



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



Année Universitaire : 2013-2014

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs :
Ciclosporine et Tacrolimus
«Chez le transplanté rénal»**

Présenté par:

ARHOUNE Ilham

Encadré par:

Pr: Youssef KHABBAL (CHU Fès)

Pr : Khalid MISBAHI (FST Fès)

Soutenu Le 20 juin 2014 devant le jury composé de:

- **Pr : Youssef KHABBAL**
- **Pr : Khalid MISBAHI**
- **Pr : EL Houcine ALILOU**
- **Pr : Abdallah OULMEKI**

Stage effectué au :

Laboratoire de Pharmaco-Toxicologie au CHU HASSAN II Fès



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: ARHOUNE Ilham

Année Universitaire : 2013/2014

Titre : suivi thérapeutique des immunosuppresseurs : ciclosporine/tacrolimus

« Chez le transplanté rénal »

Résumé

La transplantation est une thérapie de plus en plus utilisée à l'heure actuelle. Les traitements immunosuppresseurs (ciclosporine et tacrolimus) permettent une meilleure prévention du risque de rejet, mais ils ont une fenêtre thérapeutique étroite. Le suivi thérapeutique des immunosuppresseurs a été mis en place pour essayer de mieux contrôler les effets secondaires sans augmenter le risque de rejet.

Ce travail a permis d'étudier la corrélation dose/concentration du médicament, à montrer l'intérêt du suivi thérapeutique, mais également à montrer la variabilité inter-individuelle du statut immunitaire des patients transplantés rénaux.

Mots clés:

Transplantation rénale / immunosuppresseurs / suivi thérapeutique pharmacologique / ciclosporine / tacrolimus / concentration résiduelle / adaptation posologique .

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Évolution des traitements immunosuppresseurs au cours du temps.....	7
Figure 2 : représentation des différentes étapes de l'activation lymphocytaire T.....	9
Figure 3 : Les voies de signalisation en aval du récepteur des lymphocytes T (TCR) constituent des cibles privilégiées pour les drogues immunosuppressives.....	12
Figure 4 : Formule développée de la molécule de la cyclosporine.....	13
Figure 5 : Formule développée de la molécule du tacrolimus.....	15
Figure 6 : Principe de technique immunologique EMIT.....	24
Figure 7 : Principaux éléments l'analyseur ARCHITECT i2000SR.....	32
Figure 8 Couronne réactionnelle, position 1–3.....	33
Figure 9 : Couronne réactionnelle, position 64 – 67.....	33
Figure 10 : Couronne réactionnelle, position 71 – 72.....	34
Figure 11 Couronne réactionnelle, position 94–98.....	35
Figure 12 : Répartition des cas traités par les immunosuppresseurs en fonction du sexe.....	36
Figure 13 : Répartition des immunosuppresseurs selon les patients consultant au CHU-Fès..	36
Figure 14 : Corrélation entre posologie et concentration de la ciclosporine.....	37
Figure 15 : Corrélation entre posologie et concentration du tacrolimus.....	38
Figure 16 Evolution des concentrations résiduelles C ₀ de TAC au cours du temps.....	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marges thérapeutiques de la ciclosporine basées sur C_0	19
Tableau 2. Marges thérapeutiques de la ciclosporine basées sur C_2	21
Tableau 3. Marges thérapeutiques du tacrolimus.....	21
Tableau 4 : principales techniques immunologiques pour le dosage de la ciclosporine.....	25
Tableau 5 : principales techniques immunologiques pour le dosage du tacrolimus.....	26
Tableau 6 : corrélation de Pearson de la molécule ciclosporine.....	37
Tableau 7 : corrélation de Pearson de la molécule tacrolimus.....	39
Tableau 8: ajustement posologique de TAC pendant la période post-transplantation.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : anti-corps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
AUC : Aire sous la courbe des concentrations
C₀ : concentration résiduelle
CHU : Centre Hospitalier universitaire
CsA : cyclosporine A
DHOH : Dihydroorotate déshydrogénase
EDTA : Ethylène diamine tétraacétate
EMIT : enzyme multiplied immunoassay technique
FK506 : tacrolimus
GVH : graft versus host
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase
HLA : Human leucocyte antigen
HTA : Hypertension artérielle
HPLC : High performance liquid chromatography
ICN : Inhibiteurs de la calcineurine
IL-2 : Interleukine 2
IMPDH : Inosine monophosphate déshydrogénase
JAK3 : Janus kinase 3
LC-MS : chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en mode simple
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplé à la Spectrométrie de masse en mode tandem
LC-UV : liquid chromatography–ultraviolet
LT : lymphocyte T
MAP Kinase : Mitogen-activated protein kinases
MPA : Acide mycophénolique
m-TOR : Mammalian target of rapamycin
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide
NFAT : Nuclear activating factor
NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
STP : Suivi thérapeutique pharmacologique
TCR : Récepteur du lymphocyte T
TDM : Therapeutic drug monitoring

I. INTRODUCTION

Actuellement, la transplantation rénale représente la meilleure alternative au traitement de l'insuffisance rénale terminale tant en terme de survie, de qualité de vie, que de coût pour la société. Cela dit, elle nécessite une immunosuppression à vie pour le patient.

Le but du traitement immunosuppresseur est la prévention du risque de rejet aigu d'allogreffe [1]. Ce risque, plus élevé dans les trois mois qui suivent la transplantation, constitue non seulement un risque immédiat de perte de greffon, si l'épisode de rejet aigu est incontrôlable, mais prédispose également le patient à un risque de rejet chronique ultérieur [2].

Ainsi, durant les trois mois post-greffe, l'immunosuppression doit être la plus intense et pour l'obtenir, plusieurs agents immunosuppresseurs parmi ceux disponibles sur le marché sont utilisés en association.

D'ailleurs, les inhibiteurs des calcineurines (ciclosporine et Tacrolimus) constituent la pierre angulaire du traitement immunosuppresseur chez les patients transplantés rénaux. L'utilisation de ces médicaments à marge thérapeutique étroite nécessite une surveillance régulière des taux sanguins. Cette surveillance se justifie également par la forte variabilité inter et intra individuelle de sa pharmacocinétique.

Le monitoring thérapeutique des immunosuppresseurs est un outil essentiel dans la prise en charge des patients après transplantation. Il contribue à la réduction de la toxicité des médicaments immunosuppresseurs et à la diminution de l'incidence de rejet de greffe avec une thérapie basée sur la mesure des concentrations sanguines plutôt que sur la dose.

Tous ces éléments complexifient leur utilisation en pratique clinique et justifient la nécessité de rechercher les paramètres pouvant expliquer ces variations. Effectivement une connaissance de ceux-ci, permettrait d'individualiser la posologie nécessaire à l'atteinte des taux cibles du médicament. Les concentrations cibles seraient alors obtenues plus précocement et de façon plus reproductible ce qui limiterait la survenue de complications.

Les patients traités par le tacrolimus ou la ciclosporine en association ou non avec autres médicaments immunosuppresseurs (mycophénolate mofétil (MMF)/corticoïdes) et transplantés au CHU de Fès ou ailleurs ont été suivis au cours de mon stage dans une étude rétro-prospective.

L'objectif de ce travail est de confirmer l'intérêt du suivi thérapeutique des immunosuppresseurs notamment les inhibiteurs des calcineurines (ICN) dans différentes situations cliniques en transplantation rénale.

Nous présenterons tout d'abord dans la partie bibliographique les différentes classes des immunosuppresseurs, le principe de leur suivi thérapeutique des immunosuppresseurs, et les

différents technique utilisée pour le dosage des ces médicaments. Puis, dans une deuxième partie, nous présenterons le suivi et les dosages de la ciclosporine/tacrolimus dans différentes situations cliniques chez des transplantés rénaux dans le cadre du suivi thérapeutique.

II. RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

L'histoire du traitement immunosuppresseur en transplantation rénale se déroule maintenant depuis un demi-siècle. Les premières transplantations rénales en 1952 ont été tentées en l'absence de tout traitement immunosuppresseur et se sont soldées par des échecs précoces avec arrêt de fonction du greffon et décès du patient. Les réussites en l'absence de traitement immunosuppresseur sont obtenues en 1954 et 1955 aux USA et en France pour des transplantations rénales effectuées entre jumeaux homozygotes, soulignant le fait qu'en l'absence d'immunosuppression le succès ne peut être obtenu qu'avec une identité parfaite entre le donneur et le receveur. L'origine immunitaire du rejet pressentie depuis longtemps est à la base de traitement immunosuppresseur appliqué après les échecs immunosuppresseur appliqué après les échecs de la transplantation « contre nature ». De 1958 aux premières années 60, l'immunosuppression consiste en une irradiation totale suivie d'une greffe de moelle du donneur d'organes : le greffon est « toléré » mais le patient décède le plus souvent des conséquences d'une immunosuppression trop lourde. Quelques succès sont cependant obtenus avec des irradiations totales à doses plus faibles, prouvant que la barrière de la défense immunitaire peut être franchie.

