \pm 26,8\%$ ).

La comparaison de l'EMIT avec l'HPLC-UV pour le dosage de l'AMP a fait l'objet de plusieurs publications dont les résultats sont résumés dans le tableau 3, mais aucune ne concernait l'association MMF/sirolimus. La valeur de la surestimation variait d'une étude à l'autre en fonction du type de greffe, de la période post-transplantation, de l'immunosuppresseur associé, des prélèvements réalisés et de la méthodologie statistique employée (calcul et expression de la surestimation). Beal et al. (Ther Drug Monit 1998) rapportaient un biais moyen de  $1,88 \pm 0,86$  mg/L sur 102 échantillons plasmatiques obtenus chez des patients greffés rénaux, ce qui correspondait à une surestimation avec EMIT comprise entre 0,59 à 95,5% (la moyenne n'était pas indiquée). L'étude de Schütz et al. (Transplant Proc 1998(a)) portait sur différentes populations de patients et les valeurs décrites correspondaient aux pourcentages de surestimation de la méthode EMIT par rapport à la moyenne des deux méthodes EMIT et HPLC-UV (méthode de Bland-Altman). Les valeurs de biais les plus importantes (30 à 35%) avaient été obtenues chez les adultes greffés hépatiques sous tacrolimus et chez les patients transplantés rénaux (adultes et enfants) sous CsA. Chez les transplantés cardiaques les valeurs de biais moyens variaient de 7% chez les patients sous tacrolimus à 24% chez ceux sous CsA (les écart-types sur les biais moyens n'étaient pas rapportés). Cependant, ce mode de calcul ne paraît pas justifié ici car il suppose que les deux méthodes de dosage soient équivalentes. Dans nos études, nous avons considéré que la méthode LC-MS/MS était la méthode de référence et qu'elle fournissait les valeurs "vraies" des concentrations d'AMP.

Des différences de surestimation en fonction du type de greffe ou de l'immunosuppresseur associé ont également été rapportées dans d'autres études. Chez des transplantés cardiaques stables sous CsA, Vogl et al. (Ther Drug Monit 1999) rapportaient un biais moyen de +12% (écart-type non rapporté) entre EMIT et HPLC-UV. Chez des patients transplantés rénaux, la valeur moyenne du biais entre EMIT et HPLC-UV ( $+11,1 \pm 15,2\%$ ) était différente selon que le MMF était associé à la CsA ( $20,5 \pm 13,2\%$ ) ou au tacrolimus ( $6,9 \pm 14,2\%$ ) (Hosotsubo et al., Ther Drug Monit 2001). Enfin, une diminution de la surestimation de l'EMIT avec la période post-greffe avait été montrée dans une étude portant sur une population

pédiatrique sous CsA (Weber et al., Clin Chem 2002). Seules les valeurs médianes de surestimation étaient rapportées ce qui rend difficile la comparaison avec nos résultats.

Il a été démontré que la surestimation était en partie due à la réactivité croisée de l'EMIT avec l'AMPaG mais l'implication d'autres métabolites n'est pas exclue. D'autre part, les différences observées selon l'immunosuppresseur associé suggère que l'interaction de la CsA sur la PK de l'AMP pourrait jouer un rôle dans cette surestimation. La surestimation avec EMIT mesurée dans notre étude chez des patients sous sirolimus est plus élevée que celle décrite par plusieurs équipes chez des patients sous tacrolimus (Schütz et al., Transplant Proc 1998 (a) ; Hosotsubo et al., Ther Drug Monit 2001).

Quels que soient les phénomènes impliqués, il semble nécessaire de prendre en compte la surestimation de l'EMIT par rapport aux techniques chromatographiques utilisées pour le dosage de l'AMP dans le cadre des études PK et du STP. Du fait de la grande variabilité inter-patient, inter-période, voire en fonction des temps de prélèvement (sous CsA), l'EMIT ne nous a pas semblé utilisable pour nos études PK. Dans la suite de notre travail, nous n'avons tenu compte que des concentrations mesurées par HPLC-UV, LC-MS ou LC-MS/MS. Pour le STP, certains auteurs préconisent le recours à des valeurs cibles différentes selon la technique utilisée (Weber et al., Clin Chem 2002).



**Tableau 3** : Caractéristiques des études comparatives entre EMIT et HPLC ou LC-MS/MS pour le dosage de l'AMP chez des patients transplantés (1).

Référence	Population	Immunosuppresseur associé	Données PK	Période post-transplantation	Méthode de comparaison	Indices d'exposition comparés	Valeur de la surestimation avec EMIT
Beal et al. Ther Drug Monit 1998	Patients transplantés rénaux (n = 7)	NR	Profils complets	NR	(EMIT – HPLC) (EMIT – HPLC)/HPLC*100	Concentrations (n=102)	+ 1,88 ± 0,86 mg/L (0,08 ; 3,61) moyenne NR (0,59 ; 95,5 %)
Schütz et al. Transplant Proc 1998 (a)	Enfants transplantés rénaux (n=25)	CsA	Profils complets	NR	(EMIT-HPLC)/ Moyenne AMP	AUC <sub>0-12</sub>	+ 20%
	Adultes transplantés rénaux (n=12)	CsA	C <sub>0</sub>	< 3 mois		C0 (n= 95)	+ 30% à 35% (3 populations)
	Adultes transplantés hépatiques (n=10)	TAC	C <sub>0</sub>	< 3 mois		C0 (n=202)	
	Transplantés cardiaques (n=20)	TAC (n=15) CsA (n=5)	Profils complets	> 2 mois		Concentrations (n=182)	+ 7% (TAC) + 24% (CsA)
Vogl et al. Ther Drug Monit 1999	Patients transplantés cardiaques (n=18)	CsA	Profils complets	> 3 mois	(Moyenne EMIT- Moyenne HPLC)/moyenne HPLC*100	Concentrations (n=261)	+12%

**Tableau 3** : Caractéristiques des études comparatives entre EMIT et HPLC ou LC-MS/MS pour le dosage de l'AMP chez des patients transplantés (2).

Référence	Population	Immunosuppresseur associé	Données PK	Période post-transplantation	Méthode de comparaison	Indices d'exposition comparés	Valeur de la surestimation avec EMIT
Hosotsubo et al. Ther Drug Monit 2001	Patients transplantés rénaux	CsA	NR	NR	probablement (EMIT-HPLC)/HPLC*100	Concentrations (n=129)	+ 20,50 ± 13,16 % (n=89) (-7,03 ; 47,56)
		TAC					+ 6,88 ± 14,21 % (n=40) (-19,03 ; 46,97)
Weber et al. Clin Chem 2002	Enfants transplantés rénaux (n=50)	CsA	Profils complets	1 semaine	(EMIT-HPLC)/HPLC*100	C <sub>0</sub> , C <sub>12</sub> , AUC <sub>0-12</sub> (respectivement)	S1: 22,8 % ; 28,6 % ; 11,6 %
				3 semaines			S3: 35,4 % ; 23,3 % ; 17,4 %
				3 mois			M3: 14,9 % ; 23,9 % ; 10,3 %
				6 mois			M6: 46,7 % ; 16,7 % ; 6,2 %
Prémaud et al. Ther Drug Monit 2004	Adultes transplantés rénaux (n=24)	CsA	Profils complets	3 jours	(EMIT-LC-MS/MS)/LC-MS/MS*100	Concentrations (n=805) et AUC (n=77) respectivement	J3 : +83% ; +76,1%
				7 jours			J7 : +53,8% ; +51,2%
				30 jours			J30 : +53,2% ; +52,4%
				> 3 mois			>M3 : +32,3% ; +31,2%
Présente étude	Adultes transplantés rénaux (n=8)	Sirolimus	Profils complets	7 jours	(EMIT-LC-MS/MS)/(LC-MS/MS)*100	Concentrations (n=389) et AUC (n=39) respectivement	J7 : +29,8% ; +27,5%
				15 jours			J15 : +20,7% ; +19,3%
				1 mois			M1 : +18,1% ; +13,6%
				2 mois			M2 : +13,0% ; +9,1%
				3 mois			M3 : +11,7% ; +13,4%

AUC, area under the curve (aire sous la courbe); CsA, ciclosporine; EMIT, enzyme multiplied immunoassay technique; HPLC, chromatographie liquide haute performance; NR, non reporté; PK, pharmacocinétique; TAC, tacrolimus.

## III. Analyse pharmacocinétique de l'AMP

### III.1. Analyse non-compartmentale

Dans un premier temps, les pharmacocinétiques individuelles de l'AMP et de l'AMPG, son principal métabolite, ont été analysées selon une approche non-compartmentale.

#### III.1.1.Méthode

##### III.1.1.1. Indices d'exposition

L'analyse non-compartmentale a été réalisée sur les données de concentrations d'AMP et d'AMPG mesurées par LC-MS, LC-MS/MS ou HPLC-UV.

Les valeurs de  $C_0$ ,  $C_{max}$  et  $T_{max}$  correspondent aux valeurs observées. Les valeurs d'AUC ont été calculées par la méthode des trapèzes. Pour les cinétiques n'incluant pas de prélèvement à T12h, la valeur de l'AUC<sub>0-9</sub> a été analysée, puis la valeur de l'AUC<sub>0-12</sub> a été calculée en incluant la concentration à T12h estimée de la façon suivante :

- si  $C_9h < C_6h$  : extrapolation de C12h à partir des concentrations à T6h et T9h par la formule

$$\ln C_{12} = \ln C_6 + \frac{(\ln C_9 - \ln C_6)}{(T_9 - T_6)} \times (T_{12} - T_6)$$

- dans le cas où  $C_9h > C_6h$ , nous avons admis arbitrairement que  $C_{12} = C_0$ .

Nous avons analysé les valeurs brutes des concentrations ( $C_0$  et  $C_{max}$ ) et des AUC, puis les mêmes valeurs normalisées par gramme de dose de MMF.

##### III.1.1.2.Statistiques

La comparaison globale des indices d'exposition en fonction des différents délais post-transplantation au sein d'un même groupe de patients a été réalisée au moyen du test de Kruskal-Wallis. L'analyse de régression a permis de rechercher des tendances au cours du temps (augmentation ou diminution).

#### III.1.2.Cinétiques d'AMP chez des patients recevant de la ciclosporine

##### III.1.2.1.Données de la RCCT (van Gelder et al., Transplantation 1999)

Les profils de concentrations d'AMP mesurées par HPLC-UV issus de l'étude multicentrique dans laquelle la dose de MMF était adaptée régulièrement pour atteindre une AUC<sub>0-12</sub> cible, ont été analysés selon une approche non-compartmentale. Les valeurs des indices d'exposition bruts et standardisés par la dose sont reportées dans le tableau 4.

Les indices d'exposition présentent une importante variabilité avec des coefficients de variation (CV) inter-patients supérieurs à 40%. En effet, il est généralement admis qu'une variabilité est faible pour un CV inférieur à 10%, modérée pour un CV compris entre 10 et 30% et forte pour un CV supérieur à 30% (Shah et al., Pharm Res 1996). Les CV inter-patients sur les AUC<sub>0-12</sub> pondérées par la dose étaient de 44,4% à J3, 54,6% à J7 et 44,2% à J11. Les doses de MMF administrées étaient différentes en fonction de la période post-greffe considérée ( $p=0,0001$ ) et une analyse de régression a révélé une augmentation de la dose avec le délai ( $r=0,111$ ,  $p=0,04$ ). Aucune différence significative des indices d'exposition normalisés par la dose en fonction du délai post-greffe n'a été mise en évidence. En revanche il existait une différence significative des AUC<sub>0-12</sub> brutes entre les différentes périodes ( $p<0,05$ ) mais aucune tendance significative n'a été montrée.

**Tableau 4 :** Indices d'exposition de l'AMP bruts et pondérés par la dose de MMF obtenus chez des patients greffés *de novo* à différents délais post-transplantation. Les données sont issues de l'étude multicentrique RCCT (van Gelder et al., Transplantation 1999).

	<b>J3</b> (n=131)	<b>J7</b> (n=121)	<b>J11</b> (n=101)	<b>p</b>
Dose de Cellcept (mg/prise)	<b>1020 ± 519</b>	<b>1185 ± 604</b>	<b>1268 ± 648</b>	0,0001
C <sub>0</sub> (mg/L)	(450 – 1700) <b>0,81 ± 0,71</b>	(400 – 2200) <b>0,83 ± 0,54</b>	(350 – 2200) <b>1,05 ± 2,16</b>	0,42
C <sub>0</sub> /g de dose (mg/L)	(0,10 – 3,91) <b>0,82 ± 0,53</b>	(0,16 – 2,61) <b>0,79 ± 0,59</b>	(0,11 – 21,6) <b>0,82 ± 1,02</b>	0,5
C <sub>max</sub> (mg/L)	(0,11 – 2,74) <b>9,83 ± 7,24</b>	(0,14 – 3,91) <b>11,57 ± 8,19</b>	(0,08 – 9,82) <b>11,30 ± 8,05</b>	0,16
C <sub>max</sub> /g de dose (mg/L)	(0,88 – 34,40) <b>10,71 ± 7,76</b>	(0,32 – 12) <b>11,17 ± 8,19</b>	(1,27 – 39,20) <b>10,18 ± 6,71</b>	0,92
T <sub>max</sub> (h)	(0,99 – 49,56) <b>1,17 ± 1,67</b>	(0,76 – 43,33) <b>0,96 ± 1,18</b>	(1,29 – 44,25) <b>0,97 ± 0,74</b>	0,31
AUC <sub>0-12</sub> (mg.h/L)	(0,3 – 12) <b>26,0 ± 16,7</b>	(0,32 – 12) <b>28,7 ± 17</b>	(0,3 – 6,17) <b>30,7 ± 15,4</b>	0,03
AUC <sub>0-12</sub> /g de dose (mg.h/L)	(5,3 – 118,1) <b>26,90 ± 11,95</b>	(4,7 – 106,2) <b>27,06 ± 14,76</b>	(8,43 – 68) <b>27 ± 11,93</b>	0,89
	(9,41 – 72,51)	(4,46 – 89,53)	(8,71 – 71,4)	

Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées

### III.1.2.2. Données Primocine

Ces données ont été recueillies chez 24 patients greffés *de novo* à J3, J7 et J30 suivant la transplantation.

#### III.1.2.2.1. Profils de concentration

La figure 5 présente l'évolution des concentrations plasmatiques d'AMP en fonction du temps chez l'ensemble des patients, pour chaque période post-transplantation étudiée.

L'analyse visuelle de l'évolution des concentrations d'AMP montre une importante hétérogénéité des profils PK, les courbes étant caractérisées par une grande variabilité de l'intensité et du délai d'absorption et par la présence de pics secondaires de concentration plus ou moins intenses et plus ou moins précoces. Certaines courbes présentent même des profils atypiques (plus de deux pics de concentrations, courbes plates, ligne de base instable).

#### III.1.2.2.2. Indices d'exposition

Les indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG déterminés selon une approche non-compartimentale sont présentés pour chaque délai post-greffe dans les tableaux 5 et 6.

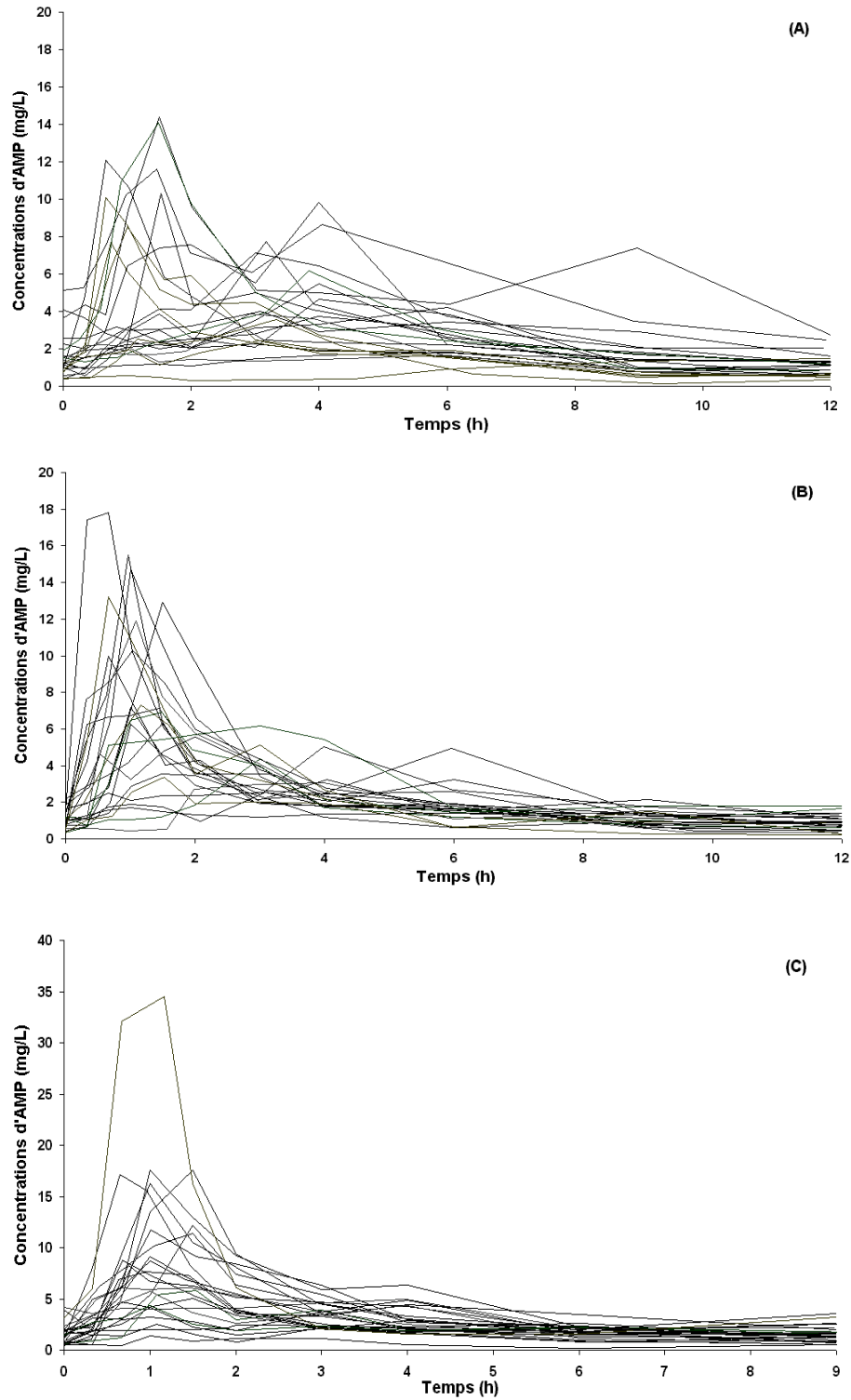


Figure 5: Courbes individuelles des concentrations plasmatiques d'AMP obtenues à J3 (A), J7 (B), J30 (C) chez des patients greffés rénaux *de novo*.

Tableau 5 : Indices d'exposition à l'AMP au cours du premier mois post-greffe chez des patients transplantés rénaux.

	<b>J3</b> (n=24)	<b>J7</b> (n=23)	<b>J30</b> (n=24)	<b>p</b>
<b>Dose de Cellcept (mg/prise)</b>	<b>989,6 ± 51,0</b>	<b>1000</b>	<b>927,1 ± 187,7</b>	0,07
	(750 – 1000)	(1000 – 1000)	(250 – 1000)	
<b>Dose de Néoral (mg/prise)</b>	<b>240,4 ± 52,6</b>	<b>232,6 ± 59,7</b>	<b>194,4 ± 67,1</b>	0,005
	(150 – 350)	(100 – 400)	(100 – 400)	
<b>AMP</b>				
C <sub>0</sub> (mg/L)	<b>1,57 ± 1,21</b>	<b>1,06 ± 0,50</b>	<b>1,53 ± 1,04</b>	0,26
	(0,38 – 5,15)	(0,36 – 2,17)	(0,1 – 4,16)	
C <sub>0</sub> /g de dose (mg/L)	<b>1,58 ± 1,20</b>	<b>1,06 ± 0,50</b>	<b>1,62 ± 1,03</b>	0,15
	(0,38 – 5,15)	(0,36 – 2,17)	(0,4 – 4,16)	
C <sub>max</sub> (mg/L)	<b>6,66 ± 3,95</b>	<b>7,87 ± 4,58</b>	<b>9,53 ± 7,22</b>	0,34
	(1,5 – 14,4)	(1,69 – 17,8)	(1,4 – 34,5)	
C <sub>max</sub> /g de dose (mg/L)	<b>6,76 ± 4,01</b>	<b>7,87 ± 4,58</b>	<b>10,38 ± 7,51</b>	0,17
	(1,5 – 14,4)	(1,69 – 17,8)	(2,55 – 34,5)	
T <sub>max</sub> (h)	<b>3,17 ± 2,56</b>	<b>1,75 ± 1,28</b>	<b>1,68 ± 1,78</b>	0,03
	(0,67 – 12)	(0,67 – 6)	(0,65 – 9)	
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>27,1 ± 13,1</b>	<b>24,2 ± 7,9</b>	<b>28,3 ± 11,1</b>	0,40
	(6,1 – 61,0)	(11,9 – 41,8)	(4,5 – 54,9)	
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>27,4 ± 13,0</b>	<b>24,2 ± 7,9</b>	<b>31,0 ± 13,1</b>	0,21
	(6,1 – 61,0)	(11,9 – 41,8)	(12,3 – 68,6)	
AUC <sub>0-12</sub> (mg.h/L)	<b>31,1 ± 15,4</b>	<b>27,1 ± 8,5</b>	<b>32,3 ± 12,1*</b>	0,24
	(10,4 – 71,4)	(12,6 – 46,3)	(4,8 – 64,5)	
AUC <sub>0-12</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>31,4 ± 15,3</b>	<b>27,1 ± 8,5</b>	<b>35,4 ± 14,3*</b>	0,12
	(10,4 – 71,4)	(12,6 – 46,3)	(13,7 – 75,6)	

Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées

\* valeurs des C12h estimées



**Tableau 6** : Indices d'exposition à l'AMPG et créatinine sérique au cours du premier mois post-greffe chez des patients transplantés rénaux.

	<b>J3</b> (n=24)	<b>J7</b> (n=23)	<b>J30</b> (n=24)	<b>p</b>
<b>AMPG</b>				
T <sub>max</sub> (h)	<b>4,38 ± 2,15</b> (0 – 9)	<b>3,43 ± 1,72</b> (0,33 – 6,2)	<b>3,68 ± 2,07</b> (0 – 9,2)	0,34
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>1395,8 ± 694,8</b> (551,9 – 2950,2)	<b>1440,0 ± 972,6</b> (676,8 – 5067,9)	<b>1190,1 ± 977,5</b> (232,7 – 5362,2)	0,23
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>1404,5 ± 684,7</b> (669,2 – 2950,1)	<b>1440,0 ± 972,6</b> (676,8 – 5067,9)	<b>1309 ± 1020,4</b> (510 – 5362,2)	0,54
AUC <sub>0-12</sub> (mg.h/L)	<b>1794,4 ± 865,8</b> (739,8 – 3795,9)	<b>1854,2 ± 1317,3</b> (812,6 – 6852,9)	<b>1520,6 ± 1326,4*</b> (297,5 – 7173,8)	0,16
AUC <sub>0-12</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>1806,2 ± 852,3</b> (805 – 3795,9)	<b>1854,2 ± 1317,3</b> (812,6 – 6852,9)	<b>1677,6 ± 1392,1*</b> (629,7 – 7173,8)	0,12
<b>Créatinine sérique (μM)</b>	<b>296 ± 291,6</b> (88 – 1053)	<b>203 ± 159,4</b> (83 – 718)	<b>150,7 ± 125,2</b> (65 – 716)	0,07
Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées				
* valeurs des C12h estimées				

Les valeurs des indices d'exposition à l'AMP sont en accord avec celles précédemment rapportées dans la littérature pour la période post-greffe précoce (Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999 ; Wollenberg et al., Transplant Proc 1998) et sont du même ordre de grandeur que celles obtenues chez les patients greffés *de novo* de l'étude RCCT (§ III.1.2.1).

Les valeurs des CV intra-patient calculés sur les AUC<sub>0-12</sub> brutes d'AMP (moyenne=30,30% ; intervalle=6,96%-62,68%) et normalisées par la dose (moyenne=30,15% ; intervalle=6,95%-76,50%) révèlent une forte variabilité intra-individuelle de la PK de l'AMP au cours des quatre premières semaines suivant la transplantation. De plus, tous les indices d'exposition à l'AMP sont caractérisés par une importante variabilité inter-individuelle avec, pour des doses équivalentes de MMF, des valeurs de CV inter-patient supérieures à 30% pour tous les indices et aux 3 périodes considérées.

Les concentrations d'AMPG sont élevées par rapport à celles de l'AMP et témoignent d'un métabolisme intense de l'AMP en AMPG. De plus, comme cela est rapporté dans la littérature, le T<sub>max</sub> du métabolite est retardé par rapport à celui du produit parent. Les AUC d'AMPG, brutes et normalisées par la dose de MMF, présentent une importante variabilité inter-

individuelle avec des CV supérieurs à 45% pour chaque période considérée. Les rapports métaboliques moyens calculés à partir des  $AUC_{0-12}$  (AMP/AMPG) étaient respectivement de  $2,3 \pm 1,5\%$ ,  $2,0 \pm 1,0\%$  et  $2,7 \pm 1,2\%$  à J3, J7 et J30. Ces rapports étaient très variables d'un patient à l'autre avec des CV de 63,4% à J3, 53% à J7 et 44,4% à J30, ce qui suggère une variabilité importante du métabolisme de l'AMP entre les patients et pourrait peut-être expliquer en partie la variabilité PK de l'AMP.

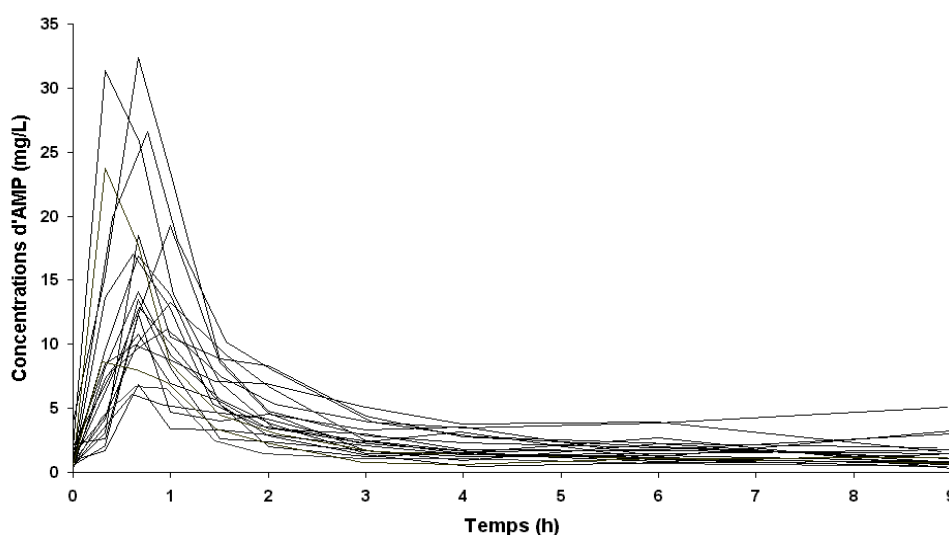
Le test de Kruskal-Wallis a montré l'existence d'une différence significative ( $p < 0,05$ ) des  $T_{max}$  de l'AMP en fonction des périodes. Les valeurs de  $T_{max}$  observées tendaient à diminuer au cours du temps et elles étaient significativement différentes entre J3 et J30 ( $p < 0,05$ ). Aucune évolution significative au cours du 1<sup>er</sup> mois suivant la greffe n'a été mise en évidence pour les autres indices d'exposition. Les doses de CsA administrées étaient statistiquement ( $p = 0,005$ ) différentes selon les périodes, conformément au schéma de prescription et de STP de ce médicament. Par ailleurs, les taux sériques de créatinine étaient significativement et inversement corrélés au délai post-greffe ( $r = -0,251$  ;  $p < 0,04$ ). La diminution de la créatininémie au cours du premier mois suivant la greffe témoigne de la reprise de la fonction rénale.

