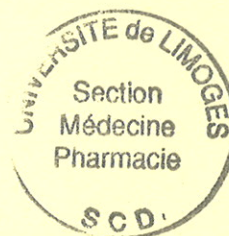


UNIVERSITÉ DE LIMOGES
FACULTÉ DE PHARMACIE



ANNÉE 2003

THÈSE N° 334 / 1

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 113778 1

**ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE DU SIROLIMUS, ASSOCIÉ
OU NON À LA CICLOSPORINE, CHEZ DES PATIENTS
TRANSPLANTÉS RÉNAUX**

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du

MÉMOIRE
du Diplôme d'Études Spécialisées de Pharmacie Industrielle et BioMédicale

présenté et soutenu publiquement
le 10 octobre 2003 à 17h00

par

Caroline MONCHAUD

Née le 22 août 1977 à Paris (XIV^{ème})

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Gérard LACHÂTRE, Praticien Hospitalier

Juges :

Monsieur le Professeur Yannick LE MEUR, Praticien Hospitalier

Monsieur le Professeur Pierre MARQUET, Praticien Hospitalier

Monsieur le Docteur Étienne CHATELUT, Maître de Conférences – Praticien Hospitalier

Madame Annick ROUSSEAU, Maître de Conférences

Monsieur Christophe SABOT, Docteur en Pharmacie, Praticien Hospitalier

À mes parents,

Pour votre Amour, votre présence à mes côtés, votre confiance et votre soutien tout au long de mes études.

À mon frère,

Pour ta bonne humeur, tes coups de colère parfois, tout ce qui fait la recette de la complicité et de la tendresse entre un frère et une sœur.

À mes amis,

Et en souvenir de tous les bons moments qui rendent la vie d'étudiant si agréable !

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier :

Madame le **Docteur Annick ROUSSEAU**, pour la patience et la bonne humeur dont elle sait faire preuve, pour ses conseils avisés, ses encouragements et le temps qu'elle m'a consacré pour l'accomplissement et la relecture de ce travail,

Monsieur le **Professeur Pierre MARQUET**, pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant de travailler sur ce sujet, pour sa disponibilité, la qualité de l'encadrement dont il sait faire preuve, et le soutien qu'il m'a apporté tout au long de l'année,

Monsieur le **Professeur Gérard LACHÂTRE**, qui m'a accueillie à bras ouverts au sein du Service de Pharmacologie et Toxicologie, et qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse,

Monsieur le **Professeur Etienne CHATELUT** et Monsieur le **Docteur Christophe SABOT**, qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse et, à cette occasion, de venir de Toulouse et Saint-Vaury respectivement.

Monsieur le **Professeur Yannick LE MEUR**, qui a participé à l'origine de ce projet et qui en a dirigé la partie clinique, et qui a également accepté de faire partie de jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier Jean-Louis Dupuy et Franck Giraudie, qui ont largement contribué aux dosages du sirolimus au sein du laboratoire.

Enfin, je souhaite remercier l'ensemble du personnel du Service de Pharmacologie et Toxicologie, pour leur accueil chaleureux et pour les deux années sympathiques et riches d'enseignements que j'ai passées parmi eux.

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

ASSESSEURS

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BOSGIRAUD Claudine

BOTINEAU Michel

BROSSARD Claude

BUXERAUD Jacques

CARDOT Philippe

CHULIA Albert

CHULIA Dominique

DELAGE Christiane

DREYFUSS Gilles

DUROUX Jean-Luc

GHESTEM Axel

HABRIOUX Gérard

LACHÂTRE Gérard

MOESCH Christian

LOUDART Nicole

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

BACTÉRIOLOGIE – VIROLOGIE – PARASITOLOGIE

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

PHARMACIE GALÉNIQUE

CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THÉRAPEUTIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE

PHARMACOGNOSIE

PHARMACIE GALÉNIQUE

CHIMIE GÉNÉRALE – CHIMIE MINÉRALE

PARASITOLOGIE

PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

TOXICOLOGIE

HYGIÈNE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

MAÎTRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THÉRAPEUTIQUE
DELABASSEE Sylvie	BACTÉRIOLOGIE - VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THÉRAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOFTI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHÉMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINÉRALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALÉNIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique	PHARMACIE GALÉNIQUE
----------------------	---------------------

PROFESSEUR CERTIFIÉ

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

ATER

POUGET Christelle	CHIMIE THÉRAPEUTIQUE
RIAHY DEHKORDI Homayoun	PHYSIOLOGIE – PARASITOLOGIE
TALLET Dominique	PHARMACOLOGIE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

7

PREMIÈRE PARTIE : LA GREFFE DE REIN ET LA LUTTE CONTRE LE REJET DE GREFFE

I	<u>UN PEU D'HISTOIRE...</u>	10
I.1	<u>DU CÔTÉ DES LÉGENDES</u>	10
I.2	<u>QUAND LA FICTION DEVIENT RÉALITÉ</u>	10
I.2.a	<u>L'expérimentation animale</u>	10
I.2.b	<u>De l'animal à l'homme</u>	11
II	<u>LE DON D'ORGANE</u>	12
II.1	<u>REINS DE CADAVRE</u>	12
II.2	<u>DONNEUR VIVANT APPARENTÉ</u>	12
II.3	<u>CROSSMATCH</u>	14
III	<u>LE REJET DE GREFFE</u>	15
III.1	<u>BASES IMMUNITAIRES DU REJET DE GREFFE</u>	16
III.1.a	<u>Antigènes des groupes sanguins</u>	16
III.1.b	<u>Antigènes du CMH</u>	16
III.1.c	<u>Antigènes mineurs d'histocompatibilité</u>	18
III.2	<u>MÉCANISMES IMMUNOLOGIQUES DU REJET DE GREFFE</u>	18
III.2.a	<u>Les cellules présentatrices de l'antigène</u>	19
III.2.b	<u>Les 2 phases immunologiques du rejet</u>	19
III.2.c	<u>Les 3 signaux de la réponse cellulaire T</u>	20
III.3	<u>LES DIFFÉRENTS TYPES DE REJET</u>	21
III.3.a	<u>Rejet hyperaigu</u>	21
III.3.b	<u>Rejet accéléré</u>	21
III.3.c	<u>Rejet aigu</u>	22
III.3.d	<u>Rejet chronique : « néphropathie chronique de l'allogreffe »</u>	22
IV	<u>LES MÉDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS</u>	24
III.1	<u>ANTICORPS ANTI-LYMPHOCYTES</u>	26
III.1.a	<u>Anticorps anti-lymphocytes T polyclonaux</u>	26
III.1.b	<u>Anticorps anti-lymphocytes T monoclonaux</u>	26
III.2	<u>CORTICOSTÉROÏDES</u>	28
III.3	<u>INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE</u>	31
III.3.a	<u>Ciclosporine (SANDIMMUN[®], NEORAL[®])</u>	32
III.3.b	<u>Tacrolimus ou FK506 (PROGRAF[®])</u>	33
III.4	<u>INHIBITEUR DE LA MTOR : SIROLIMUS (RAPAMUNE[®])</u>	33
III.5	<u>Antimétabolites</u>	35
III.5.a	<u>Azathioprine (IMUREL[®])</u>	35
III.5.b	<u>Mycophénolate mofétil (CELLCEPT[®])</u>	36

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE DU SIROLIMUS, ASSOCIÉ OU NON A LA CICLOSPORINE, CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX

I	<u>CONTEXTE DE L'ETUDE</u>	38
I.1	<u>PHARMACOCINÉTIQUE DU SIROLIMUS</u>	38
I.1.a	<u>Absorption</u>	39
I.1.b	<u>Distribution</u>	39
I.1.c	<u>Métabolisme</u>	39
I.1.d	<u>Élimination</u>	39
I.1.e	<u>Interactions médicamenteuses</u>	40
I.2	<u>EFFETS SECONDAIRES DU SIROLIMUS</u>	40
I.3	<u>POURQUOI LE SUIVI THÉRAPEUTIQUE ?</u>	41
II	<u>OBJECTIF DE L'ETUDE</u>	42
III	<u>POPULATIONS ET METHODE</u>	42
III.1	<u>Population 1 : « Population SIR-CsA » (association sirolimus – ciclosporine)</u>	42
III.2	<u>Population 2 : « Population SIR-MMF » (association sirolimus – mycophénolate)</u>	43
III.3	<u>Dosage du sirolimus</u>	45
III.4	<u>Etude pharmacocinétique</u>	46
III.5	<u>Analyse statistique</u>	50
IV	<u>RESULTATS</u>	50
IV.1	<u>Population 1 : « Population SIR-CsA »</u>	50
IV.2	<u>Population 2 : « Population SIR-MMF »</u>	62
V	<u>DISCUSSION</u>	67
	<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	70

INTRODUCTION

La transplantation rénale est la méthode de choix du traitement de l'insuffisance rénale terminale. Elle permet d'allonger la survie des patients, mais aussi leur qualité de vie, en supprimant les contraintes liées à l'épuration extra-rénale, en particulier la présence dans un centre de dialyse trois fois par semaine, le régime et la restriction hydrique. Elle permet en outre de restaurer les fonctions endocrines du rein et autorise les grossesses chez la femme. Le succès des transplantations dépend de la maîtrise des réactions de rejet. La lutte contre le rejet de greffe est basée sur l'administration de médicaments immunosuppresseurs. La ciclosporine, leur chef de file, a été introduite en transplantation dès la fin des années 1970. Le sirolimus est la dernière molécule à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en transplantation ; il a obtenu l'AMM européenne le 13 mars 2001.

L'utilisation raisonnée des immunosuppresseurs est basée sur le suivi thérapeutique pharmacologique (STP), afin d'optimiser l'exposition des patients au produit. En effet, ces médicaments sont caractérisés par une fenêtre thérapeutique étroite. Ainsi, l'optimisation de l'exposition des patients aux immunosuppresseurs a pour but de limiter les phénomènes de toxicité liés au surdosage, et d'éviter les réactions de rejet qui ont lieu lorsque les patients sont sous-exposés au médicament. Le STP est aujourd'hui largement utilisé en greffe rénale. Il est basé sur la mesure de concentrations, le plus souvent la concentration résiduelle (C_0), et, plus rarement, sur le calcul de l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC), qui représente le meilleur indice d'exposition pour la plupart des médicaments. Une bonne corrélation entre C_0 et AUC ($r^2 > 0,8$) permet d'envisager des adaptations de posologie sur la base du C_0 seul, sans avoir à réaliser de nombreux prélèvements pour le calcul de l'AUC. Ainsi, lorsqu'une bonne corrélation entre le taux résiduel et l'exposition au sirolimus a été démontrée,^[1] il est recommandé d'adapter les doses sur la base des taux résiduels.^[2] Néanmoins, cette corrélation ne garantit pas toujours une prescription parfaite du traitement, avec des risques résiduels de sous-exposition ou de surexposition au produit. Lorsque des signes cliniques de toxicité ou de rejet de la greffe apparaissent malgré une valeur de C_0 normale, il est recommandé de déterminer l'exposition globale du patient à la molécule par le calcul de l'AUC,^[3,4] ce qui est rendu plus facile par la réalisation d'études pharmacocinétiques préalables.

La première partie de ce travail présente les bases immunologiques des différents types de rejet de greffe. Puis sont envisagées les différentes approches pharmacologiques disponibles dans la prévention de ces phénomènes de rejet.

La seconde partie de ce travail présente une étude de la pharmacocinétique du sirolimus chez des patients transplantés rénaux.

PREMIÈRE PARTIE :
LA GREFFE DE REIN ET LA
LUTTE CONTRE LE REJET DE
GREFFE

I UN PEU D'HISTOIRE...^[5,6]

I.1 Du côté des légendes

A travers les récits d'Homère et Ovide, la mythologie décrit des êtres mi-hommes, mi-animaux ou mi-hommes, mi-végétaux. Ainsi, le Dieu égyptien Horus était décrit comme un homme à tête de faucon et la nymphe Daphné fût transformée en laurier pour échapper aux ardeurs d'Apollon.

En Chine ancienne, la légende raconte que le chirurgien Tsin Yue-Jen (407-310 avant Jésus-Christ) a réalisé une transplantation cardiaque entre deux soldats. Entre les années 136 et 208 de notre ère, Hua-To, un autre chirurgien chinois, aurait pratiqué des transplantations d'organes dans un but thérapeutique, sous analgésie obtenue grâce à du chanvre indien.

Au 3^{ème} siècle après Jésus-Christ, Saint-Côme et Saint-Damien furent désignés comme patrons des médecins et des chirurgiens après avoir greffé à un sacristain une jambe prélevée sur le cadavre d'un Maure.

La première réimplantation de tête décrite dans la littérature fut imaginée par François Rabelais en 1532, dans *Pantagruel* : c'était celle d'Epistémon, qui l'avait perdue au combat contre les géants commandés par Loup Garou. Rabelais fut un visionnaire puisque, dès le début du 20^{ème} siècle, Guthrie aux Etats-Unis (1908) et Demikhov en URSS (1950) greffèrent une deuxième tête à des chiens.

I.2 Quand la fiction devient réalité

I.2.a L'expérimentation animale

C'est au 18^{ème} siècle, grâce à des hommes comme Buffon, Spallanzani et le naturaliste Réaumur, que furent observées des similitudes entre les greffes animales et les greffes végétales, pratiquées depuis l'Antiquité. Les premières expérimentations animales furent réalisées par Trembley en 1744 sur des hydres d'eau douce, et par Bonnet sur des lombrics, à la même époque. Les premières greffes sur des animaux vertébrés furent décrites pour la première fois en 1749 par le naturaliste et physiologiste Duhamel du Monceau. A cette occasion il greffa avec des ergots prélevés sur de jeunes poulets, dans la crête du même ou d'un autre animal. Ainsi, le coq fut le premier modèle animal de la transplantation d'organes, utilisé en particulier par le père de la chirurgie britannique, John Hunter, en 1767, qui

confirma les expériences de Duhamel du Monceau, puis greffa des dents dans des crêtes de coq, avant d'implanter à un homme des dents prélevées sur un cadavre humain. Magendie, à la fin du 18^{ème} siècle, et Claude Bernard, au début du 19^{ème} siècle, insistèrent auprès de la communauté médicale de l'époque sur l'intérêt des greffes dans l'étude de la physiologie et en thérapeutique.

Le premier succès de greffe de peau, sur une brebis, fut publié en 1804 par Boronio. C'est un chirurgien genevois du Collège de France, Jacques Louis Reverdin, qui réitéra ce succès, chez l'homme, 65 ans plus tard. Dès cette époque, deux des facteurs favorisant la réussite de la greffe étaient connus : le degré de parenté entre le donneur et le receveur, d'une part, et, d'autre part, le jeune âge du donneur. Malgré tout, les échecs fréquents des greffes réalisées restaient inexpliqués ou mal expliqués. Le lien entre les mécanismes immunitaires qui régissent la destruction des micro-organismes (phagocytose, production d'anticorps) et la destruction d'un greffon provenant d'un organisme étranger commença à être mis en évidence par les travaux de Metchnikoff, à la fin du 19^{ème} siècle.

I.2.b De l'animal à l'homme

En France, la première greffe rénale humaine fût effectuée à Noël 1952 à l'hôpital Necker, par Louis Michon, Nicolas Economos et Jean Vaysse, chez un jeune charpentier âgé de 16 ans, Marius Renard, qui avait dû subir l'ablation de son rein unique, éclaté lors d'une chute. Le jeune homme fit malheureusement rapidement un rejet de greffe et la perte de son rein fut fatale. En 1954, la première transplantation rénale entre deux jumeaux homozygotes, dont l'un était atteint d'une glomérulonéphrite à un stade très avancé, fût réalisée par John Merrill et Joseph Murray et s'avéra un succès. A cette époque, existait déjà l'hypothèse selon laquelle, chez l'homme comme chez l'animal, l'apparement génétique pouvait favoriser la tolérance du greffon. Ainsi se dessinait l'idée que, dans de tels cas, une tolérance prolongée serait obtenue en déprimant la réaction immunologique du receveur. Cinquante ans après le succès de la première greffe de rein, la transplantation rénale est devenue le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale.

II LE DON D'ORGANE

L'alternative entre donneur vivant ou décédé varie selon les équipes, mais surtout les pays et les cultures. Les reins prélevés chez les sujets en état de mort cérébrale fournissent la majorité des transplantations effectuées dans le monde. Les reins prélevés chez des donneurs vivants sont utilisés dans 5 à 60 % des transplantations effectuées en fonction du pays. L'insuffisance du nombre de reins de cadavre par rapport au nombre de malades dialysés inscrits sur les listes d'attente explique la tendance actuelle à recourir plus volontiers à ce type de donneur. En effet, en France, 5227 patients insuffisants rénaux chroniques en phase terminale étaient inscrits sur liste d'attente au 31 décembre 2002, et seules 2255 transplantations rénales avaient été effectuées entre le 1^{er} et le 31 décembre 2002.^[7]

En France, le don d'organe est réglementé par les lois de bioéthique de juillet 1994 relatives au respect du corps humain, au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, qui sont mises en œuvre par l'Etablissement Français des Greffes. La loi repose sur la notion de consentement présumé : tout sujet qui, de son vivant, n'a pas fait connaître son refus de don d'organe, est donneur potentiel.^[8] En pratique, le prélèvement est réalisé après l'accord de la famille du donneur décédé.

II.1 Reins de cadavre

Les reins prélevés chez les sujets en état de mort cérébrale représentent l'essentiel des transplantations réalisées. L'importance du système HLA (Human Leucocyte Antigen – cf. *III.1.b Antigènes du CMH*) a été discutée pour les transplantations de reins de cadavres. Chez les patients transfusés ou non transfusés, les sujets les plus compatibles ont des résultats supérieurs à ceux notés chez les sujets les moins compatibles, en particulier chez ceux qui ont développé des anticorps.^[9]

II.2 Donneur vivant apparenté

Le greffe d'un rein prélevé chez un donneur vivant apparenté est une méthode recommandée lorsqu'elle est possible, notamment en raison de ses bons résultats pour le receveur. Cette démarche thérapeutique reste néanmoins un sujet très controversé, comme en témoignent les attitudes très différentes d'un pays à l'autre : alors que le pourcentage de ces greffes ne dépasse guère 5 % en France (108 des 2255 greffes de rein effectuées en 2002 provenaient de

donneurs vivants apparentés,^[7] il est de 26% aux Etats-Unis,^[10] 27 % au Royaume-Uni,^[11] 27 % au Danemark, 37 % en Suède et 40 % en Norvège,^[12] et atteint près de 56 % en Suisse.^[13]

En France, le prélèvement d'organe chez une personne vivante est réglementé par la loi de Bioéthique du 29 juillet 1994 : le prélèvement de rein sur personne vivante, qui en fait le don, ne peut être effectué que dans l'intérêt thérapeutique direct d'un receveur.^[14] Le receveur doit avoir la qualité de parent, enfant ou frère ou sœur du donneur, et, en cas d'urgence, le donneur peut être le conjoint.

La décision d'accepter ou non le don d'un rein à partir d'un membre de la famille implique un bilan médical strictement normal. Ainsi, outre le degré de parenté entre le donneur et le receveur, la loi de Bioéthique précise que le donneur, dûment informé, doit exprimer son consentement devant le Président du Tribunal de Grande Instance, et qu'il ne peut être une personne mineure (ou majeure faisant l'objet d'une mesure de protection légale). La pénurie de reins cadavériques pousse certains à demander un élargissement du lien de parenté aux membres plus éloignés de la famille (cousins par exemple), comme c'est déjà admis dans d'autres pays.

La transplantation rénale à partir d'un donneur vivant a l'avantage d'offrir de meilleurs résultats : la survie du greffon à 3 ans est de 90 % dans le cas de donneurs vivants apparentés, et de 85 % dans le cas de donneurs vivants non apparentés, contre 70 % pour les greffes à partir de reins de cadavre.^[15] Le bénéfice est surtout net s'il s'agit de sujets HLA identiques : la demi-vie du rein transplanté est de 39 ans pour les sujets HLA identiques, 17 ans pour les sujets partiellement identiques, contre 10 ans pour les greffes à partir de rein de cadavre.^[16] De plus, le délai d'attente pour le receveur peut être réduit au minimum, diminuant les risques du traitement par dialyse et permettant un meilleur état du receveur au moment de la greffe. Au total, le coût du traitement est diminué. Idéalement, la transplantation peut être programmée avant la période de dialyse.

Toutefois, le don d'organe expose la personne qui s'y prête à un certain nombre de risques. Ainsi, si quelques cas de mort peropératoire ont été rapportés aux premiers temps de cette chirurgie, ce risque paraît très faible aux mains d'équipes entraînées, estimée à 0,03 % aux Etats-Unis et au Canada.^[17] De plus, le risque de morbidité post-opératoire n'est pas négligeable,^[18] évalué autour de 10 % des cas (8 % chez 871 donneurs opérés de 1985 à 1995 à Minneapolis^[19]) : infections pariétales, hématomes, complications pulmonaires, phlébites,

douleurs résiduelles, sans oublier l'arrêt de travail qu'implique la néphrectomie. En revanche, la plupart des études réalisées chez des sujets ayant donné un rein, avec un recul de 20 à 30 ans, suggère qu'il existe un risque réduit d'atteinte du rein restant à moyen et long terme, du fait de l'hyperfiltration sur réduction néphronique : une microalbuminurie ou une protéinurie inférieure à 0,50 g/24 h est notée dans un tiers des cas ; la fonction rénale reste stable ; la baisse de la clairance de la créatinine, en moyenne de 20 %, est reliée à l'âge.^[20,21]

Le risque de voir survenir une hypertension artérielle chez le donneur n'est pas statistiquement plus élevé que dans une population contrôle de même âge. Au total, le risque d'insuffisance rénale chronique s'élève à 0,1 %. Ainsi, dans une étude récente suédoise^[22] la détérioration de la fonction rénale n'est pas plus rapide que celle reliée à l'âge ; l'hypertension artérielle est retrouvée chez 38 % des donneurs, pourcentage identique à celui de la prévalence liée à l'âge ; une protéinurie (> 1g/24 h) est notée chez 3 % des sujets. Ces modifications minimales ne remettent pas en cause l'appel aux donneurs vivants à condition que des critères stricts de normalité soient respectés, en particulier pour détecter d'éventuels problèmes génétiques.

II.3 Crossmatch^[23]

Le crossmatch est un examen essentiel et constitue l'étape finale, réalisée systématiquement avant toute transplantation rénale, dans le but d'identifier les greffons susceptibles d'encourir un rejet hyperaigu.^[24] Il permet de détecter, dans le sérum du receveur potentiel, la présence d'éventuels anticorps dirigés contre les antigènes du donneur. La détection de ces anticorps précise : d'une part, la spécificité des anticorps (auto-anticorps, anticorps anti-HLA de classe I, anti-T, ou de classe II, anti-B) ; d'autre part, la classe des immunoglobulines, IgG ou IgM (déterminées par le dithiothréitol qui dépolymérise les IgG) ; enfin, la date à laquelle ces anticorps sont détectés.

La technique de choix utilisée en routine pour la réalisation du crossmatch est le test de microlymphocytotoxicité, introduit au début des années 1960. La cytométrie de flux peut également être employée.^[25,26] Enfin, les anticorps anti-lymphocytes peuvent aussi être détectés par immunofluorescence, qui permet de mettre en évidence tous les anticorps, fixant ou non le complément. Cette technique a une meilleure sensibilité, mais elle est à l'origine de faux positifs. Elle doit donc être réservée aux patients à risques (receveurs présensibilisés).^[27] Les résultats sont exprimés soit en compatibilité (0 à 6 antigènes, correspondant aux 3 couples d'allèles A, B et DR, en commun), soit en incompatibilité ou *mismatches* (0 à 6 antigènes

présents chez le donneur et absents chez le receveur). Mais tous les 6 antigènes (*full house*) ne sont identifiés que pour environ 80 % des sujets.^[28]

La greffe est possible lorsque le crossmatch est négatif. En revanche, un crossmatch positif vis-à-vis des cellules T contre-indique la transplantation (Tableau 1), celle-ci exposant au risque de rejet hyperaigu.^[29,30]

Tableau 1. Interprétation des résultats du cross match et conduite à tenir

Crossmatch		Interprétation	Risque	Conduite à tenir
Cellules T	Cellules B			
Positif	Positif	Présence d'anticorps anti-HLA de classe I	Défaillance fonctionnelle précoce du transplant, voire rejet hyperaigu	Transplantation contre-indiquée ^[29]
Négatif	Positif	Présence d'anticorps anti-HLA de classe II	Diminution de la survie du greffon Augmentation du risque de rejet aigu	Transplantation possible ^[31]

Il existe peu d'études ayant caractérisé de manière fine la spécificité des anticorps cytotoxiques responsables d'un crossmatch positif. Une cytotoxicité positive sur les cellules B et T peut être due à des anticorps de classe IgM ne reconnaissant pas les molécules HLA, mais qui ne seraient pas délétères pour la survie du greffon.^[32]

III LE REJET DE GREFFE

En théorie, la réaction de rejet est d'autant plus faible que la compatibilité immunologique entre donneur et receveur est meilleure.^[9] Pour cela les transplantateurs s'efforcent de choisir le meilleur appariement immunologique. Très tôt, les médecins ont noté l'importance du respect de la compatibilité des groupes sanguins ABO en transplantation. La découverte par Dausset en 1954, puis la description du système HLA, qui constitue chez l'homme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), a conduit au typage tissulaire permettant d'identifier le meilleur couple donneur – receveur. La recherche des anticorps anti-HLA par la technique du crossmatch,^[24] qui permet de déterminer la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur, en recherchant dans le sérum du receveur la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes du donneur, a pratiquement fait disparaître les rejets hyperaigus. A côté du rejet hyperaigu, existent également le rejet dit « accéléré », le rejet aigu et, enfin, le rejet chronique.