En 1960, les **corticoïdes** et la 6- mercaptopurine font leur apparition dans le traitement immunosuppresseur des receveurs en association avec l'irradiation.

Après 1963, l'amélioration des techniques d'épuration extra-rénale et le développement de l'hémodialyse périodique, l'amélioration des techniques de prélèvement et de conservation des organes, les progrès de l'immunologie clinique dans le maniement des immunosuppresseurs et les tests d'histocompatibilité, l'utilisation du sérum antilymphocytaire associé aux **corticoïdes** et à l'**azathioprine** vont permettre une amélioration des résultats tant en terme de survie des greffons que des patients.

A partir de 1980, l'utilisation de la **ciclosporine A** va permettre d'améliorer la survie de greffons avec une augmentation de 15% des greffons fonctionnels à 10 ans par rapport au traitement conventionnel et malgré sa néphrotoxicité.

Par la suite, le **MMF** (mycophénolate mofétil) remplacera l'**azathioprine**, le **tacrolimus** pourra remplacer la **ciclosporine A**, les anticorps monoclonaux antirécepteurs de l'IL-2 pouvant remplacer les anticorps antilymphocytes polyclonaux comme les lymphoglobulines ou les thymoglobulines ou les anticorps monoclonaux comme l'OKT3.

Récemment, les **rapamycines** sont proposées à la place des anticalcineurines (ciclosporine et tacrolimus) pour leur absence de néphrotoxicité. L'arsenal thérapeutique s'est donc enrichi permettant un développement de l'immunosuppression sur mesure en fonction des caractéristiques du receveur et du donneur.

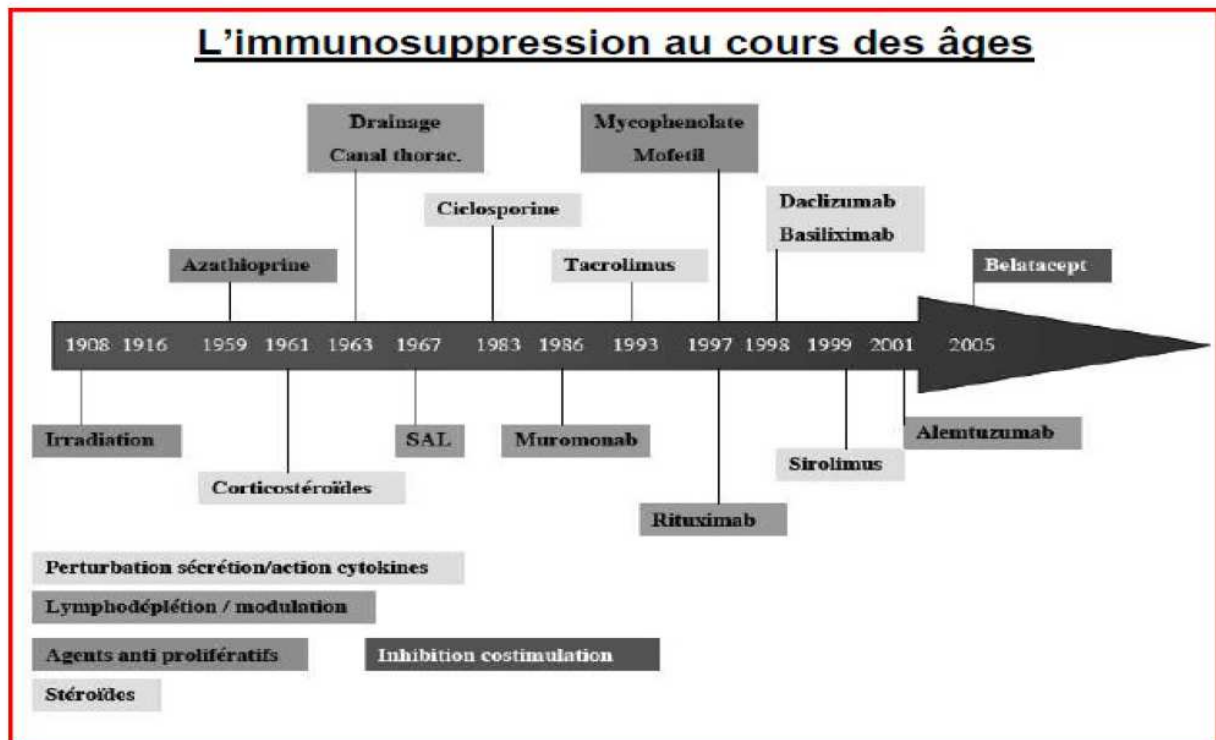


Fig 1 : Évolution des traitements immunosuppresseurs au cours du temps

II.1. Place des immunosuppresseurs dans la réponse immunitaire

Le but des immunosuppresseurs est d'empêcher le déroulement de réponses immunitaires non souhaitées, mais qui suivent les étapes classiques de toute activation immunologique.

Généralement, l'activation complète d'un lymphocyte T naïf requiert plusieurs signaux (Fig.2) [3]. Le premier signal est secondaire à la reconnaissance d'un déterminant antigénique. Les molécules HLA par exemple, par le récepteur de l'antigène du lymphocyte T (TCR). Ce premier signal est transmis par la molécule CD3, couplée aux protéines tyrosine Kinase lck et ZAP-70, qui le relaient par trois voies de signalisation. Il s'agit de celle des MAP Kinases, de celle dépendante du couple calcium-calcineurine et enfin de celle impliquant la protéine Kinase C thêta (PKC θ), qui activent respectivement les facteurs de transcription comme l'activator-protein 1 (AP-1), *facteur nucléaire des lymphocytes T activés* (NFAT), et le facteur nucléaire kB (NF- kB). Ces derniers conduisent à l'expression de CD154 (CD40 ligand), mais aussi de l'interleukine 2 (IL-2) et de la chaîne alpha (CD20) de son récepteur. La molécule CD 154 engage son ligand CD40 sur la cellule présentatrice d'antigène qu'elle active, induisant ainsi une augmentation de l'expression des molécules CD80 et CD86 [4].

Celles-ci permettent de délivrer le deuxième signal par l'engagement de la molécule de cosignal CD28 sur le lymphocyte. Ce cosignal renforce le signal transmis par le TCR, en activant AP-1 qui,

complexé à NFAT, transactive les gènes IL-2 et IL-2R. Son absence ne permet pas au lymphocyte de s'activer totalement et celui-ci devient anergique.

Le troisième signal est induit par la fixation de cytokines sur leurs récepteurs, et en particulier l'IL-2. Ce troisième signal conduit à la prolifération cellulaire. En résumé, l'expression induite de CD25(IL2R α), permet la formation du récepteur de haute affinité de l'IL-2, associant les chaînes α , β et γ . Ces récepteurs transmettent un troisième signal qui conduit à la prolifération cellulaire, à l'expression de gènes anti-apoptotiques et à la production de cytokines et de chémokines. Trois voies principales de signalisation sont décrites en aval du récepteur de l'IL-2. Une voie MAP-Kinase, une voie initiée par la janus Kinase 3 (JAK3), mettant en jeu les protéines STAT5, et une voie en aval de la phosphoinositide-3-Kinase (PI-3K), impliquant mTOR [5].

La prolifération cellulaire, parfois assimilée à un quatrième signal, requiert la synthèse de nucléotides purines et pyrimidines, respectivement dépendantes des enzymes inosine monophosphatase déshydrogénase (IMPDH), et dihydroorotate déshydrogénase (DHODH).