### III.1.2.3. Données Stablocine

Ces données proviennent de 20 patients à l'état stable, ayant bénéficié d'une greffe rénale depuis au moins 3 mois.

#### III.1.2.3.1. Profils pharmacocinétiques

La figure 6 représente l'évolution des concentrations plasmatiques d'AMP en fonction du temps chez l'ensemble des 20 patients.



**Figure 6** : Courbes des concentrations plasmatiques d'AMP en fonction du temps obtenues au-delà de 3 mois de greffe chez 20 patients greffés rénaux stables.

Les profils observés plus de 3 mois après la transplantation sont plus classiques et plus homogènes que ceux obtenus en période précoce. Les courbes présentent, conformément à ce qui est décrit dans la littérature, une croissance rapide des concentrations, qui atteignent toutes un maximum dans la première heure, suivie d'une décroissance rapide. Chez certains de ces patients, un second pic de concentration, d'intensité plus faible que le premier et lié au cycle entéro-hépatique de l'AMP a été observé.

#### III.1.2.3.2. Indices d'exposition

Les tableaux 7 et 8 présentent les principaux indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG.

Tableau 7 : Indices d'exposition à l'AMP chez des patients stables au-delà de 3 mois après la greffe.

	<b>&gt;M3 (n=20)</b>
<b>Dose de Cellcept (mg/prise)</b>	<b>862,5 ± 221,8</b>
	(500 – 1000)
<b>Dose de Néoral (mg/prise)</b>	<b>126,3 ± 29,8</b>
	(75 – 175)
<b>AMP</b>	
C <sub>0</sub> (mg/L)	<b>1,12 ± 0,88</b>
	(0,28 – 3,91)
C <sub>0</sub> / g de dose (mg/L)	<b>1,28 ± 0,84</b>
	(0,54 – 3,91)
C <sub>max</sub> (mg/L)	<b>15,61 ± 7,75</b>
	(6,12 – 32,36)
C <sub>max</sub> /g de dose (mg/L)	<b>20,0 ± 12,9</b>
	(6,1 ± 53,2)
T <sub>max</sub> (h)	<b>0,66 ± 0,19</b>
	(0,3 – 1)
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>30,4 ± 11,0</b>
	(13,6 – 51)
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>38,7 ± 20,3</b>
	(13,6 – 102,0)
AUC <sub>0-12</sub> *(mg.h/L)	<b>33,8 ± 12,7</b>
	(14,8 – 56,5)
AUC <sub>0-12</sub> /g de dose* (mg.h/L)	<b>42,8 ± 22,6</b>
	(14,8 – 112,9)
Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées.	
* valeurs des C12h estimées	

**Tableau 8** : Indices d'exposition à l'AMPG et créatinine sérique chez des patients stables au-delà de 3 mois après la greffe.

	<b>&gt;M3</b>
	<b>(n=20)</b>
<b>AMPG</b>	
T <sub>max</sub> (h)	<b>2,38 ± 1,81</b> (0,67 – 8,92)
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>813,6 ± 354,1</b> (363 – 2068,4)
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>995,5 ± 461,5</b> (574,9 – 2228)
AUC <sub>0-12</sub> *(mg.h/L)	<b>1011,0 ± 442,7</b> (457,3 – 2609,8)
AUC <sub>0-12</sub> /g de dose* (mg.h/L)	<b>1237,6 ± 571,4</b> (673,8 – 2692)
<b>Créatinine sérique (µM)</b>	<b>126,9 ± 30,3</b> (78-217)

Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées.  
\* valeurs des C12h estimées

En période stable, les indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG, bruts ou normalisés par la dose, sont caractérisés par une importante variabilité inter-individuelle avec des CV supérieurs à 35%. Seul le T<sub>max</sub> de l'AMP présente une variabilité modérée avec un CV égal à 28,9%. Le rapport métabolique moyen calculé sur les AUC<sub>0-9</sub> (AMP/AMPG) est de 4,0±1,4% et présente un CV moyen inter-patient de 33,9%.

Les indices d'exposition bruts et normalisés par la dose ont été comparés avec ceux obtenus en période précoce dans le cadre de l'étude Primocine. L'étude de l'évolution des indices bruts par analyse de régression a montré que les C<sub>max</sub> de l'AMP tendaient à augmenter (p<0,0001) et que les T<sub>max</sub> d'AMP et d'AMPG ainsi que les AUC<sub>0-12</sub> d'AMPG tendaient à diminuer (respectivement p<0,0002, p<0,007 et p<0,05) avec le délai post-greffe (figure 7). Les analyses de régression réalisées sur les indices normalisés par la dose ont montré une relation significative entre le délai post-greffe et les C<sub>max</sub>/dose d'AMP (p<0,0001) et entre le délai post-greffe et l'AUC<sub>0-12</sub>/dose d'AMP (p=0,002), dans le sens d'une augmentation de la valeur de ces indices avec le délai. En revanche, les valeurs de l'AUC<sub>0-12</sub>/dose d'AMPG diminuaient significativement avec le délai post-greffe (r=-0,212 ; p<0,05).

Les doses de CsA administrées en période stable étaient significativement réduites par rapport à celles administrées à J30 ( $p < 0,0001$ ). De plus, sur l'ensemble des périodes étudiées, les  $AUC_{0-12}/g$  de dose de l'AMP étaient inversement (mais faiblement) corrélées avec les doses de CsA ( $r = -0,318$  ;  $p < 0,003$ ).

Enfin, les valeurs du taux sérique de créatinine, qui diminuaient progressivement durant la période précoce, étaient encore plus basses en période stable ce qui est en accord avec l'amélioration de la fonction rénale dans les premiers mois post-transplantation. Les valeurs de la créatininémie observées en période stable montrent une grande variabilité témoignant de l'état fonctionnel variable du greffon, en partie dû à la néphrotoxicité de la CsA chez certains patients greffés depuis plusieurs années.

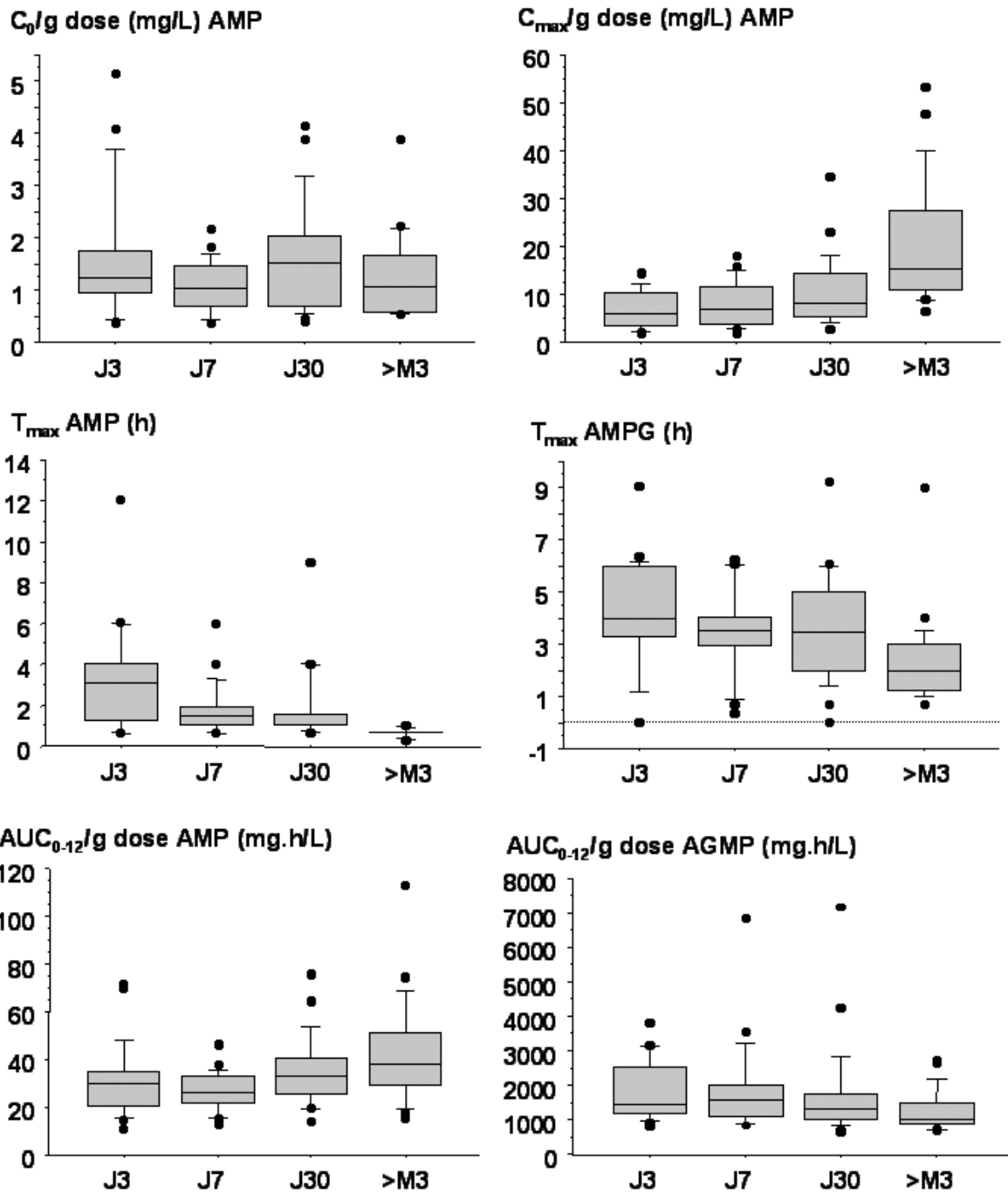


Figure 7 : Evolution des indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG pondérés par la dose de MMF en fonction du délai post-transplantation chez des patients greffés rénaux *de novo* (J3, J7 et J30) et stables (>M3) recevant de la CsA. Chaque graphe en boîte est composé de cinq lignes horizontales affichant, de bas en haut, les 10<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup>, 75<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> centiles de la variable étudiée. Les points correspondent aux valeurs extrêmes.

#### III.1.2.4. Données issues d'un groupe indépendant de patients

Ces données ont été obtenues chez cinq patients greffés rénaux ayant fourni des cinétiques d'AMP complètes à J15, M1, M2 et M3 après leur transplantation. Bien que l'effectif

soit très réduit, il est intéressant de les considérer séparément car il s'agit ici des seuls patients suivis à la fois en période précoce et en période stable.

Selon le délai post-greffe considéré, les indices d'exposition à l'AMP observés chez ces patients sont comparables à ceux observés chez les patients *de novo* et chez les patients stables décrits précédemment (tableau 9). Le nombre de cinétiques disponibles pour chaque période est insuffisant pour étudier statistiquement l'évolution des indices d'exposition en fonction du délai post-greffe. Toutefois, la figure 8 suggère une tendance à l'augmentation des valeurs des  $C_{max}/dose$  et des  $AUC_{0-9}/dose$  de l'AMP avec le délai post-transplantation.



**Tableau 9 :** Indices d'exposition à l'AMP et créatinine sérique chez des patients greffés rénaux à différentes périodes post-transplantation.

	<b>J15</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
	<b>(n=5)</b>	<b>(n=5)</b>	<b>(n=5)</b>	<b>(n=4)</b>
<b>Dose de Cellcept (mg/prise)</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>875 ± 250</b>
$C_0$ (mg/L)	(1000 – 1000) <b>1,07 ± 0,81</b>	(1000 – 1000) <b>1,22 ± 0,46</b>	(1000 – 1000) <b>1,07 ± 0,90</b>	(500 – 1000) <b>1,99 ± 1,21</b>
$C_0/g$ de dose (mg/L)	(0,44 – 2,49) <b>1,07 ± 0,81</b>	(0,85 – 1,92) <b>1,22 ± 0,46</b>	(0,26 – 2,43) <b>1,07 ± 0,90</b>	(1,15 – 3,79) <b>2,28 ± 1,07</b>
$C_{max}$ (mg/L)	(0,44 – 2,49) <b>6,84 ± 1,82</b>	(0,85 – 1,92) <b>10,02 ± 2,97</b>	(0,26 – 2,43) <b>10,45 ± 4,84</b>	(1,50 – 3,79) <b>10,75 ± 1,21</b>
$C_{max}/g$ de dose (mg/L)	(3,96 – 8,29) <b>6,84 ± 1,82</b>	(6,97 – 14,1) <b>10,02 ± 2,97</b>	(7,42 – 18,90) <b>10,45 ± 4,84</b>	(9,18 – 11,8) <b>13,65 ± 6,46</b>
$T_{max}$ (h)	(3,96 – 8,29) <b>1,40 ± 0,23</b>	(6,97 – 14,1) <b>0,87 ± 0,28</b>	(7,42 – 18,90) <b>1,48 ± 0,88</b>	(9,18 – 23,2) <b>1,30 ± 0,59</b>
$AUC_{0-9}$ (mg.h/L)	(1 – 1,55) <b>25,6 ± 5,7</b>	(0,55 – 1,17) <b>31,7 ± 6,7</b>	(0,92 – 3) <b>37,5 ± 15,5</b>	(0,67 – 2,02) <b>36,64 ± 8,93</b>
$AUC_{0-9}/g$ de dose (mg.h/L)	(18,6 – 31,1) <b>25,6 ± 5,7</b>	(22,7 – 37,3) <b>31,7 ± 6,7</b>	(24,0 – 60,2) <b>37,5 ± 15,5</b>	(26,94 – 48,54) <b>43,4 ± 9,3</b>
$AUC_{0-12}^*$ (mg.h/L)	(18,6 – 31,1) <b>28,2 ± 6,3</b>	(22,7 – 37,3) <b>34,3 ± 7,1</b>	(24,0 – 60,2) <b>44,6 ± 17,2</b>	(34,8 – 53,9) <b>40,13 ± 9,29</b>
$AUC_{0-12}/g$ de dose * (mg.h/L)	(21 – 34,4) <b>28,2 ± 6,3</b>	(24,3 – 39,9) <b>34,3 ± 7,1</b>	(25,5 – 68,5) <b>44,6 ± 17,2</b>	(29,94 – 51,97) <b>47,6 ± 10,4</b>
<b>Créatinine sérique (<math>\mu M</math>)</b>	(21 – 34,4) <b>105,8 ± 21,9</b>	(24,3 – 39,9) <b>111 ± 36,7</b>	(25,5 – 68,5) <b>104 ± 31,2</b>	(36,7 – 59,9) <b>96,5 ± 26,4</b>
	(76 – 133)	(86 – 170)	(83 – 159)	(81 – 136)

Les données correspondent aux valeurs moyennes ( $\pm$  SD) et à l'intervalle des valeurs minimum et maximum observées.

\* valeurs des C12h estimées.

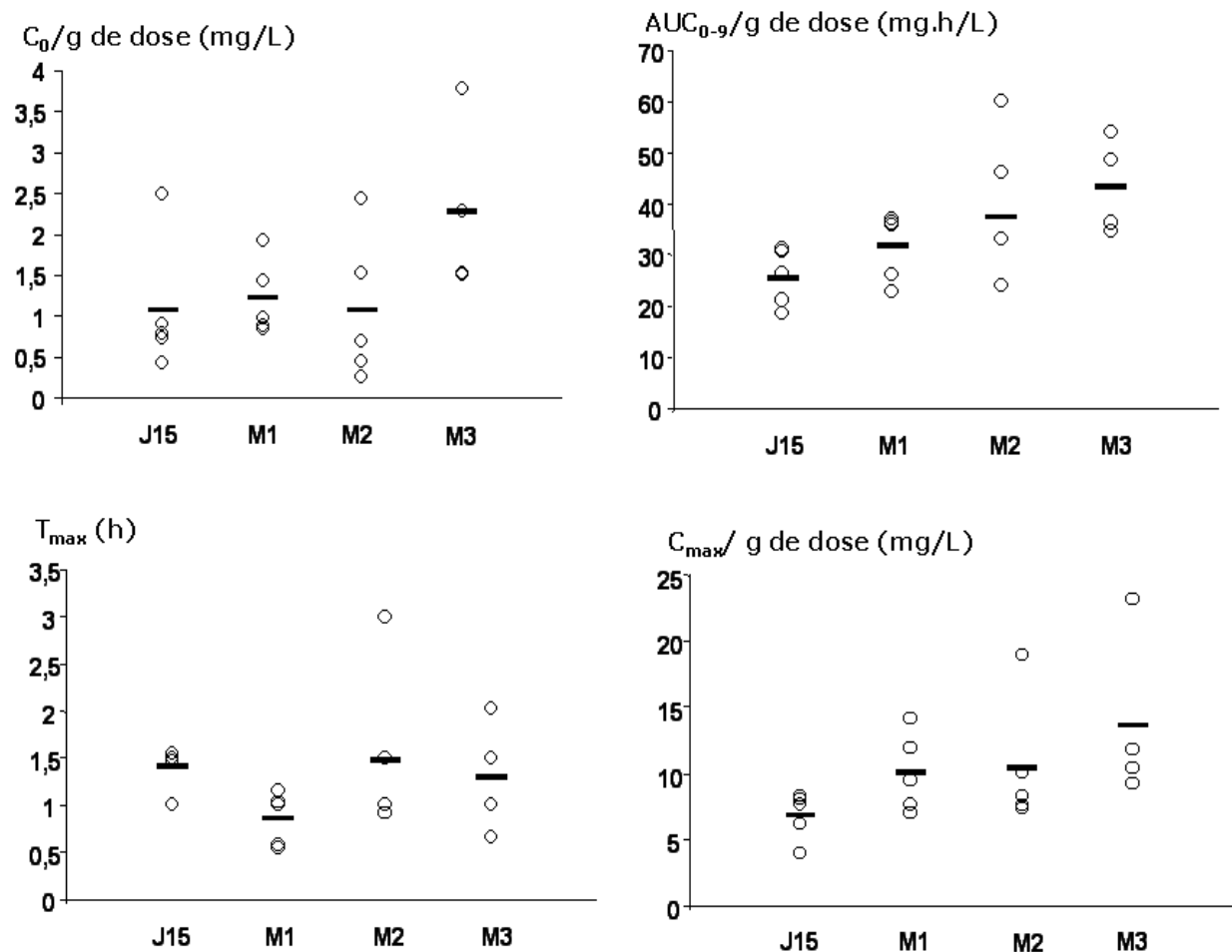


Figure 8 : Evolution de  $T_{max}$  et des principaux indices d'exposition de l'AMP pondérés par la dose avec le délai post-transplantation chez 5 patients greffés rénaux recevant de la CsA. Les traits horizontaux représentent les valeurs moyennes.

### III.1.2.5. Données de l'étude afro-américaine/caucasienne

Le tableau 10 présente les indices d'exposition bruts observés chez 78 patients stables inclus dans l'étude afro-américaine/caucasienne (Pescovitz et al., Am J Transplant 2003). Ces patients avaient reçu une greffe rénale depuis plus de 6 mois. Les doses individuelles n'étant pas disponibles, les indices normalisés par la dose n'ont pu être calculés.

Tableau 10 : Indices bruts d'exposition à l'AMP obtenus chez 78 patients ayant bénéficié d'une greffe rénale depuis plus de 6 mois.

	$C_0$ (mg/L)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (mg/L)	$AUC_{0-12}$ (mg.h/L)
<b>Afro-américains</b>	<b><math>2,74 \pm 1,66</math></b> (0,79 – 7,53)	<b><math>1,32 \pm 0,80</math></b> (0,67 – 3)	<b><math>19,77 \pm 7,45</math></b> (7,41 – 37,30)	<b><math>59,0 \pm 15,3</math></b> (38,1 – 106,3)
<b>Caucasiens</b>	<b><math>2,41 \pm 1,58</math></b> (0,21 – 10,1)	<b><math>1,20 \pm 0,69</math></b> (0,33 – 3)	<b><math>21,28 \pm 11,27</math></b> (4,86 – 68,80)	<b><math>57,4 \pm 20,3</math></b> (15,0 – 137,0)

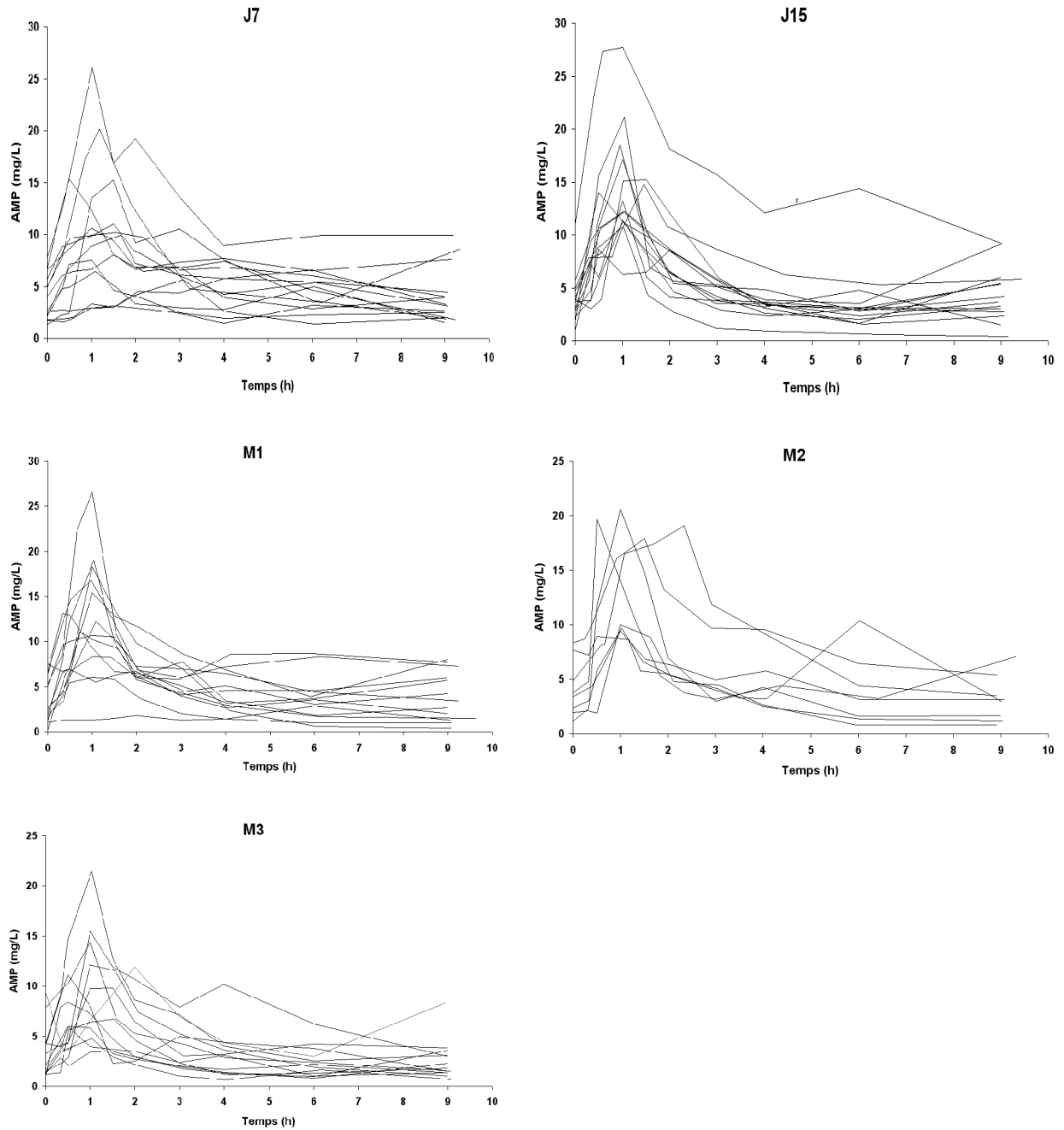
Les indices d'exposition bruts observés chez ces patients étaient du même ordre de grandeur que ceux obtenus chez les patients stables de l'étude Stablocine.

Les résultats détaillés concernant cette étude sont décrits dans l'article de Pescovitz et al. (Am J Transplant 2003).

### III.1.3. Cinétiques d'AMP chez des patients recevant du sirolimus

Une analyse non-compartimentale a également été réalisée sur les données de concentrations d'AMP obtenues chez 14 patients recevant du sirolimus comme immunosuppresseur associé au MMF, dans le cadre de l'étude Cinesiren. Ces données concernent des périodes post-greffe précoces et stables (J7, J15, M1, M2 et M3).

L'allure des courbes des concentrations plasmatiques d'AMP en fonction du temps obtenues dans le cas de l'association avec le sirolimus était comparable à celle observée dans le cas de l'association du MMF avec la CsA. Les profils PK étaient assez hétérogènes et présentaient des pics secondaires de concentration plus ou moins précoces (figure 9).



**Figure 9 :** Courbes individuelles des concentrations plasmatiques d'AMP obtenues à J7, J15, M1, M2 et M3 post-greffe chez des patients greffés rénaux traités par l'association MMF/sirolimus.