III.1 Bases immunitaires du rejet de greffe

Le rejet de greffe met en jeu de nombreuses cellules effectrices, parmi lesquelles les lymphocytes T jouent un rôle central (Figure I).^[28]

On peut séparer les antigènes du greffon reconnus par l'organisme receveur en 3 groupes : les antigènes de groupe sanguin ABO, les antigènes du CMH, et les antigènes mineurs d'histocompatibilité.

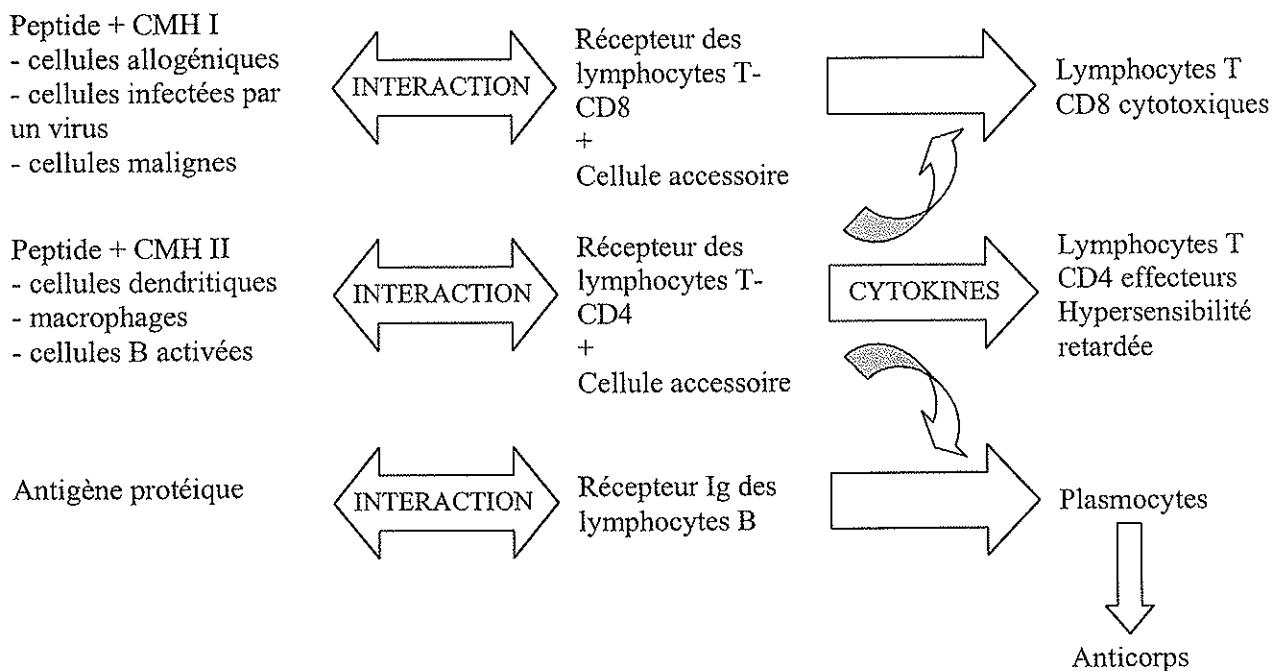
III.1.a Antigènes des groupes sanguins^[28]

La compatibilité des antigènes du groupe sanguin ABO est incontournable. Ces marqueurs sont absents de la plupart des types cellulaires, mais les antigènes A et B des globules rouges sont présents sur l'endothélium vasculaire rénal. Ils constituent la cible privilégiée des alloanticorps et, en cas d'incompatibilité, les anticorps naturels entraînent une agglutination des érythrocytes et un rejet hyperaigu avec vascularite intense. La transgression des règles de la transfusion sanguine entraîne un échec immédiat de la greffe. Une incompatibilité ABO n'est pas à l'origine d'une réponse cellulaire, mais induit une réponse humorale importante. L'antigène rhésus, quant à lui, n'intervient pas, car il n'est pas présent sur les cellules endothéliales du greffon.

III.1.b Antigènes du CMH^[33]

Autrefois appelées antigènes majeurs de transplantation, les molécules HLA sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules nucléées et codées par des gènes formant le CMH sur le bras court du chromosome 6.^[34] Elles jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire, en s'associant aux alloantigènes à la surface des cellules phagocytaires (Figure I), qui les présentent aux récepteurs des lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) et helper ($CD4^+$). Elles sont caractérisées par un polymorphisme très important, rendant très faible la probabilité que 2 individus non apparentés aient une complète identité en gènes du CMH.^[35]

Figure I. Schéma général de la réponse immunitaire spécifique.



[D'après Goodman & Gilman's. Bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9ème édition (édition française). Ed. McGraw-Hill. Chap. 52 : Immunomodulateurs – Médicaments immunosuppresseurs et immunomodulants.

Les antigènes du CMH sont regroupés en deux classes, dont la distribution tissulaire est différente.

Les antigènes de classe I, codés par 3 *loci* – A, B, C – sont présents à la surface de la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme. Au niveau rénal, ces antigènes sont absents de la surface des globules rouges, mais présents sur les cellules endothéliales, les tubes, le mésangium, et les cellules dendritiques.

Les antigènes DR, DQ, et DP représentent quant à eux les antigènes de classe II, et sont présents de manière constitutive sur les lymphocytes B et les cellules phagocytaires uniquement (monocytes, macrophages, cellules dendritiques). On les trouve également sur les lymphocytes T activés, à la surface desquels ils jouent un rôle déterminant dans la reconnaissance des alloantigènes. Au niveau du rein, les antigènes du CMH de classe II sont présents sur l'endothélium des capillaires inter-tubulaires et glomérulaires, le mésangium, et sur une partie des cellules tubulaires proximales. Leur expression est modulable par différents stimuli, en particulier par les cytokines, dont l'interféron γ (IFN γ).

En pratique, la compatibilité entre le donneur et le receveur est établie par l'étude des seuls antigènes A, B et DR. Chaque individu présente deux haplotypes définis ABDR.

Le premier stimulus de la réponse cellulaire est induit par l'incompatibilité entre les antigènes DR, d'où leur importance dans les réactions de rejet à court terme. La compatibilité entre les antigènes DR du donneur et du receveur répond à la règle du « tout ou rien » : elle est basée sur leur stricte identité. Les antigènes A et B sont, quant à eux, des indicateurs du pronostic à long terme. Leur effet s'additionnerait à celui des antigènes DR.^[36-38]

Le pronostic d'une greffe n'est pas conditionné par le système HLA seul. En effet, la possibilité de rejets aigus chez des sujets compatibles pour le système HLA suggère le rôle d'autres systèmes antigéniques, en particulier ceux portés par les cellules endothéliales et par les monocytes.^[39]

III.1.c Antigènes mineurs d'histocompatibilité

Outre les antigènes majeurs en transplantation représentés par le système ABO et par le système du CMH, il existe de nombreux antigènes mineurs d'histocompatibilité, responsables d'une réponse immunitaire faible et retardée.^[28,40]

III.2 Mécanismes immunologiques du rejet de greffe

La réaction immunologique de rejet est d'autant plus importante que la différence HLA entre donneur et receveur est grande.^[9]

Le mécanisme immunologique du rejet peut être décomposé en 2 phases principales : d'abord, la phase de sensibilisation, caractérisée par une prolifération et une différenciation des cellules T en réponse à l'alloantigène, présenté à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) ; puis, la phase effectrice consiste en la destruction du tissu cible. La réponse lymphocytaire peut être, quant à elle, décomposée en 3 signaux. Outre les effecteurs cellulaires, les anticorps sont également impliqués dans certaines réactions de rejet, en particulier dans les rejets chroniques.^[39,41]

III.2.a Les cellules présentatrices de l'antigène

Présentes dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, y compris dans les greffons rénaux, et dans le sang, les cellules dendritiques sont la clé de voûte de la stimulation de la réponse allogénique T.

On distingue 2 types de cellules dendritiques, dont la localisation dans l'organisme est différente. Les cellules lymphoïdes sont localisées dans la rate et les ganglions lymphatiques, alors que les cellules non lymphoïdes sont présentes dans la peau (cellules de Langerhans), les poumons, les reins, le cœur et l'intestin.

Dans les organes périphériques, les cellules dendritiques présentent un phénotype de cellules phagocytaires, avec une grande capacité à dégrader l'antigène, et un faible pouvoir de présentation. Elles y reconnaissent l'alloantigène et le transportent vers les organes lymphoïdes (en particulier dans les zones T-dépendantes de la rate), où elles perdent leur fonction phagocytaire et de dégradation, et deviennent de bonnes cellules présentatrices (CPA). Leur débit de migration augmente lors de traumatisme ou d'inflammation.

III.2.b Les 2 phases immunologiques du rejet^[28]

- Phase de sensibilisation

Le rejet de greffe débute par une sensibilisation périphérique des lymphocytes T du receveur, qui entrent en contact avec les alloantigènes *in situ* dans le greffon.

La migration des lymphocytes T sensibilisés *in situ* met en jeu une interaction de ces cellules avec les cellules endothéliales activées par l'intermédiaire de molécules d'adhésion (ICAM : intercellular adhesion molecules ; VCAM : vascular cell adhesion molecule), dont l'expression est modulée par les cytokines : interleukine 1 (Il1) et tumor necrosis factor (TNF), produits en particulier par les cellules endothéliales activées, interleukine 4 (Il4), IFN γ , produits par les cellules T activées.

- Phase effectrice

L'activation des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques met en jeu une reconnaissance directe des antigènes CMH de classe I allogéniques ou des antigènes étrangers dégradés et présentés en association à des antigènes CMH de classe I du soi. Elle induit des oncogènes et des gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs (récepteur de l'interleukine 2, IL2). D'autre part, cette activation nécessite la production d'IL2 par les LT CD4⁺ auxiliaires, activés à la suite de la reconnaissance des antigènes CMH de classe II à la surface des CPA. Ces LT CD4⁺ sont pourvoyeurs des signaux de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, qui se différencient par la suite en cellules mémoires.

III.2.c Les 3 signaux de la réponse cellulaire T

La réponse cellulaire T peut être décomposée en 3 signaux.

Le premier signal est induit par l'interaction entre le TCR du lymphocyte T et l'association peptide allogénique – molécule du CMH. Cette interaction provoque l'activation d'une cascade de kinases au sein du lymphocyte T, aboutissant à l'activation de la phospholipase C. La phospholipase C induit une augmentation du calcium intracellulaire libre, provoquant l'activation de la calcineurine, qui est une phosphatase calcium – calmoduline dépendante.

La calcineurine est à l'origine du deuxième signal, puisqu'elle induit la translocation nucléaire de facteurs de transcription de cytokines et de molécules d'activation (IL2, CD40 ligand).

Enfin, le troisième signal est provoqué par l'interaction des cytokines telles que l'IL2 avec leur récepteur. Il consiste en l'activation de cyclines par la mTOR (mammalian Target of Rapamycin), qui induisent la progression des cellules de la phase G1 à la phase S.

La progression dans le cycle cellulaire permet l'expansion clonale des lymphocytes T. Celle-ci nécessite, en phase tardive du cycle cellulaire, une synthèse de nucléotides puriques et pyrimidiques.

La synthèse des cytokines par les lymphocytes T activés (IL2, IFN...) active les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, mais aussi les cellules NK (Natural Killer), les monocytes, macrophages, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses, et les lymphocytes qui sécrètent alors des anticorps anti-HLA.

Cette activation massive de toutes les cellules du système immunitaire a pour conséquence l'apparition de phénomènes inflammatoires et/ou de destruction cellulaire.

III.3 Les différents types de rejet^[28]

Publiée en 1993, la classification de Banff standardise les paramètres morphologiques et cliniques qui établissent l'échelle de gravité d'un rejet, afin d'uniformiser les données et de permettre une collaboration internationale.^[42]

Quatre types de rejet, connus en expérimentation animale, sont définis en transplantation rénale humaine : hyperaigu, de type humoral ; accéléré, de type humoral ; aigu, de type cellulaire ; chronique, de type mixte.

III.3.a Rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu est exceptionnel, et survient dans les quelques heures ou les quelques jours qui suivent la transplantation. Il est caractérisé par une destruction accélérée du transplant dans les heures qui suivent les anastomoses vasculaires.

Ce type de rejet est dû à la présence d'anticorps préformés dirigés contre les antigènes du donneur. Ces anticorps, en général dirigés contre les antigènes HLA de classe I et détectés par un crossmatch T positif, sont secondaires à des transfusions, des grossesses, et de plus en plus souvent à l'échec d'une précédente transplantation. Ils interagissent directement avec l'endothélium vasculaire de l'allogreffe. En se fixant sur l'endothélium, ils provoquent l'activation du système du complément, et sont à l'origine d'une cascade d'événements résultant en une thrombose massive : activation de facteurs de la coagulation, kallikréines, bradykinines et autres substances vasoactives.^[28]

La pratique des crossmatches spécifiques donneur – receveur devrait les détecter. Lorsqu'ils sont positifs, ceux-ci contre-indiquent la greffe.^[43] Les rares cas de rejet hyperaigu avec crossmatch T négatif sont rapportés à des crossmatch B positifs (médiés par des anticorps HLA de classe II) ou à la présence d'anticorps anti-endothélium ou anti-monocytes, très difficilement détectables.

Les accidents par incompatibilité dans le système ABO sont dus à des erreurs techniques.

III.3.b Rejet accéléré

Ce type de rejet survient entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour, et met en jeu une réponse aux antigènes du donneur auxquels le receveur aurait été préalablement sensibilisé.

Il réunit tous les paramètres de gravité du rejet aigu. La gravité des rejets de type humoral dépend du titre des anticorps présents et de l'intensité de l'expression des antigènes HLA. Ce type de rejet est extrêmement rare en France, puisque les patients reçoivent un traitement d'induction par sérum anti-lymphocytaire.

III.3.c Rejet aigu

Le rejet aigu est défini comme un processus immunologique entraînant une élévation de la créatininémie supérieure à 0,4 mg/dL, avec ou sans signe clinique. Dans tous les cas, la biopsie rénale s'impose comme l'examen indispensable. Néanmoins, une bonne corrélation entre le diagnostic clinique et l'examen histologique n'est trouvée que dans la moitié des cas. Les épisodes de rejet aigu peuvent survenir à n'importe quel moment après la transplantation, mais ils sont l'apanage des trois premiers mois, avec un maximum de fréquence entre le 4^{ème} et le 15^{ème} jour. Ce type de rejet reste la cause principale de perte du greffon au cours de la première année. Surtout, étant un facteur majeur de rejet chronique, le rejet aigu a un impact négatif dans le pronostic à long terme de la greffe.

Cliniquement, le rejet aigu est caractérisé par une augmentation de la perméabilité vasculaire, avec l'apparition d'œdème, et la formation de dépôts de fibrine, typiques de l'hypersensibilité retardée.

Les phénomènes de rejet aigu mettent en jeu la reconnaissance directe des alloantigènes du greffon par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 du receveur, dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces alloantigènes sont présentés aux lymphocytes T du receveur par les CPA du donneur. Les lymphocytes activés sécrètent des cytokines induisant la libération de sérotonine par les mastocytes et une altération de l'intégrité endothéliale. Les macrophages activés, quant à eux, sécrètent de nombreuses molécules susceptibles de provoquer des lésions d'organes : radicaux oxygénés, cytokines, enzymes protéolytiques.^[28]

III.3.d Rejet chronique : « néphropathie chronique de l'allogreffe »

Le rejet chronique, que l'on rencontre après 6 mois de greffe, est souvent attribué à l'action des anticorps,^[44] et met en jeu des phénomènes inflammatoires et de cicatrisation, aboutissant à un épaississement fibroblastique concentrique de l'intima, à l'origine de l'occlusion

progressive des artères de moyen calibre.^[45] Il est responsable d'une baisse de la survie du greffon à moyen et long terme (celle-ci diminue également) avec le nombre et la gravité des épisodes de rejet aigu. La présence d'anticorps humoraux préformés chez le receveur expose à un rejet aigu. Elle est donc associée à un déclin de la demi-vie du greffon, aussi bien chez les sujets HLA-compatibles qu'HLA-incompatibles. Enfin, une immunosuppression imparfaite et une mauvaise observance du traitement constituent des facteurs de risque importants pour l'apparition de réactions de rejet. A l'inverse, la compatibilité HLA est un facteur bénéfique pour la survie du greffon : les meilleurs résultats sont obtenus chez les jumeaux HLA identiques, et, même chez les greffes de reins de cadavre, la demi-vie du greffon est inversement corrélée au nombre d'antigènes incompatibles.

La physiopathologie du rejet chronique est particulièrement complexe, et de nombreux facteurs, immunologiques et non immunologiques, peuvent en être à l'origine (Tableau 2).^[46] Les facteurs immunologiques sont prédominants, et le mécanisme pourrait être le suivant : après un rejet aigu, quelques îlots de lymphocytes T activés, qui produisent en permanence de faibles quantités de cytokines, persistent dans la circulation et les organes lymphoïdes du receveur. Après la reconnaissance des antigènes du donneur présentés par les CPA du receveur, les lymphocytes T CD4⁺ activés stimulent les lymphocytes B, qui produisent des anticorps anti-HLA, ainsi que les monocytes et macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La prolifération des cellules musculaires lisses rencontrée dans ce type de rejet est également stimulée par des facteurs de croissance sécrétés par les plaquettes (platelet derived growth factor) ou les fibroblastes (basic fibroblast growth factor).

Les macrophages activés sont impliqués dans tous les aspects du rejet chronique :

- reconnaissance indirecte de l'antigène
- sécrétion d'Il1 et de TNF, qui amplifient la réponse inflammatoire, en augmentant la perméabilité vasculaire, et par leur activité procoagulante et leur action mitogénique sur les cellules musculaires lisses vasculaires.

La conjonction de ces médiateurs contribue à la diminution du calibre des vaisseaux et à la destruction progressive du greffon.^[28]

Le rôle des facteurs non immunologiques peut être également important.^[45] Outre une possible néphrotoxicité médicamenteuse ou une récurrence de la maladie primitive, un certain nombre de facteurs doit être pris en compte. Ainsi, une reprise retardée ou imparfaite de la fonction rénale en post-greffe serait liée à un risque de perte du greffon à long terme.^[47] De

même, l'hyperfiltration sur réduction néphronique, rencontrée lorsque le donneur a un âge avancé^[48] ou est porteur de lésions vasculaires, ou lorsqu'il existe une inadéquation de la masse rénale entre donneur et receveur,^[49] constitue un facteur de risque d'apparition d'un rejet chronique. Enfin, l'hypertension artérielle,^[50] en étant à l'origine d'une fibrose intersticielle liée à une hypersécrétion locale d'angiotensine II, et l'hypertryglycémie^[46] associée au stress oxydatif, en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses, sont également des facteurs de risque du rejet chronique.

Tableau 2. Résumé des facteurs de risque à l'origine de la néphropathie chronique de l'allogreffe

Qualité du rein greffé	Donneur	Maladie vasculaire Age Hypertension
	Conditions du prélèvement	Mort cérébrale Technique de conservation Lésions de reperfusion Chirurgie d'implantation
Facteurs immunologiques	Anticorps préformés Compatibilité HLA Immunosuppression Rejet aigu Observance	
Événements post-transplantation	Insuffisance rénale post-opératoire Toxicité des médicaments Inadéquation taille des reins donneur – receveur Récidive de la maladie primitive Hypertension Anomalies lipidiques Infection par le cytomégalovirus	

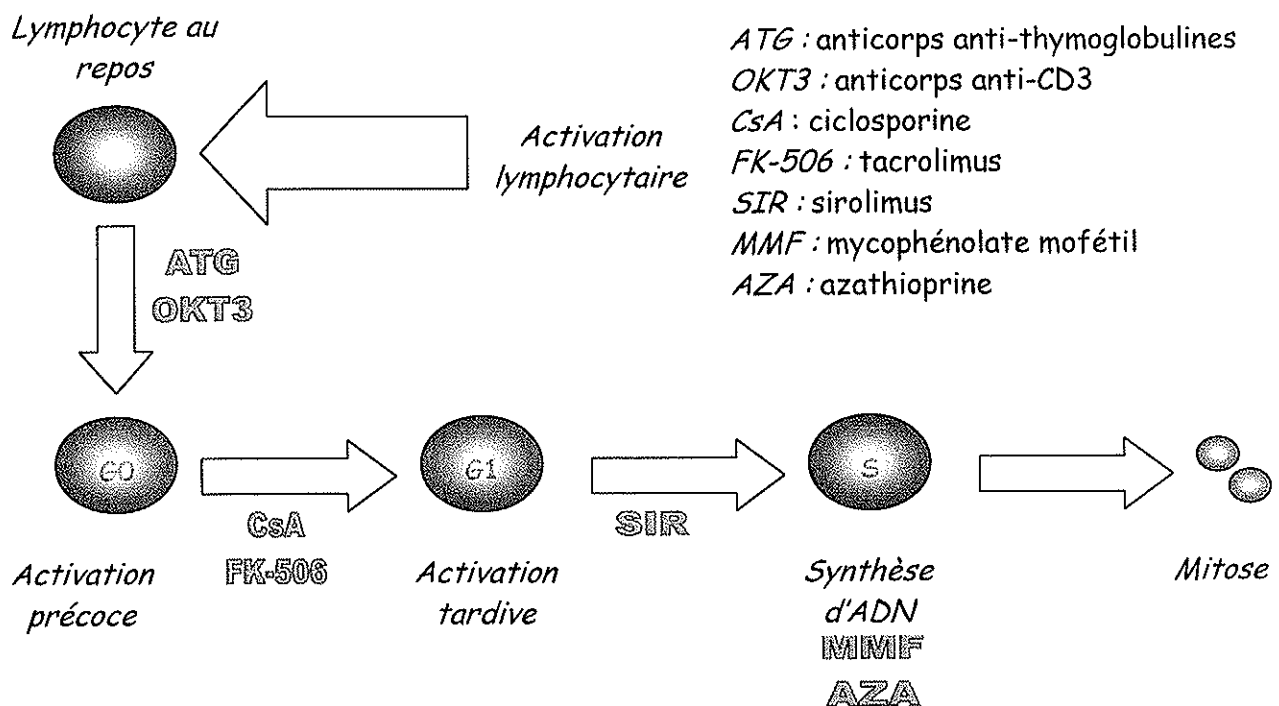
IV LES MEDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

La transplantation d'un organe d'un individu à un autre nécessite la suppression de la réponse immunitaire normale du receveur, afin d'éviter le rejet de l'organe du donneur, reconnu comme étranger par le système immunitaire du receveur. L'immunosuppression a donc pour but d'abolir la réaction immunitaire du receveur contre les alloantigènes du donneur. La réponse immunitaire primaire (présentation de l'antigène, prolifération cellulaire, synthèse de cytokines et différenciation) est plus facilement et plus complètement supprimée que la réponse immunitaire secondaire (activation des cellules mémoires). Ainsi, les immunosuppresseurs sont d'une efficacité limitée lorsque la mémoire immunologique envers l'alloantigène du donneur est déjà acquise, et l'inhibition de la réponse immune est plus

facilement obtenue si la thérapeutique immunosuppressive est débutée avant l'exposition à l'immunogène, c'est-à-dire avant la transplantation.

Initialement, la thérapeutique immunosuppressive était basée sur l'association d'antimitotiques non spécifiques (antimétabolite – azathioprine – et alkylant – cyclophosphamide) aux corticostéroïdes (prednisone). Ces immunosuppresseurs non spécifiques inhibent la prolifération lymphocytaire, mais sont également toxiques pour toutes les cellules proliférant rapidement (cellules de la moelle osseuse et du système gastro-intestinal). Cette association expose donc à de nombreux effets secondaires, en particulier des infections opportunistes.