Enfin, un certain nombre de récepteur aux chémokines (CCR1, CXCR3, CCR5) et molécules d'adressage, comme le récepteur sphingosine-1-phosphatase (S-1-P), sont exprimées, permettant au lymphocyte de quitter l'organe lymphoïde secondaire où il a été activé pour rejoindre le

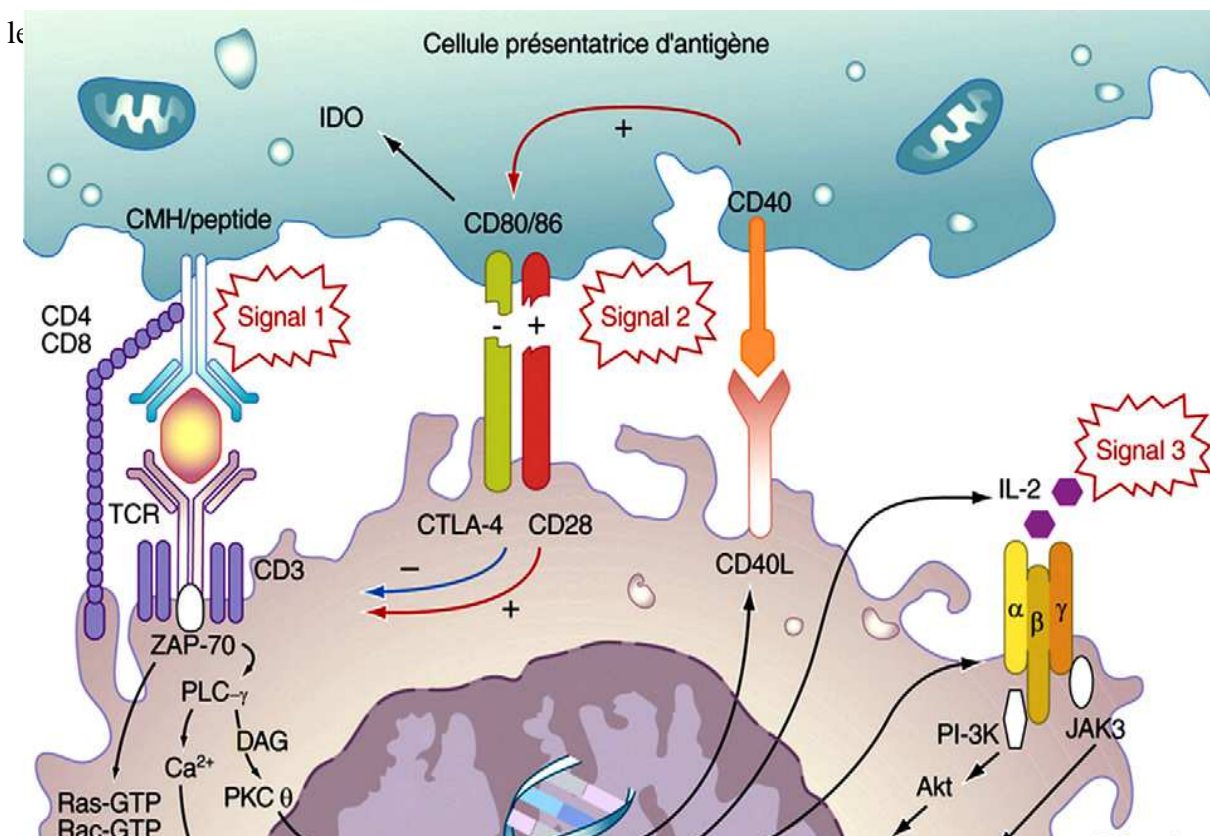


Fig. 2 Représentation des différentes étapes de l'activation lymphocytaire T. Le premier signal est issu de la reconnaissance de son ligand par le récepteur des lymphocytes T (TCR), qui active les facteurs de transcription pro-inflammatoires NF- κ B, NFAT et AP-1 par différentes voies de signalisation. Le second signal est délivré par l'engagement des molécules de cosignal (CD28, inducible costimulator-ligand [ICOS-L], CD40L), qui renforcent le premier signal. Enfin, le troisième signal naît de la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité. Celui-ci délivre un message permettant la prolifération, la sécrétion de cytokines et de chémokines, ainsi que des signaux protégeant de la mort par apoptose. La prolifération cellulaire est dépendante de la synthèse de bases puriques et pyrimidiques. L'expression du récepteur S-1-P permet au lymphocyte de s'extraire du ganglion drainant pour atteindre les tissus cibles sous l'effet des chémokines pro-inflammatoires, dont il exprime les récepteurs (CCR1, CCR5, CXCR3). CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; ZAP-70 : protéine tyrosine kinase ; PLC : phospholipase C ; CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen-4 ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; PI-3K : phospho-inositol-3 kinase ; Akt : protéine kinase ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; mTOR : mammalian target of rapamycine ; G1-S-G2-M : phases du cycle cellulaire ; JAK3 : Janus kinase 3.

II.2. Classification des immunosuppresseurs

II.2.1 Corticoïdes

Les glucocorticoïdes, dont l'utilisation remonte aux années 1960, agissent comme agonistes des récepteurs des glucocorticoïdes. Leurs mécanismes sont complexes et ont été résumés récemment dans un article de synthèse [7]. A un dosage, important, ils possèdent aussi des effets indépendants de la fixation au récepteur. Les effets médiés par le récepteur sont principalement des effets transcriptionnels, par l'intermédiaire d'interaction avec les éléments de fixation à l'ADN et des interactions protéine-protéine du complexe «récepteur des stéroïdes ». Cela entraîne un effet sur des facteurs de transcription tels que AP-1 et NF-KB.

II.2.2 Inhibiteurs de mTOR : sirolimus et évérolimus

Les inhibiteurs de la mTOR, le sirolimus et l'évérolimus, bloquent une voie de signalisation, en aval des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15 [8]. Pour être actif, ils doivent se lier, comme le tacrolimus, à la protéine FKBP12 mais n'ont aucun effet sur la phosphatase calcineurine.

Le sirolimus est un macrolide dont la structure est très proche de celle du tacrolimus, mais dont le mécanisme d'action est complètement différent [9]. En se fixant sur le FKBP12, il inhibe la prolifération cellulaire induite par les cytokines telles que l'IL-2, L'IL-3, L'IL-4 et L'IL-6 par une voie indépendante du calcium. Il bloque le cycle cellulaire en phase G1. Le complexe sirolimus-FKBP se lie à la protéine mTOR. Cette dernière a une activité d'autophosphorylation sur les résidus sérines. Elle contrôle l'activité d'une protéine kinase, la p70S6k et la phosphorylation d'une protéine qui inhibe le début de la traduction, la 4E-BP1. Le blocage de la p70S6kinase, qui phosphoryle la protéine ribosomale S6 impliquée dans l'activation de l'étape d'initiation, est responsable de l'inhibition de la traduction des ARNm comprenant un domaine riche en polypyrimidine à leur extrémité 5' (5'-TOP). Ces ARN messagers constituent une petite famille de transcrits présents en grande quantité dans la cellule, qui codent pour des protéines ribosomales et des composants de l'appareil traductionnel. La protéine 4E-BP1 sous sa forme phosphorylée se dissocie de eIF4E, qui peut alors se lier à la coiffe et mettre en route la traduction des ARNm. Le sirolimus inhibe l'induction de la phosphorylation de 4E-BP1 par les facteurs de croissance et augmente ainsi la fraction eIF4E séquestrée, inactive dans la cellule. Le blocage de ces réponses par le sirolimus va bloquer en aval la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S.

II.2.3 Anti métabolites

L'utilisation d'agents antimétabolites dans le cadre d'une thérapie immunosuppressive après transplantation d'organes, dont le premier représentant est apparu vers la fin des années 1950 était la 6-mercaptopurine (6-MP) [10].

L'azathioprine est un pré-médicament qui est rapidement converti en 6-MP puis en une série de métabolites intracellulaires agit au niveau du blocage de l'inosine monophosphatase déshydrogénase (IMPDH) et de la phosphoribosyl-pyrophosphate aminotransférase qui sont des enzymes clés dans la synthèse de novo des bases puriques.

Certains métabolites agissent également par incorporation frauduleuse dans l'ADN. Il en résulte un effet cytostatique par blocage de la réplication de l'ADN ayant pour conséquence l'inhibition de nombreuses fonctions lymphocytaires [10, 11, 12].

Le mycophénolate mofétil (MMF), il s'agit d'un pré-médicament de l'acide mycophénolique (MPA). Ce médicament agit par un blocage de la synthèse de novo de la guanine. Il en découle une inhibition de la prolifération des lymphocytes ainsi que leurs fonctions qui incluent la formation d'anticorps, l'adhésion cellulaire et la migration [10].