Tableau 11 : Indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG chez des patients recevant du sirolimus

	<b>J7</b>	<b>J15</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
	<b>(n=14)</b>	<b>(n=14)</b>	<b>(n=13)</b>	<b>(n=8)</b>	<b>(n=13)</b>
Dose de Cellcept (mg/prise)	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>885 ± 242</b>	<b>812 ± 222</b>	<b>635 ± 263</b>
	(1000 – 1000)	(1000 – 1000)	(250 – 1000)	(500 – 1000)	(250 – 1000)
<b>AMP</b>					
C <sub>0</sub> (mg/L)	<b>3,94 ± 2,16</b>	<b>3,98 ± 2,38</b>	<b>3,37 ± 2,45</b>	<b>4,18 ± 2,63</b>	<b>3,52 ± 2,71</b>
	(1,33 – 7,76)	(0,99 – 11)	(0,22 – 7,48)	(1,11 – 8,31)	(1,17 – 9,44)
C <sub>0</sub> /g de dose (mg/L)	<b>3,94 ± 2,16</b>	<b>3,98 ± 2,38</b>	<b>4,19 ± 3,26</b>	<b>6,10 ± 4,98</b>	<b>6,41 ± 5,62</b>
	(1,33 – 7,76)	(0,99 – 11)	(0,22 – 10,12)	(1,11 – 15,38)	(1,17 – 18,88)
C <sub>max</sub> (mg/L)	<b>11,14 ± 6,21</b>	<b>14,86 ± 4,97</b>	<b>12,80 ± 6,52</b>	<b>14,60 ± 5,11</b>	<b>10,13 ± 5,05</b>
	(3,17 – 26,1)	(8,63 – 27,7)	(1,84 – 26,6)	(9,43 – 20,6)	(3,59 – 21,5)
C <sub>max</sub> /g de dose (mg/L)	<b>11,14 ± 6,21</b>	<b>14,86 ± 4,97</b>	<b>14,44 ± 6,50</b>	<b>19,50 ± 9,66</b>	<b>17,93 ± 10,86</b>
	(3,17 – 26,1)	(8,63 – 27,7)	(6,01 – 26,6)	(9,66 – 39,4)	(6,72 – 43)
T <sub>max</sub> (h)	<b>2,04 ± 1,77</b>	<b>1 ± 0,27</b>	<b>0,97 ± 0,38</b>	<b>1,80 ± 1,79</b>	<b>1,62 ± 2,26</b>
	(0,5 – 6)	(0,5 – 1,5)	(0,33 – 2)	(0,5 – 6,03)	(0,5 – 9)
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>52,1 ± 23,8</b>	<b>52,0 ± 27,6</b>	<b>48 ± 20,5</b>	<b>51,2 ± 20,4</b>	<b>34,9 ± 16,5</b>
	(23,0 – 114,1)	(20,3 – 138,7)	(10,5 – 84,3)	(26,6 – 81,9)	(15,1 – 68,1)
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>52,1 ± 23,8</b>	<b>52,0 ± 27,6</b>	<b>56,5 ± 26,4</b>	<b>70,0 ± 36,2</b>	<b>61,6 ± 35,5</b>
	(23,0 – 114,1)	(20,3 – 138,7)	(25,1 – 112,7)	(26,6 – 112,8)	(22,5 – 136,2)
<b>AMPG</b>					
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	<b>1833,5 ± 850,4</b>	<b>1270,4 ± 449,6</b>	<b>780,6 ± 302,2</b>	<b>645,0 ± 540,6</b>	<b>675,8 ± 299,5</b>
	(711,3 – 3783,2)	(825,3 – 2231,3)	(456,6 – 1442)	(306,5 – 2072,4)	(211,7 – 1118,7)
AUC <sub>0-9</sub> /g de dose (mg.h/L)	<b>1833,5 ± 850,4</b>	<b>1270,4 ± 449,6</b>	<b>1016,2 ± 617,0</b>	<b>897,2 ± 540,6</b>	<b>1232,6 ± 806,0</b>
	(711,3 – 3783,2)	(825,3 – 2231,3)	(543,9–2560,2)	(306,5 – 2072,4)	(423,5 – 3084,4)

Les données correspondent aux valeurs moyennes (± SD) et à l'intervalle entre les valeurs minimum et maximum observées.

Pour des doses de MMF équivalentes, les patients recevant du sirolimus présentaient des concentrations d'AMP plus élevées que les patients recevant de la CsA (tableau 11). L'exposition à l'AMP présentait une importante variabilité inter-individuelle, avec des CV sur les AUC<sub>0-9</sub>/dose compris entre 45 et 58%. L'étude de l'évolution des indices d'exposition bruts et normalisés par la dose a montré que seuls les T<sub>max</sub> de l'AMP (p<0,05) et les AUC<sub>0-9</sub> d'AMPG bruts (p<0,001) et pondérés par la dose (p<0,01) différaient en fonction des périodes post-transplantation. L'analyse de régression a mis en évidence une évolution significative (diminution) des AUC<sub>0-9</sub> d'AMPG bruts et des doses de MMF administrées (respectivement

$p < 0,0001$  et  $p < 0,001$ ) avec le délai post-greffe, mais n'a montré aucune corrélation significative entre les  $T_{max}$  d'AMP ou les  $AUC_{0-9}/dose$  d'AMPG et le délai post-greffe.

### III.1.4. Discussion sur l'analyse pharmacocinétique de l'AMP selon une approche non-compartmentale

Ces analyses non-compartmentales ont montré que, quel que soit l'immunosuppresseur associé (CsA ou sirolimus), les profils PK de l'AMP étaient relativement hétérogènes dans la période précoce suivant la greffe. Ces observations semblent en accord avec celles de Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) qui avaient décrit une certaine complexité des profils PK de l'AMP durant le premier mois suivant la greffe. En effet, les courbes de concentrations étaient caractérisées par des délais d'absorption variables, des profils d'absorption complexes et l'existence de rebonds entérohépatiques importants. D'autres études portant sur la PK de l'AMP durant cette période (Wollenberg et al., Transplant Proc 1998 ; Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999) ne faisaient pas état de ce phénomène et les profils PK étaient décrits de façon globale par l'existence d'un pic de concentration précoce suivi d'un deuxième pic plus tardif de moindre intensité. Il semblerait que de tels profils soient plutôt observés en période stable dans les différentes populations étudiées ici.

L'exposition à l'AMP était caractérisée par une importante variabilité inter-individuelle. Les valeurs des indices d'exposition à l'AMP et à l'AMPG obtenues en période précoce et plus tardive étaient conformes à ce qui est rapporté dans la littérature chez des patients transplantés rénaux traités par MMF en association avec de la CsA (Shaw et al., J Clin Pharmacol 2000, Yeung et al., Transplant Proc 2000 ; Brunet et al., Transplant Int 2000 ; Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999 ; Wollenberg et al., Transplant Proc 1998 ; Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998) ou du sirolimus (Büchler et al., Am J Transplant 2004 ; Pescovitz et al., Am J Transplant 2004).

Chez les patients sous CsA, l'exposition à l'AMP standardisée par la dose était constante au cours du premier mois suivant la transplantation et tendait à augmenter entre le premier mois et la période stable, tandis que les concentrations d'AMPG diminuaient. Les mécanismes probablement impliqués dans cette augmentation sont décrits précisément dans la première partie de ce travail (§ 1.4.2.2.). En revanche aucune évolution significative n'a été mise en évidence chez les patients sous sirolimus. Ceci renforcerait l'hypothèse de la responsabilité majeure de la CsA dans l'évolution de la clairance apparente ( $AUC/dose$ ) de l'AMP avec le délai et pourrait donc infirmer le rôle des corticostéroïdes. Toutefois, le nombre de patients sous sirolimus était ici trop faible pour conclure avec certitude.

Malgré le comportement PK très variable de l'AMP d'un patient à l'autre, pendant la période précoce, un intérêt particulier doit être porté à cette période car elle est déterminante

pour la réussite du traitement. En effet, il semble important d'obtenir une exposition efficace très tôt après la greffe pour éviter le risque de rejet aigu (Kiberd et al., Am J Transplant 2004).

## III.2. Modélisation des pharmacocinétiques individuelles par régression non-linéaire

### III.2.1.Principe

L'objectif de cette étude était de développer un modèle mathématique capable de décrire le mieux possible l'évolution des concentrations plasmatiques de l'AMP observées chez des patients transplantés rénaux après administration orale de MMF et de calculer les valeurs des paramètres PK individuels. Notre intérêt s'est porté en particulier sur la modélisation des phénomènes observés durant la période précoce, à savoir un processus d'absorption complexe et l'existence d'un deuxième pic de concentration, d'intensité parfois très importante.

L'ajustement du modèle théorique (d'équation non-linéaire  $C=f(t)$ ) aux données expérimentales (points de coordonnées  $(t_i, C_i)$ ) a été réalisé par minimisation de la somme des écarts pondérés entre les valeurs de concentrations observées et celles prédites par le modèle ajusté. La méthode de minimisation des valeurs des paramètres de la régression utilisait l'algorithme du simplexe de Nelder-Mead, algorithme qui nécessite des estimations initiales des paramètres et qui fonctionne de manière itérative (affinement des valeurs des paramètres selon le critère de convergence fixé). La modélisation pharmacocinétique des données individuelles a été mise en œuvre au moyen du programme MMF, version adaptée du programme CICLO initialement développé pour la modélisation des profils PK de la CsA par le Docteur Jean Debord au sein du service de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Limoges.

### III.2.2. Développement de nouveaux modèles utilisant la distribution Gamma

L'observation précédente des profils PK de l'AMP a mis en évidence des intensités et des délais d'absorption variables. La représentation du processus d'absorption par une simple loi exponentielle est un peu réductrice et le recours à une loi Gamma semblait plus adapté. De plus, devant la fréquence des profils présentant un deuxième pic de concentration d'intensité non négligeable, la combinaison de deux distributions Gamma a été envisagée.

Le développement de modèles PK utilisant la distribution Gamma pour décrire la phase d'absorption orale de l'AMP chez les patients greffés rénaux *de novo* de l'étude PRIMOCINE et chez les patients stables de l'étude STABLOCINE a fait l'objet d'une présentation orale au congrès de l'IATDMCT 2003 (Prémaud et al., Ther Drug Monit 2003 (a)) et d'un article accepté pour publication dans ***Clinical Pharmacokinetics*** :

*A double absorption-phase model adequately describes mycophenolic acid plasma profiles in de novo renal transplant recipients orally administered mycophenolate mofetil [In press]*



## **A double absorption-phase model adequately describes mycophenolic acid plasma profiles in *de novo* renal transplant recipients orally administered mycophenolate mofetil.**

*A. Prémaud<sup>1</sup>, J. Debord<sup>1</sup>, A. Rousseau<sup>1,3</sup>, Y. Le Meur<sup>2</sup>, O. Toupance<sup>4</sup>, Y. Lebranchu<sup>6</sup>, G. Hoizey<sup>5</sup>, C. Le Guellec<sup>7</sup>, P. Marquet<sup>1</sup>.*

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology-Toxicology and <sup>2</sup>Nephrology and hemodialysis, University Hospital, Limoges, France; <sup>3</sup>Laboratory of Biophysics, Faculty of Pharmacy, Limoges, France; Departments of <sup>4</sup>Nephrology and hemodialysis and <sup>5</sup>Pharmacology-Toxicology, University Hospital of Reims, France; Departments of <sup>6</sup>Nephrology and hemodialysis and <sup>7</sup>Pharmacology-Toxicology, University Hospital of Tours, France.

### **ABSTRACT**

**Background :** Mycophenolic acid shows complex plasma concentration versus time profiles, particularly in the immediate (first month) post-transplantation phase for which no relevant pharmacokinetic model has been proposed so far.

**Objective:** The aim of this study was to develop a model to accurately describe the time profile of plasma mycophenolic acid concentrations after oral administration of mycophenolate mofetil in adult kidney transplants, whatever the post-transplantation period.

**Method:** Full inter-dose pharmacokinetic (PK) profiles were collected in 45 adult renal transplant patients orally administered mycophenolate and cyclosporin: 25 patients were *de novo* transplants for whom individual pharmacokinetics were assessed at three post-transplantation periods (days 3, 7 and 30) and 20 patients were stable transplants (>3 months post-transplantation). Mycophenolic acid (MPA) was determined in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. Models combining a single- or a double-input (described as one or two Gamma distributions) with one or two-compartments were developed using in-house software and fitted to the individual profiles by nonlinear regression.

**Results:** Visual inspection of the PK profiles showed highly variable absorption profiles and secondary peaks of various intensity. The PK models including a double Gamma distribution best fitted these various profiles in the immediate post-transplantation period (mean bias and precision of -0.92% and 20.19%; -1.5% and 18.02%, on day 7 and day 30, respectively), while in the stable post-grafting phase (beyond three months), the single- and double-absorption models performed similarly (mean bias and precision of -3.37% and 17.64%; -3.12%, and 18.44%, respectively).

Conclusion: The proposed PK models adequately describe the concentration-time profiles of MPA in renal transplant patients and could be helpful for the development of tools for MPA monitoring.

Evaluation des modèles pharmacocinétiques : application aux données d'un groupe indépendant de patients traités par Cellcept® et Néoral®.

Les modèles PK décrivant l'absorption selon une ou deux distributions Gamma (§ III.2.2) ont été appliqués à la modélisation des cinétiques d'AMP obtenues dans un groupe indépendant de 5 patients greffés rénaux traités par MMF et CsA chez qui des profils de concentrations d'AMP ont été obtenus à plusieurs périodes post-transplantation.

#### III.2.2.1. Modélisation pharmacocinétique

La performance des modèles PK a été testée sur l'ensemble des profils obtenus chez les cinq patients, soit 5 profils à J15, M1 et M2 et 4 à M3 post-transplantation. Les concentrations d'AMP étaient mesurées par LC-MS/MS (§ II.1). Comme décrit dans le paragraphe III.2.2, les profils PK obtenus à J15 et M1 étaient modélisés par régression non-linéaire (RNL) avec un modèle à double absorption. Les deux modèles (simple et double absorption Gamma) ont été testés pour décrire l'évolution des concentrations à M2 et à M3.

La performance des modèles a été évaluée en comparant les concentrations calculées par RNL aux concentrations observées et les AUC<sub>0-9</sub> estimées par RNL aux AUC de référence (AUC<sub>0-9</sub> trapèzes). La relation entre les valeurs observées et les valeurs calculées a été étudiée par analyse de régression linéaire. Les valeurs de biais et de RMSE (root mean squared prediction error) ont permis d'apprécier l'exactitude et la précision de l'ajustement.

#### III.2.2.2. Résultats

Les résultats de la comparaison des concentrations observées avec les concentrations calculées par RNL sont présentés dans le tableau 12 pour chaque délai post-greffe étudié.

**Tableau 12 :** Comparaison entre les concentrations d'AMP calculées par RNL et les concentrations observées.

	<b>J15</b> (modèle 2 pics)	<b>M1</b> (modèle 2 pics)	<b>M2</b> (modèle 1 pic)	<b>M2</b> (modèle 2 pics)	<b>M3</b> (modèle 1 pic)	<b>M3</b> (modèle 2 pics)
$r^2$	0,948	0,985	0,917	0,965	0,822	0,949
Biais (%)	-1,01	-0,68	-2,68	-1,21	-3,54	-2,21
RMSE (%)	15,3	10,2	21,8	15,7	23,6	17,0

Les concentrations observées et calculées étaient bien corrélées et les biais n'étaient pas significatifs quels que soient le modèle utilisé et la période considérée. Le modèle utilisant une double distribution Gamma donnait de meilleurs résultats que le modèle à une seule absorption en terme de coefficient de corrélation, de biais et de précision pour l'ajustement des données obtenues à 2 et 3 mois suivant la transplantation. Les valeurs des AUC<sub>0-9</sub> étaient estimées avec précision et exactitude (tableau 13). La seule valeur qui n'était pas comprise dans l'intervalle "d'acceptabilité clinique" (-20% ; +20%) a été obtenue à M2 avec le modèle à simple absorption.

**Tableau 13 :** Comparaison entre les AUC<sub>0-9</sub> d'AMP estimées par RNL et les AUC<sub>0-9</sub> trapèzes.

	<b>J15</b> (modèle 2 pics)	<b>M1</b> (modèle 2 pics)	<b>M2</b> (modèle 1 pic)	<b>M2</b> (modèle 2 pics)	<b>M3</b> (modèle 1 pic)	<b>M3</b> (modèle 2 pics)
n	5	5	5	5	4	4
Biais (%)	-4,01	-2,78	-0,62	4,28	-9,72	-4,57
(intervalle)	(-9,65 ; +1,32)	(-4,35 ; -0,35)	(-23,49 ; 9,31)	(-3,32 ; 18,02)	(-15,6 ; -4,68)	(-5,69 ; -3,30)

A M3 deux des quatre profils PK présentaient un deuxième pic d'intensité assez importante par rapport au premier pic, que le modèle à simple absorption n'a pu décrire. Ceci peut en partie expliquer le plus faible coefficient de détermination  $r^2$  obtenu entre les concentrations calculées et observées et les valeurs systématiquement négatives des biais entre AUC estimées et observées. Le modèle à double absorption Gamma permettait un meilleur ajustement de ces profils.

### III.2.2.3. Discussion

Ces résultats ont confirmé la performance du modèle à un compartiment avec "double absorption Gamma" pour décrire des profils PK d'AMP obtenus à différentes périodes suivant la transplantation chez des patients greffés rénaux traités par l'association MMF/CsA. Il semblerait qu'à M2 et M3 le recours à un modèle capable de décrire deux pics de concentration soit plus approprié que le modèle à 1 pic, ce que ne montrait pas l'étude initiale dans les groupes de mise au point du modèle. En particulier, le modèle avec simple absorption avait été

retenu précédemment (§ III.2.2) pour modéliser les cinétiques obtenues en période dite stable c'est-à-dire à partir de 3 mois suivant la transplantation et a donc été appliqué aux 4 cinétiques disponibles ici. Les résultats étaient corrects en terme d'estimation de l'exposition au médicament, mais deux cinétiques présentaient deux pics de concentration d'intensité assez importante. Le modèle à double absorption a permis une meilleure description des profils avec deux pics de concentration. Il en résultait une diminution des biais sur les concentrations et sur les AUC estimées par RNL. L'intérêt de l'utilisation d'un modèle avec double absorption Gamma quelle que soit la période post-greffe mérite d'être confirmé sur une population indépendante plus large.

### III.2.3. Modélisation des pharmacocinétiques individuelles des patients sous sirolimus

Les profils PK d'AMP observés chez les patients traités par sirolimus (patients de l'étude Cinesiren) présentaient des allures comparables à ceux obtenus chez les patients sous CsA. Ainsi, des modèles utilisant une ou deux distributions Gamma pour décrire l'absorption de l'AMP ont été utilisés pour tenter de modéliser ces cinétiques.

#### III.2.3.1. Matériel et méthode

##### III.2.3.1.1. Patients

L'étude a porté sur les cinétiques d'AMP obtenues chez les 14 patients inclus dans Cinesiren à différentes périodes suivant la greffe : J7 (n=14), J15 (n=14), M1 (n=13), M2 (n=8) et M3 (n=13).

##### III.2.3.1.2. Modèles pharmacocinétiques

Les paramètres PK initiaux des modèles pour la description des cinétiques sous sirolimus ont été réajustés sur la base des valeurs des paramètres obtenues chez les patients sous CsA, par une méthode itérative ITS "Iterative Two-Stage" (Steimer et al., Drug Metab Rev 1984).

L'ajustement des modèles PK aux données expérimentales a été réalisé par RNL au moyen d'une version adaptée du programme CICLO (programme MMF). Toutes les données ont été modélisées au moyen des deux modèles à simple et double absorption Gamma, précédemment décrits dans le paragraphe III.2.2.

##### III.2.3.1.3. Statistiques

Les deux modèles testés ont été comparés par le biais du critère d'Akaïké et de la qualité de leur ajustement aux données expérimentales. L'adéquation entre les valeurs de concentrations et d'AUC<sub>0-9</sub> observées et celles estimées par RNL a été évaluée par la mesure du biais et de la précision (RMSE), par une analyse de régression et par un test de Wilcoxon.

### III.2.3.2. Résultats

Les résultats obtenus avec les deux modèles testés sont présentés pour chaque période post-greffe dans le tableau 14. A J7, les valeurs de biais sur les concentrations et le critère d'Akaïké suggéraient que le modèle avec double absorption Gamma procurait un meilleur ajustement des concentrations. Aux autres périodes, les deux modèles donnaient des résultats satisfaisants et relativement comparables, la précision de l'estimation étant tout de même meilleure avec le modèle à double absorption. Les AUC étaient correctement estimées par RNL. A J15, l'AUC d'un patient était estimée avec un biais inférieur à -20% avec le modèle à simple (-21,10%) ou double absorption (-20,27%). A M2 et à M3, des biais de respectivement -28,34% et de -20,20% ont été obtenus pour deux valeurs d'AUC estimées avec le modèle utilisant une simple absorption.

Tableau 14 : Modélisation de la PK de l'AMP chez des patients transplantés rénaux traités par sirolimus avec des modèles PK décrivant l'absorption selon une simple ou une double distribution Gamma.

Modèle	J7 (n=14)		J15 (n=14)		M1 (n=13)		M2 (n=8)		M3 (n=13)	
	Simple absorption Gamma	Double absorption Gamma	Simple absorption Gamma	Double absorption Gamma	Simple absorption n Gamma	Double absorption n Gamma	Simple absorption n Gamma	Double absorption n Gamma	Simple absorption n Gamma	Double absorption n Gamma
Critère d'Akaiké	66,3 (48,1–82,4)	61,9 (34,5–76,5)	67,5 (55,8–81,7)	65,8 (50,7–74,1)	66,8 (48,6–73,4)	65,8 (50,7– 74,1)	69,7 (59,2–80,8)	67,1 (54,0–76,9)	68,9 (52,2– 82,7)	68,4 (47,6– 81,4)
Comparaison des concentrations										
r <sup>2</sup>	0,932	0,961	0,947	0,962	0,948	0,956	0,912	0,955	0,914	0,916
Biais %	-2,65 *	-1,62	-2,18	-2,18	-1,64	-1,59	-2,91	-1,86	-3,13	-2,37
RMSE %	18,9	15	20,8	18,1	16,9	14,9	20,6	16,4	22,6	20,6
Comparaison des AUC <sub>0-9</sub>										
r <sup>2</sup>	0,986	0,991	0,992	0,993	0,988	0,995	0,927	0,992	0,982	0,986
Biais %	-6,35	-4,88	-5,65	-4,78	-5,44	-2,40	-4,91	-0,75	-6,70	-4,23
RMSE %	9,1	8,0	8,0	7,1	7,8	5,3	10,5	3,1	8,9	6,7

\* p<0,05

Le modèle combinant deux distributions Gamma semblait donc mieux convenir pour modéliser les profils obtenus quelle que soit la période post-greffe et a donc été retenu ; les valeurs moyennes des paramètres PK, des AUC<sub>0-9</sub> et des AUC<sub>0-12</sub> estimées par RNL au moyen de ce modèle ainsi que la clairance apparente calculée sont présentés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Paramètres pharmacocinétiques de l'AMP (moyennes±SD) estimés par régression non-linéaire chez des patients sous sirolimus à différentes périodes post-greffe.

	<b>J7</b>	<b>J15</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
n	14	14	13	8	13
$\hat{C}_0$ (L <sup>-1</sup> )*	0,35 ± 0,21	0,36 ± 0,23	0,38 ± 0,25	0,42 ± 0,29	0,37 ± 0,22
a <sub>1</sub>	11,72 ± 8,45	9,33 ± 5,13	9,65 ± 4,16	9,79 ± 4,39	9,02 ± 4,75
b <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	24,27 ± 11,22	32,80 ±	17,16 ± 7,80	15,76 ± 8,51	15,89 ±
		14,13			11,43
a <sub>2</sub>	25,66 ± 11,62	14,25 ± 8,40	37,37 ±	38,17 ±	27,17 ±
			16,37	11,65	15,51
b <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	17,75 ± 10,37	18,20 ±	9,86 ± 5,14	10,99 ± 3,61	8,69 ± 5,14
		11,58			
r	0,49 ± 0,22	0,41 ± 0,22	0,66 ± 0,20	0,72 ± 0,21	0,65 ± 0,30
A (L <sup>-1</sup> )*	1,98 ± 1,62	2,71 ± 1,46	3,47 ± 2,70	4,42 ± 2,88	3,77 ± 1,91
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	1,40 ± 1,08	1,55 ± 0,94	1,63 ± 1,06	1,49 ± 0,92	1,71 ± 0,97
MAT <sub>1</sub> (h)	0,58 ± 0,48	0,34 ± 0,26	0,65 ± 0,41	0,66 ± 0,23	0,65 ± 0,28
SDAT <sub>1</sub> (h)	0,96 ± 0,09	0,11 ± 0,07	0,21 ± 0,09	0,23 ± 0,08	0,23 ± 0,09
MAT <sub>2</sub> (h)	1,86 ± 1,18	0,93 ± 0,44	4,27 ± 2,45	3,76 ± 1,66	3,65 ± 2,29
SDAT <sub>2</sub> (h)	0,37 ± 0,20	0,30 ± 0,19	0,74 ± 0,35	0,62 ± 0,21	0,69 ± 0,29
AUC <sub>0-9</sub> (mg.h/L)	49,59 ± 22,75	49,55 ±	46,69 ±	50,64 ±	33,64 ±
		26,76	20,02	20,10	16,69
AUC <sub>0-12</sub> (mg.h/L)	60,61 ± 28,59	59,79 ±	57,10 ±	57,83 ±	39,97 ±
		33,46	25,80	25,65	19,68
CL/F (L.h <sup>-1</sup> )	20,07 ± 9,41	20,38 ± 9,22	18,13 ± 8,46	17,17 ±	18,53 ± 9,07
				10,46	

\* valeurs standardisées par 100mg de dose ; a<sub>i</sub>, b<sub>i</sub>=paramètres de la (des) distribution(s) Gamma ; r = fraction du médicament absorbée selon la première phase ; A=coefficient de distribution dans le compartiment central ; λ<sub>1</sub>=constante de distribution ; MAT<sub>i</sub>=temps moyen d'absorption ; SDAT<sub>i</sub>= déviation standard du temps moyen d'absorption ; CL/F=clairance apparente.

### III.2.4. Discussion sur la modélisation des pharmacocinétiques individuelles d'AMP

Ces travaux ont montré que l'utilisation d'une loi Gamma convenait pour décrire la phase d'absorption orale de l'AMP. Les modèles rapportés dans la littérature décrivaient le processus d'absorption selon une cinétique d'ordre 0 avec temps de latence (Le Guellec et al., Clin Pharmacokinet 2004) ou une cinétique d'ordre 1 avec temps de latence (Shum et



al., Br J Clin Pharmacol 2003), mais le recours à une distribution Gamma semble plus adapté à la modélisation des processus d'absorption complexes (délai et intensité variables). Cette loi Gamma avait déjà été appliquée pour décrire l'absorption orale de la CsA (Debord et al., Clin Pharmacokinet 2001). Un modèle mono-compartmental combinant deux distributions Gamma a été développé pour notre étude et a permis de décrire un deuxième pic de concentration, fréquemment observé avec le MMF, qu'il soit précoce, tardif (rebond entérohépatique), d'intensité faible ou importante. Même si ce modèle ne correspond pas véritablement à une réalité physiologique il a fourni des résultats satisfaisants en terme de modélisation des cinétiques (à 1 ou 2 pics), d'estimation des AUC et des paramètres PK chez des patients greffés rénaux sous CsA et sous sirolimus. Certains profils demeuraient tout de même difficiles à modéliser. Les résultats témoignaient d'une importante variabilité des paramètres PK quel que soit l'immunosuppresseur associé. Les valeurs de clairance apparente estimées chez les patients sous sirolimus étaient globalement plus faibles que celles estimées chez les patients sous CsA ce qui est en accord avec une exposition au médicament plus importante dans le cas de l'association avec le sirolimus. La tendance à l'augmentation des valeurs de  $r$  (fraction de médicament absorbée selon la phase la plus rapide) au cours du premier mois post-greffe chez les patients sous CsA ( $p < 0,01$ ) et chez les patients sous sirolimus ( $p < 0,05$ ) témoignait de l'évolution des profils PK avec le temps, avec une diminution de l'intensité du deuxième pic, lorsqu'il existait.

Les modèles PK développés dans cette étude ont été utilisés pour mettre au point des estimateurs Bayésiens, selon une approche en deux étapes. Cette étude sera décrite dans le paragraphe IV.2.

## **III.3. Analyse pharmacocinétique de population**

### **III.3.1. But**

Les objectifs de l'analyse de population étaient de déterminer les paramètres PK de population de l'AMP chez des patients greffés rénaux précoces et stables et d'étudier l'influence de facteurs individuels (ou covariables) sur ces paramètres. Le but final était d'élaborer un modèle de population incluant des covariables explicatives de la variabilité PK de l'AMP.