Figure II. Cycle cellulaire et sites d'action des immunosuppresseurs.



En France, la prévention du rejet de greffe est à présent basée sur une quadrithérapie immunosuppressive. Les médicaments utilisés dans ces associations agissent sur des cibles différentes et interviennent sur différentes phases du cycle cellulaire (Figure II). Les traitements consistent en une phase d'induction, avant la greffe et pendant les premiers jours suivant la transplantation par sérum anti-lymphocytaire (SAL). Actuellement, ces sérums contiennent des anticorps monoclonaux, afin d'obtenir une immunosuppression plus sélective, ce qui n'était pas le cas avec les anticorps polyclonaux utilisés auparavant. A l'induction par SAL est associée un traitement de fond par corticoïdes, dont l'activité immunosuppressive

n'est pas spécifique, avec les complications infectieuses que cela peut engendrer. A terme, le traitement au long cours par corticoïdes est réduit puis stoppé, afin de s'affranchir au maximum des effets indésirables dont ils sont responsables (freinage de l'axe hypothalamo-hypophysaire, syndromes cushingoïdes, ostéoporose...). Enfin, les patients reçoivent des immunosuppresseurs plus spécifiques, avec en première ligne, les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine, tacrolimus), le plus souvent associés au mycophénolate mofétil. Autrefois largement utilisée, l'azathioprine est maintenant pratiquement abandonnée en greffe rénale, du fait notamment de sa faible spécificité. Les inhibiteurs de la calcineurine étant caractérisés par une toxicité rénale, la recherche thérapeutique en matière d'immunosuppression s'est orientée vers le développement de nouveaux immunosuppresseurs, dénués de cette néphrotoxicité. C'est ainsi que le sirolimus a été introduit plus récemment dans l'arsenal thérapeutique.

III.1 Anticorps anti-lymphocytes

Il existe actuellement plusieurs préparations d'anticorps ayant l'indication de médicaments immunosuppresseurs.

III.1.a Anticorps anti-lymphocytes T polyclonaux^[51]

La plupart des anticorps fabriqués dans le passé le furent sous la forme d'antisérums développés contre le stimulus antigénique. Les anticorps anti-lymphocytes polyclonaux sont obtenus par l'immunisation de lapins, chèvres, moutons ou chevaux, qui constituent alors des réservoirs à anticorps reconnaissant les lymphocytes humains pouvant être à l'origine de la réaction de rejet lors des transplantations d'organes. Les immunoglobulines anti-lymphocytes se fixent à la surface des lymphocytes T circulants, provoquant leur destruction, d'où une lymphopénie et la disparition des réponses immunologiques T-dépendantes.

Au début utilisés dans la prévention du rejet, ces anticorps sont actuellement plutôt indiqués dans le traitement des rejets aigus corticorésistants.

III.1.b Anticorps anti-lymphocytes T monoclonaux

Du fait de leur nature monoclonale, ces immunoglobulines produisent une réponse immunosuppressive mieux ciblée et prévisible que celle due aux anticorps polyclonaux anti-

lymphocytes. Elles permettent une baisse rapide du nombre de cellules lymphoïdes, et l'inhibition fonctionnelle des populations lymphocytaires spécifiques.^[52]

Elles sont préparées par des techniques d'hybridation. Les hybridomes sont formés par la fusion de cellules murines sécrétrices d'anticorps avec des plasmocytes myélomateux, pour produire des anticorps hautement purifiés et ayant une spécificité précise, afin de limiter la production, par le receveur, d'anticorps anti-immunoglobuline.

- *Anticorps anti-CD3 : muromonab-CD3 ou OKT3 (ORTHOCLONE®)*

Le muromonab-CD3, ou OKT3, est un anticorps monoclonal produit par un hybridome de souris, dirigé contre la chaîne ϵ de la glycoprotéine CD3 lymphocytaire.^[28] Cette glycoprotéine est située à proximité immédiate du récepteur lymphocytaire T de reconnaissance de l'antigène (TCR) et a un rôle majeur dans la transduction du signal, puisqu'elle permet l'activation du complément et la lyse du lymphocyte. En se fixant sur la glycoprotéine CD3, les anticorps anti-CD3 bloquent l'accès de l'antigène au TCR et empêchent l'activation lymphocytaire T induite par la présence des alloantigènes du greffon. Cette action s'oppose au rejet de greffe.^[53]

L'OKT-3 est indiqué dans le traitement du rejet aigu corticorésistant.

- *Anticorps anti-chaîne α du récepteur à l'interleukine 2 (CD25) : dacliximab (ZENAPAX®), basiliximab (SIMULECT®)*

L'injection de sérum anti-lymphocytaire doit être effectuée suffisamment tôt avant la greffe pour que les anticorps, encore présents à des concentrations actives au moment de la greffe, ne détruisent pas les cellules du greffon, mais assez tard pour que l'immunosuppression persiste au moment de la transplantation.

Le dacliximab et le basiliximab sont des anticorps chimériques humains – murins, la partie humaine étant majoritaire afin de limiter les réactions immunitaires anti-anticorps.

La transduction du signal de l'I ℓ 2 par l'intermédiaire de son récepteur lymphocytaire est possible si le lymphocyte T activé exprime les 3 chaînes de CD25 à sa surface du LT : α , β , γ . Lorsque la chaîne α est bloquée, la même réponse biologique nécessite plus d'I ℓ 2. La quantité d'I ℓ 2 normale devient alors insuffisante pour provoquer une réponse.

Ces anticorps sont indiqués en prophylaxie du rejet aigu, en association à d'autres immunosuppresseurs.

III.2 Corticostéroïdes

Les schémas présentés dans ce paragraphe sont issus du cours DCEM1 disponible sur le site <http://www.jussieu.fr>.

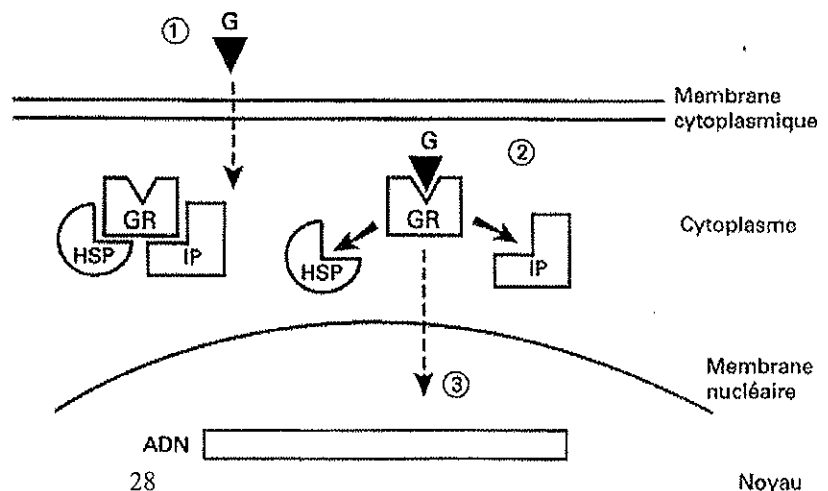
Utilisés depuis les années 1950, les corticostéroïdes font partie de l'arsenal thérapeutique dont les médecins disposent en transplantation d'organe, car ils sont doués de propriétés à la fois immunosuppressives et anti-inflammatoires. Leur mécanisme d'action est encore mal connu, mais, dès le début de leur utilisation, on a noté qu'ils provoquaient un effet lymphopéniant rapide et transitoire, en particulier à forte dose. Cette action serait liée à une redistribution des lymphocytes circulants et perdurerait environ 24 heures.

Les corticoïdes inhibent l'expression des molécules d'adhésion, diminuent la perméabilité vasculaire en inhibant l'activation des cellules endothéliales, empêchant l'afflux des leucocytes, et diminuent la prolifération des fibroblastes et la production de protéines telles que le collagène par les fibroblastes. Mais, surtout, les corticoïdes agissent sur les cellules sanguines de la lignée blanche :

- diminution de la différenciation et de l'activité anti-infectieuse des macrophages ;
- inhibition de l'adhésion des polynucléaires neutrophiles circulants aux cellules de l'endothélium vasculaire ;
- inhibition de la production, de la prolifération et des fonctions des lymphocytes T helpers et des lymphocytes T cytotoxiques, entraînant la baisse du nombre des lymphocytes circulants.

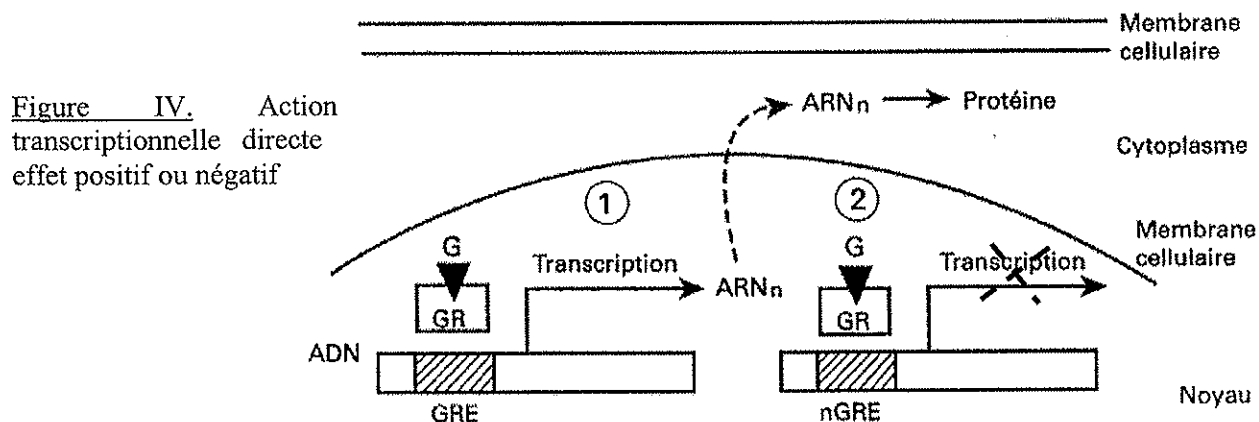
Ainsi, les corticoïdes inhibent la prolifération des lymphocytes T, mais aussi l'expression de gènes codant pour les cytokines (Il1, Il2, Il6, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$).^[54-57] La plupart de ces gènes possèdent un site GRE (Glucocorticoids-Responsive-Elements) dans leur séquence 5' de régulation, qui est une cible pour le complexe formé par l'association du corticoïde et de son récepteur protéique intracellulaire.^[58] ubiquitaire, spécifique, appartenant à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes.

Figure III. Pénétration des glucocorticoïdes dans le noyau cellulaire.



La fixation du complexe au GRE bloque la transcription du gène de l'I κ B.^[58] En effet, les glucocorticoïdes agissent par le biais d'un récepteur intracellulaire. Ce récepteur est présent sous forme inactive dans le cytosol, lié à un complexe protéique associant la « heat-shock protein », HSP 90 (protéine de choc thermique), et l'immunophiline (Figure III).

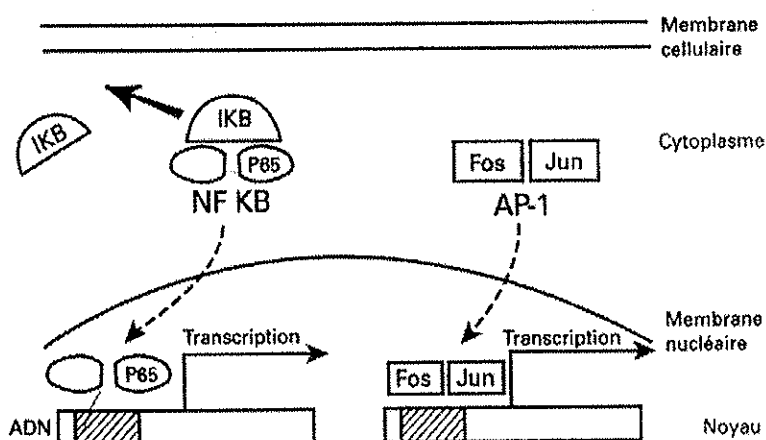
La fraction libre du corticoïde (10 à 20 %) traverse la membrane cellulaire par diffusion passive pour se lier avec une forte affinité au récepteur, provoquant la dissociation du complexe protéique, qui permet la translocation nucléaire de l'ensemble ligand-récepteur (Figure III).



Les glucocorticoïdes activent la transcription de façon directe, par interaction du complexe hormone-récepteur avec l'ADN, au niveau des sites accepteurs GRE. Cette action sur l'ADN induit une augmentation de la production de protéines anti-inflammatoires (lipocortine-1 ou annexine-1, I κ B, protéine I κ B). Ils peuvent également inhiber la transcription de certains gènes en se liant à l'ADN au niveau de sites de liaison négatifs, ou nGRE (Figure IV).

En situation inflammatoire, on assiste à une activation des facteurs de transcription NF κ B (inactivé en situation cytoplasmique par la liaison à la protéine I κ B) et AP-1 (dimère constitué par les sous-unités Fos et Jun).

Figure V.1 Facteurs de transcription impliqués dans la réaction inflammatoire.



L'inflammation induit une libération de la protéine I κ B, qui permet à NF κ B son transfert en situation intranucléaire et son activation (Figure V.1).

A ce niveau, les corticoïdes sont doués d'une activité transcriptionnelle indirecte, contrôlant l'expression des gènes de nombreuses cytokines, par l'interaction avec les facteurs de transcription (AP-1, NF κ B et NF-IL6).

Le complexe glucocorticoïde-récepteur interagit en situation intranucléaire avec la sous-unité p65 de NF κ B et la sous-unité Jun de AP-1. Il inhibe ainsi l'action transcriptionnelle des deux facteurs de transcription. Le complexe glucocorticoïde-récepteur est aussi responsable d'une augmentation de la synthèse de I κ B, favorisant l'inactivation de NF κ B (Figure V.2).

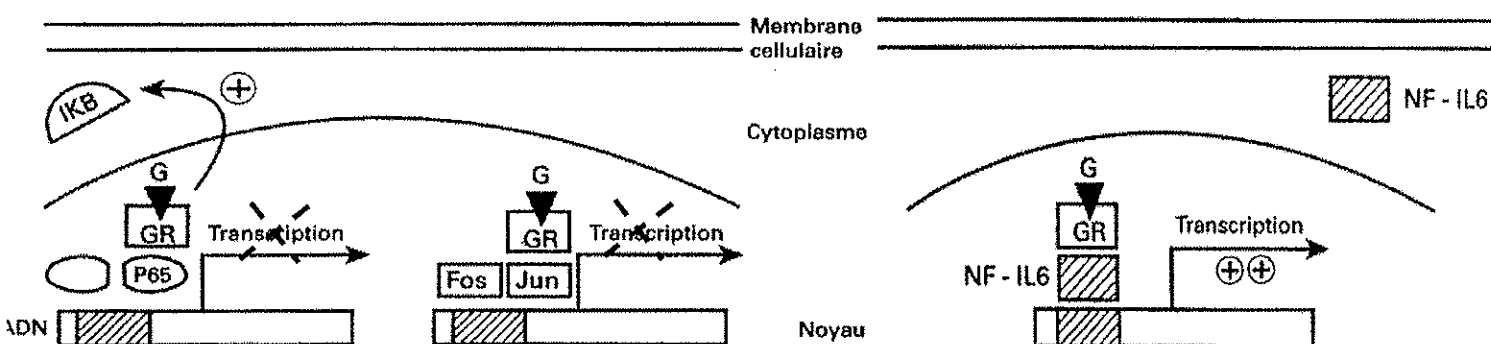


Figure V.2 Action transcriptionnelle indirecte : inhibition ou activation de facteurs de transcription.

Enfin, le complexe glucocorticoïde – récepteur interagit avec le facteur de transcription induit par l'IL6 (NF-IL6) et permet une activation de son effet transcriptionnel (Figure V.2).

Les glucocorticoïdes seraient également capables de modifier la structure de la chromatine en désacétylant les histones, ce qui entraînerait un enroulement plus serré de l'ADN réduisant l'accès des facteurs de transcription à leurs sites de fixation et ainsi inhibant l'expression des gènes concernés.

C'est l'interaction entre le complexe hormone – récepteur et ces facteurs de transcription qui constitue le principal mécanisme à l'origine des propriétés anti-inflammatoire et immunosuppressive des glucocorticoïdes.

III.3 Inhibiteurs de la calcineurine

Bien que présentant des structures chimiques et des cibles biochimiques différentes, la ciclosporine et le tacrolimus sont responsables d'effets similaires sur la transduction du signal de prolifération lymphocytaire T.^[59,60] Ils agissent tous les deux sur la phase G0 du cycle cellulaire (Figure II). Leur action immunosuppressive passe par leur combinaison à des immunophilines : la cyclophiline et les FKBP. Les immunophilines sont des protéines de liaison aux immunosuppresseurs. Les FKBP, immunophilines majeures, comptent pour approximativement 0,1 % du total des protéines cellulaires et sont douées d'une activité transpeptidylpropylisomérase.^[61]

La ciclosporine et le tacrolimus diffusent tous les deux aisément dans les cellules cibles, et inhibent la transduction du signal d'activation lymphocytaire T (Figure VI). La stimulation du récepteur du lymphocyte T (TCR) par le complexe antigène – peptide du CMH de classe II induit une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, responsable de l'activation de la calcineurine. Cette enzyme a une activité sérine – thréonine phosphatase calcium – calmoduline dépendante, dont l'un des substrats est le NFATc, fraction cytosolique du NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées), présent dans le cytoplasme sous forme déphosphorylée.

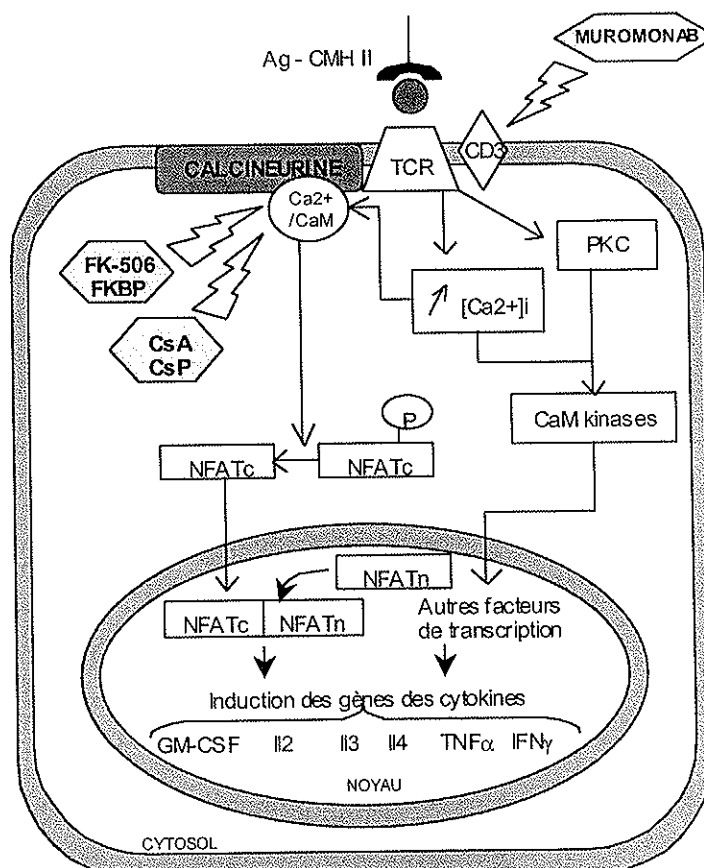


Figure VI. Mécanisme cellulaire de l'action des inhibiteurs de la calcineurine.^[62]

Ag : antigène – TCR : récepteur du lymphocyte T – CaM : calmoduline – PKC : protéine kinase C – FK506 : tacrolimus – CsA : ciclosporine – FKBP : FK-506 binding protein – CsP : cyclophiline – NFAT : nuclear factor of activated T cells – c : cytosolique – n : nucléaire.

La déphosphorylation du NFATc par la calcineurine permet sa migration du cytoplasme vers le noyau, où il s'associe à son homologue nucléaire, NFATn.^[63] Cette association régule la transcription des gènes de nombreuses interleukines, en particulier l'Il2, impliquée dans l'activation précoce des lymphocytes T, mais aussi du GM-CSF, du TNF α , de l'INF γ .^[61] Associés à leur protéine de liaison, la ciclosporine et le tacrolimus forment un complexe stable avec la calcineurine dont ils inhibent l'activité phosphatase, bloquant la translocation intranucléaire des facteurs de transcription et la transcription de certains gènes, en particulier celui de l'Il2. L'absence d'interleukine 2 empêche, en particulier, la transition des lymphocytes T helpers de type Th1 de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire.^[61,64]

III.3.a Ciclosporine (SANDIMMUN[®], NEORAL[®])

Utilisée depuis les années 1980, la ciclosporine est probablement l'immunosuppresseur le plus important en transplantation, auquel on peut vraisemblablement attribuer les plus grands progrès. C'est un produit peptidique d'origine fongique, isolé de *Tolypocladium inflatum* Gams, utilisé en transplantation d'organe.

La ciclosporine est dotée d'un effet inhibiteur très spécifique sur la réponse lymphocytaire T, supprimant la réponse cellulaire primaire à l'antigène. Après fixation son récepteur intracytoplasmique, la cyclophiline^[65,66] (enzyme de la famille des immunophilines douée d'une activité peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérase, qui intervient dans la configuration spatiale des protéines^[67]), elle bloque la voie d'activation calcineurine dépendante et, par conséquent, la transcription et l'expression génique des cytokines nécessaires à la réponse immune. La ciclosporine inhibe en particulier la production d'Il2 et l'expression de son récepteur, ainsi que la production d'INF γ et de nombreuses autres cytokines.^[66,68] La ciclosporine inhibe également la sécrétion d'Il2 en induisant une augmentation de l'expression du TGF β , puissant inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T stimulés par l'Il2 et de la production de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène.^[58,69] En inhibant la synthèse et les effets de l'Il2, la ciclosporine bloque la prolifération et la différenciation cellulaire. L'inhibition de l'activation lymphocytaire T conduit à la suppression de la réaction à médiation cellulaire mais aussi de la réaction à médiation humorale T-dépendante.

III.3.b Tacrolimus ou FK506 (PROGRAF®)

Antibiotique extrait de la fermentation d'un bouillon de *Streptomyces tsukubaensis*, micro-organisme tellurique, le tacrolimus a une structure différente de celle de la ciclosporine, et une activité immunosuppressive est, par ailleurs, 10 à 100 fois plus puissante. En revanche, tout comme la ciclosporine, il inhibe l'activité de la calcineurine. Il se fixe à une protéine cytosolique, la FKBP12 (FK-506 binding protein), l'ensemble constituant un complexe stable avec la calcineurine, dont il inhibe l'activité sérine – thréonine phosphatase calcium dépendante. Le site d'interaction du tacrolimus avec la calcineurine n'est pas identique à celui de la ciclosporine mais le chevauche.^[69]

Ainsi, malgré un récepteur intracellulaire différent de celui de la ciclosporine, le tacrolimus inhibe la calcineurine, comme la ciclosporine, bloquant l'expression précoce des gènes codant pour de nombreuses cytokines.

III.4 Inhibiteur de la mTOR : Sirolimus (RAPAMUNE®)

Malgré ses similitudes structurales avec le tacrolimus, et son affinité pour la même famille de protéines (FK506 Binding Proteins ou FKBP), le sirolimus possède un mécanisme d'action original :^[70] il inhibe la réponse aux cytokines, alors que les inhibiteurs de la calcineurine en inhibent surtout la production.

III.4.a Action moléculaire

L'activité immunosuppressive du sirolimus, comme celle des inhibiteurs de la calcineurine, nécessite sa liaison aux immunophilines.^[71]

Le sirolimus a une structure voisine de celle du tacrolimus (FK506),^[72] mais, contrairement à la ciclosporine et au tacrolimus, il n'est doué d'aucune activité sur la calcineurine.^[64,71] La FKBP12 est le récepteur cytosolique majoritaire du tacrolimus ($K_d = 0,4 \text{ nmol/L}$) et du sirolimus ($K_d = 0,2 \text{ nmol/L}$) dans les lymphocytes.^[70]

La lipophilie du sirolimus lui permet de traverser la membrane cellulaire et de se lier à la FKBP12 cytoplasmique.^[72] Son action immunosuppressive met en jeu une interaction directe avec une deuxième protéine intracellulaire (protéine secondaire), la mTOR (mammalian Target Of Rapamycin).^[70] Les premières TOR identifiées, TOR1 et TOR2, ont été isolées à

partir de souches de *Streptomyces cerevisiae*. La TOR est également désignée sous le nom de FRAP (FKBP Rapamycin Associated Protein) ou RAFT (Rapamycin And FKBP12 Target).^[70,71]

La mTOR est une protéine sérine – thréonine kinase^[72] impliquée spécifiquement dans la régulation du cycle cellulaire, active sous forme phosphorylée. Après activation par un facteur de croissance, une protéine kinase B (PKB) phosphoryle la mTOR sur un résidu sérine. Phosphorylée, la mTOR active la protéine p70s6 kinase (p70^{s6k}) ribosomale, responsable de la synthèse protéique et de la progression des cellules T de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.^[70]

La mTOR est également responsable de la phosphorylation de résidus thréonine de PHAS-1, présent dans les cellules quiescentes, lié au facteur d'initiation 4E, lui-même associé à une protéine de liaison, eIF. La dissociation de PHAS-1 du facteur 4E, stimulée par la phosphorylation induite par la mTOR, permet l'initiation d'effets mitogènes et de transformation, impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire.