II.2.4 Anticorps polyclonaux et monoclonaux

Vers la fin des années 1960 sont apparus les premiers anticorps polyclonaux antilymphocytaires. Ces derniers sont obtenus à partir de sérums de lapins ou de chevaux immunisés par des lymphocytes T humains. Ces anticorps vont diminuer le nombre de lymphocytes en circulation, s'opposant de ce fait à la réponse immunitaire [10, 13].

En 1981 a été commercialisé le premier anticorps monoclonal, le muromonab-CD3, de type murin, dont la spécificité porte sur le récepteur CD3 présent sur les lymphocytes T. sa liaison provoque la modulation et l'inactivation immunologique des cellules CD3+ impliquées dans le processus de rejet de greffe [10].

Un nouveau type d'anticorps a été mis sur le marché en 1998, il s'agit d'anticorps monoclonaux recombinants dont les représentants sont le basiliximab (chimérique murin/humain) et le daclizumab (humain). La fixation de l'IL-2 s'en trouve ainsi inhibée avec pour conséquence un blocage de l'activation de la prolifération de ces cellules [13, 14].

II.2.4 Inhibiteur de la calcineurine

Les immunosuppresseurs ciclosporine et FK506 se lient à des immunophilines et, sous la forme de ce complexe, à la calcineurine, une protéine phosphatase activée par la calmoduline en présence de Ca^{2+} . L'inhibition de l'activité phosphatasique de la calcineurine induite par la fixation du complexe immunophiline-médicament pourrait interférer avec les modifications post-traditionnelles de composants cytoplasmiques de certains facteurs de transcription, probablement NF-AT et NF-KB, dont la translocation dans le noyau, nécessaire à l'activation du gène de l'IL-2, ne pourrait plus se produire (fig3) [15]. Ainsi serait bloquée la première étape de l'activation des lymphocytes T lorsque leur récepteur reconnaît un antigène spécifique présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité [16].

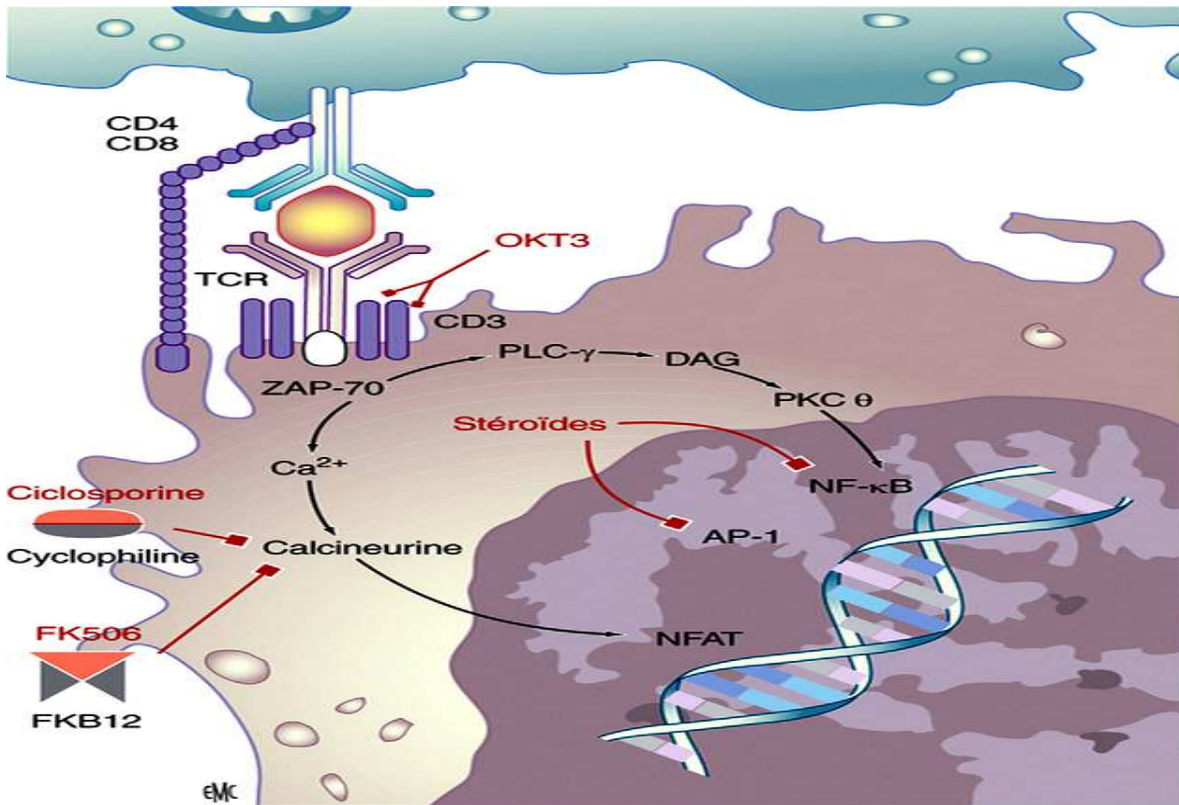


Fig. 3. Les voies de signalisation en aval du récepteur des lymphocytes T (TCR) constituent des cibles privilégiées pour les drogues immunosuppressives

Celles-ci visent l'antagonisme des facteurs de transcription NFAT, AP-1 et NF-κB, de façon spécifique, par le blocage des voies de signalisation propres au lymphocyte. La ciclosporine et le tacrolimus, toutes deux des prodrogues complexées à des immunophilines, inhibent la calcineurine, senseur biologique de l'afflux de calcium dans la cellule après l'engagement du TCR. Les stéroïdes ont un effet plus ubiquitaire, agissant directement sur les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB. Enfin, la molécule CD3, complexée au TCR, peut également être la cible d'anticorps, déplétants ou non. ZAP-70 : protéine tyrosine kinase ; PLC : phospholipase C ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; FK506 : tacrolimus ; NFAT : facteur d'activation nucléaire des lymphocytes T activés.

II.2.4.a/ Cyclosporine

1. Molécule

La cyclosporine (Neoral®, Sandimmun®) est un métabolite du champignon, *Tolypocadium inflatum* [17].

La CyA est un peptide cyclique de onze acides aminés. Sa formule chimique est $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ et sa masse molaire moléculaire est de 1 201 daltons. Elle comporte des acides aminés dextrogyres, rarement rencontrés dans la nature [18].

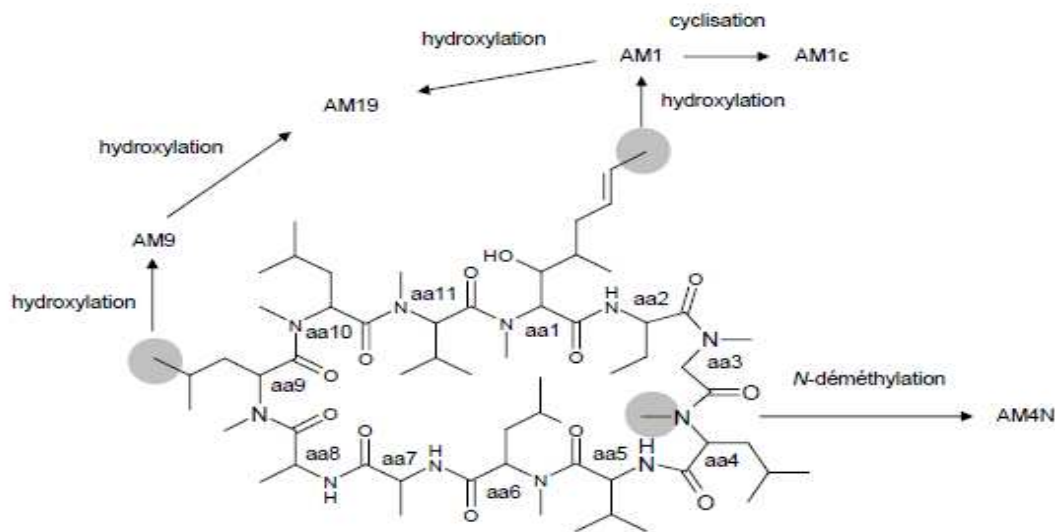


Fig 4 : Formule développée de la molécule de cyclosporine

2. Mode d'action

Elle agit à un stade précoce de l'activation du lymphocyte CD4. La cyclosporine inhibe la transcription du gène de l'interleukine 2 et des gènes d'autres cytokines (IL-1, IL-3, interféron gamma, IL-4), de proto-oncogènes et de récepteurs des cytokines. La cyclosporine se fixe dans le cytoplasme sur une isomérase, la cyclophiline. Le complexe cyclophiline-cyclosporine se lie à une phosphatase dépendante du calcium, la calcineurine. Ainsi, la cyclosporine inhibe l'action de la calcineurine qui est de déphosphoryler le facteur d'activation des lymphocytes T activés et permettre ainsi la translocation de ce facteur dans le noyau. L'inhibition des gènes de l'interleukine-2 et d'autres cytokines empêche la prolifération des lymphocytes T et la génération des lymphocytes cytotoxiques [19].