### **III.3.2. Matériel et Méthodes**

#### **III.3.2.1. Données de population**

La population de référence était constituée des données issues de 23 patients inclus dans l'étude Primocine soit 23 profils complets (11 prélèvements) à J7 et 23 profils complets (10 prélèvements) à J30, les 2 profils étant reconnus comme appartenant au même patient, et des données issues des 20 patients de Stablocine, soit 20 profils complets (10 prélèvements) obtenus plus de 3 mois après la greffe. Les profils à J3 de Primocine n'ont pas été pris en compte, du fait de leur très grande variabilité et de leur caractère souvent atypique.

La population de validation, indépendante, était constituée de 19 cinétiques riches obtenues à J15 (n=5), M1 (n=5), M2 (n=5) et M3 (n=4) post-transplantation. Ces cinétiques provenaient de 5 patients seulement mais elles ont été prises en compte indépendamment. Les valeurs des covariables avaient été renseignées pour chaque cinétique et étaient effectivement différentes pour un même patient en fonction de la période considérée.

#### **III.3.2.2. Méthodologie NONMEM**

L'analyse des données de population a été réalisée par la méthode statistique de modélisation non-linéaire à effets mixtes, implémentée dans le programme NONMEM (NONlinear Mixed Effect Model, version V ; Boekmann et al., 1992) au moyen de l'interface graphique Visual-NM (Gomeni, 1998).

NONMEM utilise une méthode de population dite "en une étape" qui permet d'estimer directement les paramètres moyens (et leur variabilité) d'une population d'individus à partir des concentrations observées. C'est de plus une méthode dite paramétrique car elle suppose une distribution normale des variables analysées. Enfin, c'est une méthode à effets mixtes car le processus d'estimation est basé sur la décomposition de chaque paramètre PK en une somme de termes appartenant à 2 catégories : les effets fixes (constants dans la population donnée) et les effets aléatoires (variables d'un patient à l'autre).

Pour la modélisation initiale, la méthode d'approximation de premier ordre FO (First Order) a été utilisée. Cette méthode consiste en une linéarisation de premier ordre autour de la moyenne des paramètres (effets fixes). L'algorithme FOCE (First Order Conditionnal Estimation) a également été testé sur le modèle initial et sur le modèle final. Dans cette méthode, la linéarisation (au premier ordre) du modèle est effectuée autour des effets aléatoires (variabilités inter- et intra-individuelles). Cette approximation serait plus précise, notamment quand les variabilités inter-individuelles sont importantes.

L'analyse de population a été menée classiquement, en plusieurs étapes.

#### III.3.2.2.1. Construction du modèle structural

Cette étape consistait à définir un modèle PK et un modèle d'erreur permettant de décrire le mieux possible l'évolution des concentrations de l'AMP en fonction du temps. L'élaboration de ce modèle de base ne prenait en compte aucune covariable.

#### **Modèle PK**

Des modèles à un ou deux compartiments ont été considérés et différentes approches ont été envisagées pour décrire l'élimination du médicament. Pour le processus d'élimination à partir du compartiment central, une cinétique de premier ordre et une cinétique de type Michaelis-Menten ont été comparées.

Plusieurs approches ont été testées pour décrire le processus d'absorption. Des modèles classiques d'absorption ont été utilisés : absorption d'ordre 0 avec et sans temps de latence (sub-routine ADVAN3 TRANS3) et absorption d'ordre 1 avec et sans temps de latence (sub-routine ADVAN4 TRANS4). Leur paramétrage a été réalisé à partir de modèles pré-programmés de la librairie PREDPP (PREdiction for Population Pharmacokinetics) fournie avec le logiciel. Ces modèles ont été précédemment utilisés pour l'analyse de population de cinétiques d'AMP obtenues en période stable (ordre 0 ; Le Guellec et al., Clin Pharmacokinet 2004) ou précoce (ordre 1 ; Shum et al., Br J Clin Pharmacol 2003). Des modèles plus complexes, décrivant l'absorption du médicament selon une distribution de Weibull ou une distribution d'Erlang ont également été testés (ADVAN 5).

Un intérêt particulier a été porté sur le développement de modèles PK capables de modéliser deux pics de concentration. Un modèle d'absorption fractionnée, proposé par Yin et al. (Clin Pharmacokinet 2003) pour modéliser les profils PK de la ranitidine, médicament présentant également 2 pics de concentration, appliqué par la suite pour décrire des cinétiques précoces de CsA (Rousseau et Marquet, Clin Pharmacokinet 2004) a été programmé. Une représentation schématique de ce modèle est illustrée dans la figure 10. Il consiste à considérer que la dose de médicament administrée par voie orale est absorbée en deux fractions distinctes,  $f_1$  et  $f_2$  (avec  $f_2=1-f_1$ ), décalées dans le temps. L'absorption dans la circulation générale se fait à partir du même site pour les deux fractions, c'est-à-dire le

compartiment digestif, et elle est décrite par une constante d'absorption d'ordre 1 ( $k_a = k_{34}$ ). Ce modèle permet de modéliser aussi bien des profils présentant 2 pics de concentrations que des profils ne présentant qu'un seul pic ( $f_1$  tend alors vers 1). Ce modèle a été programmé en utilisant la subroutine ADVAN6 (associée à TOL5) qui fait appel aux équations différentielles pour décrire les transferts entre les différents compartiments.

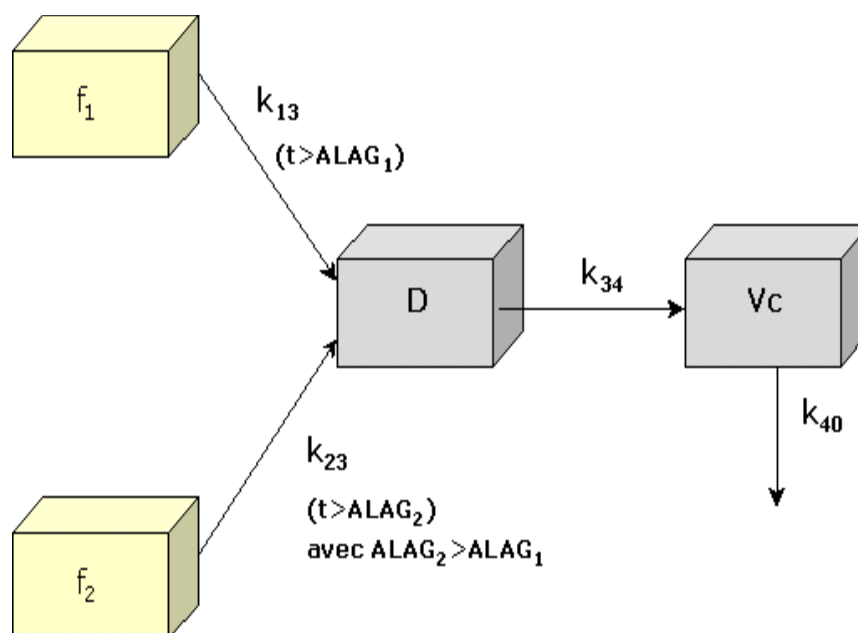


Figure 10: Représentation schématique du modèle à un compartiment avec absorption fractionnée.  $f_1$  et  $f_2$ =première et seconde fractions de dose,  $k_{13}$  et  $k_{23}$ =constantes de transfert de premier ordre,  $ALAG_1$  et  $ALAG_2$ =temps de latence,  $D$ =compartiment digestif,  $k_{34}$ =constante d'absorption d'ordre 1,  $V_c$ =compartiment central,  $k_{40}$ =constante d'élimination de premier ordre à partir du compartiment central.

Des modèles spécifiques de circulation entéro-hépatique ont également été testés. Ces modèles considéraient le passage d'une fraction du médicament dans un compartiment biliaire et plusieurs approches ont été envisagées pour modéliser le retour de cette fraction dans la circulation générale. La figure 11 illustre la structure de base de ces modèles entéro-hépatiques.

Une première approche consistait à décrire la vidange biliaire par un modèle "ON/OFF". Deux paramètres temporels définissaient respectivement le début et la fin de la vidange biliaire et régissaient ainsi le retour du médicament vers le compartiment central. Trois paramètres relatifs au cycle entéro-hépatique devaient être estimés : la fraction excrétée dans la bile et les deux paramètres de temps de la vidange. Dans un premier temps, il a été considéré que la vitesse d'excrétion de la fraction médicamenteuse dans la bile était identique à celle de l'élimination à partir du compartiment central ( $k_{24}=k_{20}$ ). Puis ce modèle a été testé avec une valeur indépendante pour la vitesse d'excrétion de la fraction médicamenteuse vers la bile ( $k_{24}\neq k_{20}$ ).

Dans une seconde approche, le passage du médicament par le compartiment biliaire était défini en terme de durée par un seul paramètre de temps. La fraction de médicament excrétée dans la bile résidait dans le compartiment biliaire jusqu'à ce que celui-ci soit complètement vidangé (au temps t). Le modèle décrivait le retour direct du médicament vers le compartiment central à une vitesse semblable à celle de son administration initiale avec  $k_{42}=k_{12}$ . L'élimination de la fraction médicamenteuse vers la bile ( $k_{24}$ ) était linéaire et décrite par la constante  $k_{20}$  (Shum et al., Br J Clin Pharmacol 2003). Cette approche a également été testée en considérant des valeurs de  $k_{24}$  et  $k_{42}$  indépendantes des valeurs de  $k_{20}$  et  $k_{12}$ .

Le troisième modèle testé consistait à décrire le transfert du médicament de la bile vers le compartiment central par une fonction sinus. Ce processus a été décrit précédemment par Wajima et al. (J Pharm Pharmacol, 2002).

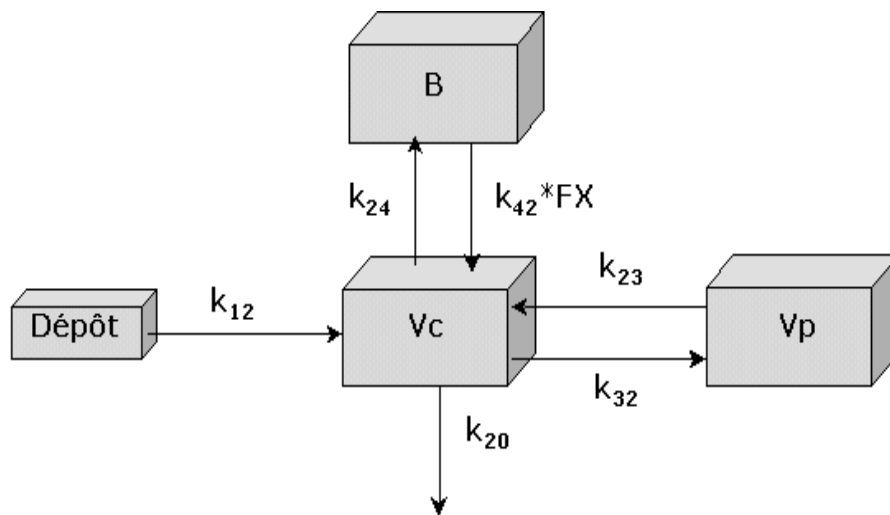


Figure 11 : Représentation de la structure des modèles de circulation entérohépatique.  $k_{12}$ =constante d'absorption;  $k_{24}$ ,  $k_{42}$ ,  $k_{23}$  et  $k_{32}$ =constantes de transferts d'ordre 1;  $Vc$ =compartiment central;  $Vp$ =compartiment périphérique;  $B$ =compartiment biliaire;  $FX$ =fonction contrôlant le transfert du compartiment biliaire vers le compartiment central.

### **Modèle statistique**

La variabilité inter-individuelle a été décrite sur chaque paramètre PK par un modèle d'erreur exponentiel. Les valeurs des paramètres PK individuels ( $P_i$ ) étaient ainsi estimées selon la formule :

$$P_i = \theta_{pop} \times \exp(\eta_i)$$

où  $\theta_{pop}$  est la valeur moyenne du paramètre P dans la population,  $\eta_i$  est la différence entre la valeur moyenne du paramètre dans la population  $\theta_{pop}$  et la valeur chez l'individu i,  $P_i$ .  $\eta$  est distribué de façon gaussienne avec une moyenne égale à 0 et une variance  $\omega^2$ . Cette

variance représente la variabilité inter-individuelle. Les valeurs individuelles des paramètres  $P_i$  sont estimées par méthode bayésienne grâce à l'option POSTHOC. Cette estimation *a posteriori* s'appuie sur les informations provenant de l'individu, sur la valeur moyenne du paramètre dans la population et sur la variabilité inter-individuelle calculée.

La variabilité inter-occasion (ou intra-individuelle) a été prise en compte pour tous les modèles testés. L'estimation des deux variabilités (inter-individuelle et inter-occasion) pour un même paramètre PK était donnée par la formule :

$$P_{ik} = \theta_{pop} \times \exp(\eta_i + \eta_{ik})$$

où  $P_{ik}$  est la valeur estimée du paramètre P de l'individu i à l'occasion k et  $\eta_{ik}$  l'effet intra-patient de moyenne 0 et de variance  $\omega^2$ .

L'influence de l'erreur aléatoire (ou résiduelle, incluant la variabilité analytique et tous les écarts non expliqués par le modèle PK) sur les observations était décrite par un modèle mixte combinant une part additive et une part proportionnelle telle que :

$$C_{obs} = C_{pred} + C_{pred} \times \varepsilon_1 + \varepsilon_2$$

où  $C_{obs}$  représente la concentration observée (concentration vraie),  $C_{pred}$  représente la valeur individuelle prédite par le modèle et  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$  sont respectivement les parts proportionnelle et additive de l'erreur résiduelle.  $\varepsilon$  se distribue de façon normale avec une moyenne égale à 0 et une variance  $\sigma^2$ .

### **Choix du modèle structural**

La sélection du modèle structural a été faite sur deux types de critères :

- un critère statistique englobant la valeur de la fonction objective témoignant de la qualité de l'ajustement entre les données observées et prédites, les valeurs d'erreur standard sur les paramètres estimés et l'importance de la variabilité résiduelle ;
- un critère graphique par représentation des concentrations observées (DV) en fonction des concentrations prédites par le modèle (PRED) et en fonction des concentrations individuelles prédites par estimation bayésienne (IPRED), et de la distribution des résidus pondérés (WRES) en fonction du temps de prélèvement.

#### III.3.2.2.2. Analyse de l'influence des covariables sur les paramètres pharmacocinétiques

Cette étape consistait à déterminer les covariables dont les valeurs influençaient significativement les paramètres PK et à définir le type de relation entre les paramètres et ces covariables.

### **Test individuel des covariables : analyse univariée**

L'influence de l'âge, du sexe, du poids, de la surface corporelle, de la créatininémie, de la clairance de la créatinine, de la dose de CsA, de l'exposition à la CsA (AUC,  $C_0$  et  $C_2$ ), de la dose quotidienne de corticoïdes, de l'AUC<sub>0-12</sub> d'AMPG, des concentrations d'AMPG mesurées aux différents horaires de prélèvement, du rapport métabolique (AMPG/AMP) et du délai post-transplantation a été testée individuellement sur les paramètres d'absorption, sur le volume apparent de distribution (V/F) et sur la clairance apparente (CL/F).

La surface corporelle a été calculée par la formule de Dubois et Dubois ; la clairance de la créatinine a été estimée par la formule de Cockcroft et Gault (Ajayi, Eur J Clin Pharmacol 1991). Le rapport métabolique a été calculé sur la base des AUC exprimées en  $\mu\text{mol.h/L}$  (AUC<sub>0-12</sub> AMPG/AUC<sub>0-12</sub> AMP) et sur la base des concentrations (en  $\mu\text{mol/L}$ ) mesurées à chaque horaire  $i$  de prélèvement ( $C_i$ , AMPG/ $C_i$ , AMP). Différentes approches ont été considérées pour étudier l'influence du délai post-greffe : (i) une approche quantitative pour laquelle le délai était exprimé de façon continue, en jours post-transplantation (covariable "délai"), (ii) une approche qualitative ou "catégorisée" en considérant un délai inférieur (codé 0) ou supérieur (codé 1) à 3 mois (covariable "période") et (iii) une approche mixte exprimant le temps écoulé depuis la greffe par une variable continue durant les 85 premiers jours et par une valeur fixe au-delà (covariable "délai mixte"). Le tableau 16 rapporte les valeurs des principales covariables étudiées.



Tableau 16 : Valeurs des covariables observées dans la population de référence

Covariable	Valeur moyenne ( $\pm$ SD)	Intervalle
Age (années)	43,7 $\pm$ 13,5	22 - 71
Poids (kg)	63,8 $\pm$ 13,7	39,5 - 130
Surface corporelle (m <sup>2</sup> )	1,7 $\pm$ 0,2	1,4 - 2,5
Créatininémie ( $\mu$ M)	163,9 $\pm$ 125,5	65 - 718
Clairance de la créatinine (mL/min)	54,0 $\pm$ 22,3	10,1 - 121,6
Dose de CsA par prise (mg)	188,1 $\pm$ 69,9	75 - 400
AUC <sub>0-12</sub> CsA (mg.h/L)	5,5 $\pm$ 1,4	2,7 - 8,5
Dose quotidienne de corticoïdes (mg)	21,1 $\pm$ 18,0	0 - 70
AUC <sub>0-12</sub> AMPG (mg.h/L)	1470,1 $\pm$ 1172,1	297,8 - 7173,8
Rapport AUC <sub>0-12</sub> AMPG/AUC <sub>0-12</sub> AMP	33,6 $\pm$ 34,8	19,4 - 217,4

L'effet d'une covariable sur un paramètre a été évalué en comparant la fonction objective obtenue avec le modèle intégrant la covariable et celle obtenue avec le modèle de référence (sans covariable). Si on fait l'hypothèse que la distribution des paramètres est gaussienne (ce qui constitue l'hypothèse de base de NONMEM), la différence entre les deux modèles suit une distribution  $\chi^2$  avec un nombre de degré de liberté égal à la différence du nombre de paramètres entre les 2 modèles (soit 1 lorsqu'une seule covariable est ajoutée). L'effet d'une covariable a été considéré comme significatif lorsque la diminution de la fonction objective était d'au moins 6,64 unités ( $p < 0,01$  ; ddl=1) par rapport au modèle de référence.

#### **Elaboration du modèle de covariables : analyse multivariée**

Toutes les covariables significatives en analyse univariée ont été intégrées simultanément dans un modèle dit intermédiaire. Ces covariables ont été combinées de façon à obtenir le meilleur ajustement des données, c'est-à-dire la fonction objective la plus basse.

Compte tenu du grand nombre de covariables étudiées, l'analyse multivariée a été réalisée en 2 temps. Dans une première étape, la dépendance des covariables a été étudiée paramètre par paramètre. Les équations ainsi obtenues ont été, dans un deuxième temps, introduites simultanément dans un modèle intermédiaire.

### **Elaboration du modèle final**

Cette étape consiste à confirmer la pertinence de chaque covariable par délétion indépendante à partir du modèle intermédiaire. Une augmentation de la fonction objective d'au moins 10,9 unités ( $p < 0,001$  ;  $ddl=1$ ) témoigne de la significativité de la covariable, qui est alors conservée dans le modèle final. Si la variation de la fonction objective ne répondait pas à ce critère, la relation entre la covariable et le paramètre PK n'était pas prise en compte dans le modèle final.

Le modèle final retenu incluait toutes les covariables significatives contribuant à l'amélioration de la qualité de l'ajustement des données.

#### **III.3.2.2.3. Validation du modèle final**

L'option POSTHOC a permis, à partir du modèle de population précédemment établi, d'estimer les valeurs des concentrations et des paramètres PK individuels dans le groupe de validation, par méthode bayésienne. La performance du modèle final dans ce groupe a été évaluée par comparaison entre les valeurs de concentrations observées et estimées et entre les AUC trapèzes et les AUC estimées par méthode bayésienne, au moyen du calcul du biais, de la précision et du coefficient de corrélation de régression linéaire.

### **III.3.3. Résultats**

#### **III.3.3.1. Modèle de base**

La base de données comprenait 682 valeurs de concentrations d'AMP, provenant de 43 patients.

Des modèles PK à deux compartiments ont été initialement choisis, sauf pour le modèle PK décrivant une absorption fractionnée, qui n'incluait qu'un seul compartiment car aucune amélioration significative n'était obtenue avec deux compartiments. La description du processus d'élimination selon une cinétique non-linéaire de type Michaelis-Menten n'a apporté aucune amélioration en terme d'ajustement aux données expérimentales et une élimination d'ordre 1 a donc été utilisée pour tous les modèles testés.

Les trois modèles de circulation entéro-hépatique n'ont pas permis de modéliser avec succès les profils PK de l'AMP du groupe de référence (modèles "not successful").

Les résultats obtenus avec les différents modèles d'absorption testés sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Comparaison des différents modèles de base testés pour modéliser la PK de l'AMP.

<b>Modèle testé</b>	<b>Fonction objective</b>	<b>Variabilité résiduelle</b>	
		Part proportionnelle	Part additive

Absorption d'ordre 0	1490	35,9 %	0,53 mg/L
Absorption d'ordre 0 avec temps de latence	1485	34,4 %	0,52 mg/L
Absorption d'ordre 1	1469	30,2%	0,55 mg/L
Absorption d'ordre 1 avec temps de latence	1404	19,3 %	0,59 mg/L
Distribution d'Erlang (3 compartiments en série)	“ not successful ”	-	-
Distribution de Weibull	“ not successful ”	-	-
Absorption fractionnée	1320	18,7 %	0,55 mg/L

Le modèle d'absorption d'ordre 1 avec temps de latence donnait de meilleurs résultats que le modèle d'absorption d'ordre 0 avec ou sans temps de latence en terme de variabilité résiduelle et de fonction objective. Ce modèle de base correspond à celui que Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) avaient finalement retenu pour l'analyse de PK de population de l'AMP en période post-greffe précoce tout en le considérant peu performant. Les résultats sur les paramètres estimés dans la présente population sont présentés dans le tableau 18. Les variabilités inter-occasion n'ont pas été estimées pour la clairance inter-compartimentale, le volume périphérique et le temps de latence car cela n'apportait aucune amélioration au modèle.

Tableau 18 : Paramètres moyens de population, variabilités inter-individuelle et inter-occasion estimés avec un modèle à 2 compartiments avec absorption d'ordre 1 et temps de latence.

Paramètres	Moyenne	Erreur standard de la moyenne	Variabilité inter-individuelle %	Variabilité inter-occasion %
$k_a$ (h <sup>-1</sup> )	0,92	0,08	44,5 %	41,7%
Q (L/h)	22,70	6,86	105,4 %	NE
Vc/F (L)	11,20	2,80	154,3%	50,7%
Vp/F (L)	333	122	88,7%	NE
CL/F (L/h)	31,2	5,74	52%	32,6%
ALAG (h)	0,26	0,02	33%	NE

$k_a$  = constante d'absorption; Q = clairance inter-compartimentale ; Vc et Vp = volumes apparents de distribution respectivement dans le compartiment central et périphérique ; CL = clairance apparente et ALAG = temps de latence.

NE =non estimé

La description du processus d'absorption par les distributions d'Erlang et de Weibull n'a pas fourni de résultats satisfaisants avec l'ensemble des données étudiées. Il est à noter que la loi de Weibull n'avait pas été retenue par Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) pour modéliser l'absorption de l'AMP car elle n'apportait aucune amélioration significative par rapport à un processus d'ordre 1 avec temps de latence. Tous ces modèles ne permettaient de décrire qu'un seul pic de concentration.

Le meilleur ajustement aux données expérimentales (fonction objective la plus basse) et la variabilité résiduelle la plus faible ont été obtenus avec le modèle décrivant une absorption fractionnée, qui était en mesure de décrire des profils PK présentant 2 pics de concentration.

L'un des objectifs de ce travail étant d'étudier les facteurs responsables de cinétiques complexes, avec des pics secondaires, observés pendant les premières semaines suivant la transplantation, le modèle d'absorption fractionnée a donc été utilisé comme modèle structural pour l'analyse de population des données PK de l'AMP. Les figures 12A et 12B illustrent l'ajustement des concentrations prédites par le modèle (PRED) et des concentrations individuelles prédites par estimation bayésienne (IPRED) par rapport aux concentrations observées (DV).

Le graphique représentant les DV en fonction des PRED montre que le modèle ne peut estimer correctement les concentrations supérieures à 13 mg/L. Les IPRED sont significativement corrélées aux DV ( $r^2=0,960$ ) avec un faible biais (la pente de la droite de régression est statistiquement non différente de 1 et son ordonnée à l'origine est proche de

0). L'analyse des résidus pondérés (WRES) en fonction du temps (figure 12C) montre une répartition homogène des WRES de part et d'autre de l'axe des abscisses (WRES=0). La variabilité résiduelle obtenue combine une erreur proportionnelle et une erreur additive estimées respectivement à 18,7% et 0,55 mg/L. La valeur de la part proportionnelle est satisfaisante et celle de la part additive est un peu élevée par rapport à la limite de quantification de la méthode utilisée pour la mesure des concentrations d'AMP (0,1 mg/L). Le modèle PK comprend 8 paramètres:  $k_{13}$  et  $k_{23}$ , les constantes de transfert des 2 fractions médicamenteuses vers le compartiment intestinal ;  $ALAG_1$  et  $ALAG_2$ , les temps de latence des fractions  $f_1$  et  $f_2$ ;  $CL/F$ , la clairance apparente ;  $Vc/F$  le volume apparent de distribution dans le compartiment central ;  $k_{34}$ , la constante d'absorption dans le compartiment central et  $f_1$ , la première fraction de dose. Les variabilités inter-occasion n'ont pas été prises en compte pour  $ALAG_1$ ,  $ALAG_2$ ,  $Vc/F$  et  $k_{34}$  car elles n'apportaient aucune amélioration du modèle. En revanche elles ont été introduites sur  $k_{13}$ ,  $k_{23}$ ,  $CL/F$  et  $f_1$ . La prise en compte de la covariabilité entre les  $\eta$  correspondants aux paramètres  $k_{13}$  et  $Vc$  (en utilisant la matrice complète de variance-covariance avec l'option OMEGA BLOCK) a permis d'améliorer le modèle.