La phosphorylation de la mTOR est inhibée par le complexe sirolimus – FKBP12, empêchant l'activation de la p70^{s6k}^[71] et induisant une stabilisation de l'association PHAS-1-eIF-4E.^[70]

Le sirolimus est donc responsable du blocage de la progression des cellules (en particulier lymphocytes Th1) de la phase G1 à la phase S, et de l'inhibition de la prolifération cellulaire médiée par les cytokines telles que l'IL2, l'IL4 et l'IL15.^[61,64,70]

D'autre part, le sirolimus bloque la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire par des voies faisant intervenir l'IL2, mais indépendantes de la mTOR. En effet, il interagit avec des complexes cyclines – kinases cyclines dépendantes impliqués dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire. Le complexe cycline E – kinase cycline dépendante 2 (cdk2) active la transcription du promoteur de l'histone H2B par phosphorylation du site NPAT, fondamental pour l'entrée en phase S. L'inhibiteur p27^{kip1} inhibe l'activité de l'association cycline E – cdk 2 en formant un complexe nommé cycline E – cdk 2-p27^{kip1}. En présence de sirolimus, p27^{kip1} est up-régulé à des niveaux tels que la prolifération cellulaire est inhibée.^[70]

III.4.b Action cellulaire

In vitro, le sirolimus inhibe la croissance des cellules B et T murines et humaines, induite par des agents tels que le lipopolysaccharide S, ou des associations IL1 – concanavaline A ou IL1 – phytohémagglutinine A. Il agit à une étape plus tardive du cycle cellulaire que les inhibiteurs

de la calcineurine : il réduit l'activation des lymphocytes T en inhibant les voies de transduction du signal induites par les cytokines, en particulier par l'Il2, alors que la ciclosporine et le tacrolimus en inhibent la production.^[70,71] De plus, il empêche la prolifération des lymphocytes B, dépendante et indépendante de l'Il2, et induit une diminution de la production d'IgA, IgM et IgG, contribuant à ses effets immunomodulateurs.^[71]

Le sirolimus inhibe la prolifération des cellules immunitaires et non immunitaires. En effet :

- à faible dose, il inhibe la prolifération des lymphocytes et des cellules musculaires lisses ;
- à forte dose, il inhibe la prolifération des cellules NK (Natural Killer) et LAK (Lymphokin Activated Killer).

Le sirolimus semble donc inhiber la prolifération de cellules non immunitaires, en particulier des cellules musculaires lisses présentes dans l'intima des artères (stimulées par le basic fibroblast growth factor et le platelet derived growth factor). Or, la prolifération des cellules musculaires lisses est impliquée dans l'épaississement de l'intima des artères, qui peut être à la base du rejet chronique du greffon chez les patients transplantés. Le sirolimus présente donc un intérêt potentiel dans la prévention de l'épaississement de l'intima des artères associé au rejet chronique.^[71]

III.5 Antimétabolites

Ces médicaments s'opposent à l'expansion clonale à la fois des lymphocytes B et des lymphocytes T.

Il existe 2 voies de synthèse des purines : la voie *de novo* et la voie de sauvetage. Les lymphocytes B et T prolifèrent par synthèse purinergique *de novo*, contrairement aux neurones, qui utilisent exclusivement la voie de sauvetage, et à toutes les autres cellules, dont la prolifération emprunte les 2 voies de synthèse des purines.

III.5.a Azathioprine (IMUREL®)^[73]

Utilisée depuis 1962, l'azathioprine (AZA) est aujourd'hui de moins en moins utilisée. C'est un antimétabolite purique, promédicament de la 6-mercaptopurine (analogue de l'hypoxanthine). Cette molécule est un inhibiteur de la synthèse des purines : elle intervient donc tardivement dans le cycle cellulaire.

Après exposition à des molécules nucléophiles telles que le glutathion, l’AZA est convertie en 6-mercaptopurine ribonucléotide, qui présente des analogies structurales avec l’inosine monophosphate. Il existe alors une compétition entre ces 2 molécules pour la synthèse des nucléotides puriques (AMP, GMP), qui résulte en une inhibition de la synthèse *de novo* des purines ou la formation de thioinosine monophosphate (thio-IMP) qui, en tant que faux nucléotide, peut interférer avec la voie alterne de synthèse des purines. Le thio-IMP est transformé ensuite en thio-GMP (thioguanosine monophosphate) et, enfin, en thio-GTP (thioguanosine triphosphate), conduisant à des altérations de l’ADN par intercalation de thio-GMP dans son squelette. Au final, l’action de l’AZA résulte en un blocage de la synthèse d’ADN et d’ARN, et en une inhibition de la prolifération des cellules immunocompétentes.

III.5.b Mycophénolate mofétil (CELLCEPT®)^[73]

Le mycophénolate mofétil est le 2-morpholinoéthyl ester de l’acide mycophénolique. L’acide mycophénolique (MPA), métabolite actif du mycophénolate mofétil, est un inhibiteur puissant de l’inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme indispensable à la synthèse *de novo* des purines. Le MPA inhibe spécifiquement la synthèse *de novo* des purines, en épargnant la voie de sauvetage, et a, en principe un effet inhibiteur spécifique sur les lymphocytes B et les lymphocytes T. L’IMPDH existe sous 2 isoformes, I et II. L’isoforme II est présente dans les lymphocytes T activés, et le MPA a une meilleure affinité pour l’IMPDH de type II que pour l’IMPDH de type I. Il exerce donc une action plus sélective sur les lymphocytes T. L’inhibition de l’IMPDH résulte en un blocage de la synthèse de la guanosine et des dérivés nucléotidiques.

Le MPA entre en compétition avec le NAD, cofacteur nécessaire à l’activité de l’IMPDH, et supprime la prolifération lymphocytaire et la formation d’anticorps par les cellules B. Il peut également inhiber le recrutement de leucocytes par les sites inflammatoires en déplaçant les nucléotides guanosine leucocytaires, et en inhibant la glycosylation des glycoprotéines lymphocytaires impliquées dans l’adhésion aux cellules endothéliales. Cet effet résulte en une diminution de la reconnaissance allogénique par les lymphocytes. Enfin, le MPA inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de façon plus efficace que la ciclosporine, permettant d’envisager son utilisation dans la prévention du rejet chronique.

DEUXIÈME PARTIE :
ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE
DU SIROLIMUS, ASSOCIÉ OU
NON A LA CICLOSPORINE,
CHEZ DES PATIENTS
TRANSPLANTÉS RÉNAUX

I CONTEXTE DE L'ETUDE

Antibiotique macrocyclique anciennement appelé rapamycine, le sirolimus (RAPAMUNE®), est le produit de fermentation naturelle d'une bactérie actinomycète, *Streptomyces hygroscopicus*, isolée pour la première fois à partir d'échantillons de sol de la région de Vai Atore située sur l'île de Pâques (*Rapa Nui*).^[70,71] Cette découverte résulte, au début des années 70, d'une recherche de nouveaux agents antifongiques par la « Canadian Medical Mission » assistée du « Center for Disease Control ». Les études initiales ont prouvé que le sirolimus était particulièrement puissant contre *Candida albicans*. Son potentiel immunosuppresseur a été découvert au cours d'études utilisant des modèles expérimentaux de tumeurs, de maladies auto-immunes, et, plus tard, de transplantations d'organes.^[64] L'investigation de son activité dans la prévention du rejet d'organes n'a commencé sérieusement qu'en 1995, avec la description du potentiel immunosuppresseur de son analogue structural, le FK506, ou tacrolimus.^[70]

Son activité immunosuppressive puissante et synergique avec celle des autres immunosuppresseurs, en particulier la ciclosporine, ainsi que son mécanisme d'action original, lui ont valu en septembre 1999 l'autorisation de sa mise sur le marché américain, en transplantation rénale, par la Food and Drug Administration.^[70]

En France, la RAPAMUNE®, commercialisée depuis 2001 par les laboratoires Wyeth, est indiquée en *prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale*,^[74] et se présente sous la forme d'une solution buvable à 1 mg/mL. Cette spécialité, pour l'heure réservée à l'usage hospitalier, a l'agrément pour les collectivités. Elle s'administre en une prise unique quotidienne, le matin.

I.1 Pharmacocinétique du sirolimus

La pharmacocinétique du sirolimus est caractérisée par une variabilité interindividuelle semblable à celle de la ciclosporine et du tacrolimus, avec des coefficients de variation des paramètres pharmacocinétiques allant de 31 % pour la demi-vie d'élimination, à 86 % pour le T_{max} .^[71,96]

I.1.a Absorption

L'absorption du sirolimus après administration orale est rapide ($T_{\max} = 20 \text{ min à } 3 \text{ h}$).^[64,75-77,80] Sa biodisponibilité systémique est faible, de l'ordre de 15 %, du fait d'un métabolisme intestinal et hépatique important.^[77]

I.1.b Distribution

Le sirolimus se concentre dans les éléments figurés du sang pour plus de 95 %, ^[78] et 97 % de la fraction plasmatique est liée à l'albumine.^[79] En raison de sa lipophilie importante,^[80] sa distribution tissulaire est large, en particulier dans les organes riches en lipides (rate, foie, reins, intestins, cœur),^[78] d'où un volume de distribution apparent élevé et variable, compris entre 5,6 et 16,7 L/kg chez des transplantés rénaux stables.^[76]

I.1.c Métabolisme

Le sirolimus est principalement métabolisé par le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) hépatique et intestinal en de nombreux métabolites,^[75,78] par O-déméthylation et hydroxylation.^[71] Ces métabolites sont ensuite éliminés par voie biliaire.^[79] Leur activité représenterait moins de 10 % de l'activité immunosuppressive du sirolimus : il est donc peu probable qu'ils participent à son activité immunosuppressive.^[79]

I.1.d Elimination

L'élimination du sirolimus fait l'objet d'une variabilité interindividuelle très importante, probablement en raison de la variabilité interindividuelle de la quantité et de l'activité du CYP3A4.^[75] Dans une étude de phase I, réalisée chez 30 volontaires sains recevant du sirolimus par voie orale en dose unique, la clairance d'élimination moyenne était comprise entre 145 et 567 mL/h.kg pour une moyenne de 278 mL/h.kg, et la demi-vie était égale à $81,5 \pm 15,6$ heures.^[80] De même, dans une étude réalisée chez des transplantés rénaux, la demi-vie d'élimination du sirolimus après administration par voie orale était comprise entre 57 et 63 heures, pour une clairance moyenne de $208 \pm 95 \text{ mL/h.kg}$.^[76]

La longue demi-vie du sirolimus justifie l'administration d'une dose de charge en début de traitement, afin d'atteindre l'état stable rapidement, puis d'une seule dose quotidienne en traitement d'entretien.^[76]

I.1.e Interactions médicamenteuses

Le sirolimus est un substrat de la P-glycoprotéine (P-gp).^[75] En conséquence, les médicaments modifiant les concentrations et/ou l'activité du CYP3A4 et de la P-gp sont responsables d'interactions pharmacocinétiques avec le sirolimus, et doivent être utilisés avec précautions.^[71]

L'association de la ciclosporine au sirolimus induit une augmentation des concentrations sanguines de sirolimus, en particulier de la concentration résiduelle (C_0) avec une augmentation de l'AUC,^[81] probablement par inhibition du CYP3A4 et de la P-gp par la ciclosporine.^[76,80] En pratique, il est recommandé d'administrer le sirolimus 4 heures après la dose matinale de ciclosporine, afin de minimiser cette interaction.^[71]

D'autre part, une étude chez le lapin n'a mis en évidence aucune interaction entre le sirolimus et la prednisolone.^[75]

Enfin, le diltiazem et le kétoconazole (inhibiteurs de la P-gp et du CYP3A4) induisent une augmentation significative de l'exposition au sirolimus alors que la rifampicine (inducteur du CYP3A4) la réduit.^[71]

I.2 Effets secondaires du sirolimus^[72]

Le sirolimus, comme les autres immunosuppresseurs, est caractérisé par une fenêtre thérapeutique étroite, justifiant le suivi thérapeutique pharmacologique de cette molécule. La fréquence et l'intensité des effets secondaires rapportés sont corrélées aux concentrations résiduelles de sirolimus, avec un risque majeur pour des taux résiduels supérieurs à 15 µg/L.

Les effets indésirables les plus fréquents sont d'ordre hématologique, à type d'anémie, de thrombopénie et de neutropénie, le plus souvent modérées, et réversibles à l'arrêt du médicament.

D'autre part, le sirolimus interagit avec le métabolisme lipidique, à l'origine d'hyperlipidémies, avec une augmentation des triglycérides supérieure à l'augmentation du cholestérol sanguin. Ces effets sont par ailleurs majorés lorsqu'il est associé à la ciclosporine, connue elle aussi pour ses effets hyperlipémiants.

En revanche, le sirolimus ne semble pas néphrotoxique, et la toxicité rénale de la ciclosporine ne serait pas majorée par la co-administration des deux produits.

Parmi les effets indésirables du sirolimus, on peut également noter des nausées et des vomissements, des manifestations cutanées à type de rash et d'acné, et l'augmentation des enzymes hépatiques.

Enfin, comme pour tous les immunosuppresseurs, un traitement par sirolimus induit une augmentation du risque infectieux (infections à *Herpes simplex virus* en particulier).

I.3 Pourquoi le suivi thérapeutique ?

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) du sirolimus a été recommandé lors de son autorisation de mise sur le marché, et cette recommandation s'est transformée en obligation dans le résumé des caractéristiques du produit. Il est justifié par l'importante variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du sirolimus^[64,76,82] et ses nombreuses interactions pharmacocinétiques potentielles. D'autre part, les concentrations sanguines sont mal corrélées aux doses administrées,^[83] alors qu'il existe une relation entre les concentrations et les effets thérapeutiques et toxiques.^[64] De plus, il est impossible de réaliser des mesures directes de l'effet immunosuppresseur du sirolimus.

Enfin, le STP est possible puisque des méthodes de dosage du sirolimus ont été développées, en chromatographie liquide haute performance avec détection UV (HPLC/UV)^[84-87] ou par spectrométrie de masse (LC/MS).^[88-90]

Il a été montré qu'il existait une bonne corrélation entre les concentrations résiduelles et l'exposition globale au produit, appréciée par l'AUC.^[76] D'autre part, les concentrations résiduelles sont corrélées à l'efficacité et à la toxicité du médicament. Il a donc été recommandé d'adapter la dose de sirolimus sur la base des concentrations résiduelles, avec une zone thérapeutique de 3,5 µg/L à 15 µg/L.^[91] Toutefois, chez certains sujets, C_0 n'est pas représentative de l'exposition au médicament, pouvant être comprise dans la fourchette thérapeutique malgré une sous-exposition donc un risque de rejet, ou, à l'inverse, une surexposition, responsable d'effets toxiques. Dans ce genre de situation, il est probablement intéressant d'estimer plus précisément l'AUC et donc l'exposition réelle du patient au produit, ce qui nécessite au préalable des études pharmacocinétiques.^[4] Alors que de nombreuses méthodes utilisant une stratégie de prélèvement en nombre limité ont été mises en place pour calculer l'AUC de médicaments tels que la ciclosporine^[92,93] et le mycophénolate,^[81] il n'y a que très peu de travaux utilisant une telle approche pour le sirolimus.^[95]

II OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif de la présente étude est d'établir un modèle pharmacocinétique et d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de population du sirolimus en association ou non à la ciclosporine chez des patients transplantés rénaux récents.

III POPULATIONS ET METHODE

III.1 Population 1 : « Population SIR-CsA » (association sirolimus – ciclosporine)

La première population a été constituée à partir d'une base de données issue de l'étude 0468E1-302-US, mise à notre disposition par les laboratoires Wyeth.

L'étude 302 est un essai clinique de phase III, multicentrique et randomisé, réalisé en double-aveugle, visant à évaluer l'efficacité du sirolimus en association avec la ciclosporine dans la prévention du rejet de greffe rénale allogénique, et a servi de base pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché.

Cet essai a inclus 576 patients transplantés rénaux âgés de 15 à 71 ans, parmi lesquels 3 jeunes adultes de moins de 18 ans. Les patients recevaient tous un traitement associant ciclosporine et corticostéroïdes, et, quatre heures plus tard, sirolimus 2 mg/j (212 patients) ou sirolimus 5 mg/j (206 patients) ou placebo (158 patients), selon le bras de randomisation dans lequel ils se situaient. La première dose était une dose de charge du sirolimus égale à trois fois la dose d'entretien, puis un STP du sirolimus basé sur un contrôle régulier des concentrations résiduelles était réalisé. La posologie de la ciclosporine était adaptée selon la concentration sanguine résiduelle, avec une cible comprise entre 200 et 400 µg/L pendant le premier mois, 200 et 300 µg/L lors des deuxième et troisième mois, 150 et 250 µg/L entre le quatrième et le douzième mois.

La base de données fournie par les laboratoires Wyeth a été établie à partir de prélèvements réalisés chez 42 patients transplantés rénaux de l'étude 302. Ces patients étaient issus des 2 bras recevant du sirolimus, et les profils pharmacocinétiques étaient réalisés lors de 3 périodes différentes – fin du premier mois, fin du troisième mois, fin du sixième mois post-transplantation. Une cinétique complète a été réalisée chez chaque patient à une ou deux des trois périodes. Ainsi la base de données Wyeth inclut un ou deux profils pharmacocinétiques pour chaque patient, réalisés de façon aléatoire à M1, M3 ou M6. Cette base de donnée

comporte donc 6 séries de profils pharmacocinétiques en 10 points (avant administration – T₀ – et 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h, 12 h, 24 h après administration) du sirolimus.

Le dosage du sirolimus en vue de la détermination des paramètres pharmacocinétiques a été effectué dans un laboratoire centralisé par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse selon une méthode validée^[64] tandis que le dosage du sirolimus en vue du suivi des concentrations résiduelles a été effectué par MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay).^[91]

Disposant de la totalité des pharmacocinétiques établies pour la base de données Wyeth, nous avons ainsi effectué une étude rétrospective de la pharmacocinétique du sirolimus associé à la ciclosporine chez des patients transplantés rénaux.

III.2 Population 2 : « Population SIR-MMF » (association sirolimus – mycophénolate)

La seconde population est constituée par les patients de l'étude « CINESIREN », prospective, bicentrique, de phase IV, ouverte, de la pharmacocinétique du sirolimus chez des patients transplantés rénaux récents. Les deux centres investigateurs sont les Centres Hospitaliers Universitaires de Limoges et de Reims. Elle prévoit d'inclure, d'ici novembre 2003, 16 hommes et femmes de 18 à 65 ans ayant bénéficié d'une greffe rénale.

Les patients inclus dans l'étude reçoivent une quadrithérapie immunosuppressive associant :

- une induction par sérum anti-lymphocytaire pendant les cinq premiers jours post-transplantation ;
- des corticostéroïdes : 250 mg avant la greffe, 250 mg après la greffe, puis 1 mg/kg pendant une semaine, et enfin décroissance progressive selon le schéma habituel du centre ;
- du mycophénolate mofétil (CELLCEPT[®]) : 2 g le jour de la transplantation, puis 1 g matin et soir chaque jour ;
- du sirolimus : une dose de charge de 12 à 15 mg, administrée dans les premières 24 heures suivant la transplantation, puis 5 mg par jour pendant 7 jours, et enfin adaptation des posologies basée sur le suivi des concentrations sanguines résiduelles, en essayant d'obtenir des valeurs comprises entre 10 et 15 µg/L.

Seuls sont inclus les patients ayant donné leur consentement éclairé par écrit.

En revanche, ne sont pas inclus les sujets en désaccord avec le protocole ou souffrant de problèmes neuro-psychiques ne permettant pas une bonne compréhension du protocole ou un consentement fiable, les patients présentant une anémie grave (inférieure à 6 g/dL) incompatible avec des prélèvements sanguins multiples, et, enfin, les patients dont le traitement comporte un ou plusieurs médicaments interférant avec le CYP3A4 impliqué dans le métabolisme du sirolimus (inducteurs : rifampicine, carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne ; inhibiteurs : kétoconazole, diltiazem). L'investigateur peut interrompre prématurément la participation d'un sujet à l'étude, en cas notamment de maladie intercurrente, d'échec du traitement, ou d'événement indésirable.

Les deux premières périodes de l'étude (7^{ème} jour, J7, et 15^{ème} jour, J15 post-transplantation) ont lieu au cours de l'hospitalisation suivant la transplantation rénale. Pour les trois périodes suivantes (1^{er} mois, M1, 2^{ème} mois, M2, et 3^{ème} mois, M3 après la greffe), le séjour dans le service est au maximum de 12 heures.

Tableau 3. Planning détaillé de l'étude pharmacocinétique du sirolimus.

PERIODE	JOUR	HEURE THEORIQUE		
J7, J15 M1, M2, M3	J-1	8h00	Prise matinale de RAPAMUNE®	
	J	7h50	Prélèvement de 3 tubes de sang : - dosage de la concentration résiduelle de sirolimus, C ₀ - examens biochimiques de routine - numération formule sanguine	
		8h00	Prise matinale de RAPAMUNE® (T ₀) et de CELLCEPT®	
		8h20	1 tube de sang/temps :	T _{20 min}
		8h30	dosage du sirolimus	T _{30 min}
		8h40	Petit déjeuner	
		9h00	1 tube de sang/temps : dosage du sirolimus	T _{1h}
		9h30		T _{1h30}
		10h00		T _{2h}
		11h00		T _{3h}
		12h00		T _{4h}
		12h30	Déjeuner	
		14h00	1 tube de sang/temps : dosage du sirolimus	T _{6h}
		17h00		T _{9h}
		20h00		T _{12h}
J7, J15	J+1	8h00		T _{24h}

Au matin de la journée d'étude, sont effectués une mesure de la taille et du poids du patient, ainsi qu'un examen clinique (examen général, température) et un recueil des constantes

hémodynamiques (pouls, pression artérielle). Des examens hématologiques et biochimiques de routine sont également réalisés : numération formule sanguine, ionogramme, dosage plasmatique des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ GT), de la créatinine, de l'urée et de la bilirubine. Enfin, sont relevés les antécédents médicaux et la liste des médicaments associés. L'étude pharmacocinétique se déroule selon le planning détaillé, présenté dans le tableau 3. Les profils pharmacocinétiques sont réalisés pour chaque patient lors de chacune des 5 périodes citées plus haut.

III.3 Dosage du sirolimus

Le dosage du sirolimus est effectué dans le sang total, prélevé dans un tube Vacutainer® avec EDTA. Le sirolimus est identifié et dosé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS), selon une méthode mise au point et validée dans le laboratoire, puis agréée par le laboratoire Wyeth après validation par une série de tests en aveugle.

200 μ L de sang total du patient sont nécessaires au dosage. Une gamme d'étalonnage de 0 à 100 μ g/L est réalisée à l'aide de prises d'essai de 200 μ L de sang total sans sirolimus auxquelles sont ajoutées des quantités croissantes de sirolimus en solution dans le méthanol. Des contrôles externes (en aveugle) et internes (de concentrations connues), traités de façon identique aux prélèvements des patients, sont dosés lors de chaque série. A chaque prise d'essai sont ajoutés 100 μ L d'étalon interne, le desméthoxysirolimus. L'ensemble des échantillons dans le sang total (gamme d'étalonnage, contrôles, échantillons patients) subit une hémolyse et une défécation par du sulfate de zinc à 50 g/L, puis le sirolimus et le desméthoxysirolimus sont extraits dans de l'acétone. La phase organique est ensuite alcalinisée par de la soude à 0,1 N, et le sirolimus et son étalon interne sont extraits dans du 1-chlorobutane. Après évaporation à 60°C et refroidissement, le résidu sec est repris par 50 μ L de méthanol, dont 10 μ L sont ensuite injectés dans le système chromatographique, constitué d'une colonne de type X-Terra® C18 (Waters ; longueur : 150 mm, diamètre interne : 2,1 mm, granulométrie : 3,5 μ m) chauffée à 60°C. Le gradient de phase mobile, composé d'un mélange acétonitrile – tampon formiate tel que présenté dans le tableau 4, permet une bonne séparation du sirolimus (temps de rétention, TR = 7,9 minutes) et du desméthoxysirolimus (TR = 8,6 minutes).