3. Métabolisation

La cyclosporine est métabolisée à plus de 99% par les cytochromes P450 3A4 et 3A5 (CYP3A4/5) dans la paroi intestinale et au niveau hépatique. Plus de 30 métabolites différents sont formés par hydroxylation, déméthylation et cyclisation (Fig.4). Ces derniers sont désignés par A pour « cyclosporine A », puis M pour « métabolite » et finalement par un numéro indiquant l'acide aminé sur lequel se produit la modification.

L'utilisation de deux numéros indique une transformation similaire à deux emplacements. Lorsque ni un N (qui désigne une N-déméthylation) ou un c (qui désigne une cyclisation) n'est indiqué, il s'agit d'une hydroxylation [20]. Les métabolites principaux rencontrés dans le sang sont l'AM1, AM4N et AM9 qui comptent respectivement pour 70%, 21% et 7.5% de l'aire sous la

courbe des concentrations sanguines (AUC) en ciclosporine [21]. Aux taux résiduels, des concentrations en hydroxy-ciclosporine supérieures à celles en molécule mère ont été observées [22]. Certains métabolites sont actifs, le principal est l'AM1 avec une activité immunosuppressive correspondant à 10-20% de celle de la ciclosporine, suivi de l'AM9 et de l'AM4N [20,23]. Il a été rapporté que des concentrations d'AM1 et d'AM19 augmentées pouvaient être liées à l'apparition de néphrotoxicité [24]. D'après les données disponibles, il n'est pas possible de conclure si la mesure spécifique individuelle des métabolites est cliniquement significative.

Les métabolites sont excrétés à plus de 90% dans la bile et seulement 6% sont retrouvés dans l'urine [25]. Les concentrations de ciclosporine déclinent généralement de manière biphasique avec une demi-vie d'élimination terminale se situant entre 5-18 h [24].

II.2.4.b/ Tacrolimus

1. Molécule

Le tacrolimus (prograf®), également appelé FK 506 ou Fujimycine (fig.5), appartient à la famille des macrolides. Il a été isolé à partir de cultures de *Streptomyces tsukubaensis* en 1984 [26].

Il possède une structure cyclique. Sa formule chimique est $C_{44}H_{69}NO_{12}$, H_2O et sa masse molaire moléculaire est de 804 daltons. C'est une molécule qui absorbe peu dans l'ultraviolet et qui n'est pas fluorescente [27].

C'est une molécule lipophile, très soluble dans le méthanol, le chloroforme, et l'acétone et pratiquement insoluble dans l'eau et l'hexane [26, 27].

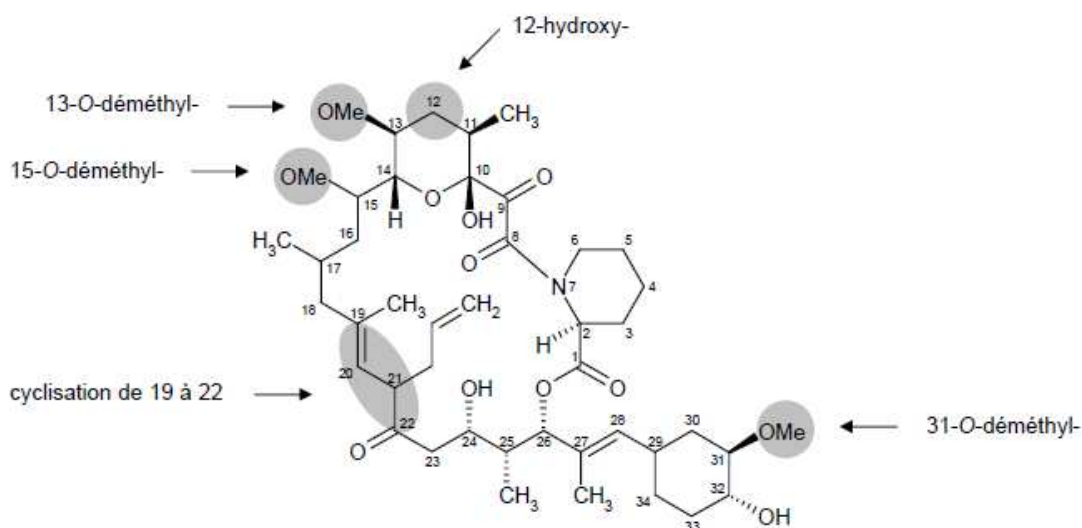


Fig 5 : Formule développée du tacrolimus

2. Mode d'action

Tout comme pour la ciclosporine, l'activité immunosuppressive [28] du tacrolimus est due à l'inhibition de la calcineurine, protéine du cytosol des lymphocytes T ; la calcineurine ne peut pas déphosphoryler le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) ; la conséquence est l'inhibition de la synthèse de l'Interleukine 2 (IL-2) et par la même occasion de la prolifération des lymphocytes T. Mais le tacrolimus est 100 fois plus puissant que la Ciclosporine. Son utilisation a considérablement amélioré le succès des transplantations. Toutefois, la zone thérapeutique est voisine de la zone toxique ; cette molécule ralentit la filtration glomérulaire et induit une hypertension, elle est à l'origine de diabètes et de neuropathies ; on a une marge de manœuvre limitée pour avoir une action efficace sans induire d'effets toxiques.

3. Métabolisation

Le tacrolimus systémique est métabolisé à plus de 99% au niveau hépatique par les CYP3A4/5. Ces isoenzymes sont également présentes au niveau de la paroi intestinale et il a été estimé qu'elles étaient responsables d'une biotransformation présystémique d'environ 50% de la dose [29]. Plus de 15 métabolites différents ont été identifiés *in vitro*, avec une activité immunosuppressive équivalente à celle de la molécule mère pour le 31-*O*-déméthyl-tacrolimus. L'activité des autres métabolites était très faible ou négligeable. Dans le sang de patients transplantés rénaux ou hépatiques, les principaux métabolites retrouvés étaient le déméthyl-, hydroxy-, déméthylhydroxy-, didéméthyl- et didéméthylhydroxy-tacrolimus qui ont compté en moyenne pour 43% (0-152%) de la concentration résiduelle en tacrolimus [30-31]. L'élimination des métabolites se fait majoritairement par voie biliaire (> 95%), moins de 2% sont retrouvés dans l'urine. La demi-vie d'élimination est de 12-15 h en moyenne, avec des valeurs plus élevées rencontrées dans certains cas [32, 33].

Une étude récente, non exempte de critique méthodologique, portant sur plus de 1500 patients, montre une meilleure efficacité du tacrolimus comparé à la ciclosporine. Cette étude a montré que des C₀ de tacrolimus comprises entre 3 ng/mL et 7 ng/mL étaient associés aux meilleurs résultats [34]. Dans cette étude, les patients recevant du tacrolimus présentaient une meilleure fonction rénale, une moindre incidence de rejet aigu et une meilleure survie à un an du greffon rénal en comparaison avec les groupes traités avec de fortes ou de faibles doses de ciclosporine ou avec du sirolimus combinés aux autres traitements (mycophénolate mofétil et stéroïdes). D'autres études ne retrouvent pas une telle différence [35].

II.2.4.c / effets indésirables Ciclosporine/Tacrolimus

En ce qui concerne les effets indésirables, la néphrotoxicité et l'HTA sont des complications communes aux deux inhibiteurs de la calcineurine. En revanche, si le profil lipidique est meilleur en

cas d'utilisation du tacrolimus, ce dernier est associé à une augmentation du risque de troubles de la glycorégulation. Une étude randomisée a récemment rapporté l'incidence de ces troubles [35]. Cette étude a comparé de façon prospective l'incidence de troubles de la glycorégulation observés chez des patients transplantés recevant, soit un traitement par ciclosporine, soit un traitement par tacrolimus. Après six mois, l'incidence de diabète survenant après transplantation ou d'anomalie de la glycémie à jeun a été de 26 % dans le groupe traité par ciclosporine, contre 33,6 % dans le groupe traité par tacrolimus ($p = 0,046$). De plus, l'utilisation du tacrolimus est associée à la survenue d'une alopecie réversible, en particulier chez les patients diabétiques et les femmes [36].