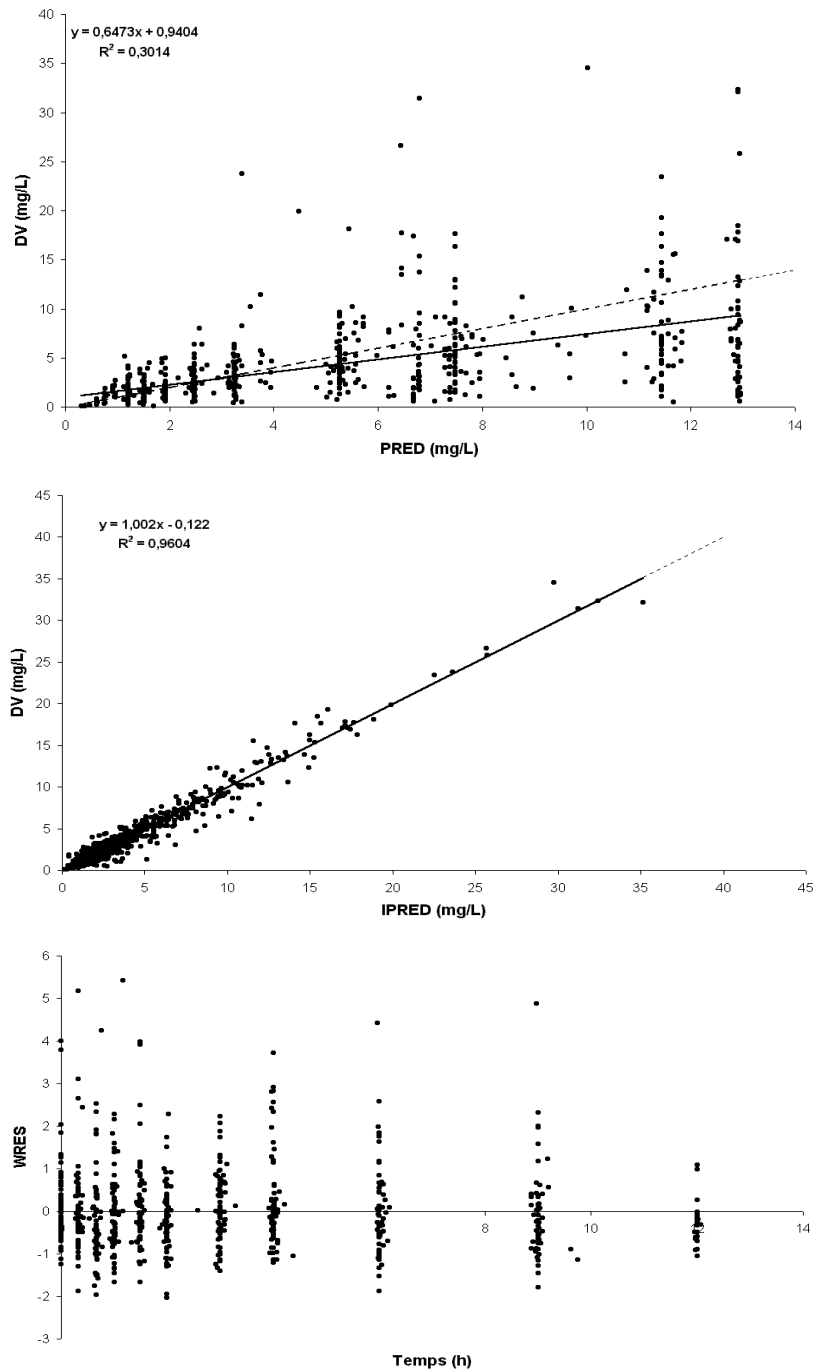


Figure 12 : Performances du modèle structural de base “absorption fractionnée”. Concentrations observées en fonction des concentrations prédites par le modèle de population (A) et des concentrations individuelles estimées par méthode bayésienne (B). Les droites en pointillés sont les droites unités et les droites en trait plein sont les droites de régression. Résidus pondérés en fonction du temps (C).

Le tableau 19 présente les moyennes et les variabilités inter-individuelles et inter-occasion des paramètres du modèle, estimées dans la population étudiée.

**Tableau 19 :** Valeurs moyennes, variabilités inter-individuelles et inter-occasion des paramètres PK de l'AMP estimées dans la population de référence avec le modèle de base "absorption fractionnée".

Paramètres	Moyenne	Erreur standard de la moyenne	Variabilité inter-individuelle %	Variabilité inter-occasion %
$k_{13}$ (h <sup>-1</sup> )	1,71	0,36	41,2	37,4
$k_{23}$ (h <sup>-1</sup> )	0,10	0,01	55,9	-
ALAG <sub>1</sub> (h)	0,13	0,05	-	NE*
ALAG <sub>2</sub> (h)	0,23	0,14	622,1	NE
CL/F (L/h)	26,90	4,41	43,6	27,2
Vc/F (L)	3,10	2,29	148,7	NE
$k_{34}$ (h <sup>-1</sup> )	3,78	2,12	82,5	NE
$f_1$	0,34	0,05	44,3	29,1

\*NE : non estimé

Ces résultats montrent une importante variabilité inter-individuelle des paramètres PK. Les variabilités inter-individuelles sur ALAG<sub>1</sub> et ALAG<sub>2</sub> et la variabilité inter-occasion sur  $k_{23}$  n'ont pu être correctement estimées avec ce modèle de base.

A titre de comparaison, l'analyse a été réalisée en parallèle avec le modèle de population basé sur un modèle structural simple à 2 compartiments avec temps de latence, absorption et élimination d'ordre 1 (tableau 18).

### III.3.3.2. Etude de l'influence des covariables avec le modèle basé sur une absorption fractionnée

#### III.3.3.2.1. Analyse univariée

L'analyse individuelle des covariables sur les paramètres PK du modèle "absorption fractionnée" a montré un effet significatif pour de nombreuses covariables. Les résultats sont présentés pour chaque paramètre PK dans le tableau 20.

**Tableau 20 :** Covariables significatives sur les paramètres PK du modèle de base "absorption fractionnée" à l'issue de l'analyse univariée.

Paramètre PK	Covariable	$\delta$ (p<0,01)
$k_{13}$	<i>Période</i>	46,5
	<i>Délai</i>	50,9
	<i>Délai mixte</i>	50,9
	<i>Age</i>	9,3
	<i>Dose CsA</i>	15
$k_{23}$	<i>Surface corporelle</i>	7

<b>f<sub>1</sub></b>	<i>Période</i>	7,8
	<i>Age</i>	10
	<i>Dose CsA</i>	16
	<i>1/créatininémie</i>	19,4
<b>ALAG<sub>1</sub></b>	<i>Sexe</i>	10,9
<b>k<sub>34</sub></b>	<i>Période</i>	46,2
	<i>Délai</i>	56,4
	<i>Délai mixte</i>	59,4
	<i>Age</i>	10,5
	<i>1/créatininémie</i>	22,6
<b>Vc/F</b>	<i>Sexe</i>	26,4
	<i>Dose CsA</i>	42,9
	<i>AUC CsA</i>	49
	<i>C<sub>0</sub> CsA</i>	48,2
	<i>C<sub>2</sub> CsA</i>	53,9
	<i>Dose de corticoïdes</i>	44,3
	<i>Créatininémie</i>	13,7
	<i>Clairance de la créatinine</i>	15,6
	<i>Rapport métabolique AUC</i>	85,2
	<i>Rapport métabolique C<sub>20min</sub></i>	141
<i>Rapport métabolique C<sub>1h</sub></i>	143	
<b>CL/F</b>	<i>Poids</i>	10,4
	<i>Dose de corticoïdes</i>	11,7
	<i>Créatininémie</i>	13,4

$\delta$ = différence entre la fonction objective du modèle de référence et la fonction objective du modèle intégrant la covariable



### III.3.3.2.2. Analyse multivariée

Dans un premier temps, chaque paramètre a été considéré indépendamment. Lorsque plusieurs covariables présentaient un effet significatif sur un paramètre, celles-ci étaient intégrées dans un modèle indépendant pour chaque paramètre. La pertinence de chaque covariable sur le paramètre considéré était évaluée par délétion indépendante. La combinaison de covariables qui procurait le meilleur ajustement (fonction objective la plus basse) était sélectionnée pour la construction du modèle intermédiaire. Le tableau 21 présente les covariables significatives déterminées par l'analyse multivariée réalisée individuellement sur chaque paramètre PK. L'étude de l'influence du délai post-greffe a mis en évidence des résultats comparables entre les différentes approches considérées (continue, catégorisée ou mixte). C'est l'approche catégorisée (délai inférieur ou supérieur à 85 jours) qui a finalement été retenue.

Dans un deuxième temps, tous les paramètres étaient considérés ensemble et les covariables sélectionnées dans l'étape précédente étaient intégrées simultanément dans un nouveau modèle intermédiaire.

**Tableau 21** : Combinaisons significatives de covariables sur chaque paramètre du modèle "absorption fractionnée"

<b>Paramètre PK</b>	<b>Covariable</b>	<b><math>\delta</math> (p&lt;0,01)</b>
<b>k<sub>13</sub></b>	<i>Période</i>	57
	<i>Dose ciclosporine</i>	
<b>k<sub>23</sub></b>	<i>Surface corporelle</i>	7
<b>f<sub>1</sub></b>	<i>1/créatininémie</i>	19,4
<b>ALAG<sub>1</sub></b>	<i>Sexe</i>	10,9
<b>k<sub>34</sub></b>	<i>Période</i>	82,2
	<i>1/créatininémie</i>	
<b>Vc/F</b>	<i>Dose de corticoïdes</i>	99,2
	<i>Rapport métabolique AUC</i>	
<b>CL/F</b>	<i>Poids</i>	11,5
	<i>Créatininémie</i>	

$\delta$ = différence entre la fonction objective du modèle de référence et la fonction objective du modèle intégrant les covariables combinées

A l'issue de la deuxième étape, trois covariables se sont révélées significatives et ont été sélectionnées. L'introduction dans le modèle de la covariable "période" (PER) sur la constante d'absorption  $k_{13}$ , du "rapport métabolique des AUC" (MTB<sub>AUC</sub>) sur le volume apparent de distribution (Vc/F) et du "poids" (PDS) sur la clairance apparente (CL/F) aboutissait à une fonction objective significativement diminuée de (156,8 unités) par rapport au modèle initial sans covariable.

Le rapport métabolique (AUC<sub>0-12</sub> AMPG/AUC<sub>0-12</sub> AMP) étant un indice difficile à obtenir en pratique clinique, nous avons étudié, en parallèle, le rapport des concentrations

AMPG/AMP obtenu à 1h suivant l'administration du MMF, rapport le plus significatif après le rapport des AUC au vu de la diminution de la fonction objective.

### III.3.3.3. Modèle final "absorption fractionnée"

Dans le modèle final,  $k_{13}$ ,  $V_c/F$  et  $CL/F$  étaient décrits selon les équations suivantes :

$$K_{13} = \theta_1 + \theta_2 \times \text{PER}$$

$$V_c/F = \theta \times \text{MTB}_{\text{AUC}}$$

$$CL/F = \theta \times \text{PDS}$$

Les paramètres et les variabilités inter-individuelle et inter-occasion estimés dans la population de référence au moyen du modèle final sont présentés dans le tableau 22.

La part additive et la part proportionnelle exprimant l'erreur résiduelle étaient respectivement de 21,2% et 0,47 mg/L, c'est-à-dire très proches de l'erreur résiduelle estimée par le modèle initial. Les paramètres du modèle (effets fixes) étaient estimés avec une précision acceptable à l'exception du coefficient de proportionnalité de la période ( $\theta_2$ ) pour  $k_{13}$ . Les variabilités inter-individuelles estimées sur le coefficient d'absorption  $k_{13}$  et sur le volume de distribution dans le compartiment central étaient abaissées par rapport aux valeurs obtenues avec le modèle de base n'incluant aucune covariable : de 41,2 à 18,1% pour  $k_{13}$  et de 148,7 à 57,8% pour  $V_c/F$ . La période et le ratio métabolique semblent donc expliquer une part de la variabilité inter-individuelle sur ces paramètres. En revanche, la variabilité inter-individuelle sur  $CL/F$  n'était pas plus faible après introduction du poids dans le modèle final.

Tableau 22 : Valeurs moyennes, variabilités inter-individuelle et inter-occasion des paramètres PK de l'AMP estimées dans la population de référence avec le modèle final incluant des covariables.

Paramètres	Moyenne ( $\pm$ erreur standard à la moyenne)	Variabilité inter-individuelle $\omega^2$ (SE <sup>2</sup> )	Variabilité inter-occasion $\omega^2$ (SE <sup>2</sup> )
<b><math>k_{13}</math> (h<sup>-1</sup>) : <math>\theta_1 + \theta_2 \times \text{PER}</math></b>	$\theta_1 = 2,99 (\pm 0,81)$ $\theta_2 = 9,1 (\pm 6,8)$	18,1 % 0,03 (0,3)	79,4 % 0,63 (0,44)
<b><math>K_{23}</math> (h<sup>-1</sup>) : <math>\theta_3</math></b>	$\theta_3 = 0,07 (\pm 0,01)$	84,3 % 0,711 (0,671)	0,5 (fixé)
<b>ALAG<sub>1</sub> (h) : <math>\theta_4</math></b>	$\theta_4 = 0,14 (\pm 0,03)$	0,25 (fixé)	NE*
<b>ALAG<sub>2</sub> (h) : <math>\theta_5</math></b>	$\theta_5 = 1,42 (\pm 0,13)$	0,5 (fixé)	NE
<b>CL/F (L/h) : <math>\theta_6 \times \text{PDS}</math></b>	$\theta_6 = 0,48 (\pm 0,08)$	47,3 % 0,224 (0,137)	28,1 % 0,079 (0,042)
<b>Vc/F (L) : <math>\theta_7 \times \text{MTB}_{\text{AUC}}</math></b>	$\theta_7 = 1,17 (\pm 0,17)$	57,8 % 0,334 (0,035)	NE
<b><math>K_{34}</math> (h<sup>-1</sup>) : <math>\theta_8</math></b>	$\theta_8 = 6,5 (\pm 1,6)$	83,8 % 0,7 (0,9)	NE
<b><math>f_1</math> : <math>\theta_9</math></b>	$\theta_9 = 0,48 (\pm 0,04)$	29,6 % 0,088 (0,052)	15,4 % 0,02 (0,03)

\* NE = non estimée

La performance du modèle final en terme d'ajustement aux données expérimentales est représentée dans la figure 13. Le graphique (figure 13A) représentant les DV en fonction des PRED montre que l'introduction des covariables a permis d'élargir l'intervalle des concentrations estimées par le modèle par rapport au modèle de base qui ne parvenait pas à estimer les valeurs de concentrations supérieures à 13 mg/L. Le modèle final tendait tout de même à sous-estimer les concentrations supérieures à 15 mg/L, mais celles-ci constituent une faible proportion de l'ensemble des données (environ 4%). L'analyse de régression a montré une relation linéaire entre les DV et les IPRED (la pente de la droite de régression était statistiquement non différente de 1 et l'ordonnée à l'origine était très proche de 0) avec un coefficient de détermination  $r^2 = 0,958$  (figure 13B). Enfin les résidus pondérés étaient répartis de façon homogène autour de l'erreur résiduelle pondérée nulle et 95% des valeurs étaient comprises dans l'intervalle (-2 ; +2) (figure 13C).

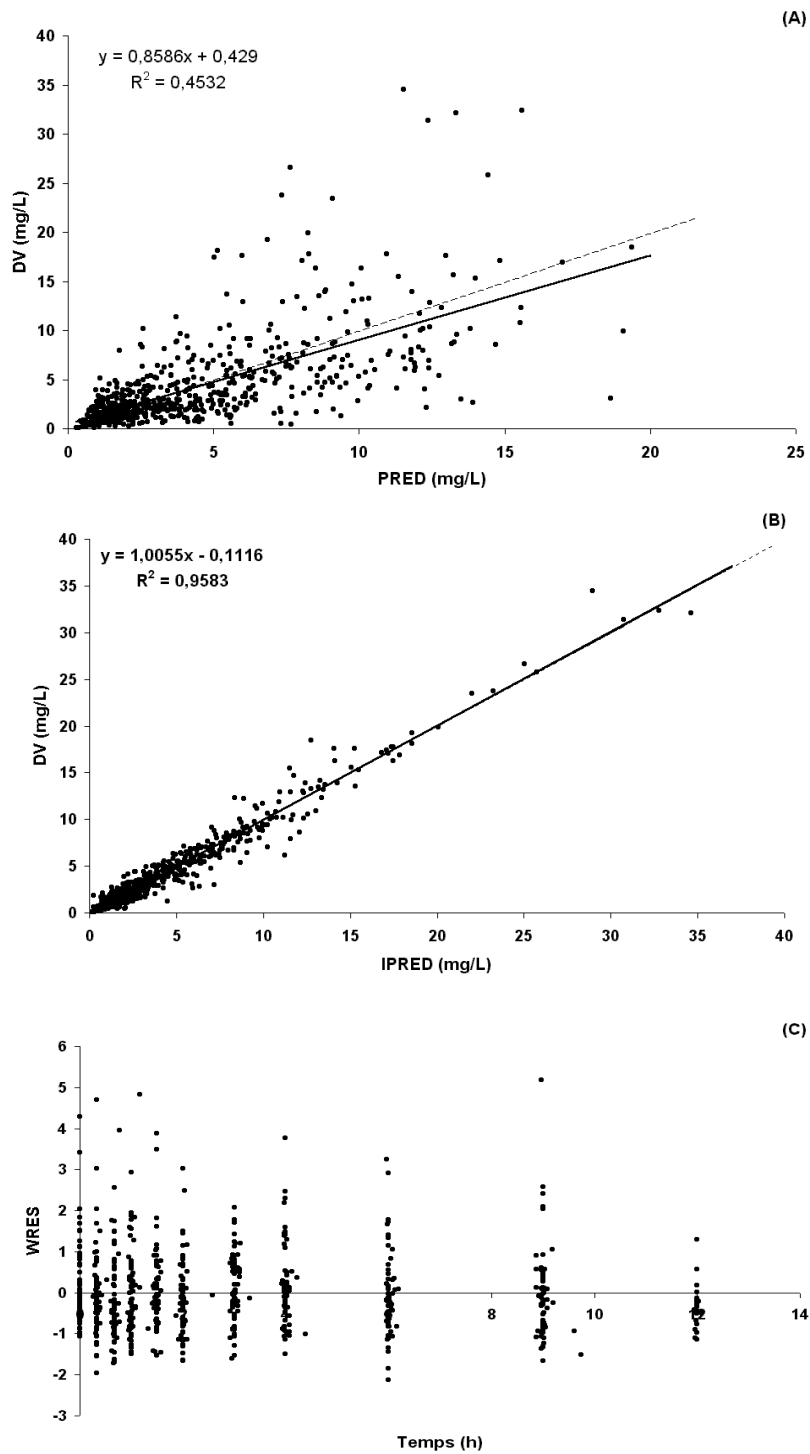


Figure 13: Performances du modèle final incluant les covariables. Concentrations observées en fonction des concentrations prédites par le modèle final de population (A) et des concentrations individuelles estimées par méthode bayésienne (B). Les droites en pointillés sont les droites unités et les droites en trait plein sont les droites de régression. Résidus pondérés en fonction du temps (C).

La modélisation avec l'algorithme FOCE n'a pas abouti à ce jour. Il est à souligner que cette méthode est difficile à mettre en œuvre avec ce modèle, compte tenu de temps de calcul extrêmement longs (plusieurs semaines).

Lorsque le rapport métabolique des concentrations d'AMPG et d'AMP mesurées à 1h était introduit dans le modèle à la place du rapport métabolique sur les AUC, la fonction objective était diminuée de 40 unités par rapport à celle du modèle final mais la variabilité sur  $k_{13}$  semblait mal estimée (très augmentée par rapport au modèle initial sans covariable : 99% contre 41%) et celle sur  $V_c/F$  restait supérieure à celle estimée par le modèle final (74% contre 58%). De plus, la précision de l'estimation des ces deux variabilités était mauvaise (rapport de l'écart-type sur la valeur estimée supérieur à un).

#### III.3.3.4. Validation du modèle final "absorption fractionnée"

Les valeurs des concentrations et des paramètres PK individuels ont été estimées par méthode bayésienne chez les patients du groupe de validation en utilisant comme information *a priori* le modèle final.

Les profils PK reconstitués à partir des concentrations individuelles prédites par estimation bayésienne (option POSTHOC) témoignent de la performance du modèle. Globalement, les courbes simulées étaient correctement ajustées aux concentrations observées. Le modèle permettait de décrire des profils présentant indifféremment un ou deux pics de concentration, mais il semblait mieux convenir lorsque le deuxième pic était précoce. Des exemples sont présentés dans la figure 14. Par rapport au modèle de base, l'introduction des covariables permettait une meilleure modélisation des profils présentant des doubles pics de concentration.

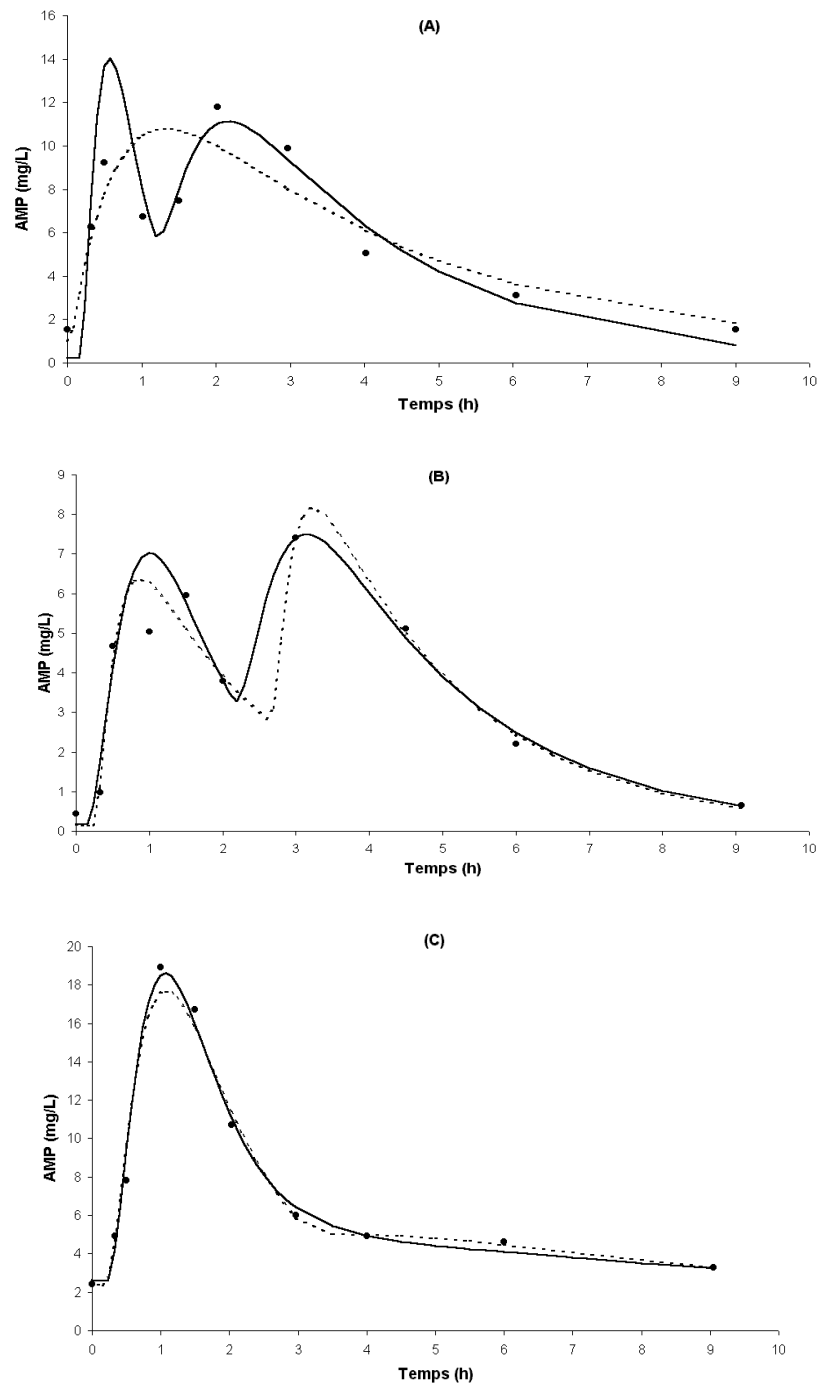


Figure 14 : Courbes des concentrations individuelles d'AMP en fonction du temps estimées par méthode bayésienne chez 3 patients du groupe de validation. Les points correspondent aux valeurs de concentrations observées (DV) et les courbes correspondent aux concentrations estimées par méthodes bayésienne (IPRED) avec le modèle initial sans covariable (pointillés) et avec le modèle final (trait plein).

Les AUC estimées par méthode bayésienne étaient bien corrélées avec les AUC trapèzes ( $r^2=0,939$ ,  $p<0,0001$ ). Les AUC étaient estimées avec précision (RMSE = 8,2%) avec un biais moyen non significatif de +2,63% (-13,83% à +19,75%).

Les mêmes profils ont été étudiés avec le modèle incluant le rapport métabolique des concentrations d'AMPG et d'AMP mesurées à 1h post-administration du MMF avec un biais non significatif de +1,24% et une RMSE de 7,5%. La modélisation des profils présentant deux pics de concentration était globalement moins satisfaisante qu'avec le modèle final incluant le rapport métabolique des AUC. Aucun des profils n'était mieux décrit avec le modèle incluant le rapport  $C1(AMPG)/C1(AMP)$ . La figure 15 montre deux situations extrêmes.

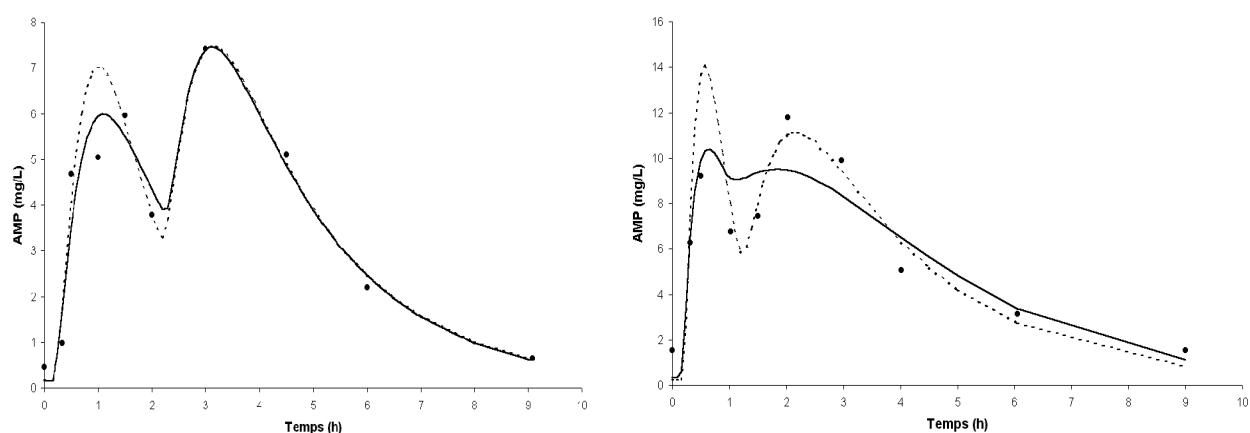


Figure 15 : Courbes des concentrations individuelles d'AMP en fonction du temps, estimées par méthode bayésienne chez 2 patients du groupe de validation. Les points correspondent aux valeurs de concentrations observées (DV) et les courbes correspondent aux concentrations estimées par méthodes bayésienne (IPRED) avec le modèle final (pointillés) et avec le modèle incluant le rapport métabolique des concentrations mesurées à C1h (trait plein).

### III.3.4. Discussion sur le modèle de pharmacocinétique de population

Un modèle de population basé sur un modèle structural à un compartiment avec absorption séquentielle en deux fractions (et temps de latence) et élimination linéaire a été développé. Ce modèle a montré l'influence de la période post-transplantation sur l'absorption, du poids sur la clairance et du rapport métabolique (AUC AMPG/AUC AMP) sur le volume de distribution.

Ce modèle structural avait été précédemment présenté pour modéliser les profils PK de la ranitidine présentant deux pics de concentration (Yin et al., Clin Pharmacokinetics 2003). Les modèles PK avec absorption d'ordre 1 avec temps de latence et avec absorption d'ordre

0 rapportés respectivement par Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) et Le Guellec et al. (Clin Pharmacokinet 2004) pour la modélisation de l'AMP ont été testés mais ils se sont révélés moins performants que le modèle à absorption fractionnée, du fait de la complexité des profils PK de l'AMP observés dans notre population, notamment dans la période précoce suivant la greffe. Les modèles décrivant l'absorption de l'AMP selon une distribution de Weibull ou d'Erlang et les modèles de circulation entéro-hépatiques testés n'ont pas fourni de résultats satisfaisants. Un modèle avec absorption décrite selon une loi de Weibull et un modèle de circulation entéro-hépatique avaient également été testés par Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) pour modéliser la PK de l'AMP chez des patients greffés précoces et n'avaient pas été retenus car n'amélioraient pas significativement les résultats par rapport au modèle avec absorption d'ordre 1 avec temps de latence.