Tableau 4. Gradient de phase mobile.

A : tampon formiate d'ammonium, 20 mmol/L, pH = 3
 B : B : 80 % acétonitrile, 20 % tampon formiate d'ammonium, 20 mmol/L, pH = 3

Temps (min)	% A	% B
0	40	60
1	40	60
3	10	90
8	10	90
8,5	40	60
11,5	40	60

Après séparation des produits, les transitions ioniques spécifiques de chaque produit sont détectées en polarité positive à l'aide d'un spectromètre de masse à triple quadripôle, selon des conditions spectrométriques représentées dans le tableau 5. La pression du gaz de collision est de 1,5 mTorr.

Tableau 5. Conditions spectrométriques utilisées pour le dosage du sirolimus.
 Q : ion de quantification ; C : ion de confirmation

	m/z		Largeur de scan (u)	Temps (s)	Energie de collision (eV)	Largeur du pic à mi-hauteur (u)	
	Ion Parent	Ions Fils				Quad 1	Quad 2
Sirolimus	931,4	Q : 864,4 C : 882,4	3	0,1	24 18	0,7	0,7
Desméthoxysirolimus	901,3	Q : 816,4 C : 834,2	3	0,1	12 10	0,7	0,7

La méthode mise en œuvre pour le dosage du sirolimus dans le sang total a été validée grâce à des contrôles de qualité internes et externes ; sa limite de détection est de 0,5 µg/L, et sa zone de linéarité comprise entre 1 et 100 µg/L.

III.4 Etude pharmacocinétique

III.4.a Etude de la population SIR-CsA

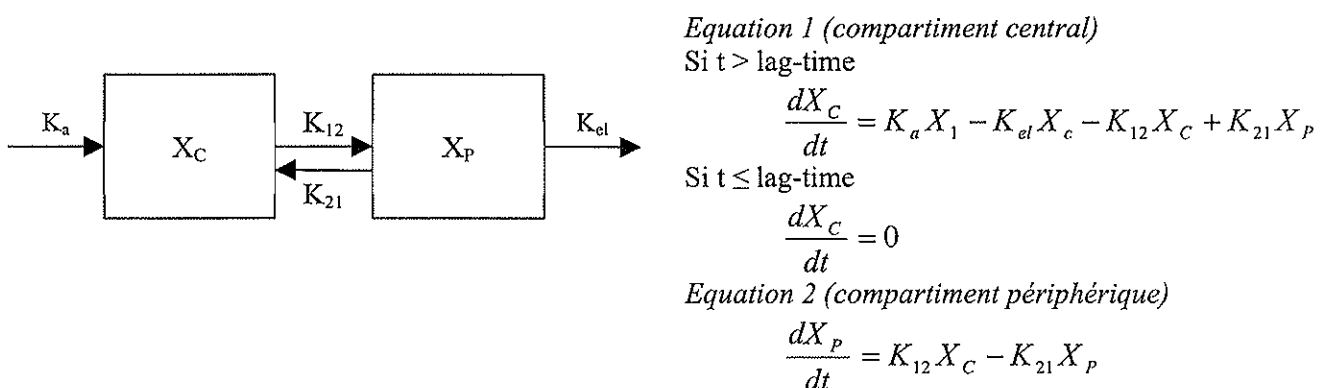
- Approche non-compartmentale

Dans un premier temps, l'évaluation des principaux indices d'exposition (C_0 , C_{max} , T_{max} et AUC_{0-24}) de chaque patient a été réalisée selon une approche non-compartmentale (concentrations ou temps mesurés, AUC calculée par la méthode des trapèzes linéaires).

• Etude des pharmacocinétiques individuelles

Une étude de pharmacocinétique individuelle a été réalisée grâce au logiciel de pharmacocinétique WinNonlin® Professional, version 4.0.1 (Pharsight). Cette étude a utilisé le modèle qui semblait le mieux adapté à la description des profils d'absorption et d'élimination du sirolimus. Les différents profils pharmacocinétiques individuels étaient ajustés aux données expérimentales par régression non linéaire (RNL). Le modèle choisi est un modèle à deux compartiments, avec une absorption et une élimination d'ordre 1, et un temps de latence (ou lag-time), représenté dans la figure VII. Ce modèle a pour paramètres A (µg/L), B (µg/L), α (1/h), β (1/h), K_a (1/h), et lag-time (h), où A, B, a et b sont les paramètres du modèle d'élimination bi-compartimental (Ae^{-αt}+Be^{-βt}), et K_a la constante d'absorption. En ont été déduits pour chaque patient les paramètres pharmacocinétiques et les indices d'exposition suivants : volume apparent du compartiment central (V_C/F), constante d'élimination (K_{el}), volume apparent du compartiment périphérique (V_P/F) et constantes de transfert (K₁₂ et K₂₁), clairance totale apparente (Cl/F), concentration sanguine maximale (C_{max}) et le temps auquel elle est atteinte (T_{max}). La détermination des paramètres pharmacocinétiques individuels des patients de la population SIR-CsA a donc fourni une estimation des paramètres de population (moyenne, écart-type des paramètres individuels, matrice de variance-covariance), et a permis de rechercher un éventuel effet dose ou effet temps.

Figure VII. Modèle pharmacocinétique utilisé pour la détermination des paramètres individuels



- Etude de la pharmacocinétique de population en une étape : méthodologie NonMEM®

L'analyse des données de l'essai 302 réalisé par les laboratoires Wyeth a permis de réaliser une étude rétrospective de la pharmacocinétique de population du sirolimus lorsque celui-ci est associé à la ciclosporine. Cette étude a consisté en une recherche préliminaire du modèle pharmacocinétique structural le mieux adapté à la molécule, selon une approche populationnelle en une étape à effets mixtes, ou Mixed Effect Model, intégrée dans la version V du programme NonMEM® (« Non Linear Mixed Effect Model », Globomax, Hanover, MD, USA), qui fonctionne sur micro-ordinateur PC. L'interface Visual NonMEM® a été utilisée. Une fois choisi le modèle structural le mieux adapté, elle a permis de déterminer au sein d'une même approche les paramètres moyens de la population SIR-CsA ainsi que leurs variabilités interindividuelles, sans avoir besoin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques individuels de façon directe.

Un modèle structural de base capable de décrire au mieux l'évolution des concentrations sanguines du sirolimus au cours du temps a été recherché. Ce modèle de base intègre à la fois un modèle pharmacocinétique et un modèle d'erreur. A chaque étape de sa construction, la pertinence du modèle structural a été évaluée selon plusieurs critères : (i) la minimisation de la fonction objective ; (ii) la minimisation des variances inter-individuelles et l'amélioration de leur précision ; (iii) la qualité de l'ajustement des concentrations prédites par rapport aux concentrations observées (DV) ; (iv) la distribution des résidus. Les concentrations prédites par estimation Bayésienne grâce au module POSTHOC sont de deux types : les concentrations prédites par individu (IPRED), c'est-à-dire prenant en compte toutes les concentrations mesurées chez un même individu, et les concentrations prédites (PRED), calculées sur la base des paramètres pharmacocinétiques estimés à l'aide de la seule dose de sirolimus administrée.

- *Modèle pharmacocinétique*

Le modèle pharmacocinétique permet de décrire l'évolution des concentrations sanguines au cours du temps et de générer les prédictions des paramètres pharmacocinétiques. Différents types de modèles pharmacocinétiques ont été testés : (i) modèle mono-compartmental avec élimination du premier ordre et lag-time (ADVAN 2 TRANS 2) ; (ii) modèle bi-

compartimental avec absorption d'ordre 0 et élimination de premier ordre, avec et sans lag-time (ADVAN 3 TRANS 4) ; (iii) modèle bi-compartimental avec absorption et élimination du premier ordre, avec et sans lag-time (ADVAN 4 TRANS 4) ; (iv) modèle à 3 compartiments, avec absorption et élimination d'ordre 1, avec et sans lag-time (ADVAN 6 SS 6) ; (v) modèle bi-compartimental avec une absorption suivant la loi d'Erlang et une élimination du premier ordre (ADVAN 5 SS 5) ; (vi) modèle bi-compartimental avec une absorption de type Michaelis-Menten, lag-time et élimination du premier ordre (ADVAN 6 SS 6).

- *Modèle d'erreur*

Le modèle statistique d'erreur représente la relation décrivant les écarts aléatoires entre paramètres prédits et observés, et entre concentrations prédites et observées ; en d'autres termes il modélise la variabilité interindividuelle sur les paramètres pharmacocinétiques, et la variabilité résiduelle au niveau des concentrations. Le modèle utilisé dans cette étude est un modèle d'erreur mixte, combinant erreur additive et erreur multiplicative.

Au total, le modèle pharmacocinétique de base a permis de générer des estimations : de la valeur moyenne des paramètres pharmacocinétiques ; de la variabilité interindividuelle sur chaque paramètre pharmacocinétique ; de la variabilité résiduelle.

III.4.b Etude de la population SIR-MMF

CINESIREN est une étude prospective de la pharmacocinétique du sirolimus lorsque celui-ci est administré en association avec le mycophénolate mofétil et non avec la ciclosporine. Comme 8 patients seulement ont été inclus à ce jour, seule une analyse individuelle des profils pharmacocinétiques a pu être réalisée, selon le même schéma que pour la population SIR-CsA.

Ainsi, l'approche non-compartimentale a tout d'abord permis d'évaluer les principaux indices d'exposition individuels au sirolimus (C_0 , $C_{\max}$, $T_{\max}$ et AUC_{0-24} calculées selon la méthode des trapèzes). Puis, une étude de pharmacocinétique individuelle des profils a été réalisée grâce au logiciel WinNonlin[®], selon le même modèle que celui choisi pour l'estimation de la pharmacocinétique des patients de la population SIR-CsA (Figure VII). Les différents profils pharmacocinétiques individuels ont été ajustés aux données expérimentales par RNL, et les

principaux paramètres pharmacocinétiques individuels ont été analysés : K_a , V_C/F , K_{el} , Cl/F , C_{max} , T_{max} , V_P/F , K_{12} et K_{21} .

III.5 Analyse statistique

L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour la recherche d'éventuels effets « période » ou « dose » sur les variables d'exposition : $C_0/Dose$, $C_{max}/Dose$, $AUC/Dose$, T_{max} , lag-time, K_a , Cl/F et V_C/F . La performance prédictive des modèles pharmacocinétiques testés a été évaluée par analyse de régression et par le calcul du biais et du RMSE (Root Mean Square Error), selon les formules suivantes :^[99]

$$Biais = \frac{Estimé - Observé}{Observé}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum \left[\frac{Estimé - Observé}{Observé} \right]^2}$$

De plus, les valeurs estimées et les valeurs observées des différents paramètres d'exposition ont été comparées par un test de Wilcoxon. Les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques obtenus dans différentes populations ont été comparées par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Le test de normalité de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour évaluer si les indices d'exposition standardisés par la dose $C_{max}/Dose$ et $AUC/Dose$ suivaient une distribution normale.

L'ensemble de ces analyses statistiques a été réalisé sur Statview® (Abacus concepts 4.5, Berkeley, CA, USA).

IV RESULTATS

IV.1 Population 1 : « Population SIR-CsA »

La population SIR-CsA est constituée de 92 profils pharmacocinétiques collectés chez 42 patients issus des 2 bras sirolimus de l'étude 302 : 19 patients traités par ciclosporine + sirolimus 2 mg/j, et 23 patients traités par ciclosporine + sirolimus 5 mg/j, à la fin du premier

mois (M1), à la fin du troisième mois (M3), et à la fin du sixième mois (M6) post-transplantation.

Trois cinétiques incomplètes ont été exclues de l'analyse : une cinétique du groupe de dose 2 mg à M3 (C_0 manquant), une cinétique du groupe de dose 2 mg à M6, et une cinétique du groupe de dose 5 mg à M6 (profils réalisés sur une période inférieure à 24 heures).

IV.1.1.a Approche non-compartimentale

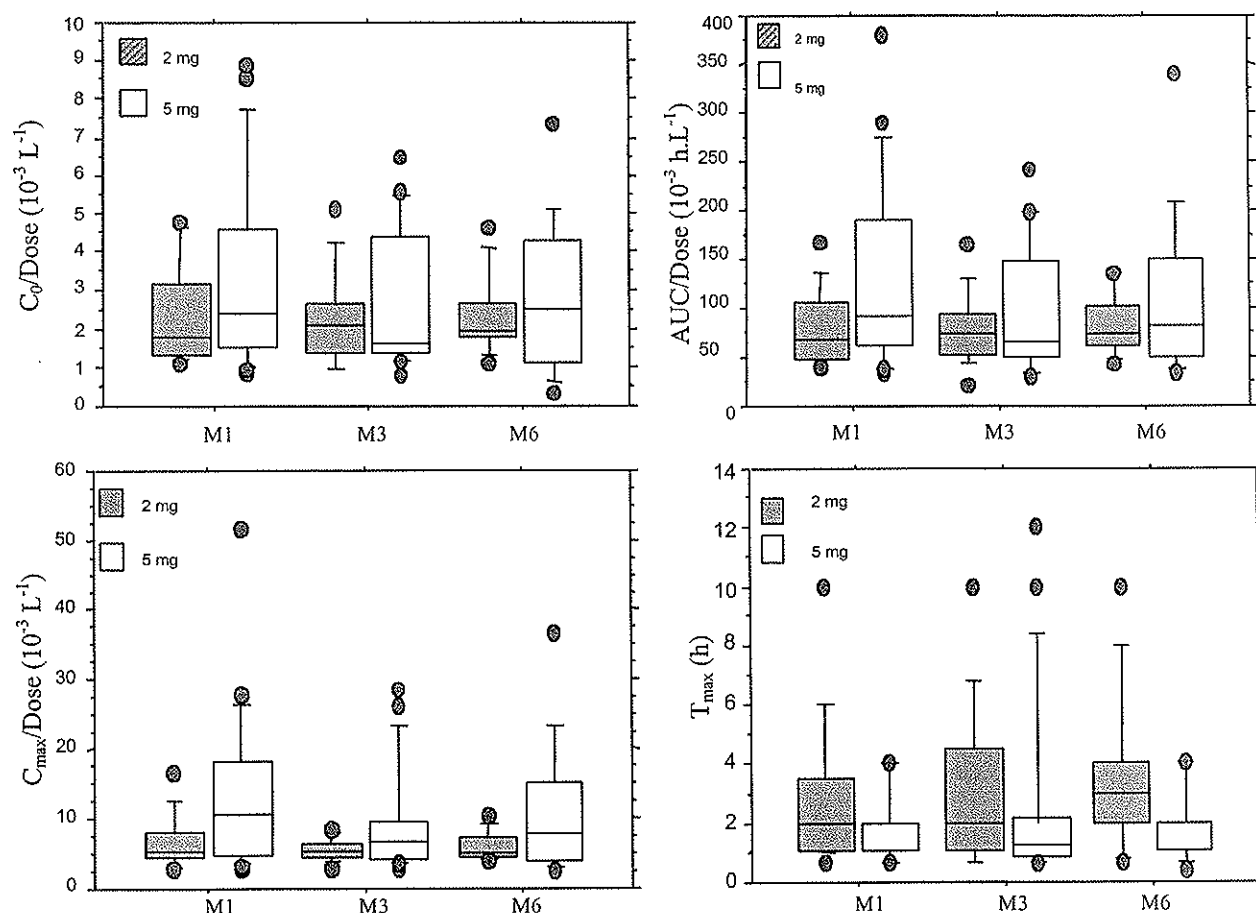
Les indices d'exposition déterminés selon une approche non-compartimentale dans chacun des groupes sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Indices d'exposition au sirolimus de la population SIR-CsA, déterminés selon une approche non-compartimentale (moyennes $\pm$ écarts-types).

Groupe de dose	M1		M3		M6	
	2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j
n	15	19	13	17	10	15
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	4,63 $\pm$ 2,53	11,66 $\pm$ 7,70	4,28 $\pm$ 2,58	10,0 $\pm$ 5,34	4,59 $\pm$ 1,19	11,2 $\pm$ 7,30
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	13,1 $\pm$ 7,65	47,8 $\pm$ 35,7	10,3 $\pm$ 3,97	30,1 $\pm$ 16,9	11,5 $\pm$ 4,26	41,3 $\pm$ 29,8
T_{max} (h)	2,64 $\pm$ 2,52	1,63 $\pm$ 1,15	3,02 $\pm$ 2,72	2,43 $\pm$ 3,30	3,57 $\pm$ 2,79	1,80 $\pm$ 1,07
AUC (h. $\mu\text{g/L}$)	158 $\pm$ 77,3	466 $\pm$ 297	146 $\pm$ 81,3	371 $\pm$ 197	159 $\pm$ 58,1	450 $\pm$ 265

Les indices d'exposition standardisés par la dose et déterminés par approche non-compartimentale ne différaient pas significativement entre les trois périodes après la transplantation, ainsi qu'il est illustré dans la figure VIII.

Figure VIII. Indices d'exposition estimés par approche non-compartmentale, pondérés par la dose, éclatés par période post-greffe et par groupe de dose.

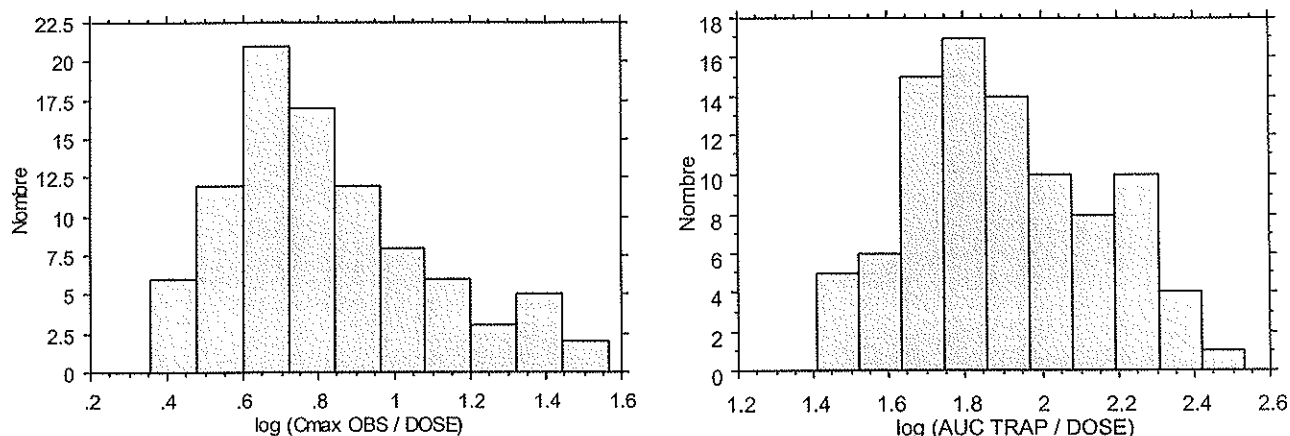


Toutes périodes confondues, la concentration résiduelle ainsi que l'AUC sont faiblement corrélées avec la dose administrée ($r^2 = 0,24$ et $0,20$ respectivement). L'AUC varie d'un patient à un autre dans un rapport de 1 à 4,2 pour une dose identique quotidienne de 2 mg et dans un rapport de 1 à 8,2 pour une dose quotidienne de 5 mg.

De plus, les indices d'exposition standardisés par la dose (AUC/Dose, C₀/Dose, C_{max}/Dose) ne diffèrent pas significativement entre les deux groupes de dose. Ce résultat est en faveur d'une pharmacocinétique linéaire.

L'étude de la distribution des logarithmes de C_{max}/Dose et AUC/Dose par le test de Kolmogorov-Smirnov ne met pas en évidence d'écart significatif à la normalité. Une distribution log-normale de ces indices est donc admissible (Figure IX). Néanmoins, l'observation de l'histogramme pourrait laisser suspecter une distribution bimodale, avec un second pic moins marqué que le premier. L'existence d'une telle sous-population n'est toutefois pas mise en évidence par l'analyse des probits (ns), peut-être du fait d'effectifs insuffisants.

Figure IX. Représentation semi-logarithmique de la distribution en fréquence des indices d'exposition $C_{\max}$ et AUC standardisés par la dose dans la population SIR-CsA.



IV.1.b Approche individuelle compartimentale

Dans un deuxième temps, l'approche bi-compartimentale individuelle réalisée avec le logiciel WinNonlin® a permis de calculer les paramètres pharmacocinétiques et les indices d'exposition pour chaque patient. Les valeurs moyennes de ces paramètres dans la population sont présentés dans le tableau 7.

Pour cette analyse, un profil pharmacocinétique très atypique et impossible à modéliser de manière simple, issu du groupe de dose 2 mg/j un mois après la transplantation, a dû être exclu (Figure X).

Figure X. Profil pharmacocinétique du patient 5347, groupe de dose 2 mg/j, 1 mois après la transplantation.

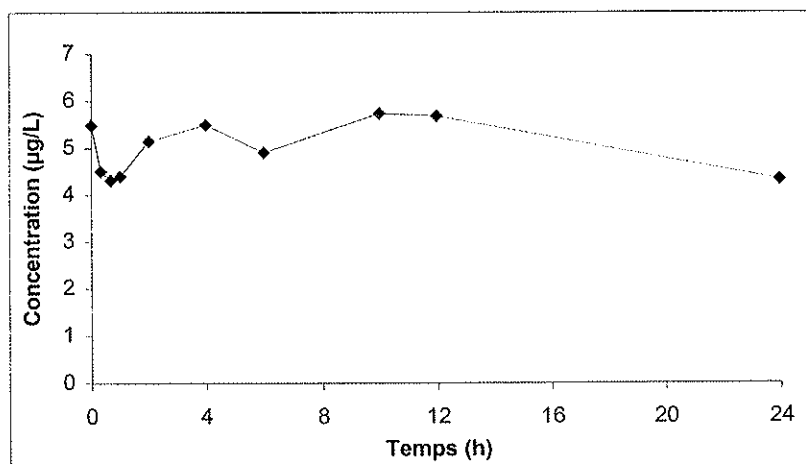


Tableau 7. Paramètres pharmacocinétiques et indices d'exposition au sirolimus de la population SIR-CsA, déterminés par une approche individuelle bi-compartimentale à l'aide du logiciel WinNonlin® (moyennes $\pm$ écarts-types).

Groupe de dose	M1		M3		M6	
	2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j
n	14	19	13	17	10	15
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	4,40 $\pm$ 2,70	11,8 $\pm$ 8,18	4,46 $\pm$ 2,79	9,96 $\pm$ 6,06	4,58 $\pm$ 2,40	11,8 $\pm$ 8,14
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/L}$)	9,33 $\pm$ 5,86	35,3 $\pm$ 31,8	5,67 $\pm$ 1,88	22,6 $\pm$ 17,4	7,19 $\pm$ 3,14	30,5 $\pm$ 24,1
$T_{\max}$ (h)	2,94 $\pm$ 4,37	1,47 $\pm$ 0,90	2,90 $\pm$ 2,32	2,18 $\pm$ 2,56	3,79 $\pm$ 3,49	1,84 $\pm$ 1,54
AUC (h. $\mu\text{g/L}$)	166 $\pm$ 79,9	467 $\pm$ 288	148 $\pm$ 77,3	369 $\pm$ 192	181 $\pm$ 78,0	446 $\pm$ 254
Lag-time (h)	0,60 $\pm$ 0,39	0,33 $\pm$ 0,21	1,01 $\pm$ 1,15	0,63 $\pm$ 1,34	0,78 $\pm$ 0,79	0,67 $\pm$ 0,50
K_a (1/h)	4,61 $\pm$ 6,39	11,4 $\pm$ 17,2	5,58 $\pm$ 8,28	4,47 $\pm$ 5,32	1,87 $\pm$ 2,42	11,7 $\pm$ 25,7
Cl/F (L/h)	14,5 $\pm$ 5,96	11,0 $\pm$ 7,66	17,9 $\pm$ 11,7	14,3 $\pm$ 9,05	12,4 $\pm$ 5,62	13,6 $\pm$ 8,23
V_C/F (L)	195 $\pm$ 139	144 $\pm$ 123	332 $\pm$ 227	182 $\pm$ 124	202 $\pm$ 135	202 $\pm$ 165

Le tableau 8 résume la comparaison des indices d'exposition calculés par RNL aux indices d'exposition observés. Les concentrations recalculées lors de la modélisation de chaque profil pharmacocinétique ont également été comparées de manière globale à l'ensemble des concentrations observées disponibles.

Tableau 8. Evaluation de la pertinence des indices d'exposition au sirolimus calculés par RNL selon une approche compartimentale individuelle.