Le tacrolimus pourrait aussi être associé à une augmentation du risque de survenue d'une néphropathie à virus BK pouvant conduire à la perte du greffon [37].

II.3. Utilisation thérapeutique et pratique de ces médicaments

Le champ d'action des immunosuppresseurs concerne la transplantation d'organes solides (rein, foie, cœur, poumon, intestin, pancréas), la transplantation de moelle osseuse et certaines maladies auto-immunes incluant psoriasis, syndrome néphrotique et polyarthrite rhumatoïde. Dans la transplantation d'organes solides, la stratégie thérapeutique a pour objectif d'une part de prévenir le phénomène de rejet et d'autre part de le traiter.

II.3.1 Domaine de la transplantation d'organes

II.3.1.1 Prévention du rejet

Le traitement immunosuppresseur de référence dans la prévention du rejet de greffe associe classiquement un inhibiteur de la calcineurine, un antimétabolite et des corticostéroïdes [38]. L'utilisation d'une telle trithérapie permet d'obtenir une immunosuppression adéquate sans avoir recours à des doses toxiques de chaque agent. Le choix des molécules, parfois dépendant des habitudes des centres de transplantation, est tout de même fonction de la nature de l'organe greffé et des comorbidités. Ainsi le tacrolimus semble provoquer moins de néphrotoxicité [39] et d'hypertension [40] que la ciclosporine, mais a été associé à un risque de diabète sucré plus élevé [41]. En transplantation cardiaque, il a été suggéré que le tacrolimus pourrait être substitué à la ciclosporine chez des patients ayant souffert d'épisodes de rejets récidivants, ou en cas de mauvaise tolérance à la ciclosporine [42].

II.3.1.2 Traitement du rejet aigu

La prévention du rejet aigu en transplantation rénale repose sur :

- Une trithérapie associant des stéroïdes à faibles doses, un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, le plus souvent inhibiteur de l'IMPDH (inosine mono-phosphatase déshydrogénase) et un immunosuppresseur de la famille des anti-calcineurines (ciclosporine ou tacrolimus), ce

dernier pouvant être introduit d'emblée ou de façon retardée de quelques jours en cas de reprise retardée de fonction rénale ;

- Un traitement dit «d'induction» en fonction du risque immunologique : ce traitement est soit absent, soit constitué d'anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'interleukine 2 en cas de risque faible et d'anticorps polyclonaux anti-lymphocyte en cas de risque élevé.

Les différents immunosuppresseurs sont ensuite modulés en fonction de leur suivi pharmacocinétique, de leur efficacité et de leurs effets secondaires.

Globalement, l'incidence de rejet aigu est à l'heure actuelle inférieure à 15% avec une proportion croissante de rejet aigus humoraux.

II.3.1.3 Traitement préventif ou curatif de la réaction GVH

Le traitement préventif de la GVH (maladie du greffon contre l'hôte) est systématique. Le protocole le plus utilisé actuellement associe la ciclosporine (2 à 5 mg/kg/j un jour avant la greffe jusqu'au sixième mois) et le méthotrexate (15 mg/m² IV (Injection intraveineuse) à J1, puis 10 mg/m² à J3 et J6 post-greffe). D'autres protocoles associent à des degrés divers des bolus de méthylprednisolone et l'association cyclophosphamide/méthotrexate/corticoïdes ou mofétil mycophénolate [43].

II.3.2 Autres indication

- Affections Dermatologiques : psoriasis, dermatites atopiques.
- Rhumatologie
- Néphrologie : Syndromes néphrotiques corticoresistants.
- En cas de maladie de Crohn, cancers.
- Maladies Inflammatoires chroniques

II.4. Le suivi thérapeutique des immunosuppresseurs

La maîtrise du traitement immunosuppresseurs optimale est un élément essentiel dans la prévention d'un rejet après une transplantation d'organe. Le monitoring thérapeutique de ces médicaments, qui consiste à individualiser la posologie sur la base de la concentration sanguine individuelle, a été accepté comme étant un outil indispensable à la prise en charge des patients transplantés et a contribué à l'augmentation de la durée de vie observée ces dernières années chez ces patients. La corrélation entre les concentrations sanguines et l'effet thérapeutique et toxique, ainsi que l'absence de mesure clinique simple des effets recherchés, sont des critères importants pour avoir un monitoring thérapeutique.

Ciclosporine et tacrolimus font l'objet d'une recommandation de suivi thérapeutique régulier, pour les raisons suivantes :

- Leur marge thérapeutique est étroite, c'est-à-dire qu'ils ne déploient leur effet pharmacologique désiré avec une tolérance acceptable qu'à l'intérieur d'un faible domaine de concentrations sanguines. Les conséquences d'un sous-dosage peuvent être désastreuses (rejet de greffe, décès), il en est de même en cas de surdosage avec l'apparition d'une toxicité médicamenteuse importante.
- Leur pharmacocinétique présente une grande variabilité intra- et inter-individuelle, en raison notamment d'une biodisponibilité sujette à une large fluctuation (il n'existe pas de corrélation entre la dose et les concentrations sanguines) et de la métabolisation par le CYP 3A4, cible de nombreuses interactions médicamenteuses.

Le dosage des immunosuppresseurs est réalisé dans le sang complet (mise à part pour le mycophénolate mofétil). Les raisons de dosage ciclosporine et tacrolimus dans le sang total que le plasma sont les suivantes : [44, 45, 46]

- La distribution est largement dans les érythrocytes, leurs concentrations peuvent donc être mesurées plus aisément dans le sang complet que dans le plasma.
- La distribution érythrocytaire dépend de la température et de la concentration en immunosuppresseurs. Des erreurs de reproductibilité ont en effet été observées lorsque le dosage était effectué à partir du plasma. Ces erreurs ont pu être limitées par une standardisation du processus de séparation des deux matrices (centrifugation) à l'aide d'un équilibrage de l'échantillon à une température déterminée pendant au moins 1 heure. Cette pratique n'est cependant plus utilisée en routine.
- Les concentrations plasmatiques peuvent être influencées par la concentration en lipoprotéines ainsi que par l'hématocrite.

II.4.1 La ciclosporine A

Le suivi thérapeutique de la ciclosporine a été introduit dans la pratique clinique depuis plus de 20 ans. La valeur la plus couramment utilisée est la concentration sanguine résiduelle (C_0), mesurée juste avant l'administration de la dose suivante (Tableau 1). Cependant, il est actuellement établi que la corrélation entre C_0 et l'exposition totale au médicament n'est pas optimale et que la valeur prédictive de ce paramètre dans la survenue d'un rejet aigu et de néphrotoxicité est limitée [51].

Tableau 1 : Marges thérapeutiques de la ciclosporine basées sur C_0 [47].

Type de transplantation	Fonction rénale	Période post-transplantation	Valeurs cibles de C_0 [ng/ml]
Rénale	Normale	Initiale	100-250
	Diminuée	Dès 3 mois	100-150
Hépatique, cardiaque, pulmonaire, moelle osseuse		Initiale	150-250
		Dès 3 mois ou 1 an	100-150

Il a été montré que l' AUC_{0-12} présentait une meilleure corrélation que C_0 avec la survie du greffon [48]. La mesure de l'exposition totale nécessite cependant de nombreux prélèvements, ce qui est coûteux et difficilement réalisable en pratique. Le suivi thérapeutique basé sur l' AUC_{0-12} peut être simplifié en utilisant des stratégies d'échantillonnages limités et en procédant à une estimation de ce paramètre selon l'un des nombreux algorithmes développés, comme par exemple une mesure à 2 h (C_2) et à 6 h (C_6) après l'administration pour estimer l'absorption et l'élimination [49].

Par ailleurs, il a été mis en évidence que la plus grande variabilité pharmacocinétique se produisait dans les 4h après la prise de la ciclosporine microémulsion et que l'utilisation de l' AUC de la phase d'absorption (AUC_{0-4}) permettait d'obtenir une bonne prédiction du devenir clinique précoce. Des valeurs d' AUC_{0-4} plus faibles ont été observées chez des patients ayant présenté un épisode de rejet aigu par rapport à ceux n'ayant pas rencontré cette complication, alors que les concentrations résiduelles étaient identiques dans les deux groupes. Il a également été observé que le plus grand effet pharmacodynamique se produisait dans les 2 h après l'administration du médicament, d'où l'importance de la vérification des taux à ce moment là [50, 51].