Dans notre étude, la composante additive du modèle d'erreur résiduelle était un peu élevée (0,47 mg/L) par rapport à la limite de quantification de la méthode analytique utilisée pour le dosage de l'AMP mais elle restait inférieure à celles rapportées par Le Guellec et al. (Clin Pharmacokinet 2004) dans une population de transplantés rénaux stables dont certains figurent dans notre base de données (2,04 mg/L) et par Shum et al. (Br J Clin Pharmacol 2003) dans une population de transplantés rénaux précoces (0,75 mg/L). Ces derniers décrivaient en plus une erreur résiduelle proportionnelle de 35%.

Les relations entre la constante d'absorption  $k_{13}$  et le délai post-greffe, entre la clairance apparente et le poids du patient et entre le volume de distribution apparent du compartiment central et le rapport métabolique (AUC AMPG/AUC AMP) ont été prises en compte dans le modèle final. L'influence du délai post-greffe est en accord avec une évolution de la PK de l'AMP au cours du temps (Shaw et al., Ther Drug Monit 1995 ; Pirsch et Sollinger, Ther Drug Monit 1996 ; Bullingham et al., Clin Pharmacokinet 1998), l'augmentation de l'exposition à l'AMP entre la phase précoce et la phase tardive étant attribuée à plusieurs facteurs tels que l'amélioration de la fonction rénale, associée à une diminution de la fraction libre d'AMP (Shaw et al., Ther Drug Monit 1995), et la diminution des doses des traitements concomitants, notamment de la CsA (Smak Gregoor et al., Transplantation 1999) et des corticostéroïdes (Cattaneo et al., Kidney Int 2002), interagissant sur la PK de l'AMP. Ces effets sont donc vraisemblablement pris en compte ici dans l'effet période, ce qui pourrait contribuer à expliquer qu'aucune relation significative entre la PK de l'AMP et les doses de CsA, les doses de corticostéroïdes et les marqueurs de la fonction rénale (créatinine sérique, clairance de la créatinine) n'ait été retenue dans le modèle final. La relation entre le poids et la clairance apparente de l'AMP, décrite de façon similaire ( $CL/F = \theta \times \text{poids}$ ), a déjà été rapportée dans l'étude de PK de population de Le Guellec et al. (Clin Pharmacokinet 2004) portant sur des patients stables. En revanche, cette relation n'était pas significative dans l'étude réalisée par Shum et al. (Br J Clin Pharmacol



2003) sur des patients greffés précoces, mais les valeurs de poids n'étaient disponibles que pour 10 patients sur 22. Enfin, cette étude a mis en évidence une relation significative entre le volume de distribution du compartiment central et le rapport métabolique. La prise en compte de ce rapport métabolique semble pertinent car il dépend de plusieurs phénomènes, variables d'un individu à l'autre : (i) l'activité métabolique, liée à la fois au génotype des enzymes de glucuro-conjugaison, à l'état physiopathologique et à l'influence de substances inductrices et inhibitrices - en particulier, les corticoïdes (inducteurs des enzymes responsables de la glucuro-conjugaison) peuvent largement modifier cette activité métabolique (Cattaneo et al., *Kidney Int* 2002) ; (ii) le transport actif de l'AMPG des hépatocytes vers la bile, peut-être par la P-gp mais plus probablement par MRP2, qui est probablement inhibé par l'administration concomitante de CsA (van Gelder, *Ther Drug Monit* 2001) ; (iii) la déconjugaison de l'AMPG au niveau de la flore intestinale, sous la dépendance de la nature et de l'activité de cette flore ; (iv) la fonction rénale qui, si elle est altérée, induit une augmentation des concentrations d'AMPG pouvant faire varier l'équilibre fraction libre/fraction liée d'AMP (Meier-Kriesche HU et al., *Ther Drug Monit* 2000). Comme cela a été suggéré pour l'effet période, cette covariable "rapport métabolique" pourrait donc englober les facteurs liés à la fonction rénale et aux traitements concomitants connus pour influencer la PK de l'AMP.

A titre de comparaison, nous avons appliqué à notre fichier de données le modèle bi-compartimental incluant une absorption d'ordre 1 avec temps de latence préconisé par Shum et al. (*Br J Clin Pharmacol* 2003). L'analyse des covariables significatives a montré que l'introduction de la période, du poids et du rapport métabolique résultait en un abaissement de la fonction objective de 230 unités. Les résultats ainsi obtenus sont rapportés dans le tableau 23. Cette étude croisée a montré la pertinence de ces covariables pour la description de la PK de l'AMP.

**Tableau 23** : Valeurs moyennes, variabilités inter-individuelle et inter-occasion des paramètres PK de l'AMP estimées dans la population de référence en utilisant un modèle structural incluant une absorption d'ordre 1 avec temps de latence

<b>Paramètres</b>	<b>Moyenne (<math>\pm</math> erreur standard à la moyenne)</b>	<b>Variabilité inter-individuelle <math>\omega^2</math> (SE<sup>2</sup>)</b>	<b>Variabilité inter-occasion <math>\omega^2</math> (SE<sup>2</sup>)</b>
<b>K<sub>a</sub> (h<sup>-1</sup>) : <math>\theta_1 + \theta_2 \times \text{PER}</math></b>	$\theta_1 = 0,71 (\pm 0,12)$ $\theta_2 = 9,08 (\pm 6,81)$	39,7 % 0,16(0,10)	55,3 % 0,306 (0,160)
<b>Q (L/h) : <math>\theta_3</math></b>	$\theta_3 = 28,80 (\pm 5,08)$	72,2 % 0,52 (0,25)	NE*
<b>Vc/F (L) : <math>\theta_4 \times \text{MTB}_{\text{AUC}}</math></b>	$\theta_4 = 0,52 (\pm 0,12)$	107,2 1,150 (0,466)	83,5 % 0,697 (0,375)
<b>Vp/F (L) : <math>\theta_5</math></b>	$\theta_5 = 436 (\pm 176)$	NE	NE
<b>CL/F (L/h) : <math>\theta_6 \times \text{PDS}</math></b>	$\theta_6 = 0,48 (\pm 0,05)$	36,6 % 0,134 (0,050)	28,3 % 0,080 (0,042)
<b>ALAG (h) : <math>\theta_7</math></b>	$\theta_7 = 0,29 (\pm 0,01)$	NE	NE

\*NE =non estimé

Les deux modèles structuraux (basés soit sur une absorption d'ordre 1 avec temps de latence, soit sur une absorption fractionnée) conduisaient à des résultats cohérents pour l'analyse des covariables. Le modèle le plus simple (absorption d'ordre 1) était caractérisé par une meilleure précision de l'estimation du paramètre d'absorption. En revanche, les variabilités résiduelles étaient du même ordre de grandeur et l'estimation des variabilités inter-individuelle et inter-occasion posait problème avec les deux modèles. Les deux approches conduisaient donc : (i) à des résultats concordants ; (ii) à deux modèles de population pas totalement satisfaisants. Le principe de parcimonie plaidait en faveur du modèle le plus simple (modèle structural basé sur une absorption d'ordre 1). Toutefois l'estimation bayésienne des PK individuelles observées dans un groupe indépendant de patients (groupe de validation) utilisant comme information *a priori* ces deux modèles de population, a montré une nette supériorité du modèle basé sur une absorption fractionnée. Le modèle avec absorption d'ordre 1 était incapable de décrire les profils complexes observés principalement en période post-greffe précoce (figure 16). En revanche, le modèle basé sur une absorption fractionnée permettait de décrire de façon satisfaisante les profils PK observés, qu'ils présentent un ou deux pics de concentrations. Il semblait toutefois mieux adapté à la modélisation d'un deuxième pic précoce, plutôt qu'à un rebond entéro-hépatique plus tardif. Ceci peut se justifier par le fait que ce modèle structural constitue un modèle physiologique d'absorption séquentielle et non de cycle entérohépatique.

La présente étude de population a confirmé la difficulté à modéliser la PK de l'AMP dans la période précoce suivant la greffe (Shum et al., Br J Clin Pharmacol 2003). Dans la période stable, les profils pharmacocinétiques présentent une allure plus classique, caractérisée par un pic principal de concentration avec un maximum dans les quatre premières heures et éventuellement un pic secondaire caractéristique d'un rebond entéro-hépatique. Au contraire, pendant le premier mois post-greffe, des profils complexes avec deux pics de concentration, pouvant être d'intensité comparable, ont été observés. La base de donnée analysée ici incluait tous ces types de profils. L'étude des concentrations prédites par chacun des deux modèles comparés ici, montre que le modèle structural basé sur une absorption d'ordre 1 est adapté à la seule description des profils classiques (figure 16) et c'est très certainement la présence, dans la base de données, de nombreux profils « classiques », recueillis en période stable, qui a contribué à améliorer les performances de ce modèle avec absorption d'ordre 1.

L'analyse des covariables a montré une relation significative entre le poids et la clairance apparente de l'AMP ; cette relation avait déjà été rapportée dans la littérature (Le Guellec et al., Clin Pharmacokinet 2004). De plus, cette étude a permis de mettre en évidence l'influence de la période post-greffe et du rapport métabolique comme covariables explicatives. L'effet période était montré sans ambiguïté avec le modèle structural décrivant une absorption d'ordre 1, mais de façon moins nette avec le modèle structural incluant une absorption fractionnée (à cause de l'imprécision de l'estimation du paramètre de proportionnalité). Essentiellement deux arguments nous ont conduit à conserver l'effet période : sa délétion du modèle intermédiaire (i) entraînait une augmentation de la fonction objective de 22 points ; (ii) dégradait significativement la relation concentrations prédites – concentrations observées.

Le calcul du rapport métabolique comme rapport de l'AUC d'AMPG sur l'AUC d'AMP semble difficile dans la pratique clinique. C'est pourquoi le rapport métabolique des concentrations d'AMPG et d'AMP mesurées à 1h a été étudié comme témoin indirect ("surrogate marker"), mais le modèle incluant cette covariable reste à perfectionner. D'autres covariables restent à explorer. Une recherche systématique des facteurs potentiellement responsables de la variabilité de ce rapport métabolique (facteurs génétiques, physiopathologiques, etc.) doit maintenant être réalisée. L'intérêt de ces paramètres serait d'être caractéristiques d'un patient et constants dans le temps. D'autres facteurs tels que les traitements concomitants (CsA, corticostéroïdes), la fonction rénale, l'âge, le sexe, la surface corporelle n'ont, en revanche, pas été retenus pour expliquer la variabilité de la PK de l'AMP.

Les limites de l'analyse de population effectuée ici tiennent à l'effectif relativement réduit de patients inclus et incluables dans une telle étude. Cette analyse, qui doit encore

être considérée comme préliminaire, a tout de même fourni des informations intéressantes sur la PK de l'AMP.

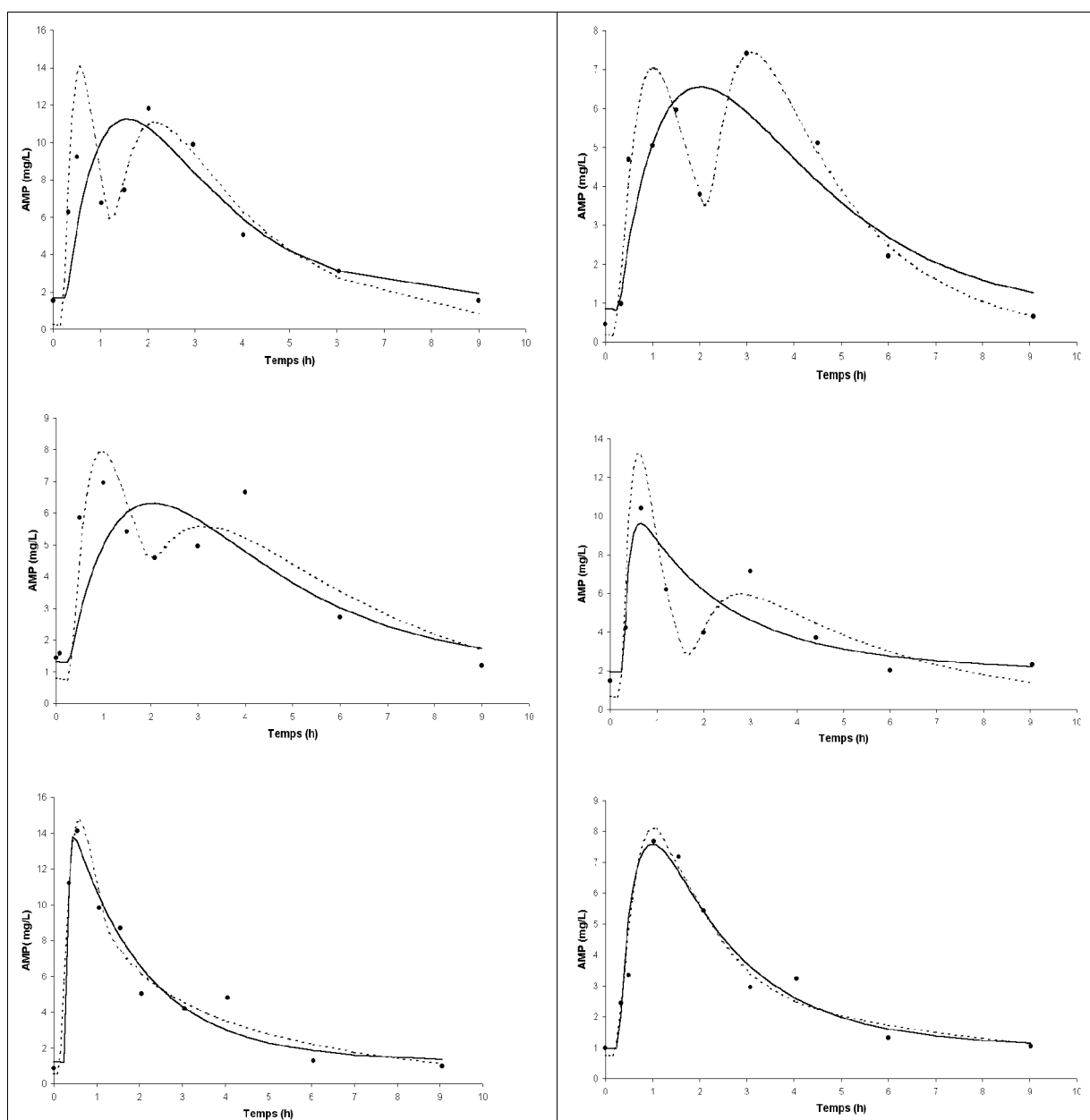


Figure 16 : Exemples de courbes des concentrations individuelles d'AMP en fonction du temps, estimées par méthode bayésienne chez des patients du groupe de validation. Les points correspondent aux valeurs de concentrations observées (DV). Les courbes correspondent aux concentrations estimées par méthodes bayésienne (IPRED) avec les modèles de population basés soit sur un modèle structural avec absorption fractionnée (pointillés), soit sur un modèle structural avec absorption d'ordre 1 (trait plein).

## IV. Estimation de l'AUC d'AMP à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins

Deux méthodes ont été employées pour prédire la valeur d'AUC de l'AMP à partir d'un nombre limité d'échantillons sanguins : la méthode de régression linéaire multiple et la méthode bayésienne.

### IV.1. Estimation par régression linéaire multiple

L'objectif de cette étude était de développer des stratégies permettant l'estimation de l'exposition à l'AMP par régression linéaire multiple à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins.

#### IV.1.1.Principe de la méthode par régression linéaire multiple

Cette méthode statistique prend en compte la relation linéaire entre plusieurs variables indépendantes (concentrations sanguines mesurées) et une variable dépendante, l'AUC. Elle aboutit à une équation, exprimant la valeur d'AUC en fonction de plusieurs concentrations mesurées, de la forme :

$$AUC_{0-12} = Cte + a_1 \times C_{t_1} + a_2 \times C_{t_2} + \dots + a_i \times C_{t_i}$$

où  $AUC_{0-12}$  est la valeur prédite de l'AUC inter-dose, Cte une constante correspondant à l'intercept sur l'axe y,  $C_{t_1}$ ,  $C_{t_2}$ ,  $C_{t_i}$  les concentrations mesurées aux temps  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_i$  et  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_i$  les coefficients attribués à chaque valeur de concentration mesurée.

#### IV.1.2.Recherche de la meilleure stratégie de prélèvements limités

##### IV.1.2.1. Matériel et Méthode

###### IV.1.2.1.1.Patients

La recherche de la stratégie de prélèvements limités la plus performante a été réalisée à partir de l'ensemble des patients greffés rénaux inclus dans les études cliniques Primocine, Stablocine, RCCT (van Gelder et al., Transplantation 1999) et afro-américaine/caucasienne (Pescovitz et al., Am J Transplant 2003). Chaque période post-greffe était considérée indépendamment : J3 (n=24), J7 (n=23) et J30 (n=24) chez les patients Primocine, >M3 (n=20) chez les patients Stablocine, J3 (n=131), J7 (n=121) et J11 (n=101) chez les patients de la RCCT et >M6 (n=78) chez les patients de l'étude afro-américaine/caucasienne. Bien que des délais post-greffe (J3 et J7) soient communs dans

les deux études Primocine et RCCT, les données n'ont pas été combinées car les horaires de prélèvement différaient entre les deux études.

#### IV.1.2.1.2. Recherche des meilleures stratégies de prélèvements limités, détermination des équations correspondantes et validation.

Par souci de compatibilité avec une pratique clinique en routine, la recherche de la meilleure stratégie a été réalisée à partir des concentrations obtenues dans les 3 premières heures suivant la prise du MMF. Seules les concentrations pour lesquelles les horaires de prélèvements avaient été respectés à  $\pm 5$  min par rapport aux horaires théoriques ont été prises en compte. Enfin, les modèles devaient inclure au plus trois valeurs de concentrations.

Le nombre de cinétiques disponibles dans les études Primocine et Stablocine n'étant pas suffisant pour individualiser deux groupes de patients, la recherche des meilleures stratégies a été réalisée, pour chaque période, à partir de l'ensemble des cinétiques, puis chaque stratégie a été validée selon une méthode de permutation circulaire. Les données de chaque série (chaque période) étaient réparties de façon aléatoire dans 3 groupes nommés A, B et C (tableau 24). Une équation, utilisant la stratégie de prélèvements limités sélectionnée auparavant, était développée pour chaque combinaison de deux groupes : AB, AC et BC. Chacune des équations était ensuite testée indépendamment sur les données du troisième groupe, n'ayant pas servi à déterminer l'équation. Cette méthode permettait d'évaluer la stratégie de prélèvements limités mais pas l'équation finale, développée avec l'ensemble des patients et incluant les coefficients affectés à chaque valeur de concentration.

Tableau 24 : Répartition des cinétiques Primocine (J3, J7 et J30) et Stablocine (>M3) dans 3 groupes distincts pour la validation des modèles de régression linéaire multiple par la méthode de permutation circulaire. A chaque période, les cinétiques ont été réparties, par tirage au sort, dans les groupes A, B et C.

	<b>J3</b>	<b>J7</b>	<b>J30</b>	<b>&gt;M3</b>
Groupe A	8	8	8	7
Groupe B	8	7	8	6
Groupe C	8	8	8	7

Les études RCCT et afro-américaine/caucasienne ayant fourni un nombre suffisant de cinétiques pour chaque délai post-greffe, les patients ont été répartis entre un groupe de référence à partir duquel a été construit le modèle et un groupe de validation dans lequel le modèle a été testé et validé par comparaison des AUC<sub>0-12</sub> estimées avec les valeurs de référence obtenues par la méthode des trapèzes (tableau 25).

Tableau 25 : Répartition aléatoire des patients inclus dans les études RCCT (J3, J7 et J11) et afro-américaine caucasienne (>M6) dans des groupes de référence et de validation.

Délai post-transplantation	Groupe de référence	Groupe de validation
	n	n
J3	101	30
J7	91	30
J11	71	30
>M6	58	20

Une analyse de régression pas-à-pas a permis de déterminer, pour chaque série de données (chaque période post-greffe), la combinaison des 3 concentrations la mieux corrélée à la valeur de l'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP (les AUC trapèzes étant les valeurs de référence) et l'équation correspondante (c'est-à-dire les coefficients à affecter à chaque valeur de concentration). Cette analyse a été mise en oeuvre à l'aide du logiciel Statview.

La comparaison entre les AUC estimées par régression linéaire multiple et les AUC de référence était réalisée par analyse de régression ( $r^2$ ), par mesure du biais et de la précision (RMSE%). Le test de Wilcoxon a été employé pour comparer les AUC entre les groupes deux à deux. De plus, le pourcentage de patients pour lesquels le biais était en dehors de l'intervalle (-20% ; +20%) a été calculé.

#### IV.1.2.2. Résultats

##### IV.1.2.2.1. Meilleures stratégies de prélèvements limités et équations de régression linéaire multiple



Les combinaisons de 3 concentrations qui présentaient la meilleure relation avec les valeurs d'AUC<sub>0-12</sub> de l'AMP étaient différentes en fonction des délais post-transplantation considérés et plusieurs équations ont été développées. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 26. En fonction de la stratégie de prélèvements limités, la totalité des profils n'a pas toujours été prise en compte (18 à 21 profils sur 24 dans Primocine ; 74 profils sur 101 à J3, 70 sur 91 à J7 et 57 sur 71 à J11 dans l'étude RCCT) du fait du non respect des horaires de prélèvement, ces données ayant pourtant été recueillies dans le cadre d'études cliniques.

**Tableau 26:** Meilleures stratégies de prélèvements limités pour chaque période post-transplantation, et équations correspondantes. Les équations ont été établies à partir de l'ensemble des données disponibles pour Primocine et Stablocine et à partir des données de la population de référence pour les études RCCT et afro-américaine/caucasienne.

Délai post-greffe	n	Meilleure stratégie	r <sup>2</sup>	Equation
<b>Primocine</b>				
J3	18	0 – 1h30 – 3h	0,936	$4,434 + 6,984 C_0 + 1,375 C_{1h30} + 2,741 C_{3h}$
J7	21	0 – 40min – 2h	0,846	$10,087 + 3,530 C_0 + 1,255 C_{40min} + 1,716 C_{2h}$
J30	21	0 – 1h – 2h	0,767	$11,206 + 3,897 C_0 + 0,885 C_{1h} + 1,726 C_{2h}$
<b>Stablocine</b>				
>M3 RCCT	20	20min – 1h – 3h	0,885	$1,499 + 0,612 C_{20min} + 0,901 C_{1h} + 6,873 C_{3h}$
J3	74	0 – 40min – 2h	0,793	$2,365 + 8,819 C_0 + 0,934 C_{40min} + 3,213 C_{2h}$
J7	70	0 – 40min – 2h	0,913	$1,883 + 6,595 C_0 + 1,077 C_{40min} + 3,381 C_{2h}$
J11	57	40min – 75min – 2h	0,835	$4,98 + 0,898 C_{40min} + 0,750 C_{75min} + 3,247 C_{2h}$
<b>Afro-américaine/caucasienne</b>				
> M6	58	40min – 75min – 2h	0,786	$20,353 + 0,731 C_{40min} + 0,092 C_{75min} + 2,527 C_{2h}$

#### IV.1.2.2.2. Validation des modèles

Les résultats de la comparaison entre les AUC<sub>0-12</sub> estimées par régression linéaire multiple et les AUC<sub>0-12</sub> calculées par la méthode des trapèzes sont présentés dans le tableau 27.

**Tableau 27** : Comparaison entre les AUC<sub>0-12</sub> d'AMP estimées par régression linéaire multiple et les AUC<sub>0-12</sub> de référence

	n	r <sup>2</sup>	Biais (%)	RMSE (%)	Pourcentage de patients "mal estimés"	
					biais <- 20%	biais >20%
<b><i>Primocine</i></b>						
J3	18	0,879	+ 4,25	15,6	5,6	11,1
J7	21	0,596	+ 1,92	20,7	14,3	19,0
J30	21	0,671	+ 3,6	16,2	4,8	14,3
<b><i>Stablocine</i></b>						
>M3	20	0,796	+ 1,67	14,6	10	10
<b><i>RCCT</i></b>						
J3	26	0,826	+ 6,67	20,7	7,7	26,9
J7	23	0,884	+ 1,42	17,9	8,7	13
J11	23	0,924	+ 2,55	13,3	4,3	4,3
<b><i>Etude afro-américaine/caucasienne</i></b>						
> M6	20	0,605	+ 1,53	17,5	5	10

Aucun biais n'était significatif ( $p > 0,05$ ). Le pourcentage de patients mal estimés (biais en dehors de l'intervalle  $-20\%$  ;  $+20\%$ ) variait de 8,6% à 34,6% selon les délais et les stratégies considérés.

#### IV.1.2.3. Discussion sur les meilleures stratégies obtenues

Plusieurs équations ont été proposées pour prédire la valeur de l'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP par régression linéaire multiple chez des patients greffés rénaux adultes et enfants (tableau 28).

Tableau 28 : Equations pour l'estimation de l'AUC d'AMP chez des patients transplantés rénaux

<b>Population étudiée</b>	<b>Stratégie proposée</b>	<b>Référence</b>
20 adultes , au-delà de 6mois post-greffe (+CsA)	<b>20min, 1h, 3h</b> $r^2=0,985$	Le Guellec et al., Eur J Clin Pharmacol 2002
10 adultes, 1 <sup>er</sup> mois post-greffe (+CsA)	<b>0, 1h, 3h, 6h</b> $r^2=0,841$	Johnson et al., Clin Pharmacol Ther 1999
10 adultes, de 1 semaine à 1 an post-greffe (+CsA)	<b>0, 1h, 2h, 4h</b> $r^2=0,890$	Yeung et al., Transplant Proc 2001
21 adultes, de 1 semaine à 3 mois post-greffe (+tacrolimus)	<b>0, 30min, 2h</b> $r^2=0,862$	Pawinski et al., Clin Chem 2002
36 enfants, 1 semaine à 6 mois post-greffe (+CsA)	<b>0,75min, 6h</b> $r^2=0,880$	Schütz et al., Transplant Proc 1998(b)
61 enfants, période stable (+CsA ou tacrolimus ou sans anti-calcineurine)	<b>1h, 2h, 6h</b> $r^2=0,870$	Filler et al., Ther Drug Monit 2000

Selon les études, les stratégies de prélèvements limités étaient différentes ce qui peut en partie s'expliquer par le fait que les populations étudiées (patients, immunosuppresseur associé, délai post-greffe) et les horaires de prélèvements disponibles et testés n'étaient pas identiques. Certaines équations ont été testées par d'autres équipes et sur d'autres données mais elles n'étaient pas forcément efficaces (Willis et al., Ther Drug Monit 2000 ; Taylor et al., Ther Drug Monit 2001), ce qui pose la question des conditions d'applicabilité d'un modèle. La plupart des équations ont été développées à partir de données globales et ne tenaient pas compte de la période post-transplantation.