Groupe de dose		M1		M3		M6	
		2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j	2 mg/j	5 mg/j
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	Biais (%)	- 5,5	0,2	4,2	- 3,3	- 1,8	14
	RMSE (%)	21	21	14	16	8,6	38
Concentrations ($\mu\text{g/L}$)	Biais (%)	- 1,4	0,5	0,3	-0,3	- 0,3	2,2
	RMSE (%)	11	15	12	15	7,5	18
AUC ($\mu\text{g.h/L}$)	Biais (%)	4	1,5	10	- 0,1	20	0,3
	RMSE (%)	7	5,7	20	6,1	57	8,3

Ces indices d'exposition ont été généralement bien estimés, avec des biais globalement inférieurs à 10 %, et une bonne précision (RMSE < 20 %), excepté pour le groupe de dose 2 mg, 6 mois après la transplantation. Pour ce groupe, les écarts d'estimation étaient dus à des

patients isolés dont les profils étaient atypiques et pour lesquels le modèle utilisé était mal adapté, ainsi qu'il est illustré dans la figure XI.

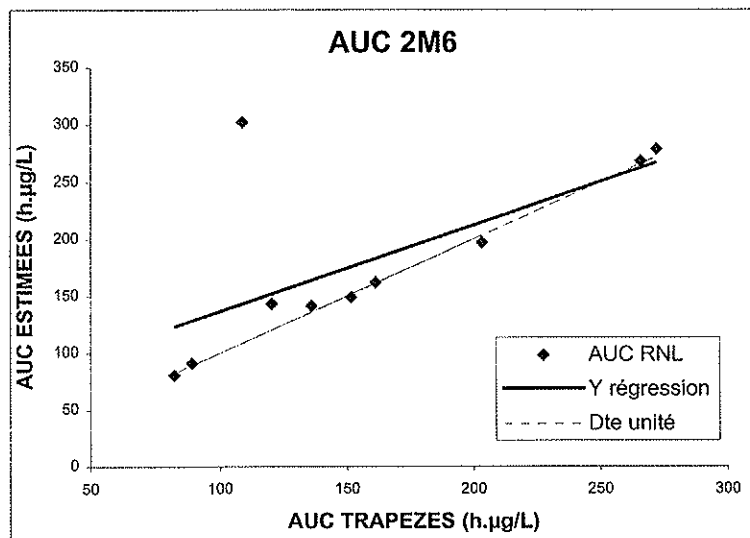


Figure XI. Comparaison des AUC calculées par RNL aux AUC calculées par la méthode des trapèzes.

$AUC_{RNL} = 0,658 * AUC_{TRAP} + 60,850$
 $R = 0,662$
Pente statistiquement différente de 1 ($p = 0,28$)
Ordonnée à l'origine statistiquement différente de 0 ($p = 0,23$)

Dans le groupe de dose 2 mg, respectivement 86 %, 92 % et 80 % des AUC ont été calculées avec une erreur inférieure à 10 % à M1, M3 et M6. Pour ces mêmes périodes et dans le groupe 5 mg, une erreur d'estimation de moins de 10 % a été commise pour 89 %, 82 % et 75 % des AUC.

L'analyse de ces résultats confirme l'absence d'effet « période » sur les indices d'exposition standardisés par la dose (Figure XII) et sur les paramètres pharmacocinétiques (Figure XIII) calculés dans chacun des deux groupes de dose constituant la population.

Figure XII. Indices d'exposition estimés par une approche bi-compartmentale individuelle, pondérés par la dose, éclatés par période post-greffe et par groupe de dose.

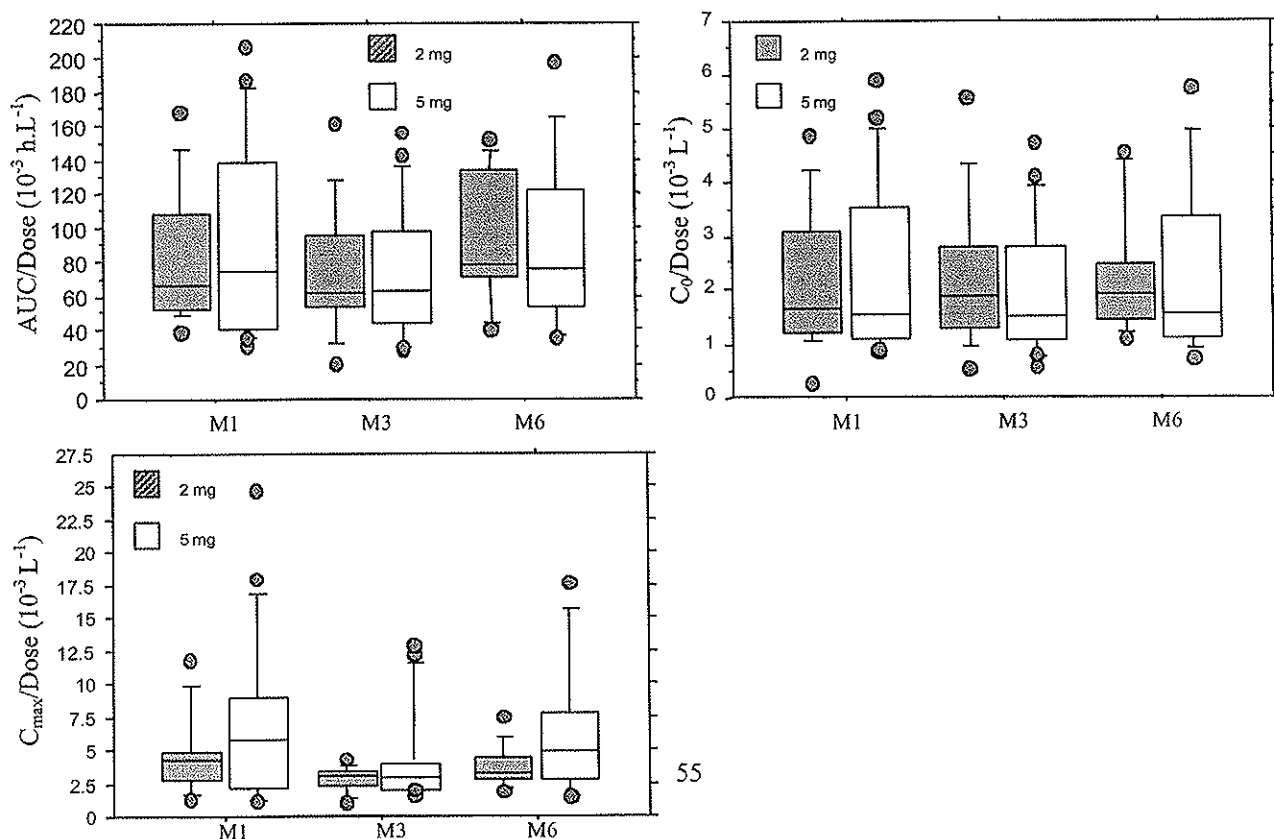
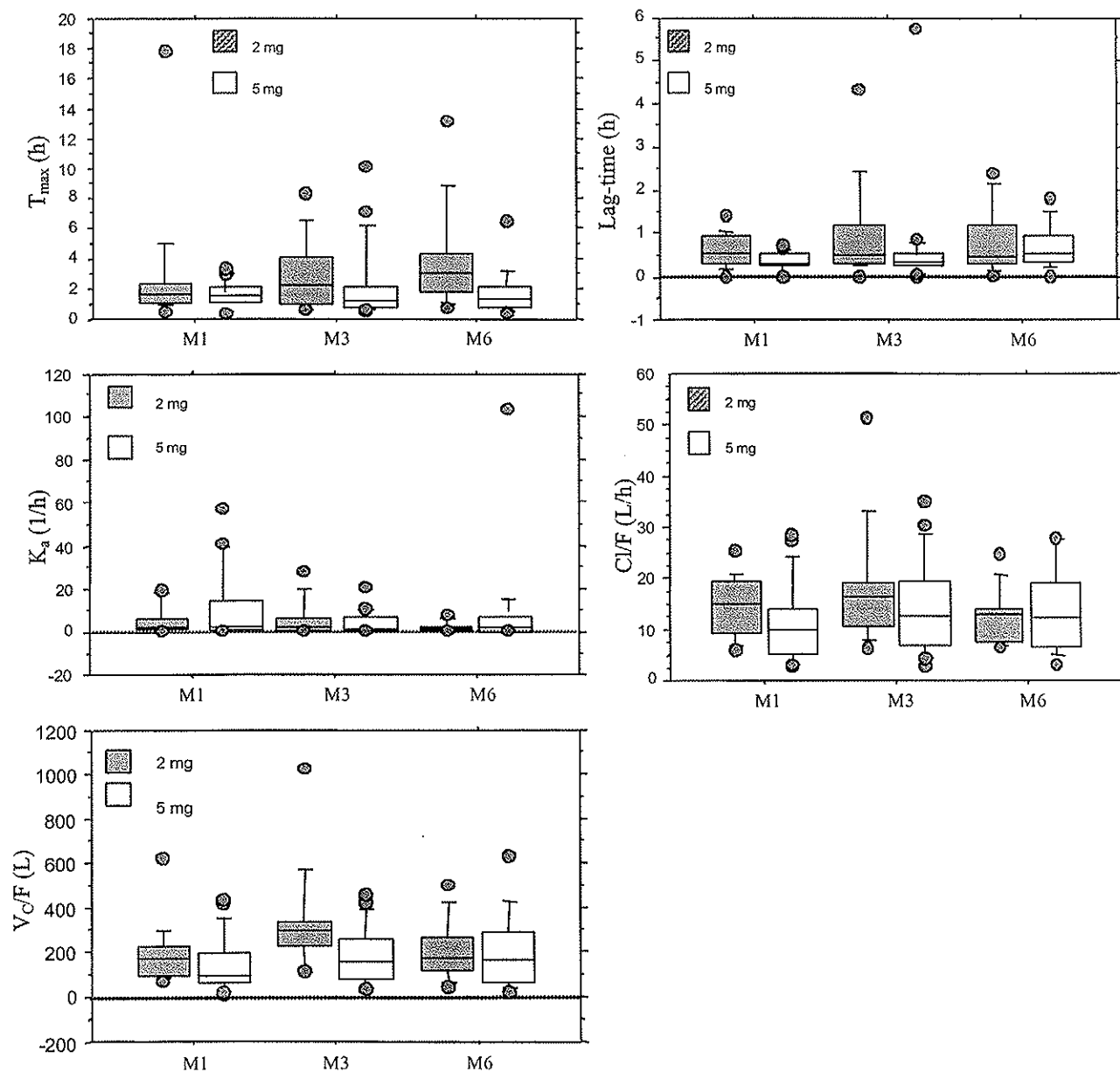


Figure XIII. Indices d'exposition et paramètres pharmacocinétiques estimés par une approche bi-compartimentale individuelle, pondérés par la dose, éclatés par période post-greffe et par groupe de dose.



Le modèle pharmacocinétique utilisé pour l'estimation des profils individuels dans WinNonlin® était adapté pour des profils pharmacocinétiques simples (Figure XIV), mais s'est révélé limité pour les profils plus complexes, en particulier dans le cas des profils d'absorption retardée (Figure XV), et chez les patients présentant un pic secondaire (Figure XVI).

Figure XIV. Profil pharmacocinétique du patient 5356, groupe 2 mg/j, à M6.

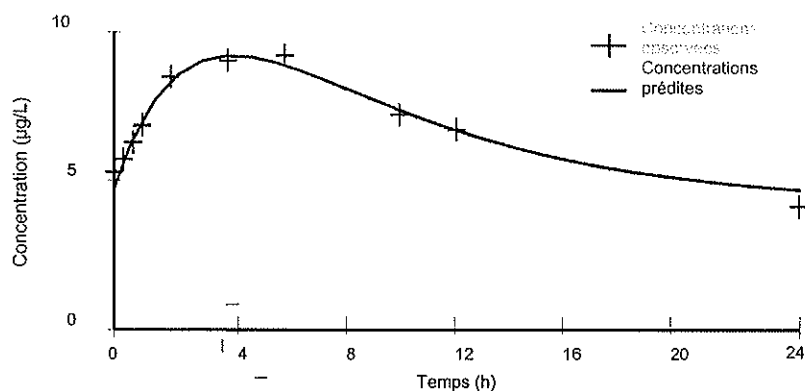


Figure XV. Profil pharmacocinétique du patient 5350, groupe 5 mg/j, à M3.

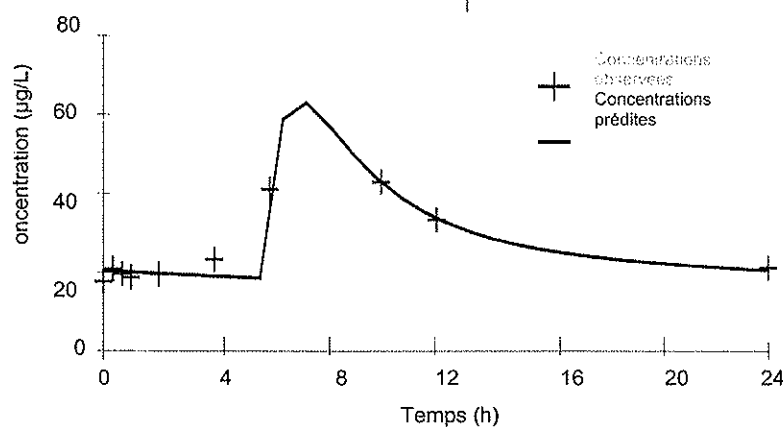
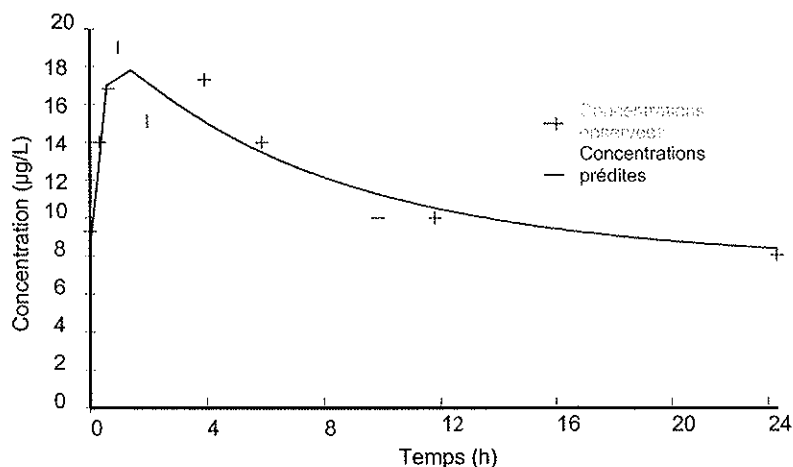


Figure XVI. Profil pharmacocinétique du patient 5367, groupe 2 mg/j, à M1.



IV.1.c Pharmacocinétique de population en une étape

Les principaux modèles pharmacocinétiques et les hypothèses testés sont représentés dans le tableau 9.

Tableau 9. Principales étapes de la construction du modèle structural.

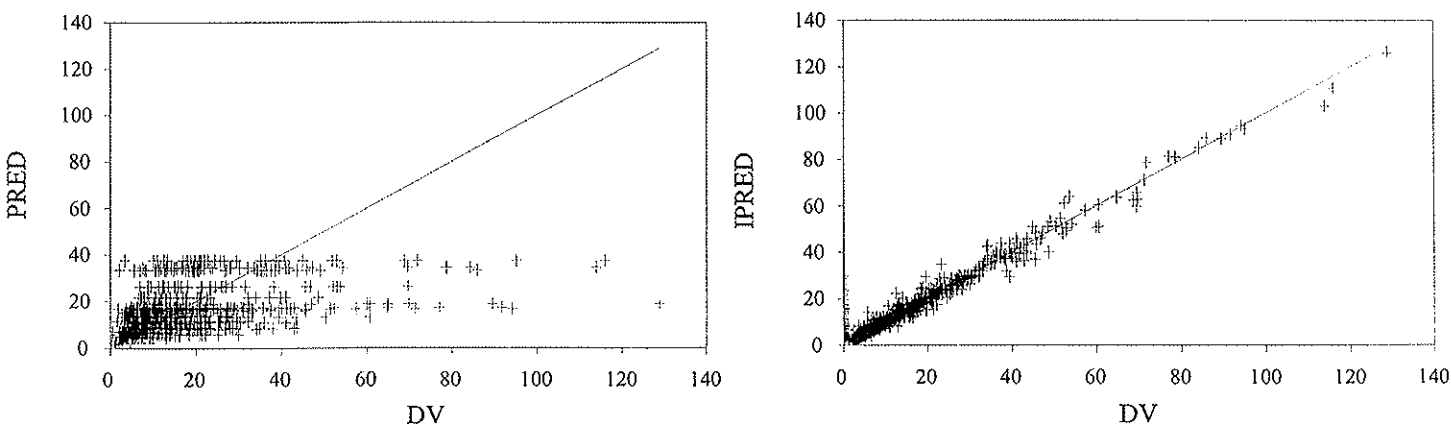
Modèle n°	Description du modèle	Fonction Objective	Remarques
1	1 compartiment Absorption d'ordre 1 avec lag-time Elimination d'ordre 1	4005,127	CV = 34,9 %
2	2 compartiments Absorption d'ordre 1 sans lag-time Elimination d'ordre 1	3798,322	CV = 21,7 %
2 bis	2 compartiments Absorption d'ordre 1 avec lag-time Elimination d'ordre 1	3586,986	CV = 18,0 %
3	3 compartiments Absorption d'ordre 1 avec lag-time Elimination d'ordre 1	3734,294	CV = 18,5 % Erreur add = 2,81
4	2 compartiments Absorption suivant une loi d'Erlang ^[100] Elimination d'ordre 1	3610,394	CV = 19,7 %
5	2 compartiments Absorption de type Michaelis-Menten avec lag-time Elimination d'ordre 1	3538,499	CV = 17,1 %

L'analyse de la fonction objective et de la variabilité résiduelle a permis de montrer que le modèle pharmacocinétique le mieux adapté était un modèle bi-compartmental avec une absorption d'ordre 1 et lag-time, et une élimination du premier ordre.

Entre les modèles n°1 et n°2, un modèle pharmacocinétique bi-compartmental, avec une absorption d'ordre 0 et une élimination du premier ordre, avec et sans lag-time a été testé, sans succès en raison de l'absence de convergence du logiciel.

La droite de régression entre les concentrations observées (DV) et les concentrations prédites par estimation Bayésienne (PRED et IPRED) est représentée figure XVII pour le modèle n°2 bis.

Figure XVII. PRED = f(DV) et IPRED = f(DV) pour le modèle n°2 bis.



L'équation de la droite utilisant le modèle bi-compartmental n°2 bis, $IPRED = 0.976 \cdot DV + 0.605$ avec $R^2 = 0,983$, montre un faible biais (pentes de régression non différentes de 1 et ordonnées à l'origine statistiquement non différente de 0, $p < 0.001$), et révèle la qualité de l'ajustement de ces données ; la droite de régression n'est pas significativement différente de la droite d'identité.

Cependant, dans le contexte de notre étude, la comparaison de l'ajustement entre concentrations observées et concentrations prédites sans tenir compte des concentrations individuelles semble un outil plus pertinent pour juger de la validité de notre modèle pharmacocinétique. En effet, les valeurs PRED sont calculées essentiellement sur la base des valeurs moyennes des paramètres de notre population, et en fonction des doses orales qui varient d'un individu à l'autre. De plus, dans cette étude, nous disposons de profils pharmacocinétiques en 10 points (analyse en données riches). Ainsi, le « poids » de l'individu est prédominant dans le calcul Bayésien des IPRED et l'ajustement avec les concentrations observées reste correct, même lorsque le modèle pharmacocinétique n'est pas optimal.

La droite de régression PRED versus DV obtenue avec le modèle bi-compartmental n°2 bis montre un problème d'ajustement : $PRED = 0,280 \cdot DV + 10,416$ avec $R^2 = 0,217$ (Figure XVII). Toutefois, le modèle à 3 compartiments (modèle n°3) ayant conduit à un biais similaire, il a été décidé de se limiter à un modèle bi-compartmental. Différentes tentatives ont été réalisées afin d'améliorer le modèle choisi. Ainsi, deux autres modèles décrivant la

phase d'absorption ont été testés : loi d'Erlang,^[100] qui est un cas particulier de la loi Gamma,^[101] et absorption de type Michaelis-Menten.

L'examen des courbes individuelles a montré en particulier que les $C_{\max}$ mesurées les plus élevées étaient mal estimées par le modèle (sous-estimées). Compte-tenu de l'hypothèse évoquée lors de l'analyse pharmacocinétique non-compartmentale des données, selon laquelle il semble exister 2 sous-populations, le modèle n°2 bis a été testé en intégrant un paramètre « sous-population », en se basant sur une valeur seuil de $C_{\max}/\text{Dose} = 10 \text{ mL}^{-1}$.

Tableau 10. Modèle n°2 bis appliqué à la population SIR-CsA scindée en 2 sous-populations, « à fort $C_{\max}/\text{Dose}$ » et « à faible $C_{\max}/\text{Dose}$ ».

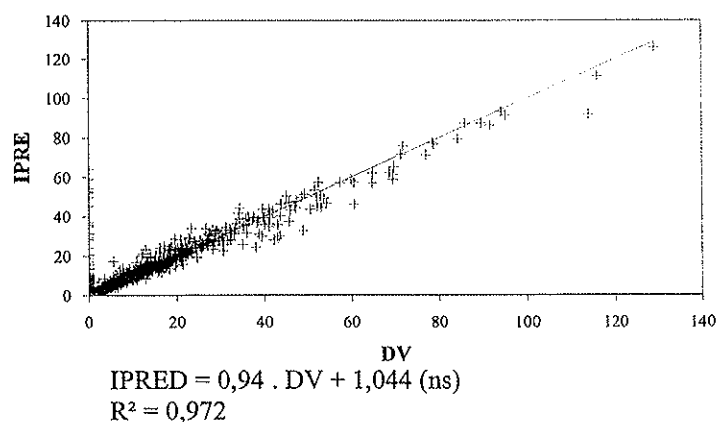
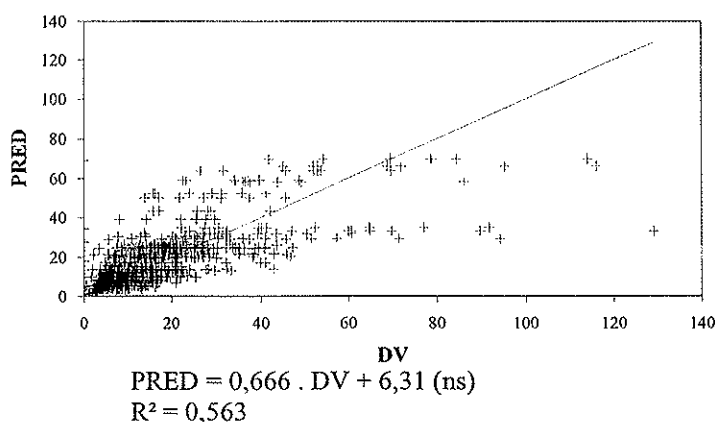
	Sous-population 1 $C_{\max}/\text{Dose} < 10 \text{ mL}^{-1}$ $n = 71$			Sous-population 2 $C_{\max}/\text{Dose} > 10 \text{ mL}^{-1}$ $n = 21$		
	TPV	SD	Variabilité inter- individuelle	TPV	SD	Variabilité inter- individuelle
Cl/F (L/h)	2,79*	0,148	16,7 %	14,4*	0,065	16,7 %
V_c/F (L)	14,3*	0,168	90,3 %	32,4*	0,140	90,3 %
K_a (1/h)	0,19*	0,191	128 %	0,28*	0,077	128 %
Lag-time (h)	0,40	0,228	26,6 %	0,24	0,102	26,6 %
Fonction Objective	3134,121					
CV	6,2 %					

TPV : typical value (valeur moyenne de la population) – SD : standard deviation (écart-type)

* : $p < 10^{-4}$

L'hypothèse de l'existence d'une sous-population « à fort $C_{\max}/\text{Dose}$ » est renforcée par l'amélioration importante de la fonction objective, la diminution de la variabilité résiduelle pour ce modèle (Tableau 10) et l'amélioration de la corrélation PRED versus DV (Figure XVIII) par rapport aux valeurs obtenues dans l'ensemble de la population avec le modèle n°2 bis.