D'autre part, il a été montré que la détermination de C_2 uniquement donnait une bonne estimation de l' AUC_{0-4} [52]. Une incidence de rejets aigus plus faible a été observée chez des patients dont les doses étaient adaptées en fonction de C_2 , par rapport au groupe contrôle recevant des doses permettant d'atteindre des valeurs cibles basées sur C_0 , avec une tolérance identique dans

les 2 groupes. Il est actuellement admis que le suivi thérapeutique de la ciclosporine basé sur la mesure de C_2 représenterait un indice plus sensible que C_0 dans la prédiction de la survenue d'un épisode de rejet aigu (Tableau 2) [53]

Tableau 2. Marges thérapeutiques de la ciclosporine basées sur C_2 [52].

Type de transplantation	Période post-transplantation [mois]	Valeurs cibles de C_2 [ng/ml]
Hépatique	0-3	1000
	3-6	800
	>6	600
Rénale	1	1700
	2	1500
	3	1300
	4-6	1100
	7-12	900
	>12	800

Il est recommandé de procéder à un dosage sanguin 1-2 jours après la transplantation, puis 2-3 fois par semaine pendant les 3-6 premiers mois jusqu'à stabilisation du patient. La mesure des concentrations sanguines peut ensuite être espacée de plusieurs mois, en l'absence de modification de la posologie, des traitements concomitants ou de l'état clinique du patient [54].

II.4.2 Tacrolimus

Une bonne corrélation a été mise en évidence entre l'exposition totale en tacrolimus et la concentration résiduelle. Cette valeur est devenue le standard dans l'optimisation des thérapies (Tableau 3). Cependant, d'autres études ont observé des corrélations très variables entre C_0 et l'AUC et il semblerait qu'une mesure des concentrations à C_2 ou C_4 soit utile [55]. Des investigations complémentaires sont souhaitées dans ce domaine afin d'améliorer la qualité des adaptations posologiques [52].

Tableau 3. Marges thérapeutiques du tacrolimus [52].

Type de transplantation	Période post-transplantation [mois]	Valeurs cibles de C ₀ [ng/ml]
Hépatique	1-12	5-20
Rénale	1-3	7-20
	4-12	5-15

II.5. Recommandations preanalytiques [56]

II.5.1 Prélèvements

Sang total prélevé sur tube EDTA sans gel séparateur. Proscrire les tubes héparinés.

Prélèvement à l'état d'équilibre, obtenu après 1 à 4 jours de traitement. Deux types de prélèvements possibles :

- Prélèvement pour dosage de la concentration résiduelle de ciclosporine A (C₀), juste avant la prise suivante.
- Prélèvement 2 heures (+/- 10 minutes) après la prise est actuellement reconnue comme un bon index d'exposition, permettant d'apprécier l'intensité de l'absorption et d'estimer l'aire sous la courbe (AUC), très variable d'un patient à l'autre.
- Des prélèvements répétés sont parfois effectués pour estimer l'AUC_{0-4h} ou l'AUC_{0-12h} (analyse pharmacocinétique). Il a été établi une relation entre le risque de rejet et l'AUC_{0-12h} de la ciclosporine.

II.5.2 Renseignement indispensable

Conformément à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale, toute demande de dosage de médicaments doit comporter impérativement :

- Les raisons de la prescription (recherche d'efficacité ou de toxicité), l'heure de prélèvement, la date de début du traitement et/ou de l'éventuelle modification de posologie, les renseignements posologiques (quantité administrée, fréquence, voie d'administration), ainsi que l'âge, la taille et le poids du sujets lorsque cela est possible.
- Préciser l'indication du dosage (si transplantation : préciser le type de greffe et le délai par rapport à la greffe, ainsi que la date de début du traitement).
- Fonction rénale (créatininémie).

- Traitement en cours risquant d'interférer avec le métabolisme de la ciclosporine.

II.5.3 Conservations et transports

- Conservation 8 à 12 jours à température ambiante.
- Transport à température ambiante ou à +4°C.

II.6. Techniques de dosage des immunosuppresseurs

II.6.1 Introduction

De nombreuses techniques ont été développées pour le dosage sanguin des immunosuppresseurs. Il s'agit principalement d'immunoessais, mais également de méthodes séparatives par chromatographies liquide (HPLC) couplées à la spectrophotométrie d'absorption de l'ultra-violet (LC-UV), à la spectrométrie de masse (LC-MS) et également à la spectrométrie de masse en mode tandem (LC-MS/MS). Pour la ciclosporine, le tacrolimus les immunoessais sont largement utilisés. En raison de leur spécificité pour les molécules mères, les techniques par LC-UV et surtout par LC-MS ou LC-MS/MS sont actuellement considérées comme les méthodes de choix pour le dosage de ces médicaments [57].