Dans la présente étude, les stratégies de prélèvements limités permettant la meilleure estimation de l'AUC<sub>0-12</sub> d'AMP étaient différentes en fonction du délai post-greffe considéré, ce qui est en accord avec la variabilité de la PK de l'AMP en fonction du temps. Cependant, d'un point de vue clinique, le recours à une stratégie différente en fonction du délai post-transplantation paraît difficilement applicable car source de confusions. Aussi, il semblerait plus pratique de disposer d'une stratégie de prélèvements limités identique quel que soit le délai écoulé depuis la transplantation.

### IV.1.3.Mise au point de modèles utilisant une stratégie de prélèvements limités commune

L'objectif de cette partie était d'élaborer des modèles d'estimation de l'AUC d'AMP par régression linéaire multiple au moyen d'une stratégie de prélèvements limités commune pour différents délais post-transplantation.

#### IV.1.3.1. Matériel et méthode

Une stratégie commune pour toutes les périodes post-greffe a été établie pour l'estimation de l'AUC par méthode Bayésienne et elle est actuellement employée dans le cadre d'une étude clinique. Elle comprenait trois valeurs de concentrations obtenues 20min, 1h et 3h après la prise du médicament (§ IV.2.2.). Pour accorder les méthodes d'estimation, dans la perspective d'une utilisation en routine de la méthode linéaire multiple à titre de vérification, cette stratégie commune a également été appliquée pour l'estimation de l'AUC d'AMP par régression linéaire multiple. Des équations ont ainsi été développées à partir des données Primocine et Stablocine pour les délais post-greffe suivants : J3, J7, J30 et >M3.

Les données PK de la RCCT et de l'étude afro-américaine/caucasienne ne comprenaient pas les concentrations à 20min et 1h. Il était donc impossible d'appliquer la même stratégie que définie précédemment. La meilleure stratégie commune aux données de ces deux études a donc été recherchée à part.

La validation des modèles développés a été réalisée comme décrit précédemment dans le paragraphe IV.1.2.1.2.

De plus, les équations déterminées à partir des données Primocine et Stablocine ont été testées sur les données provenant du groupe indépendant de 5 patients. Les AUC<sub>0-12</sub> de ces 5 patients à J15, M1 et M3 ont été estimées avec les équations développées dans Primocine et Stablocine pour J7, J30 et >M3 respectivement. Deux équations (J30 et >M3) ont été utilisées alternativement pour estimer les AUC<sub>0-12</sub> à M2.

### IV.1.3.2. Résultats

#### IV.1.3.2.1. Stratégie commune pour les données des études Primocine et Stablocine

La stratégie 20min-1h-3h correspond à la meilleure stratégie déterminée chez les patients stables (>M3) dans le paragraphe IV.1.2.2.1. L'équation est donc la même que celle décrite précédemment. Elle est rappelée dans le tableau 29, avec les équations développées pour les autres périodes post-transplantation. Seuls 16 profils à J3, 20 à J7 et J30 respectaient ces 3 horaires de prélèvement à 5 min près.

Tableau 29 : Equations pour l'estimation des  $AUC_{0-12}$  d'AMP utilisant une stratégie de prélèvements limités commune (20min-1h-3h). Les équations ont été établies à partir de l'ensemble des données obtenues pour chaque période post-greffe.

Délai post-greffe	Equation	$r^2$
J3	$0,996 + 6,456 C_{20min} + 0,735 C_{1h} + 4,582 C_{3h}$	0,844
J7	$10,525 + 1,215 C_{20min} + 0,968 C_{1h} + 2,292 C_{3h}$	0,783
J30	$13,292 + 0,635 C_{20min} + 0,832 C_{1h} + 3,074 C_{3h}$	0,723
>M3	$1,499 + 0,612 C_{20min} + 0,901 C_{1h} + 6,873 C_{3h}$	0,885

Les résultats de la validation des modèles de régression linéaire multiple par la méthode de permutation circulaire sont résumés dans le tableau 30.

**Tableau 30** : Comparaison entre les AUC<sub>0-12</sub> trapèzes et les AUC<sub>0-12</sub> estimées par régression linéaire multiple à partir des concentrations mesurées à 20min, 1h et 3h suivant la prise de MMF chez des patients greffés rénaux *de novo* et stables.

	n	r <sup>2</sup>	Biais (%)	RMSE (%)	Pourcentage de patients mal estimés (Biais ><20%)
<b><i>Primocine</i></b>					
J3	16	0,719	+ 7,89	31,7	31,3
J7	20	0,610	+ 8,27	26,0	30
J30	18	0,622	+ 3,67	16,5	16,7
<b><i>Stablocine</i></b>					
>M3	20	0,796	+ 1,67	14,6	20

A J3, les résultats obtenus avec la stratégie commune étaient moins satisfaisants que ceux obtenus avec la meilleure stratégie (valeurs du biais, de la RMSE et du pourcentage de patients mal estimés plus élevées). Cependant, les valeurs de biais n'étaient pas significatives. A J7, le coefficient de détermination était meilleur et le pourcentage d'AUC mal estimées plus faible avec la stratégie commune. Cependant, un biais moins important et une meilleure précision étaient obtenus avec la meilleure stratégie. A J30, la valeur du coefficient de détermination était plus faible que celle obtenue avec la meilleure stratégie, les valeurs de biais (non significatif) et de précision étaient comparables, mais le pourcentage de patients mal estimés était légèrement plus faible (16,7%) qu'en utilisant la stratégie définie comme la meilleure (19,1%). Ainsi, selon la période, la stratégie commune ne donnait pas forcément de moins bon résultats que la stratégie dite meilleure, mais il faut souligner que les profils considérés différaient en fonction de la stratégie considérée. Ces résultats suggèrent que le coefficient de détermination r<sup>2</sup> ne constitue pas forcément le meilleur index de sélection et de comparaison entre plusieurs stratégies et que la prise en compte d'un ensemble de facteurs incluant le r<sup>2</sup>, la valeur de biais et de précision de l'estimation semble plus pertinente.

Les équations ont également été employées pour estimer les AUC<sub>0-12</sub> obtenues à J15, M1, M2 et M3 suivant la greffe dans un groupe indépendant de patients.

A J15 (n=5), les AUC<sub>0-12</sub> étaient bien estimées par l'équation développée à partir des données J7 de Primocine. Le biais moyen était de +0,85± 9,84% (intervalle = -12,28% ; 14,69%).

A M1, seulement deux AUC<sub>0-12</sub> ont pu être estimées car les horaires de prélèvements n'avaient pas été respectés à ±5 min pour les autres cinétiques. Ces deux AUC<sub>0-12</sub> étaient bien estimées avec des valeurs de biais de +4,02% et 3,74%.

A M2 (n=5), deux équations ont été testées (déterminées à partir des données de J30 et de >M3). Avec l'équation J30, la valeur moyenne du biais était de  $-4,08 \pm 21,83\%$  (intervalle =  $-26,15\%$  ;  $18,75\%$ ) et deux patients étaient mal estimés, avec un biais  $< -20\%$ . Avec l'équation >M3, la valeur moyenne du biais était de  $+14,7 \pm 30,6\%$  (intervalle =  $-8,3\%$  ;  $67,26\%$ ). Un seul patient présentait un biais très supérieur à  $20\%$ .

A M3, les valeurs de biais calculées sur les trois  $AUC_{0-12}$  estimées étaient de  $-5,99\%$ ,  $-8,93\%$  et  $+52,63\%$ .

#### IV.1.3.2.2. Stratégie commune pour les données des études RCCT et Afro-américaine/caucasienne

A la demande de l'investigateur principal de l'étude FDCC (Dr T. van Gelder), toutes les stratégies incluant 3 concentrations comprises dans les deux premières heures suivant la prise du médicament ont été testées dans les groupes de référence. La stratégie commune qui donnait les meilleurs résultats, en terme de biais et de coefficient de détermination ( $r^2$ ) entre les AUC estimées et les AUC observées, était celle qui comprenait les concentrations mesurées à 40min, 75min et 2h. Cette combinaison correspond aux meilleures stratégies déterminées pour les périodes J11 et >M6. Les équations déterminées dans le groupe de référence pour l'estimation de l'AUC à partir de ces trois prélèvements figurent dans le tableau 31, y compris celles des périodes J11 et >M6 déjà présentées dans un précédent paragraphe (IV.1.2.2.1).



Tableau 31 : Equations pour l'estimation des AUC<sub>0-12</sub> d'AMP à différentes périodes post-transplantation à partir d'une stratégie de prélèvements limités commune pour l'ensemble des périodes post-greffe (40min, 75min, 2h).

Délai post-greffe	Equation	r <sup>2</sup>
J3	$4,75 + 1 C_{40\text{min}} + 0,772 C_{75\text{min}} + 2,874 C_{2\text{h}}$	0,712
J7	$3,74 + 0,805 C_{40\text{min}} + 1,090 C_{75\text{min}} + 3,085 C_{2\text{h}}$	0,918
J11	$4,98 + 0,898 C_{40\text{min}} + 0,750 C_{75\text{min}} + 3,247 C_{2\text{h}}$	0,835
>M6	$20,353 + 0,731 C_{40\text{min}} + 0,092 C_{75\text{min}} + 2,527 C_{2\text{h}}$	0,786

Ces équations ont été testées pour estimer les AUC des patients du groupe de validation (tableau 32).

Tableau 32 : Comparaison entre AUC<sub>0-12</sub> observées et AUC<sub>0-12</sub> estimées par régression linéaire multiple au moyen de la stratégie commune 40min-75min-2h.

	n	r <sup>2</sup>	Biais (%)	RMSE (%)	Pourcentage de patients mal estimés (Biais ><20%)
<b><u>RCCT</u></b>					
J3	23	0,650	+ 1,93	25,3	39,1
J7	18	0,881	+ 3,21	21,3	38,8
J11	23	0,924	+ 2,55	13,3	8,6
> M6	20	0,605	+ 1,53	17,5	15

A J3, le biais (non significatif) était plus faible qu'avec la meilleure stratégie (+1,93% versus +6,67%) et le pourcentage d'AUC estimées avec un biais >< 20% n'était pas beaucoup plus élevé (39,1% versus 34,6%). A J7, les résultats obtenus avec la stratégie commune étaient moins bons en terme de biais, de précision et de pourcentage d'AUC mal estimées.

Le développement d'une stratégie commune et d'un algorithme global pour les données de la RCCT et de l'étude afro-américaine/caucasienne a fait l'objet d'un poster avec résumé publié (Prémaud et al., Ther Drug Monit 2003(b)). Les équations résultantes sont actuellement utilisées dans une étude clinique internationale, la "fixed dose versus concentration controled study" (FDCC).

#### IV.1.4. Discussion sur la méthode d'estimation par régression linéaire multiple

La présente étude a montré que chez des patients greffés rénaux, *de novo* et stables, traités par MMF et CsA, les concentrations les plus utiles pour prédire la valeur de l'AUC<sub>0-12</sub> différaient en fonction de la période post-greffe considérée. Toutefois, dans la

perspective d'une application clinique, des équations fondées sur une stratégie de prélèvements limitée commune pour tous les délais post-transplantation ont été développées. Ainsi la stratégie 20min-1h-3h a été appliquée sur les données Primocine et Stablocine et a fourni des résultats satisfaisants. Une autre stratégie commune (40min-75min-2h) a été élaborée à partir des données issues des études RCCT et afro-américaine/caucasienne pour lesquelles les horaires de prélèvements étaient différents. Il est important de souligner que, même avec une stratégie de prélèvements commune, il convient, du fait de la variation de la PK de l'AMP au cours du temps, d'établir des équations différentes en fonction des périodes post-greffe de façon à estimer l'AUC le plus exactement et le plus précisément possible.

Même si, globalement, les prédictions des valeurs d'AUC par régression linéaire multiple sont correctes, cette méthode d'estimation se heurte à certaines limites. En effet, l'application de tels modèles requiert le strict respect des horaires de prélèvement ce qui n'est pas forcément compatible avec la pratique clinique en routine. Dans les populations étudiées ici, pourtant incluses dans des études PK pour la plupart, de nombreuses AUC n'ont pu être estimées au moyen des équations développées du fait du non respect des horaires de prélèvement. De plus, cette méthode ne fournit qu'une valeur d'AUC ; aucune autre information sur le comportement PK du médicament n'est accessible ce qui limite l'application du modèle. Si la valeur estimée pour une AUC est totalement erronée, il n'y a aucun moyen pour l'utilisateur de s'en apercevoir, ce qui n'est pas le cas avec la méthode bayésienne qui permet de visualiser une courbe estimée. Cette méthode d'estimation doit donc être utilisée avec précaution. Toutefois, les équations de régression linéaire multiple ont encore souvent les faveurs des cliniciens, voire des laboratoires de l'industrie pharmaceutique. Dans la perspective du STP de l'AMP, cette méthode d'estimation de l'AUC ne semble pas constituer une méthode de choix. En revanche, elle peut être employée en complément d'une autre méthode à titre de contrôle.

## **IV.2. Méthode bayésienne**

L'objectif de cette étude était de développer des estimateurs bayésiens pour prédire les AUC d'AMP chez des patients transplantés rénaux.

### **IV.2.1. Principe de l'estimation bayésienne**

La statistique bayésienne s'appuie sur le théorème de Bayes ou probabilité conjointe de réalisation de deux événements, qui s'exprime par le produit de la probabilité de l'un des événements par la probabilité conditionnelle de l'autre si le premier est réalisé. Elle calcule et maximalise une densité de probabilité *a posteriori* d'obtenir des valeurs de paramètres pour des données de concentrations observées.

La méthode bayésienne conjugue une information de groupe (information *a priori* provenant des données de la population) et des informations individuelles (données de concentration) apportées par l'expérience. Elle suppose :

- que la variabilité dans la population soit décrite. Pour chaque valeur de paramètre PK, il doit être possible de déterminer sa plausibilité, c'est-à-dire sa densité de probabilité *a priori* d'occurrence dans la population ;
- que pour une certaine information individuelle disponible (valeur de concentration), il soit possible de chiffrer sa densité de probabilité si les paramètres cinétiques ont telle ou telle valeur (Mallet, Informatique et Santé, 1989).

L'estimation bayésienne est donc une méthode statistique basée sur l'expérience acquise dans une population. Il s'agit d'une approche adaptative qui permet de déterminer les paramètres PK et les meilleures doses d'un médicament à administrer à un patient sans avoir besoin toutefois d'un nombre élevé de concentrations. Le processus adapte son raisonnement en fonction des valeurs obtenues et des valeurs connues de la population dite de "référence", représentative de l'ensemble des individus similaires, et il ajuste ainsi les paramètres PK d'un patient de façon à obtenir des concentrations sanguines estimées les plus proches possible des concentrations mesurées.

#### IV.2.2. Mise au point d'estimateurs bayésiens : approche en deux étapes

##### IV.2.2.1. Principe de l'approche en deux étapes

Pour une population donnée dans laquelle des cinétiques "riches" ont pu être obtenues chez chaque individu, cette approche permet de déterminer la distribution statistique des paramètres PK nécessaire au développement d'un estimateur bayésien.

Dans la 1<sup>ère</sup> étape, chaque sujet est considéré indépendamment et les paramètres PK individuels sont calculés à partir des données de concentration obtenues, par RNL, au moyen d'un modèle PK approprié.

La 2<sup>ème</sup> étape consiste à constituer une population de référence en regroupant les paramètres PK estimés individuellement chez tous les sujets de la population de départ. La distribution statistique des paramètres individuels (moyenne et matrice de variance/covariance) permet de définir les valeurs estimées dans la population étudiée.

Cette méthode est facile à mettre en œuvre mais elle nécessite un nombre élevé de points par sujet pour bien définir les profils PK et déterminer les paramètres individuels.

IV.2.2.2. Mise au point d'estimateurs bayesiens pour la détermination de l'exposition à l'AMP chez des patients transplantés rénaux, à différentes périodes post-greffe.

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans Ther Drug Monit et acceptée sous réserve de modifications mineures : *Bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different post-grafting periods.*

## Bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different post-grafting periods.

Aurélie Prémaud<sup>1</sup>, Yannick Le Meur<sup>2</sup>, Jean Debord<sup>1</sup>, Jean-Christophe Szelag<sup>2</sup>, Annick Rousseau<sup>1,3</sup>, Guillaume Hoizey<sup>4</sup>, Olivier Toupance<sup>5</sup>, Pierre Marquet<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmacology-Toxicology, University Hospital, Limoges, France; <sup>2</sup>Department of Nephrology and Hemodialysis, University Hospital, Limoges, France; <sup>3</sup>Laboratory of Biophysics, Faculty of Pharmacy, Limoges, France; <sup>4</sup>Department of Pharmacology-Toxicology, University Hospital, Reims, France; <sup>5</sup>Department of Nephrology and Hemodialysis, University Hospital, Reims, France.

### ABSTRACT

The aim of this study was to develop maximum *a posteriori* probability (MAP) Bayesian estimators of mycophenolic acid (MPA) pharmacokinetics (PK), able to accurately estimate MPA interdose AUC in renal transplant patients, using a limited number of blood samples.

The individual MPA plasma concentration-time profiles of 44 adult kidney transplant recipients were retrospectively studied : in from 24 *de novo* transplant patients, two profiles were obtained on day 7 and day 30 after transplantation and in 20 stable transplant patients one profile was obtained in the stable period (>3 months). MPA was assayed by liquid chromatography-mass spectrometry. Concentration data were fitted using previously designed PK models, including one or two Gamma distributions to describe the absorption rate. MAP-Bayesian estimation were performed using an in-house program.

For each post-transplantation period, the limited sampling strategies (LSS) providing either the best determination coefficient or the lowest bias for AUC estimates with respect to trapezoidal AUCs were selected, and compared with respect to the percentage of “clinically acceptable” AUC estimates (i.e. within -20% to +20% of the true value) they yielded. A common LSS (blood samples collected at T20min, T1h and T3h post-dosing) convenient for all three periods was also selected and validated: bias (RMSE%) values were -5.7% (20.5%), -8.2% (14.4%) and +0.4% (12.0%) on D7, D30 and for >M3 with respect to the reference values obtained using the trapezoidal rule, respectively.

For the first time, MAP-Bayesian estimators of MPA systemic exposure at different post-transplantation periods (early as well as later periods) could be designed. They have since been used for MPA dose adaptation in concentration-controlled studies, as well as for MPA therapeutic drug monitoring in clinical practice.

#### IV.2.2.3. Evaluation des estimateurs bayesiens dans un groupe indépendant de patients

Les estimateurs bayesiens développés pour la prédiction des  $AUC_{0-12}$  d'AMP à partir de 3 valeurs de concentration obtenues à 20min-1h et 3h chez des patients greffés rénaux sous CsA ont été appliqués pour l'estimation de l'exposition à l'AMP chez les 5 patients du groupe indépendant.

#### IV.2.2.4. Estimation des $AUC_{0-12}$ par méthode bayésienne

L'exposition à l'AMP a été estimée chez les 5 patients du groupe indépendant pour les 4 périodes post-greffe (J15, M1, M2 et M3). Les trois estimateurs développés précédemment (IV.2.2.) concernaient des données PK obtenues 7 jours, 30 jours et plus de 3 mois après la greffe. Les  $AUC_{0-12}$  des 5 patients à J15 ont été calculées au moyen de l'estimateur élaboré à J7, celles à M1 avec l'estimateur élaboré à J30, celles à M3 avec l'estimateur élaboré à >M3. Les  $AUC_{0-12}$  obtenues à M2 ont été calculées au moyen des estimateurs élaborés à J30 et >M3.

La performance des estimateurs bayesiens a été évaluée en comparant les  $AUC_{0-12}$  prédites par le modèle avec les  $AUC_{0-12}$  de référence (AUC calculées avec la méthode des trapèzes). L'exactitude et la précision de l'estimation étaient données par les valeurs de biais et de RMSE. Les comparaisons des AUC par paire ont été effectuées par le test de Wilcoxon (Statview).

#### IV.2.2.5. Résultats

A J15 les  $AUC_{0-12}$  étaient globalement sous-estimées par la méthode bayésienne et le biais moyen était significatif (tableau 33). A M1 les AUC étaient correctement estimées à l'exception d'une pour laquelle le biais était supérieur à 20%. L'estimateur bayésien développé chez les patients stables (>M3) semblait mieux convenir pour prédire les AUC obtenues à M2 car une seule AUC (contre 4 avec l'estimateur élaboré à J30) était estimée avec un biais supérieur à 20%. Il est à noter que pour ce patient, la courbe des concentrations en fonction du temps reconstituée par méthode bayésienne était très mal ajustée aux données expérimentales (concentrations à 20min, 1h et 3h) et suggérait une mauvaise estimation de l'AUC. A M3, deux AUC étaient mal estimées par méthode bayésienne. Là encore, les courbes calculées ne passaient pas par les points expérimentaux. Ces deux cinétiques étaient caractérisées par un deuxième pic de concentration d'intensité assez importante et l'estimateur bayésien utilisant un modèle PK à une simple absorption n'était pas adapté.

Un modèle incluant une seule absorption Gamma avait été choisi précédemment pour modéliser les cinétiques obtenues après 3 mois de greffe, cependant ces résultats laissaient envisager l'intérêt d'utiliser un modèle avec double absorption Gamma pour cette

période. Un estimateur bayésien a donc été développé à partir des données stables (>M3) et utilisant un modèle PK avec double absorption et a été testé pour prédire les AUC chez les patients à M2 et M3 (tableau 32). A M2 cet estimateur donnait de meilleurs résultats que l'estimateur J30 (modèle avec double absorption) mais le pourcentage d'AUC mal estimées restait supérieur à celui obtenu avec l'estimateur >M3 (modèle avec simple absorption). A M3 l'estimateur utilisant un modèle avec double absorption tendait à sous estimer les AUC mais une seule AUC était estimée avec un biais inférieur à -20%. Du fait du faible nombre de profils disponibles pour chaque période, il semble difficile de conclure. Il serait intéressant de tester l'ensemble de ces estimateurs sur un plus grand nombre de profils afin de déterminer quel estimateur est le plus adapté pour prédire les AUC obtenues à partir de 1 mois post-transplantation.

**Tableau 33** : Comparaison entre les AUC<sub>0-12</sub> trapèzes et les AUC<sub>0-12</sub> estimées par méthode bayésienne à partir de trois prélèvements sanguins réalisés à 20min, 1h et 3h.

		Biais (%)	Intervalle	RMSE (%)	Nombre d'AUC mal estimées biais ><20%
<b>J15</b> (n=5)	Estimateur J7 (modèle double absorption)	-13,4*	-24,54 ; +4,96	15,3	1 (20%)
<b>M1</b> (n=5)	Estimateur J30 (modèle double absorption)	+4,1	-0,03 ; +35,86	18	1 (20%)
<b>M2</b> (n=5)	Estimateur J30 (modèle double absorption)	-10,2	-32,32; +7,72	23,2	4 (80%)
	Estimateur >M3 (modèle simple absorption)	+15,5	+6,42; +89,93	41,4	1 (20%)
	Estimateur >M3 (modèle double absorption)	-11,5	-32,34 ; 15,97	21,9	2 (40%)
<b>M3</b> (n=4)	Estimateur >M3 (modèle simple absorption)	+12,7	+1,40; +39,30	25,6	2 (50%)
	Estimateur >M3 (modèle double absorption)	-16,0	-24,88 ; -10,97	16,8	1 (25%)

#### IV.2.3. Discussion sur l'estimation par méthode bayésienne

Des estimateurs bayésiens ont été développés pour estimer, à partir de 3 concentrations plasmatiques mesurées 20min, 1h et 3h après la prise de MMF, l'exposition à l'AMP chez des patients transplantés rénaux sous CsA, à différentes périodes post-greffe. Globalement, ces estimateurs prédisaient de façon satisfaisante les valeurs d'AUC d'AMP mais leurs performances étaient limitées face à l'allure parfois atypique des cinétiques.

Cette méthode d'estimation présente l'avantage d'une plus grande souplesse dans le respect des horaires de prélèvement comparé à la méthode par régression linéaire multiple, ce qui est plus compatible avec la pratique clinique. Cette méthode fournit une valeur de l'exposition au médicament mais elle permet également d'estimer les paramètres PK et de reconstituer les courbes des concentrations en fonction du temps. L'ajustement de la courbe calculée aux points expérimentaux est un bon indice préjugeant de la pertinence de l'estimation.



Même si elle est un peu plus complexe à mettre en œuvre, l'estimation bayésienne semble être plus adaptée que la régression linéaire multiple pour le STP de l'AMP et plus sûre, pour le clinicien et pour le patient. En revanche, ces deux méthodes peuvent être utilisées de façon complémentaire pour limiter le risque d'erreur dans le rendu des résultats.

# CONCLUSION

Au cours de cette étude une méthode spécifique et sensible utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été mise au point pour la mesure des concentrations plasmatiques d'AMP et d'AMPG (Prémaud et al., Ther Drug Monit). La comparaison de cette méthode avec la méthode immunoenzymatique EMIT pour la mesure des concentrations d'AMP chez des patients transplantés rénaux traités par MMF a confirmé une surestimation notable de l'EMIT dans cette population. Cette surestimation était variable en fonction du délai post-greffe considéré et de l'immunosuppresseur associé (CsA ou sirolimus) et conduisait à d'importantes différences entre les valeurs d'exposition globale (-15,4 à 276,6%) au médicament selon la méthode utilisée. Dans le cas d'une application en routine il paraît indispensable, soit de disposer d'une méthode permettant de doser spécifiquement les concentrations d'AMP afin de mesurer l'exposition réelle au médicament, déterminante pour la réussite du traitement, soit de disposer de valeurs cibles adaptées à chaque méthode de dosage. Or, la variabilité de la surestimation de l'EMIT en fonction de la période post-greffe, de l'immunosuppresseur associé et, d'après la synthèse des autres études publiées, de l'organe transplanté et de l'âge (enfants/adultes) nous semble rendre matériellement impossible cette deuxième solution. La méthode EMIT nous paraît peu adaptée au suivi thérapeutique pharmacologique du MMF par voie orale, sauf cas particuliers.

L'étude de la PK de l'AMP a confirmé l'existence d'une importante variabilité intra- et inter-individuelle des indices d'exposition à l'AMP et à son métabolite, l'AMPG, pour des doses de MMF équivalentes. De plus, ces travaux ont montré une grande diversité des profils de concentration obtenus après administration orale de MMF, notamment au cours de la période précoce suivant la greffe. Or, cette période constitue une phase critique pour l'efficacité du traitement immunosuppresseur ce qui justifie de lui porter un intérêt particulier.

Des modèles PK capables de décrire des profils PK classiques ou complexes, avec un ou deux pics de concentrations (fréquemment observé), des délais et des intensités d'absorption variables ont ainsi été développés. Ces modèles combinaient un ou deux compartiment(s) avec une phase d'absorption décrite par une ou deux distribution(s) Gamma. Ils ont permis d'estimer les paramètres PK individuels de patients transplantés rénaux traités par du MMF associé à de la CsA ou du sirolimus.

Deux principales approches ont été employées pour étudier la PK de l'AMP. La première approche, méthode en deux étapes, a permis de mettre au point, sur la base de modèles PK décrivant la phase d'absorption selon une ou deux distribution(s) Gamma, des estimateurs bayésiens permettant de prédire les paramètres PK individuels au moyen de

trois échantillons sanguins prélevés 20 min, 1 et 3h après la prise de MMF chez des patients sous CsA. Ces estimateurs ont permis la mise en place d'une étude prospective, randomisée multicentrique nationale (APOMYGRE) visant à démontrer l'intérêt du STP de l'AMP. Cette méthode est la plus simple à mettre en œuvre mais son application nécessite que l'on dispose d'un nombre suffisant de points par sujet pour déterminer les paramètres individuels et elle est essentiellement destinée à estimer des paramètres au sein de populations homogènes. Les profils de concentration de MPA des patients sous sirolimus ayant été obtenus tardivement, nous n'avons pas encore pu développer des estimateurs bayésiens pour cette population, mais cela sera réalisé rapidement.