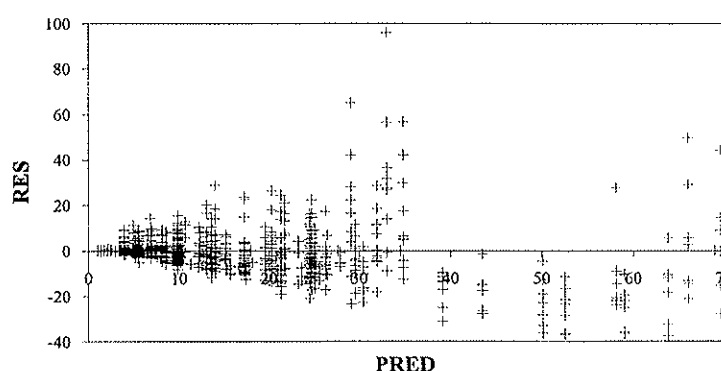
Figure XVIII. PRED = f(DV) et IPRED = f(DV) pour le modèle n°2 bis, appliqué à la population séparée en 2 sous-populations.



Les paramètres calculés au sein de chacune des deux sous-populations à l'aide de ce modèle étaient tous significativement différents, à l'exception du lag-time (Tableau 10). La valeur du $T_{\max}$ de la sous-population 1 était significativement plus élevée que la valeur du $T_{\max}$ de la sous-population 2 (2,6 vs 1,3 h ; $p < 0,05$).

L'analyse des résidus ($RES = PRED - DV$) entre les concentrations prédites ($PRED$) et les concentrations observées (DV) est en accord avec une augmentation proportionnelle des valeurs des résidus en fonction des concentrations prédites. Ceci démontre que les erreurs sur toutes les observations (concentrations sanguines) n'ont pas le même écart-type.

Figure XIX. Analyse des résidus : $RES = f(PRED)$ pour le modèle n°2 bis, appliqué à la population séparée en 2 sous-populations.



L'ensemble des erreurs pondérées ($WRES = RES/VAR$) obtenues montre une répartition homogène autour de l'erreur résiduelle pondérée nulle. Les erreurs pondérées indiquent une dispersion resserrée et comprise dans la fourchette d'intervalle entre -2 et $+2$, donc incluses dans l'intervalle de confiance à 95 % autour de la valeur observée. L'analyse des résidus pondérés n'a pas mis en évidence de biais majeur (Figure XX).

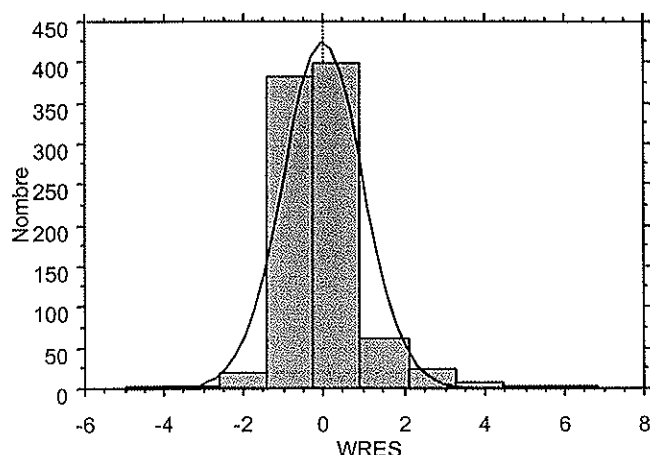


Figure XX. Distribution en fréquence des résidus pondérés ($WRES$).

Chez les patients de la population SIR-CsA, la posologie de la ciclosporine était adaptée sur la base des concentrations résiduelles sanguines en ciclosporine. Les concentrations résiduelles cibles étant différentes en fonction de la période post-transplantation, l'influence de la ciclosporine sur la pharmacocinétique du sirolimus a été testée en considérant le délai post-greffe comme une covariable dans le modèle (faute de connaître les doses de ciclosporine administrées ou les concentrations résiduelles mesurées chez chacun de ces patients). L'intégration de la période dans le modèle a montré que celle-ci n'influait pas la pharmacocinétique du sirolimus : la variation de la ciclosporinémie résiduelle ne semble donc pas modifier la pharmacocinétique du sirolimus.

IV.2 Population 2 : « Population SIR-MMF »

Ce travail présente une analyse pharmacocinétique des données recueillies entre novembre 2002 et juin 2003, date à laquelle 8 patients avaient été inclus dans l'étude CINESIREN, 6 à Limoges et 2 à Reims.

Les patients (4 hommes, 4 femmes) ont entre 20 et 65 ans, pour un âge moyen de 46,5 ans. Un patient est sorti prématurément de l'essai pour rejet aigu cortico-résistant du greffon au 13^{ème} jour après la transplantation. Le traitement par sirolimus a été stoppé et remplacé par du tacrolimus. Les profils pharmacocinétiques ont été réalisés lors de 5 périodes post-transplantation différentes dans le centre de Limoges – J7, J15, fin du 1^{er} mois (M1), fin du 2^{ème} mois (M2), fin du 3^{ème} mois (M3) – et lors de 4 périodes après la greffe dans le centre de Reims – J7, J15, M1, M3.

Tableau 11. Caractéristiques physiopathologiques de la population SIR-MMF (n = 8).

Caractéristiques physiopathologiques	Moyenne (Extrêmes)				
	J7 n = 8	J15 n = 7	M1 n = 6	M2 n = 4	M3 n = 5
Poids (kg)	69 (48 – 90)	67,7 (48 – 90)	68,5 (48 – 90)	70,5 (48 – 90)	71,2 (48 – 90)
Créatininémie ($\mu\text{mol/L}$)	204 (86 – 505)	128 (65 – 322)	11 (65 – 181)	114 (69 – 183)	103 (69 – 147)
Clairance de la créatinine (mL/min)	46,6 (16,7 – 64,8)	75,6 (26,2 – 118)	68,0 (46,6 – 85,0)	66,6 (46,1 – 89,6)	71,5 (55,4 – 93,8)

La clairance de la créatinine a été calculée à l'aide de la formule de Cockcroft – Gault.

Le dernier patient inclus à Limoges pendant la période sur laquelle porte l'analyse des données ayant été greffé le 5 mai, ne sont disponibles pour l'analyse que les premières cinétiques, J7 et J15. L'un des 2 patients du centre de Reims n'ayant pas encore atteint son 3^{ème} mois de greffe à cette date, le dernier profil pharmacocinétique n'avait pas encore été réalisé.

IV.2.a Approche non-compartimentale

Les indices d'exposition moyens de la population SIR-MMF, déterminés selon une approche non-compartimentale pour chacune des périodes, sont représentés dans le tableau 12.

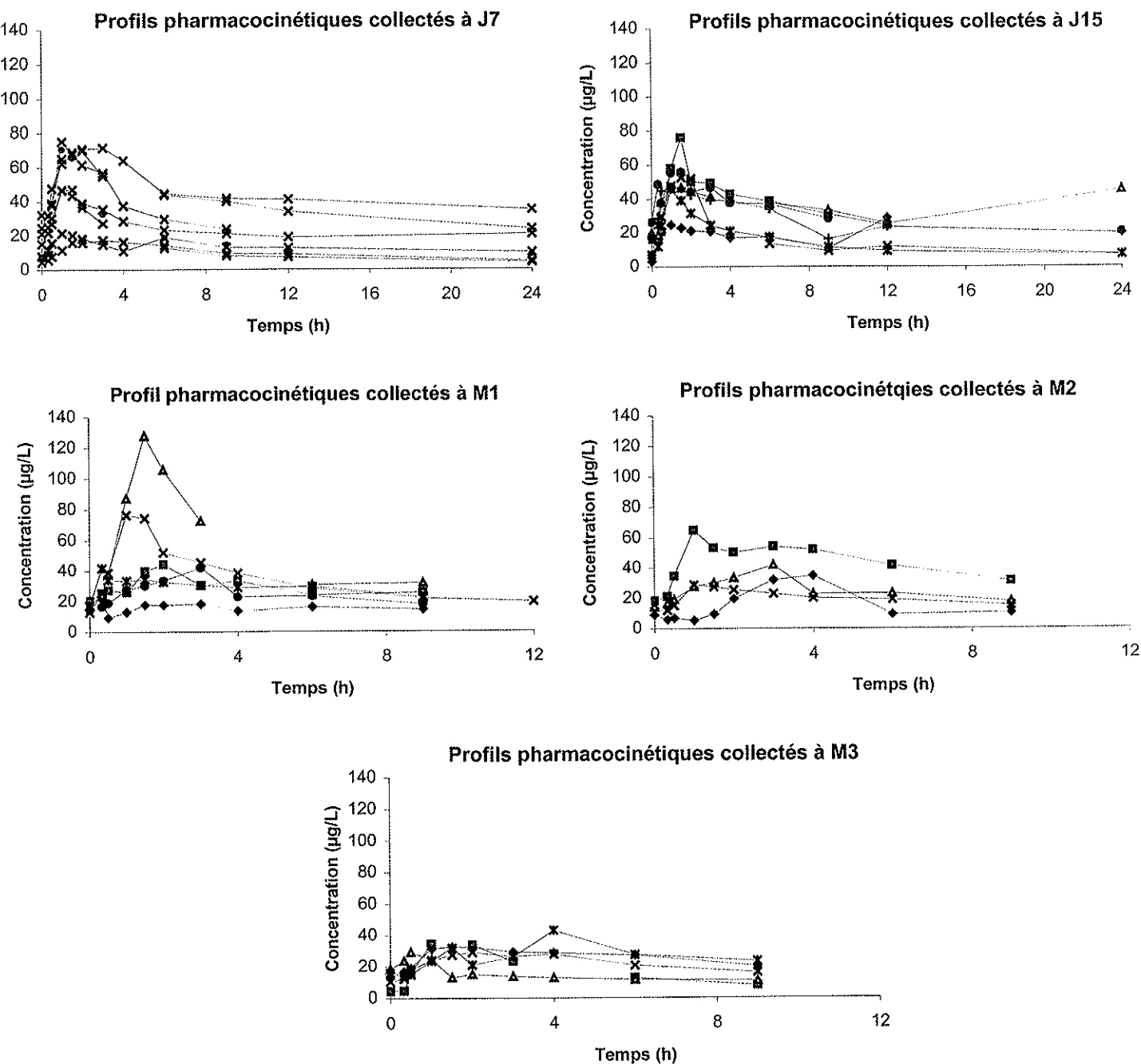
Tableau 12. Indices d'exposition de la population SIR-MMF, déterminés selon une approche non-compartimentale (moyenne $\pm$ écart-type).

	J7 <i>n</i> = 8	J15 <i>n</i> = 7	M1 <i>n</i> = 6	M2 <i>n</i> = 4	M3 <i>n</i> = 5
Dose quotidienne moyenne (mg)	10 $\pm$ 0,0	9,9 $\pm$ 2,7	9,3 $\pm$ 5,9	5,8 $\pm$ 1,7	6,6 $\pm$ 3,6
AUC₀₋₂₄ trapèzes (h, μg/L)	535 $\pm$ 332 (<i>n</i> = 7)	579 $\pm$ 233 (<i>n</i> = 5)	—	—	—
AUC₀₋₉ trapèzes (h, μg/L)	282 $\pm$ 181	279 $\pm$ 89,6	289 $\pm$ 120	234 $\pm$ 110	185 $\pm$ 55,2
C₀ (μg/L)	15,2 $\pm$ 10,0	13,8 $\pm$ 10,4	16,8 $\pm$ 2,90	12,3 $\pm$ 4,06	12,4 $\pm$ 5,35
C_{max} (μg/L)	52,5 $\pm$ 23,1	49,9 $\pm$ 15,2	59,1 $\pm$ 38,1	39,4 $\pm$ 17,3	32,2 $\pm$ 7,71
T_{max} (h)	1,71 $\pm$ 0,87	1,37 $\pm$ 0,25	1,37 $\pm$ 1,03	2,10 $\pm$ 1,59	1,90 $\pm$ 1,34

Des profils pharmacocinétique complets, entre 0 et 24 heures, devaient être réalisés lors des deux premières périodes, J7 et J15, les patients étant hospitalisés. Toutefois, compte-tenu de problèmes d'organisation de service certains profils sont incomplets à J7 et à J15, ne permettant pas le calcul des AUC complètes entre 0 et 24 heures. C'est pourquoi, dans un souci de comparabilité des profils, sont présentés dans le tableau 12 les calculs d'AUC complètes et d'AUC tronquées entre 0 et 9 heures.

La figure XXI met en évidence la grande variabilité interindividuelle des profils pharmacocinétiques.

Figure XXI. Profils pharmacocinétiques collectés lors des différentes périodes après la transplantation.



IV.2.b Approche individuelle compartimentale

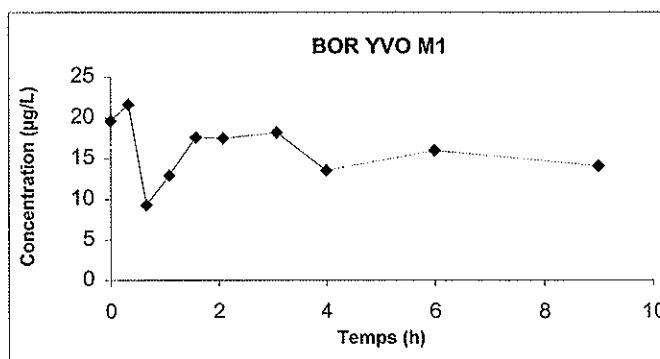
Les profils pharmacocinétiques individuels ont été modélisés grâce au même modèle bi-compartimental que celui utilisé pour modéliser les profils de la population SIR-CsA.

Tableau 13. Paramètres pharmacocinétiques et indices d'exposition estimés dans la population SIR-MMF à chaque période post-transplantation : moyenne (extrêmes).

	J7 <i>n</i> = 8	J15 <i>n</i> = 7	M1 <i>n</i> = 5	M2 <i>n</i> = 4	M3 <i>n</i> = 5
<i>C</i> ₀ <i>est.</i> ($\mu\text{g/L}$)	13,9 (0,19 – 93,4)	15,4 (6,98 – 25,5)	14,6 (9,40 – 21,1)	11,2 (6,31 – 16,5)	10,8 (3,66 – 15,6)
<i>C</i> _{max} <i>est.</i> ($\mu\text{g/L}$)	43,6 (11,6 – 65,3)	60,0 (15,0 – 188)	60,9 (34,1 – 116)	33,0 (18,5 – 65,9)	20,2 (7,87 – 50,4)
<i>T</i> _{max} <i>est.</i> (<i>h</i>)	1,46 (0,78 – 3,00)	1,29 (1,07 – 1,68)	1,28 (0,06 – 2,19)	1,94 (0,94 – 3,32)	1,47 (0,38 – 2,48)
<i>AUC</i> ₀₋₂₄ <i>est.</i> (<i>h</i> , $\mu\text{g/L}$)	755 (241 – 1779)	744 (241 – 1326)	895 (733 – 1058)	844 (564 – 1189)	441 (377 – 532)
Lag-time (<i>h</i>)	0,49 (0,24 – 0,98)	0,30 (0 – 0,96)	0,25 (0,01 – 0,44)	0,34 (0,25 – 0,47)	0,42 (0,05 – 0,96)
<i>K</i> _a (1/ <i>h</i>)	8,16 (0,45 – 18,6)	2,74 (0,63 – 8,95)	36,7 (1,03 – 177)	3,7 (1,01 – 7,8)	7,95 (0,54 – 20,8)
<i>Cl/F</i> (<i>L/h</i>)	23,2 (8,43 – 41,6)	22,9 (11,3 – 41,5)	14,7 (11,6 – 20,5)	8,73 (5,27 – 10,6)	20,8 (7,51 – 53,0)
<i>V</i> _c / <i>F</i> (<i>L</i>)	220 (103 – 408)	167 (57,1 – 362)	177 (51,6 – 366)	156 (86,9 – 218)	352 (166 – 793)

Les paramètres pharmacocinétiques et d'exposition obtenus avec ce modèle sont présentés dans le tableau 13. Un des profils pharmacocinétiques collectés à M1 a dû être exclu, car celui-ci était « douteux » (échantillons dosés à plusieurs reprises, excluant une erreur d'origine analytique) et impossible à modéliser (Figure XXII).

Figure XXII. Profil « douteux » collecté à M1, impossible à modéliser.



Les AUC calculées par RNL étant les AUC sur 24 heures, elles n'ont pas été comparées aux AUC calculées par la méthode des trapèzes, la majorité d'entre elles étant tronquées à 9 heures. En revanche la qualité de la modélisation avec l'approche individuelle bi-compartimentale a été évaluée en comparant les concentrations calculées par RNL aux concentrations mesurées (Tableau 14).

Tableau 14. Comparaison des concentrations estimées par RNL aux concentrations mesurées : biais, RMSE, équation de la droite de régression.
Les pentes et les ordonnées à l'origine ne différaient pas statistiquement de 1 et de 0 respectivement, sauf mention (* : $p < 0,05$)

	J7	J15	M1	M2	M3	Toutes les périodes
<i>Biais (%)</i>	- 21,8	41,0	- 10,6	- 9,4	- 11,8	- 1,28
<i>RMSE (%)</i>	42,1	79,9	22,3	16,0	16,5	46,9
<i>Droite de régression</i>						
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	1,006.x – 2,34	0,803.x + 4,60	0,964.x – 1,093	0,968.x – 0,662	0,738.x + 1,66	0,888.x + 0,744
<i>Biais (%)</i>	- 17,8	7,12	- 8,92	- 20,7	- 35,3	- 13,7
<i>RMSE (%)</i>	20,9	56,9	9,23	18,8	45,0	35,0
<i>Droite de régression</i>						
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	0,768.x + 3,979	4,732.x – 188*	0,925.x – 0,673	1,252.x – 16,359	0,037*.x + 19,016*	1,166.x – 15,052
<i>Biais (%)</i>	- 4,03	8,70	- 1,26	1,07	2,84	1,45
<i>RMSE (%)</i>	23,6	31,6	14,2	16,1	20,8	23,5
<i>Droite de régression</i>						
<i>Concentrations</i> ($\mu\text{g/L}$)	0,994.x – 0,223	0,981.x + 1,929	0,963.x + 0,768	0,979.x + 0,601	0,790.x + 4,032*	0,974.x + 0,906

V DISCUSSION

Cette étude nous a permis de développer un modèle pharmacocinétique pour le sirolimus et d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de population de ce médicament chez des transplantés rénaux récents.

La pharmacocinétique du sirolimus a été abordée dans un premier temps selon une approche individuelle, afin d'orienter l'analyse pharmacocinétique et d'obtenir une première description des populations étudiées. Elle a nécessité de rechercher le modèle structural de base le mieux adapté. Le modèle à deux compartiments utilisé s'est avéré meilleur que le modèle mono-compartimental, conformément aux données de la littérature.^[4] L'analyse des valeurs individuelles estimées confirme que la pharmacocinétique du sirolimus est caractérisée par une très grande variabilité inter-individuelle.^[64,71,75,77,78,80,97]

Globalement, les valeurs estimées dans cette étude sont en accord avec les valeurs décrites dans la littérature : clairance apparente comprise entre 10 et 20 L/h,^[80] volume de distribution apparent légèrement inférieur aux volumes décrits dans la littérature, mais, néanmoins, élevé et très variable (volume de distribution apparent moyen compris entre 144 et 332 L selon le groupe de dose et la période post-transplantation dans la population SIR-CsA, et valeur maximale de 793 L chez l'un des patients de la population SIR-MMF), pour des valeurs de 5,6 à 16,7 L/kg dans la littérature (soit entre 300 et 2500 L environ pour des individus pesant 70 kg).^[64,76] Le volume de distribution apparent calculé en POSTHOC dans la population SIR-CsA semble toutefois plus faible ($V_C/F = 14,3 \pm 0,168$ et $32,4 \pm 0,140$ L respectivement dans les populations « à faible $C_{\max}/\text{Dose}$ » et « à fort $C_{\max}/\text{Dose}$ ») ; en effet, ce dernier correspond au volume apparent du compartiment central alors que le volume de distribution estimé par l'approche individuelle et décrit dans la littérature représente le volume apparent à l'état d'équilibre (V_{ss}/F).

L'importante disparité des profils pharmacocinétiques du sirolimus a été retrouvée dans les deux populations étudiées dans le cadre de cette étude (SIR-CsA et SIR-MMF). Ainsi, si les profils d'absorption et d'élimination peuvent être qualifiés de « simples » chez certains patients, d'autres, au contraire, présentent des profils pharmacocinétiques plus « complexes », avec une absorption ralentie ou retardée, et parfois, l'existence d'un second pic plus tardif, pouvant caractériser une absorption en deux phases ou une réabsorption. Or, le modèle

pharmacocinétique choisi dans cette étude (modèle bi-compartmental avec absorption et élimination du premier ordre et lag-time) permet de modéliser la pharmacocinétique du sirolimus lorsque celui-ci présente un profil d'absorption et d'élimination relativement simple, mais reste pour l'heure moins bien adapté aux profils plus complexes.

La difficulté à modéliser les profils complexes est objectivée par des valeurs élevées de biais et de RMSE des concentrations estimées par rapport aux concentrations observées dans la population SIR-MMF, en approche individuelle (Tableau 14). Aucun modèle pharmacocinétique plus sophistiqué, capable de modéliser de tels profils, n'a été proposé pour le sirolimus. Pourtant de tels modèles, capables de prendre en compte les profils atypiques, en particulier les profils présentant 2 pics, ont été décrits pour d'autres médicaments, tels que la ranitidine^[99] et la ciclosporine.^[102,103]

La recherche du modèle pharmacocinétique structural le mieux adapté au profil du sirolimus a également porté sur le mode d'élimination. Il n'a été mis en évidence aucun effet de la dose sur la clairance d'élimination, impliquant que l'élimination du sirolimus est linéaire, et ne dépend donc pas d'un mécanisme saturable. Une élimination de type Michaelis-Menten n'a d'ailleurs apporté aucune amélioration dans la modélisation de la pharmacocinétique du sirolimus.

L'analyse de la pharmacocinétique de population du sirolimus a mis en évidence l'existence probable de deux sous-populations, la première présentant de faibles valeurs de $C_{\max}/\text{Dose}$ (inférieures à 10 mL^{-1}), et la seconde étant caractérisée par de fortes valeurs de $C_{\max}/\text{Dose}$ (supérieures à 10 mL^{-1}). La valeur de $C_{\max}/\text{Dose}$ atteint $51,6 \text{ mL}^{-1}$ dans cette deuxième sous-population. La sous-population « à faible $C_{\max}/\text{Dose}$ » (sous-population 1) est celle dans laquelle l'effectif est le plus grand ($n = 71$). Les patients de cette sous-population présentent une faible constante d'absorption, ainsi qu'une clairance et un volume de distribution central apparents (Cl/F et V_C/F) plus faibles que les patients de la sous-population « à fort $C_{\max}/\text{Dose}$ » (sous-population 2). Ces constatations ne permettent pas de déterminer avec certitude l'origine de ces différences entre les deux sous-populations, mais Il semble toutefois intéressant d'envisager l'exploration de la variabilité de la biodisponibilité :

- en étudiant l'impact de la co-administration de médicaments inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques sur la biodisponibilité

- en réalisant une étude de phénotypage et de génotypage des patients en ce qui concerne la P-gp, protéine d'efflux limitant l'absorption intestinale, et sur les CYP 3A4 et 3A5, enzymes impliquées dans le métabolisme du sirolimus et responsables de l'effet de premier passage hépatique et intestinal.

En effet, la biodisponibilité du sirolimus étant faible (de l'ordre de 14 %),^[77] de faibles variations de l'absorption ou du métabolisme du sirolimus peuvent induire de très grandes variations de l'exposition du patient à la molécule.

La base de données des profils pharmacocinétiques de la population SIR-CsA ne mentionnant aucune covariable en dehors du délai post-greffe, seule celle-ci a pu être évaluée : elle n'a montré aucune influence sur la pharmacocinétique du sirolimus. En revanche, l'étude CINESIREN en cours étant prospective, un suivi particulier des covariables physiopathologiques est effectué. Cette analyse pourra donc être réalisée au terme de l'étude CINESIREN.

Une comparaison pharmacocinétique des 2 populations SIR-CsA et SIR-MMF est également envisagée à l'issue de l'étude CINESIREN, afin d'évaluer l'importance des interactions sirolimus – ciclosporine et sirolimus – mycophénolate mofétil.

Le nombre d'inclusions dans l'étude CINESIREN en 6 mois a été plus faible que celui initialement prévu, expliquant le petit effectif dont on dispose pour l'analyse des données sur la période allant de novembre à juin 2003. Ce retard dans les inclusions est liée à une baisse significative du nombre de transplantations rénales en France, et en particulier à Limoges et à Reims, depuis le début de l'année 2003.

Toutefois, fin septembre 2003, l'ensemble des inclusions prévues dans le protocole était réalisé, mais l'analyse des échantillons et des résultats n'était pas terminée au moment de la rédaction de ce travail.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La transplantation rénale constitue une avancée majeure dans la prise en charge des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale. Elle a énormément progressé depuis l'avènement des immunosuppresseurs spécifiques, en particulier depuis la découverte de la ciclosporine au début des années 1970. L'enjeu de tels traitements est primordial, puisque leur utilisation a pour objectif de diminuer au maximum le risque de rejet du greffon. Les effets toxiques et thérapeutiques des médicaments immunosuppresseurs dépendent en grande partie de leur concentration sanguine. Ces médicaments sont caractérisés par un index thérapeutique étroit, ce qui rend leur manipulation difficile. C'est pourquoi ils font tous l'objet d'un suivi thérapeutique pharmacologique. Or, pour être optimal, le STP nécessite de bien connaître la pharmacocinétique de ces molécules.

Le sirolimus est le dernier médicament à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché dans le domaine de l'immunosuppression. On a pour l'heure peu de recul sur l'utilisation de ce produit, peu d'études pharmacocinétiques ont été publiées, et aucune étude de pharmacocinétique ou de pharmacodynamie de population ne figure dans la littérature. Or l'utilisation pertinente et sûre du sirolimus comme médicament immunosuppresseur dans la prévention du rejet aigu de greffe rénale nécessite d'en connaître les propriétés pharmacocinétiques, les relations concentration – efficacité et concentration – toxicité, et de développer les outils de suivi thérapeutique pharmacologique. Pour cela, des études de pharmacocinétique clinique sont indispensables, afin de mieux prévoir le devenir et l'activité du médicament dans l'organisme.

Ce travail présente une première analyse de la pharmacocinétique de population du sirolimus, en association avec la ciclosporine. Toutefois, cette analyse présente des limites car il s'agit pour une part d'une étude rétrospective (SIR-CsA), dans laquelle peu de données étaient disponibles (en particulier, manque de covariables). Par ailleurs, une étude prospective de la pharmacocinétique du sirolimus associé au mycophénolate mofétil a débuté en novembre 2003. Toutes les inclusions ont été effectuées à ce jour, mais l'ensemble des données n'est pas disponible pour l'heure, tous les patients n'ayant pas encore atteint le troisième mois post-greffe. Néanmoins, l'analyse des données des deux populations étudiées a confirmé l'importante variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du sirolimus. De plus, l'existence de profils pharmacocinétiques atypiques, caractérisés une absorption retardée et/ou des pics secondaires (Figures XV et XVI), a été mise en évidence dans les deux études.

D'autre part, l'analyse des données disponibles dans la population SIR-MMF a mis en évidence des problèmes de respect du protocole dans la réalisation des prélèvements, dans le cadre de la collecte de profils pharmacocinétiques à données riches. L'intérêt de la pharmacocinétique de population est de pouvoir se contenter de profils pharmacocinétiques incomplets, voire constitués d'un nombre très limité de prélèvements (jusqu'à un seul par patient). Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un modèle pertinent, permettant d'envisager la mise au point ultérieure d'estimateurs Bayesiens de la pharmacocinétique avec une stratégie de prélèvements limités. L'intérêt d'une telle stratégie est de la rendre compatible avec le fonctionnement de routine d'un service clinique, de limiter la spoliation sanguine et, si possible, de réaliser les prélèvements sur une courte période après la prise du médicament, ce qui épargne au patient une journée d'hospitalisation. Cette stratégie offre également une plus grande souplesse dans les horaires de prélèvements, dès lors qu'ils sont connus avec exactitude. Cette stratégie est déjà utilisée en routine, avec succès, pour le suivi thérapeutique pharmacologique de la ciclosporine,^[93-95,101] et elle est en cours de développement par l'équipe DEXO (Université de Limoges) pour les autres immunosuppresseurs, tels que le tacrolimus et le mycophénolate mofétil.

Actuellement, l'adaptation de posologie du sirolimus est faite sur la base du suivi des concentrations résiduelles, sans qu'il ait été démontré qu'il s'agissait là de l'indice d'exposition optimal, ni que les cibles proposées aient été justifiées par des études cliniques prospectives. La disponibilité d'estimateurs Bayesiens rendrait plus aisée la réalisation d'études rétrospectives concernant les index les mieux corrélés au succès thérapeutique et/ou aux effets indésirables, suivies éventuellement d'études prospectives comparatives comparant 2 indices d'exposition ou plus, puis d'études prospectives comparatives de type « exposition contrôlée » pour définir les valeurs cibles d'exposition.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol*. 1997 ; 37(5) : 405 – 415.
2. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation : a review of the evidence. *Kidney Int*. 2001 ; 59(1) : 3 – 16.
3. Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW. Rapamycin : distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations : an update. *Clin Biochem*. 1998 ; 31(5) : 345 – 351.
4. Ferron GM, Mishina EV, Jusko WJ, Zimmerman JJ. Population pharmacokinetics of sirolimus. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 ; 63(4) : 494.
5. Küss R, Bourget P. Une histoire illustrée de la greffe d'organes – La grande aventure du siècle. Ed Sandoz, 1992.
6. Legendre C, Thervet E, Chrétien Y, Noël LH, Lacombe M, Chkoff N, Hélénon O, Mamzer-Bruneel MF, Zucman S, Chatenoud L, Pol S, Cantarovich F, Kreis H. Aspects cliniques et thérapeutiques de la transplantation rénale chez l'adulte. *Encycl Med Chir Néphrol Urol*. 18-067-D-20. Paris : Editions techniques, 1995 : 20 p.
7. Rapport du Conseil Médical et Scientifique de l'Etablissement français des Greffes – <http://www.efg.fr>. (consulté le 23/09/03)
8. Code de la Santé Publique, article L1232-1.
9. Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and II. *Transplantation*. 2002 ; 73(8) : 1269 – 1273.
10. United Network for Organ Sharing – <http://www.unos.org>. (consulté le 23/09/03)
11. Transplant activity in the UK 2002-2003 – <http://www.uktransplant.org.uk>. (consulté le 23/09/03)
12. <http://www.scandiatriansplant.org>. (consulté le 23/09/03)
13. <http://www.swisstransplant.org>. (consulté le 23/09/03)
14. Code de la Santé Publique, article L1231-1.
15. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *New Engl J Med*. 1995 ; 333(6) : 333 – 336.
16. Cecka JM. The UNOS scientific renal transplant registry. *Clin Transpl*. 1999 : 1 – 21.
17. Najarian JS, Chavers BM, McHugh LE, Matas AJ. 20 years or more of follow-up of living kidney donors. *Lancet*. 1992 ; 340(8831) : 1354 – 1355.
18. Johnson EM, Najarian JS, Matas AJ. Living kidney donation : donor risks and quality of life. *Clin Transpl*. 1997 ; 231 – 240.

19. Johnson EM, Remucal MJ, Gillingham KJ, Dahms RA, Najarian JS, Matas AJ. Complications and risks of living donor nephrectomy. *Transplantation*. 1997 ; 64(8) : 1124 – 1128.
20. William SL, Oler J, Jorkasky DK. Long-term renal function in kidney donors : a comparison of donors and their siblings. *Ann Intern Med*. 1986 ; 105(1) : 1 – 8.
21. Goldfarb DA, Martin SF, Braun WE, Schreiber MJ, Mastroianni B, Papajcik D, Rolin HA, Flechner S, Goormastic M, Novick AC. Renal outcome 25 years after donor nephrectomy. *J Urol*. 2001 ; 166(6) : 2043 – 2047.
22. Fehrman-Ekholm I, Duner F, Brink B, Tyden G, Elinder CG. No evidence of accelerated loss of kidney function in living kidney donors : results from a cross-sectional follow-up. *Transplantation*. 2001 ; 72(3) : 444 – 449.
23. Cho YW, Cecka JM. Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991 – 2000. *Clin Transpl*. 2001 ; 237 – 246.
24. Karuppan SS, Lindholm A, Moller E. Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney transplanted patients selection criteria based on crossmatching. *Transplantation*. 1992 ; 53(3) : 666 – 673.
25. Cook DJ, Fettouh HI, Gjertson DW, Cecka JM. Flow cytometry crossmatching (FCXM) in the UNOS Kidney Transplant Registry. *Clin Transpl*. 1998 ; 413 – 419.
26. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE, Lou CD, Garovoy MR, Bachetti P, Ascher NL, Melzer JS, Roberts JP, Stock PF. Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplant. *Clin Transplant*. 2000 ; 14(2) : 167 – 173.
27. Pelletier RP, Adams PW, Hennessy PK, Drosz CG. Comparison of crossmatch results obtained by ELISA, flow cytometry, and conventional methodologies. *Hum Immunol*. 1999 ; 60(9) : 855 – 861.
28. Kahan BD, Clark JH. Transplantation of solid organs. In *Samter's immunologic diseases*, 5th edition. Chap. 82.
29. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New Engl J Med*. 1969 ; 280(14) : 735 – 739.
30. Katz SM, Kimball PM, Ozaki C, Monsour H, Clark J, Cavazos D, Kahan BD, Wood RP, Herman RH. Positive pretransplant crossmatches predict early graft loss in liver allograft recipients. *Transplantation*. 1994 ; 57(4) : 616 – 620.
31. Le Bas-Bernadet S, Hourmant M, Valentin N, Paitier C, Girard-Class M, Curry S, Follea G, Souillou JP, Bignon JD. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation*. 2003 ; 75(4) : 477 – 482.
32. Moller E, Soderberg-Naucleer C, Sumitran-Karuppan S. Role of alloimmunity in clinical transplantation. *Rev Immunogenet*. 1999 ; 1(3) : 309 – 322.
33. Male, Cooke, Owen, Trowsdale, Champion. Antigen binding molecules – Class I and II of the MHC. In *Advanced Immunology*, 3rd edition. Ed. Mosby. Chap 4, p.4.1.

34. Kahan BD, Reisfield RA, Pellegrino MA, Curtoni ES, Mattivz PL, Cepellini R. Water-soluble human transplantation antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968. 61(3) : 897 – 904.
35. Reche PA, Reinherz EL. Sequence variability analysis of human class I and II MHC molecules : functional and structural correlates of amino-acid polymorphisms. *J Mol Biol*. 2003 ; 331(3) : 623 – 641.
36. Thorsby E, Moen T, Solheim BG, Albrechtsen D, Jakobsen A, Jervel J, Halvorsen S, Flatmark A. Influence of HLA matching in cadaveric renal transplantation experience from one Scandiatransplant center. *Tissue antigens*. 1981 ; 17(1) : 83 – 90.
37. Busson M, Raffoux C, Bouteiller AM, Beterel H, Cambon-Thonssen A, Fizet O, Fauchet R, Mercier P, Seignalet J, Bignon JD, et al. Influence of HLA-A, B and DR on the outcome of kidney transplant survival in preimmunized patients. *Transplantation*. 1984 ; 38(3) : 227 – 230.
38. Opelz G, Schwarz V, Engemann A, Back D, Wilk M, Keppel E. Long-term impact of LA matching on kidney graft survival in cyclosporine-treated patients. *Transpl Proc*. 1991 ; 23(1Pt1) : 373 – 375.
39. Muller-Steinhardt M, Fricke L, Kirchner H, Hoyer J, Kluter H. Monitoring of anti-HLA class I and II antibodies by flow cytometry in patients after first cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2000 ; 14(1) : 85 – 89.
40. Falkenburg JH, van de Corput I, Marijt EW, Willenze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2003 ; 743 – 751.
41. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Lei HY. All chronic rejection failures of kidney transplant were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002 ; 74(8) : 1192 – 1194.
42. TPIS : Transplant Pathology Internet Services –
<http://tpis.upmc.edu/tpis/schema/KNCode97.html>
43. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. 1966 ; 2(7465) : 662 – 665.
44. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvien RH. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol*. 2003 ; 25(2) : 119 – 140.
45. Kasiske BL. Clinical correlates to chronic allograft rejection. *Kidney Int. Suppl*. 1997 ; 63 : S71 - S74.
46. Puyoo O, Rostaing L, Bernard E, Cisterne JM, Modesto A, Durand D. Risk factors of chronic rejection after renal transplantation : retrospective study of 201 patients. *Transplant Proc*. 1998 ; 30(6) : 2804 – 2806.
47. Arias M. Impact of the delayed graft function in hypersensitized kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2003 ; 35(5) : 1655 – 1657.
48. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin Transplant*. 1997 ; 11(5Pt1) : 366 – 372.

49. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D. Inadequate donor size in cadaver kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2002 ; 13(8) : 2152 – 2159.
50. Koomans HA, Ligtenberg G. Mechanisms and consequences of arterial hypertension after renal transplantation. *Transplantation.* 2001 ; 72(6 Suppl.) : S9 – S12.
51. Najarian JS, Simmons RL, Condie RM, Thompson EJ, Fryd DS, Howard RJ, Matas AJ, Sutherland DE, Ferguson RM, Schmidtke JR. Seven years' experience with antilymphoblast globulin for renal transplantation from cadaver donors. *Ann Surg.* 1976 ; 184 : 352 – 368.
52. Parlevliet KJ, Schellekens PT. Monoclonal antibodies in renal transplantation: a review. *Transplant Int.* 1992. 5 : 234 – 246.
53. Waid TH, Lucas BA, Thompson JS, Brown SA, Munch L, Presbeck RJ, Jezek D. Treatment of acute cellular rejection with T10B9.1A-31 or OKT3 in renal allograft recipients. *Transplantation.* 1992 ; 53 : 80 – 86.
54. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin-1 in U937 cells. *J Immunol.* 1987 ; 139 : 4129 – 4134.
55. Zanker B, Walz G, Wieder KJ, Strom TB. Evidence that glucocorticoids block expression of the human interleukin-6 gene by accessory cells. *Transplantation.* 1990 ; 49 : 183 – 185.
56. Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC. Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma interferon messenger RNA. *J Immunol.* 1984 ; 133 : 273 – 276.
57. Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli D, Frati L, Gulino A. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med.* 1992 ; 175 : 637 – 646.
58. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994 ; 331 : 365 – 376.
59. Fliri H, Baumann G, Enz A, Kallen J, Luyten M, Mikol V, Mowa R, Quesniaux V, Schreier M, Walkinshaw M. Cyclosporins: structure – activity relationships. *Ann NY Acad Sci.* 1993 ; 696 : 47 – 53.
60. Liu J. FK-506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today.* 1993 ; 14 : 290 – 295.
61. Soldin SJ. Immunophilins : their properties and their potential role in therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2000 ; 22 : 44 – 46.
62. Rao A. NF-AT : a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today.* 1994 ; 15 : 274 – 281.
63. Schreiber SL. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathway. *Cell.* 1992 ; 70 : 365-368.

64. McDonald A, Scarola J, Burke JT, Zimmerman JJ. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clin Ther* 2000 ; 22(B) : B101 – B121.
65. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs*. 1993 ; 45(6) : 953 – 1040.
66. Zenke G, Baumann G, Wenger R, Hiestand P, Quesniaux V, Andersen V, Schreirer MH. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporins. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 ; 685 : 330 – 335.
67. Snyder SH, Sabatini DM. Immunophilins and the nervous system. *Nature Med*. 1995 ; 1(1) : 32 – 37.
68. Noble S, Markham A. Cyclosporine. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a micro-emulsion-based formulation (Neoral®). *Drugs*. 1995 ; 50(5) : 924 – 941.
69. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann. NY Acad Sci*. 1993 ; 696 : 9 – 19.
70. Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside : history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit* 2001 ; 23(5) : 559 – 586.
71. Vasquez EM. Sirolimus : a new agent for prevention of renal allograft rejection. *Am J Health-Syst Pharm* 2000 ; 57 : 437 – 448.
72. Kahan BD. Sirolimus : a comprehensive review. *Expert Opin Pharmacother*. 2001 ; 2(11) : 1903 – 1917.
73. Goodman & Gilman. Bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9ème édition (édition française). Ed. McGraw-Hill. Chap. 52 : Immunomodulateurs – Médicaments immunosuppresseurs et immunomodulants.
74. Résumé des caractéristiques du produit.
75. Gallant-Haidner HL, Trepanier DJ, Freitag DG, Yascoff RW. Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus. *Ther Drug Monit*. 2000 ; 22(1) : 31 – 35.
76. Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol*. 1997 ; 37 : 405 – 415.
77. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Toxicity and efficacy of sirolimus : relationship to whole-blood concentrations. *Clin Ther*. 2000 ; 22(B) : B93 – 100.
78. Mahalati K, Kahan BD. Clinical pharmacokinetics of sirolimus. *Clin Pharmacokinet*. 2001 ; 40(8) : 573 – 585.
79. Rapamune (sirolimus) solution package insert. Philadelphia : Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals, Inc. 1999.
80. Brattström C, Säwe J, Jansson B, Lönnebo A, Nordin J, Zimmerman JJ, Burke JT, Groth CG. Pharmacokinetics and safety of single oral doses of sirolimus (rapamycin) in healthy male volunteers. *Ther Drug Monit*. 2000 ; 22(5) : 537 – 544.

81. Le Guellec C, Büchler M, Giraudeau B, Le MY, Gakoue 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(11) : 805 – 811.
82. McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, McDonald AS. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit.* 2002 ; 24(3) : 346 – 350.
83. Christians U, Sewing KF. Pharmacokinetics, metabolism and therapeutic drug monitoring of the macrolide immunosuppressants tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin). Principles of Drug Development in Transplantation and Autoimmunity, ed. Lieberman and Mukherjee, 1996.
84. Holt D, Lee T, Johnston A. Measurement of sirolimus in whole blood using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin Ther.* 2000 ; 22(B) : B38 – 48.
85. Maleki S, Graves S, Becker S, Horwatt R, Hicks D, Stroshane R, Kincaid H. Therapeutic drug monitoring of sirolimus in human whole-blood samples by high-performance liquid chromatography. *Clin Ther.* 2000 ; 22(B) : B25 – 37.
86. Napoli K. A practical guide to the analysis of sirolimus using high-performance liquid chromatograph with ultraviolet detection. *Clin Ther.* 2000 ; 22(B) : B14 – 24.
87. Connor E, Sakamoto M, Fujikawa K, Law T, Rifai N. Measurement of whole blood sirolimus by an HPLC assay using solid-phase extraction and UV detection. *Ther Drug Monit.* 2002 ; 24 : 751 – 756.
88. Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzner J, Spöhrer U, Seidel D. Quantification of sirolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using on-line solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med.* 2002 ; 40(1) : 40 – 45.
89. Taylor P, Johnson A. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 1998 ; 718 : 251 – 257.
90. Taylor P, Salm P, Lynch S, Pillans P. Simultaneous quantification of tacrolimus and sirolimus, in human blood, by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2000 ; 22 : 608 – 612.
91. Jones K, Saadat-Lajevardi S, Lee T, Horwatt R, Hicks D, Johnston A, Holt D. An immunoassay for the measurement of sirolimus. *Clin Ther.* 2000 ; 22(B) : B49 – B61.
92. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation : a review of the evidence. *Kidney Int.* 2001 ; 59(1) : 3 – 16.
93. Léger F, Debord J, Le Meur Y, Rousseau A, Büchler M, Lachâtre G, Paintaud G, Marquet P. Maximum a posteriori bayesian estimation of oral cyclosporin pharmacokinetics in patients with stable renal transplants. *Clin Pharmacokinet.* 2002 ; 41(1) : 71 – 80.
94. Monchaud C, Rousseau A, Léger F, David OJ, Debord J, Dantoine T, Marquet P. Limited sampling strategies using Bayesian estimation or multilinear regression for

- cyclosporin AUC(0-12) monitoring in cardiac transplant recipients over the first year post-transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 ; 58(12) : 813 – 820.
95. Rousseau A, Monchaud C, Debord J, Vervier I, Estenne M, Thiry P, Marquet P. Bayesian forecasting of oral cyclosporine pharmacokinetics in stable lung transplant recipients with and without cystic fibrosis. *Ther Drug Monit.* 2003 ; 25(1) : 28 –35.
 96. Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Napoli K, Kahan BD. A limited sampling strategy for estimating sirolimus area-under-the-concentration curve. *Clin Chem.* 1997 ; 43(3) : 539 – 40.
 97. Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin : clinical results and future opportunities. *Transplantation.* 2001 ; 72(7) : 1181-1193.
 98. Yin O, Tomlinson B, Chow A, Chow M. A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clin Pharmacokinet.* 2003 ; 42(2) : 179 – 192.
 99. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981 ; 9 : 503 – 512.
 100. Matis JH, Wehrly TE. Generalized stochastic compartmental models with Erlang transit times. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1990 ; 18(6) : 589 – 607.
 101. 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 : 375 – 382.
 102. 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. *Ther Drug Monit.* 2003 ; 25(4) : 535. [Abstract]
 103. Rousseau A, Marquet P. Modelling cyclosporin double-peak absorption profiles in the early post-transplantation period. *Clin Pharmacokinet.* [Accepté]

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 224

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE DU SIROLIMUS, ASSOCIÉ OU NON À LA CICLOSPORINE, CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX

RESUME

La transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale. L'organe transplanté, issu de donneurs décédés ou de donneurs vivants, étant considéré comme étranger par l'organisme receveur, celui-ci peut faire l'objet de plusieurs types de rejet, qui diffèrent par leur mécanisme immunologique et leurs manifestations cliniques. Le succès de la transplantation rénale dépend de la maîtrise de ces réactions, basée sur l'appariement entre donneur et receveur, et sur l'administration de médicaments immunosuppresseurs. Le sirolimus est la dernière molécule à avoir obtenu l'AMM dans la prévention du rejet aigu de greffe rénale. Sa pharmacocinétique (PK) est caractérisée par une importante variabilité interindividuelle. L'utilisation optimale de ce médicament repose donc sur le suivi thérapeutique pharmacologique (STP). Dans le but d'étudier la PK du sirolimus chez des patients transplantés rénaux récents, deux études ont été réalisées chez des patients transplantés rénaux : (i) une étude rétrospective, chez des patients traités par sirolimus associé à la ciclosporine et des corticostéroïdes; (ii) une étude prospective, sur la base d'un essai clinique (« CINESIREN ») chez des patients traités par sirolimus, mycophénolate mofétil (MMF) et corticostéroïdes. La PK du sirolimus a été étudiée selon trois approches : non-compartimentale, compartimentale individuelle (WinNonlin®) et compartimentale populationnelle (NonMEM®). Les paramètres PK estimés étaient en accord avec les données de la littérature ($Cl/F = 10$ à 20 L/h, $V_c/F = 144$ à 332 L) et sujets à une très grande variabilité interindividuelle. Des profils complexes (absorption retardée, doubles pics) ont été observés. D'autre part, l'étude a mis en évidence l'existence possible de deux types de patients, l'un fortement et l'autre plus faiblement exposé au sirolimus. L'analyse complète des données de l'étude CINESIREN permettra de mieux caractériser ces deux sous-populations et de comparer les paramètres PK du sirolimus associé à la ciclosporine ou au MMF. La meilleure connaissance de la PK du sirolimus devrait permettre le suivi de pharmacocinétique en routine pour des patients traités.

MOTS-CLÉS : Transplantation rénale, Don d'organe, Rejet, Crossmatch, Immunosuppresseurs, Sirolimus, Pharmacocinétique clinique, Modélisation pharmacocinétique, Suivi thérapeutique pharmacologique.

PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

PHARMACOKINETIC STUDY OF SIROLIMUS, ASSOCIATED OR NOT TO CYCLOSPORIN, IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS.

ABSTRACT

Transplantation of kidney grafts from cadaveric or living donors is the best treatment for terminal chronic renal insufficiency. Different types of rejection reactions exist, differing by their immunological mechanism and by their clinical manifestation. The success of renal transplantation is based on the crossmatch between donor and recipient and on the use of immunosuppressant drugs. Sirolimus is the last immunosuppressant authorized in France. Its pharmacokinetics (PK) is characterized by an important inter-patient variability, rendering therapeutic drug monitoring essential for optimal use. Sirolimus PK was evaluated in *de novo* renal transplant recipients in two clinical studies: first, a retrospective study including patients treated by sirolimus, cyclosporin and corticosteroids; secondly, a prospective study ("CINESIREN"), in which patients received sirolimus, mycophenolate and corticosteroids. Non-compartmental, individual- and compartmental population PK of sirolimus was evaluated, using WinNonlin® professional and NonMEM®. The calculated PK parameters values were similar to those reported in the literature ($Cl/F = 10 - 20$ L/h, $V_c/F = 144 - 332$ L), and the important inter-individual variability was confirmed. Complex profiles were observed (delayed absorption, double peaks). Moreover, the study showed that there were probably two types of patients, more or less exposed to the drug. Complete analysis of data from CINESIREN will help characterize better the two populations, and compare sirolimus PK, when associated to cyclosporin or mycophenolate. A better understanding of sirolimus PK will allow optimal therapeutic drug monitoring in renal transplant recipients receiving sirolimus.

KEY WORDS: Renal transplantation, Donors, Reject, Crossmatch, Immunosuppressants, Sirolimus, Clinical pharmacokinetics, Pharmacokinetic modelling, Therapeutic drug monitoring.