La seconde approche, en une étape, s'appuyant sur des modèles non-linéaires à effets mixtes, a permis de développer un modèle de population incluant des covariables explicatives de la variabilité des paramètres PK de l'AMP à partir de données de concentration issues de patients greffés rénaux précoces et stables traités par MMF et CsA. Ce modèle de population incluait un modèle structural original, adapté à la PK de l'AMP puisqu'il permettait de décrire des profils PK présentant un ou deux pics de concentration. Cette analyse de PK de population a mis en évidence une influence significative de la période post-greffe sur l'absorption, du poids sur la clairance apparente et du rapport métabolique (AMPG/AMP) sur le volume apparent de distribution. Cette méthode en une étape est très puissante puisqu'elle permet de quantifier les variabilités inter- et intra-individuelles et de déterminer l'influence de covariables sur la PK du médicament étudié. De plus, elle peut permettre d'étudier de vastes populations avec peu de points par patients, ce qui devrait faciliter l'extension de notre base de données et des estimateurs bayésiens à d'autres types de transplantation (hépatique, cardiaque, pulmonaire, etc.) et d'autres associations médicamenteuses (tacrolimus, sirolimus, etc.). En revanche, la modélisation en une étape est plus complexe que la méthode en deux étapes et nécessite de disposer, pour chaque patient, de toutes les covariables dont on veut étudier l'influence.

La méthode en deux étapes a permis la mise au point d'estimateurs bayésiens performants pour l'estimation des paramètres PK de l'AMP chez des patients greffés rénaux sous CsA, estimateurs qui peuvent être (et sont déjà dans certains centres, dont le CHU de Limoges) mis à profit en thérapeutique pour l'adaptation de posologie et l'optimisation du traitement. La construction de ces estimateurs requiert de disposer d'un modèle PK pertinent. De nouvelles études sont à entreprendre afin d'élargir le domaine d'application de ces outils à d'autres types de patients (greffés cardiaques, hépatiques) et à d'autres traitements associés (sirolimus, tacrolimus). A noter que deux études pharmacocinétiques multicentriques dont le CHU de Limoges est promoteur vont permettre d'alimenter cette étude de population dans les prochains mois :

- l'étude STIMMUGREP, concernant la pharmacocinétique des immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, mycophénolate, sirolimus, everolimus) en greffe pulmonaire ;
- l'étude PCCP, concernant la pharmacocinétique du mycophénolate et du tacrolimus associés chez les greffés rénaux.

Le modèle de population développé a permis d'expliquer une part de la variabilité PK de l'AMP mais de nombreuses covariables restent à explorer, notamment sur le versant pharmacogénétique qui présente un intérêt certain pour la description du métabolisme de l'AMP. Le génotypage des enzymes responsables du métabolisme de l'AMP (UGT) et des protéines de transport (P-gp, MRP2) est actuellement développé au sein de l'équipe DEXO, à Limoges et devrait nous permettre d'évaluer l'impact des facteurs génétiques sur le métabolisme du médicament et la variabilité du rapport métabolique.

Même si, actuellement il n'existe pas (encore ?) d'arguments pour recommander le STP systématique de l'AMP, celui-ci peut s'avérer utile dans certaines circonstances particulières et des efforts doivent encore être faits pour décrire et expliquer au mieux le comportement PK de ce médicament.

## BIBLIOGRAPHIE

Le dictionnaire Vidal® 2004. Paris : Editions du Vidal 2004.

Cellcept®. Une nouvelle dimension de l'immunosuppression. Laboratoire Roche, 1996.

Abramowicz D, Wissing KM, Broeders N. Nephrotoxicity of calcineurin inhibitors: new therapeutic approaches. *Transplant Proc* 2000; 32 (Suppl 1A), 3S-5S.

Ajayi AA. Estimation of creatinine clearance from serum creatinine: utility of the cockroft and gault equation in Nigerian patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40:429-31.

Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug. *Clin Transplantation* 1993; 7: 96-112.

Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85-118.

Armstrong VW, Schwabe H, Scmuck B, Scholz C, Wiese C, Bonsack S, Oellerich M. The acylglucuronide of mycophenolic acid forms a specific covalent adduct with inosine monophosphate dehydrogénase 2 [Abstract]. 8<sup>th</sup> World Congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Brisbane, Australia, August 2004. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31 (S1): A99.

Acheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CMJ, Duffull SB, Mudge DW, Pillans PI, Johnson DW, Tett SE. Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther Drug Monit* 2004; 26(3): 284-6.

Acheson B, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Pillans PI, Tett SE. Quantification of free mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma by liquid-chromatography using mass spectrometric and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 799(1): 157-63.

Beal JL, Jones CE, Taylor PJ, et al. Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit* 1998; 20 : 685-90.

Boekmann AJ, Sheiner LB, Beal SL. NONMEM User's guide, Part V: Introductory guide. Technical Report of the Division of Clinical Pharmacology, University of California, San Fransisco, 1992.

Brunet M, Martorell J, Oppenheimer F, Vilardel J, Millan O, Carrillo M, Rojo I, Corbella J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transplant Int* 2000; 13:S301-5.

Büchler M, Beneton M, Le Meur Y, Westeel PF, Heng AE, Idier I, Lebranchu Y, Paintaud G. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in renal graft recipients treated with sirolimus [Abstract]. *Am J Transplant* 2004; 4(S8): 254.

Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36(4): 315-324.

Bullingham RES, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443) : a short review. *Transplant Proc* 1996; 28(2): 925-9.

Bullingham RES, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34(6): 429-55.

Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993; 268(36): 27286-90.

Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Gotti E, Remuzzi G. Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int* 2002; 62: 1060-67.

Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver : efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004 ; 21: 25-51.

Cox VC, Ensom MHH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 137-57.

Debord J, Risco E, Harel M, Le Meur Y, Büchler M, Lachâtre G, Le Guellec C, Marquet P. Application of a gamma model of absorption to oral cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(5): 375-82.

DeNofrio D, Loh E, Kao A, Korecka M, Pickering FW, Craig KA, Shaw LM. Mycophenolic acid concentrations are associated with cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(11): 1071-6.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345: 1321-5.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 1999; 68 (3): 391-6.

Filler G, Zimmering M, Mai I. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil are influenced by concomitant immunosuppression. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 100-4.

Filler G, Mai I. Limited sampling strategy for mycophenolic acid area under the curve. *Ther Drug Monit* 2000; 22(2):169-73.

Filler G, Lepage N, Delisle B, Mai I. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid area under the concentration-time curve in pediatric kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 514-9.

Funaki T. Enterohepatic circulation model for population pharmacokinetic analysis. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1143-8.

Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51(2): 278-98.

van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, Hené RJ, Verpooten GA, Navarro MT, Hale MD, Nicholls AJ. A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; 68(2): 261-6.

van Gelder T, Klupp J, Barten M, Christians U, Morris RE. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 119-128.

van Gelder T, Klupp J, Sawamoto T, Christians U, Morris RE. ATP-binding cassette transporters and calcineurin inhibitors: potential clinical implications. *Transplant Proc* 2001; 33:2420-1.

Gimenez F, Foeillet E, Bourdon O, Weller S, Garret C, Bidault R, Singlas E. Evaluation of pharmacokinetic interactions after oral administration of mycophenolate mofetil and valaciclovir or aciclovir to healthy subjects. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(10): 685-92.

Gomeni R. Visual-NM user's manual. Research Development Population Pharmacokinetics. Montpellier France, 1998.

Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RES, Hené R, Hoitsma A, Squifflet JP, Weimar W, Vanrenterghem Y, Van de Woude FJ, Verpooten GA. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1998, 64(6): 672-683.

Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker for the International mycophenolate mofetil renal transplant study groups. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Transplantation* 1997; 63(1): 39-47.

Hosotsubo H, Takahara S, Imamura R, Kyakuno M, Tanaka T, Yazawa K, Hanafusa T, Matsumita K, Nonomura N, Okuyama A, Sugimoto H. Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 669-74.

Hübner GI, Eismann R, Sziegoleit W. Relationship between mycophenolate mofetil side effects and mycophenolic acid plasma trough levels in renal transplant patients [Abstract]. *Arzneimittelforschung* 2000 ; 50(10) : 936-40.

Iliadis A. L'adaptation de posologie par ordinateur en pharmacocinétique clinique. *Informatique et Santé* 1989 (2) : 142-53.

Jacqz-Aigrain E, Shaghaghi EK, Baudouin V, Popon M, Zhang D, Maisin A, Loirat C. Pharmacokinetics and tolerance of mycophenolate mofetil in renal transplant children. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 95-9.

Jain A, Kashyap R, Kramer D, Dodson F, Hamad I, Starzl TE, Fung JJ. Prospective randomised trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil: complete report on 350 primary adult liver transplantations. *Transplant Proc* 2001; 33: 1342-4.

Jain A, Venkataramanan R, Hamad IS, Zuckerman S, Zhang S, Lever J, Warty VS, Fung JJ. Pharmacokinetics of mycophenolic acid after mycophenolate mofetil administration in liver transplant patients treated with tacrolimus. *J Clin Pharmacol* 2001 ; 41(3) : 268-76.

Johnson HJ, Swan SK, Heim-Duthoy KL, Nicholls AJ, Tsina I, Tarnowski T. The pharmacokinetics of a single oral dose of mycophenolate mofetil in patients with varying degrees of renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 512-8.

Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ, Jones CE, Allen J, Franzen K, Falk MC, Nicol D. The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 492-500.

Kaplan B, Gruber SA, Nallamathou R, Katz SM, Shaw LM. Decreased protein binding of mycophenolic acid associated with leukopenia in a pancreas transplant recipient with renal failure. *Transplantation* 1998; 65(8): 1127-9.

Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Friedman G, Mulgaonkar S, Gruber S, Korecka M, Brayman KL, Shaw LM. The effect of renal insufficiency on mycophenolic acid protein binding. *J Clin Pharmacol* 1999; 39(7): 715-20.

Kiberd BA, Lawen J, Fraser AD, Keough-Ryan T, Belitsky P. Early adequate mycophenolic acid exposure is associated with less rejection in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:1079-83.

Klupp J, Glanemann M, Bechstein WO, Platz KP, Langrehr JM, Keck H, Settmacher U, Radtke C, Neuhaus R, Neuhaus P. Mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus versus neoral after liver transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 113-4.

Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T. Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309(3): 1029-35.



Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wrammer L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Morales JM, Grinyo JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, Vialtel P. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 69(7): 1252-60.

Krumme B, Wollenberg K, Kirste G, Schollmeyer. Drug monitoring of mycophenolic acid in the early period after renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 1773-4.

Kuypers DRJ, Vanrenterghem Y, Squifflet JP, Mourad M, Abramowicz D, Oellerich M, Armstrong V, Shipkova M, Daems J. Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 609-22.

Kuypers DRJ, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic in relation to combined long-term pharmacokinetics in *de novo* renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(5): 434-7.

Le Guellec C, Büchler M, Giraudeau B, Le Meur Y, Gakoué JE, Lebranchu Y, Marquet P, Paintaud G. Simultaneous estimation of cyclosporin and mycophenolic acid areas under the curve in stable renal transplant patients using a limited sampling strategy. *Eur J Clin Pharmacol* 2002 ; 57 : 805-11.

Le Guellec C, Bourgoin H, Büchler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P, Paintaud G. Population pharmacokinetics and bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2004 ; 43(4) : 253-66.

Mallet A. Intérêt de la pharmacocinétique de population pour l'aide à la posologie des médicaments. *Informatique et Santé* 1989 (2) : 126-41.

Mandla R, Line PD, Midtvedt K, Bergan S. Automated determination of free mycophenolic acid and its glucuronide in plasma from renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 407-14.

Marquet P. Mycophénolate mofétil et mycophénolate sodique: deux médicaments ou deux formes galéniques? *La Lettre du Pharmacologue* 2004 ; 18(2) : 45-9.

Marquet P. Proposition for a new definition of therapeutic drug monitoring. Communication personnelle, 2003.

Mathew TH. A blinded, long-term, randomised multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation* 1998; 65(11): 1450-4.

Mc Millan JM, Shaddock JG, Casciano DA, Arlotto MP, Leakey JE. Differential stability of drug-metabolizing enzyme activities in primary hepatocytes, cultured in absence or presence of dexamethasone. *Mutat Res* 1991; 249: 81-92.

Meier-Kriesche HU, Shaw LM, Korecka M, Kaplan B. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal insufficiency. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 27-30.

Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM, Gordon RD, Liebman MN, Morris JA, Kaplan B. Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *Am J Transplant* 2003; 3(1): 68-73.

Meiser BM, Pfeiffer M, Schmidt D, Reichenspurner H, Ueberfuhr P, Paulus D, von Scheidt W, Kreuzer E, Seidel D, Reichart B. Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(2): 143-9.

ter Meulen CG, Wetzels JFM, Hilbrands LB. The influence of mycophenolate mofetil on the incidence and severity of primary cytomegalovirus infections and disease after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 711-4.

Morissette P, Albert C, Busque S, St-Louis G, Vinet B. *In vivo* higher glucuronidation of mycophenolic acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 520-5.

Mourad M, Malaise J, Eddour DC, De Meyer M, König J, Schepers R, Squifflet JP, Wallemacq P. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2001; 47(1): 8-94.

Mudge DW, Atcheson BA, Taylor PJ, Pillans PI, Johnson DW. Severe toxicity associated with a markedly elevated mycophenolic acid free fraction in a renal transplant recipient. *Ther Drug Monit* 2004; 26(4): 453-5.

Nicholls AJ. Opportunities for therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for mycophenolic acid and suppression rejection. *Clin Biochem* 1998; 31(5): 329-33.

Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 1995; 41(7): 1011-7.

Oellerich M, Shipkova M, Schütz E, Wieland E, Weber L, Tönshoff B, Armstrong VW, and members of the German study group on mycophenolate mofetil therapy in pediatric renal transplant recipients. Pharmacokinetic and metabolic investigations of mycophenolic acid in pediatric patients after renal transplantation: implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 20-6.

Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik D, Magee JC, Wolfe RA, Agodoa LY, Kaplan B. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000; 69(11): 2405-9.

Palmer SM, Baz MA, Sanders L, Miralles AP, Lawrence CM, Rea JB, Zander DS, Edwards LJ, Staples ED, Tapson VF, David RD. Results of a randomized, prospective, multicenter

- trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in the prevention of acute allograft rejection. *Transplantation* 2001; 71(12): 1772-6.
- Parker G, Bullingham R, Kamm B, Hale M. Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment. *J Clin Pharmacol* 1996; 36(4): 332-44.
- Pawinski T, Hale M, Korecka M, Fitzsimmons WE, Shaw LM. Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult renal transplant patients treated with concomitant tacrolimus. *Clin Chem* 2002; 48(9): 1497-504.
- Pescovitz MD, Guasch A, Gaston R, Rajagopalan P, Tomlanovich S, Weinstein S, Bumgardner GL, Melton L, Ducray PS, Banken L, Hall J, Boutouyrie BX. Equivalent pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in African-American and Caucasian male and female stable renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3(12): 1581-6.
- Pescovitz M, Vincenti F, Hart M, Melton L, Whelchel J, Mulgaonkar S, McKay D, Leung M, Calleja E, Ghahramani P. Pharmacokinetics, safety and efficacy of mycophenolate mofetil in combination with sirolimus vs cyclosporine in renal transplant patients [Abstract]. *Am J Transplant* 2004; 4(S8): 251.
- Picard N, Cresteil T, Prémaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004 [sous presse].
- Pillans PI, Rigby RJ, Kubler P, Willis C, Salm P, Tett SE, Taylor PJ. A retrospective analysis of mycophenolic acid and cyclosporin concentrations with acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Biochem* 2001; 34: 77-81.
- Pirsch JD, Sollinger HW. Mycophenolate mofetil – Clinical and experimental experience. *Ther Drug Monit* 1996; 18(4): 357-361.
- Pou L, Brunet M, Cantarell C, Vidal E, Oppenheimer F, Monforte V, Vilardell J, Roman A, Martorell J, Capdevila L. Mycophenolic acid plasma concentrations: influence of comedication. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 35-8.
- Prémaud A, Debord J, Rousseau A, Hoizey G, Le Meur Y, Toupance O, Marquet P. A double-absorption pharmacokinetic model for mycophenolate in *de novo* renal transplant patients. 8<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland, September 2003. Abstract in *Ther Drug Monit* 2003(a); 25: 535.
- Prémaud A, Le Meur Y, Rousseau A, Marquet P. Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolate AUC : a large scale study. 8<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland, September 2003. Abstract in *Ther Drug Monit* 2003(b); 25: 504.
- Prémaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Lachâtre G, Marquet P. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2004 [sous presse].

- Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 681-684.
- Roth D, Colona J, Burke GW, Ciancio G, Esquenazi V, Miller J. Primary immunosuppression with tacrolimus and mycophenolate mofetil for renal allograft recipients. *Transplantation* 1998; 65(2): 248-52.
- Rousseau A, Marquet P. Modelling cyclosporin double-peak absorption profiles in the early post-transplantation period. *Clin Pharmacokinet* 2004 [sous presse].
- Sallustio BC, Westley IS, Morris RG, Evans AM. Hepatobiliary transport of mycophenolic acid and mycophenolate ether glucuronide: role of MRP2 [Abstract]. 8<sup>th</sup> World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Brisbane, Australia, August 2004. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31 (S1): A171.
- Sawamoto T, van Gelder T, Christians U, Okamura N, Jacobsen W, Benet L. Membrane transport of mycophenolate mofetil and its active metabolite, mycophenolic acid in MDCK and MDR1-MDCK cell monolayers [Abstract]. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:234-5.
- Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Niedmann PD, Weber L, Tönshoff B, Pethig K, Wahlers T, Braun F, Ringe B, Oellerich M. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid : comparison of HPLC and immunoassay reveals MPA metabolites. *Transplant Proc* 1998(a); 30: 1185-1187.
- Schütz E, Armstrong VW, Shipkova M, Weber L, Niedmann PD, Lammersdorf T, Wiesel M, Mandelbaum A, Zimmerhackl LB, Mehls O, Tönshoff, Oellerich M. Limited sampling strategy for the determination of mycophenolic acid area under the curve in pediatric kidney recipients. *Transplant Proc* 1998(b); 30: 1182-4.
- Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999; 45(3): 419-22.
- Shah VP, Yacobi A, Barr WH, Benet LZ, Breimer D, Dobrinska MR, Endrenyi L, Fairweather W, Gillespie W, Gonzalez MA, Hooper J, Jackson A, Lesko LJ, Midha KK, Noonan PK, Patnaik R, Williams RL. Evaluation of orally administered highly variable drugs and drug formulations. *Pharm Res* 1996; 13(11): 1590-4.
- Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Marsh JW, McCauley J, Johnston J, Randhawa P, Irish W, Gritsch HA, Naraghi R, Hakala TR, Fung JJ, Starzl TE. A prospective, randomized trial of tacrolimus/prednisone versus tacrolimus/prednisone/mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 67(3): 411-5.
- Shaw LM, Sollinger HW, Halloran P, Morris RE, Yatscoff RW, Ransom J, Tsina I, Keown P, Holt DW, Lieberman R, Jaklitsch A, Potter J. Mycophenolate mofetil : a report of a consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 690-9.

Shaw LM, Mick R, Nowak I, Brayman KL. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients with delayed graft function. *J Clin Pharmacol* 1998; 38(3): 268-75.

Shaw LM, Nicholls A, Hale M, Armstrong VW, Oellerich M, Yatscoff R, Morris RE, Holt DW, Venkataramanan R, Haley J, Halloran P, Ettenger R, Keown P, Morris RG. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid a consensus panel report. *Clin Biochem* 1998; 31(5): 317-22.

Shaw LM, Kaplan B, DeNofrio D, Korecka M, Brayman KL. Pharmacokinetics and concentration-control investigations of mycophenolic acid in adults after transplantation. *Ther Drug Monit* 2000; 22(1): 14-19.

Shaw LM, Korecka M, Aradhya S, Grossman R, Bayer L, Innes C, Cucciara A, Barker C, Najji A, Nicholls A, Brayman K. Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. *J Clin Pharmacol* 2000; 40(6): 624-33.

Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T. Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid : report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 305-15.

Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Schütz E, Wieland E, Shaw LM, Oellerich M. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide in human plasma using a simple high-performance liquid chromatography procedure. *Clin Chem* 1998; 44(7): 1481-8.

Shipkova M, Armstrong VW, Schneider T, Niedmann PD, Schütz E, Wieland E, Oellerich M. Stability of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma. *Clin Chem* 1999; 45(1): 127-9.

Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiß G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1075-82.

Shipkova M, Schütz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Oellerich M, Wieland E. Determination of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in human plasma by HPLC and Emit. *Clin Chem* 2000; 46(3): 365-72.

Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, Perner F, Fabrizi V, Holzer H, Wieland E, Oellerich M. Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 717-21.

Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, Niedmann PD, Wieland E, Haley J, Tönshoff B, Oellerich M. Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 390-9.

Shum B, Duffull SB, Taylor PJ, Tett SE. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 188-97.

Smak Gregoor PJH, Hesse CJ, van Gelder T, van der Mast BJ, Ijzermans JNM, van Besouw NM, Weimar W. Relation of mycophenolic acid trough levels and adverse events in kidney allograft recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 1192-3.

Smak Gregoor PJH, van Gelder T, Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM, Weimar W. Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 706-708.

Smak Gregoor PJH, de Sévaux RGL, Hené RJ, Hesse CJ, Hilbrands LB, Vos P, van Gelder T, Hoitsma AJ, Weimar W. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid trough levels in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68(10): 1603-6.

Smak Gregoor PJH, van Gelder T, van Besouw NM, van der Mast BJ, Hesse CJ, Ijzermans JNM, Weimar W. Mycophenolic acid trough levels after kidney transplantation in a cyclosporine-free protocol. *Transpl Int* 2000; 13(Suppl 1): S333-5.

Sollinger HW for the U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1995; 60(3): 225-232.

Squifflet JP, Backman L, Claesson K, Dietl KH, Ekberg H, Forsythe JL, Kunzendorf U, Heemann U, Land W, Morales JM, Muhlbacher F, Talbot D, Taube D, Tyden G, van Hooff J, Schleichner S, Vanrenterghem Y, European Tacrolimus-MMF Renal Study Group. Dose optimization of mycophenolate mofetil when administered with a low dose of tacrolimus in cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72(1): 63-9.

Stegall MD, Wachs ME, Everson G, Steinberg T, Bilir B, Shrestha R, Karrer F, Kam I. Prednisone withdrawal 14 days after liver transplantation with mycophenolate: a prospective trial of cyclosporine and tacrolimus. *Transplantation* 1997; 64(12): 1755-60.

Steimer JL, Mallet A, Golmard JL, Boisvieux JF. Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters : comparison with the nonlinear mixed-effect model. *Drug Metab Rev* 1984; 15(1-2): 265-92.

Streit F, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M. Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid. *Clin Chem* 2004; 50(1): 152-9.

Takahashi K, Ochiai T, Uchida K, Yasumura T, Ishibashi M, Suzuki S, Otsubo O, Isono K, Takagi H, Oka T, Okuyama A, Sonoda T, Amemiya H, Ota K. RS-61443 Investigation Committee-Japan. Pilot study of mycophenolate mofetil (RS-61443) in the prevention of acute rejection following renal transplantation in Japanese patients. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 1421-4.

- Taylor PJ, Willis C, Salm P, Tett SE, Pillans PI. Accurate estimation of mycophenolic acid AUC. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 301-2.
- The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61(7): 1029-37.
- Tredger JM, Brown NW, Adams J, Gonde CE, Dhawan A, Rela M, Heaton N. Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: toward a therapeutic range. *Liver Transpl* 2004; 10(4): 492-502.
- US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(2): 296-303.
- Vietri M, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Mycophenolic acid glucuronidation and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human liver and kidney. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56(9-10): 659-64.
- Vogl M, Weigel G, Seebacher G, et al. Evaluation of the EMIT mycophenolic acid assay from Dade Behring. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 638-43.
- Wajima T, Yano Y, Oguma T. A pharmacokinetic model for analysis of drug disposition profiles undergoing enterohepatic circulation. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 929-34.
- Weber LT, Shipkova M, Lamersdorf T, Niedmann PD, Wiesel M, Mandelbaum A, Zimmerhackl LB, Schütz E, Mehls O, Oellerich M, Armstrong VW, Tönshoff B. Pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) and determinants of MPA free fraction in pediatric and adult renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(8): 1511-20.
- Weber LT, Lamersdorf T, Shipkova M, Niedmann PD, Wiesel M, Zimmerhackl LB, Staskewitz A, Schütz E, Mehls O, Oellerich M, Armstrong VW, Tönshoff B. Area under the plasma concentration-time curve for total, but not for free, mycophenolic acid increases in the stable phase after renal transplantation: a longitudinal study in pediatric patients. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 498-506.
- Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schütz E, Mehls O, Zimmerhackl LB, Oellerich M, Tönshoff B. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the German study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 759-68.
- Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Comparison of the Emit immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in renal-transplant recipients on mycophenolate mofetil therapy. *Clin Chem* 2002; 48: 517-25.
- Willis C, Taylor JP, Salm P, Tett SE, Pillans PI. Evaluation of limited sampling strategies for estimation of 12-hour mycophenolic acid area under the plasma concentration-time curve in adult renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 549-54.

- Wolfe EJ, Mathur V, Tomlanovich S, Jung D, Wong R, Griffy K, Aweeka FT. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and intravenous ganciclovir alone and in combination in renal transplant recipients. *Pharmacotherapy* 1997; 17(3): 591-8.
- Wollenberg K, Krumme B, Pisarski P, Schollmeyer P, Kirste G. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in the early period after kidney transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 4090-1.
- Yamani MH, Starling RC, Goormastic M, van Lente F, Smedira N, McCarthy P, Young JB. The impact of routine mycophenolate mofetil drug monitoring on the treatment of cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69(11): 2326-30.
- Yeung S, Tong KL, Tsang WK, Chan HWH, Chan AYW. Pharmacokinetic study of mycophenolate mofetil in asian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2000; 32: 1753-4.
- Yeung S, Tong KL, Tsang WK, Tang HL, Fung KS, Chan HWH, Chan AYW, Chan L. Determination of mycophenolate area under the curve by limited sampling strategy. *Transplant Proc* 2001; 33: 1052-3.
- Yin OQP, Tomlinson B, Chow AHL, Chow MSS. A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(2): 179-92.
- Zhu BT, Suchar LA, Huang MT, Conney AH. Similarities and differences in the glucuronidation of oestradiol and estrone by UDP-glucuronosyltransferase in liver microsomes from male and female rats. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1195-202.
- Zucker K, Rosen A, Tsaroucha A, de Faria L, Roth D, Ciancio G, Esquenazi V, Burke G, Tzakis A, Miller J. Augmentation of mycophenolate mofetil pharmacokinetics in renal transplant patients receiving Prograf and Cellcept in combination therapy. *Transplant Proc* 1997; 29: 334-6.
- Zucker K, Tsaroucha A, Olson L, Esquenazi V, Tzakis A, Miller J. Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 35-43.