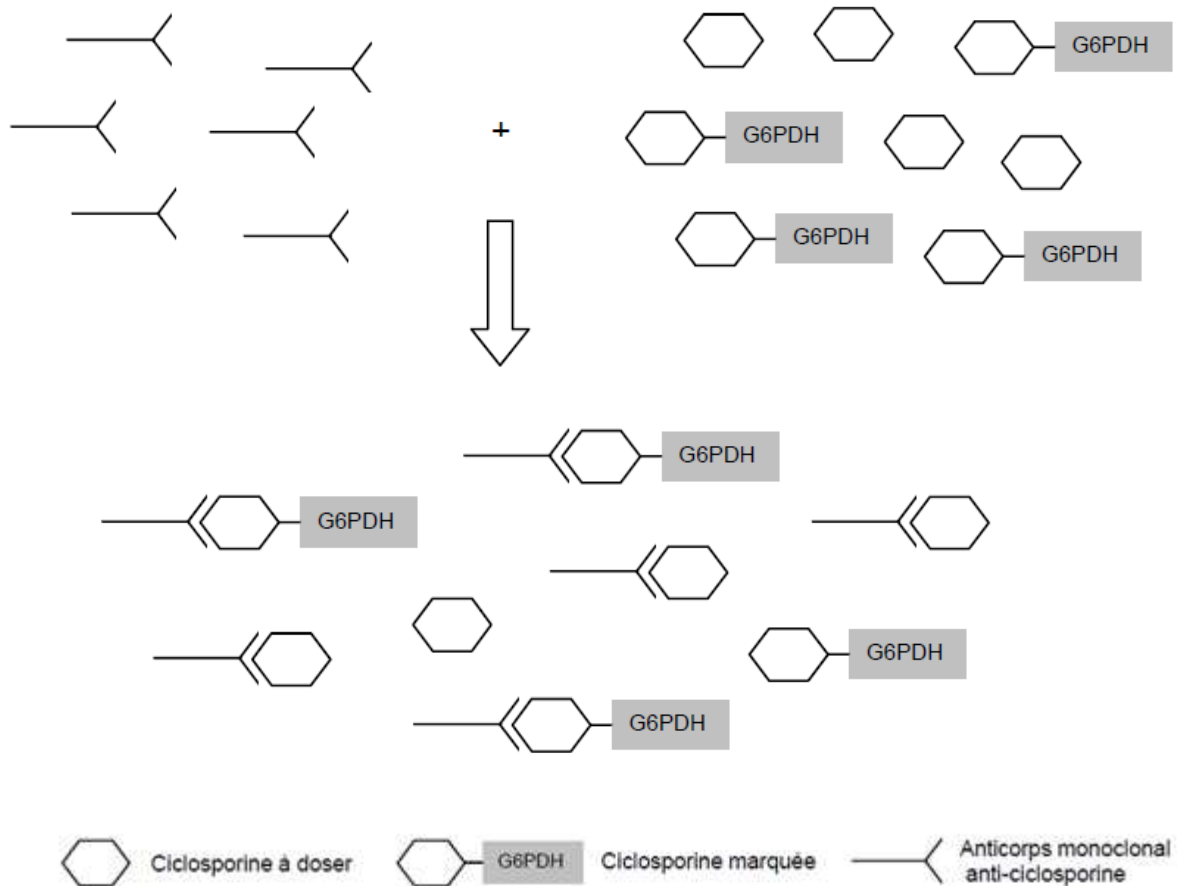
II.6.2 Techniques immunologiques

Les immunoessais regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction immunologique antigène-anticorps. La majorité de ces techniques utilisent un troisième élément, le traceur, qui résulte de l'association de l'antigène ou de l'anticorps avec un marqueur (radioélément, enzyme, luminophore) [58]. Différentes méthodes sont utilisées pour le dosage des immunosuppresseurs. La ciclosporine, le tacrolimus et le MPA sont quantifiés à l'aide de la technique EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique). La ciclosporine à doser ainsi que de la ciclosporine marquée par une enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), entrent en compétition pour se lier à un anticorps monoclonal anti-ciclosporine. Lorsque la ciclosporine marquée est liée à l'anticorps, la G6PDH perd son activité enzymatique en raison de l'encombrement stérique qui en résulte. L'activité est en revanche conservée lorsque la ciclosporine marquée est libre. La G6PDH convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone alors que le coenzyme NAD⁺ est réduit en NADH, résultant en une modification de l'absorbance à 340 nm. Ainsi, plus la concentration en ciclosporine dans l'échantillon à doser est élevée, plus il y aura de ciclosporine marquée libre (ne pouvant se lier à l'anticorps) et plus l'activité de l'enzyme sera importante.

II.6.2.1 Cyclosporine

De nombreux immunoessais utilisant des anticorps anti-cyclosporine ont été commercialisés pour la mesure des taux sanguins de cyclosporine (Tableau 4). La proportion de leur utilisation parmi différents laboratoires européens (n=540) est indiquée à la (figure 6). Les principales différences entre ces immunoessais résident dans la facilité de manipulation, la sélectivité pour la substance mère par rapport aux métabolites et la précision.

A) Réaction immunologique de compétition



B) Réaction enzymatique

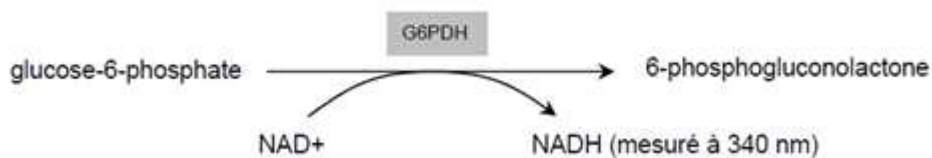


Figure 6 : principe de technique immunologique EMIT

Tableau 4 : principales techniques immunologiques pour le dosage de la ciclosporine.

Abréviation	Technique	Anticorps	Fabricant
FPIA TDx poly	Fluorescence polarisation immunoAssay	Polyclonaux non sélectifs (ciclosporine + métabolites)	Abbott
FPIA TDx mono	Fluorescence polarisation immunoAssay	Monocloaux	Abbott
FPIA AxSYM	Fluorescence polarisation immunoAssay	Monoclonaux	Abbott
RIA CYCLO-Trac ns	radioImmunoAssay	Monoclonaux non sélectifs (ciclosporine + métabolites)	DiaSorin
RIA CYCLO-Trac sp	radioImmunoAssay	Monoclonaux	DiaSorin
CEDIA PLUS	Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay	Monoclonaux	Microgenics
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Monoclonaux	Dade Behring
ACMIA	Antibody conjugated Magnetic Immunoassay	Monoclonaux	Dade Behring

Parmi ces techniques, deux manquent fortement de sélectivité et présentent une forte réactivité croisée avec les métabolites. Il s'agit du FPIA TDx poly qui utilise des anticorps polyclonaux reconnaissant la ciclosporine et ses métabolites et du RIA-ns qui utilise des anticorps monoclonaux non sélectifs. Les résultats obtenus avec ces techniques sont respectivement de 3 à 5 fois et 5 à 7 fois supérieures à ceux obtenus à l'aide d'une technique séparative sélective. Les surestimations mesurées par ces immunoessais varient en fonction de la proportion de métabolites présents dans le sang par rapport à la molécule mère, qui dépend du type de transplantation, de la période écoulée depuis la greffe, de la capacité métabolique du patient et de son état clinique. La

quantification des métabolites n'est pas souhaitée, en raison de l'absence d'activité pharmacologique significative (seule une minorité d'entre eux ont une activité correspondante à 10-20% de celle de la molécule mère).

Les valeurs déterminées avec ces techniques présentent une faible corrélation avec les événements cliniques [59].

Les autres immunoessais dits « sélectifs » comportent néanmoins un certain degré de réactivité croisée, variable selon la technique, ne donnant pas nécessairement le même résultat pour un échantillon donné.

II.6.2.2 Tacrolimus

La mesure des taux résiduels de tacrolimus présents dans le sang est rendue plus difficile que pour la ciclosporine en raison des faibles concentrations rencontrées (< 20 ng/ml). Différentes techniques immunologiques sont également disponibles pour le dosage de cette molécule (Tableau 5).

Tableau 5 : principales techniques immunologiques pour le dosage du tacrolimus.

Abréviation	Méthode	Fabricant
MEIA IMx II	Microparticle Enzyme-linked ImmunoAssay	Abbot
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Dade Behring
ELISA PRO-Trac II	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	DiaSorin

La problématique de surestimation des taux réels en molécule mère exposée pour la ciclosporine est également valable pour le tacrolimus.

II.6.3 Méthodes chromatographiques

II.6.3.1 Cyclosporine

II.6.3.1 a/ HPLC/ UV

Un grand nombre de méthodes par chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet (LC-UV) ont été développées pour le dosage de la cyclosporine depuis 1981. La sensibilité de cette technique est suffisante pour quantifier cette molécule dans le sang complet en raison de la présence de concentrations relativement élevées (100-1500 ng/ml selon le moment de prélèvement). Certaines méthodes permettent également de quantifier les principaux métabolites. Les limites de quantification se situaient entre 15-100 ng/ml et les temps de séparation chromatographique entre 6-60 minutes.

Le large domaine de concentrations rencontré avec la cyclosporine peut conduire à des problèmes de linéarité et la plupart des méthodes n'étendaient pas leur intervalle de dosage aux hautes concentrations, c'est à dire à celles rencontrées lors des prélèvements effectués à C₂, ce qui nécessitait une dilution de certains échantillons. Les méthodes par LC-UV sont vulnérables aux interférences liées à la matrice ainsi qu'à d'autres médicaments administrés simultanément et nécessitent des procédures d'extraction préalables souvent fastidieuses et de longue durée. De plus, afin de limiter les interférences, de bonnes séparations chromatographiques sont également nécessaires, conduisant dans la plupart des cas à des temps d'élution relativement longs. Ces désavantages peuvent causer des problèmes lors de l'utilisation de ces méthodes en routine dans certains centres de transplantation où de nombreuses analyses sont effectuées chaque jour.

II.6.3.1 b/ LC/MS et LC/MS-MS

Une meilleure sélectivité ainsi qu'une limite de quantification plus basse peuvent être obtenues à l'aide de méthodes par LC-MS et surtout LC-MS/MS. Les procédures de préparation des échantillons peuvent être simplifiées et les temps de séparation chromatographique raccourcis. De telles méthodes ont été développées pour le dosage de la cyclosporine dans le sang complet, incluant dans certains cas les métabolites principaux, avec des techniques de préparation de l'échantillon par SPE off-line (extraction en phase solide n'est pas couplée directement au système analytique), LLE off-line (extraction liquide-liquide n'est pas couplée directement au système analytique) ou injection directe. Les limites de quantification se situaient entre 1-10 ng/ml et les temps d'analyse entre 2-20 minutes.

II.6.3.2 Tacrolimus

II.6.3.2 a/ HPLC / UV

Le tacrolimus ne possède pas de chromophore, il n'est par conséquent pas possible de le quantifier à l'aide d'une méthode par LC-UV.

II.6.3.2 b/ HPLC / Fluorimétrie

Une méthode de chromatographie liquide a été proposée comprenant une étape d'extraction et de dérivation avec une limite de quantification de 3ng/ml ; technique longue, de sensibilité insuffisante, non adapté au dosage de cette molécule.

II.6.3.2 c/ LC/ MS

En raison des faibles concentrations rencontrées dans le sang aux taux résiduels (5-20 ng/ml), le dosage du tacrolimus nécessite une méthode permettant d'atteindre des limites de quantification assez basses, ce qui peut être apporté par la LC-MS. Plusieurs méthodes ont été proposées ces dernières années, avec la possibilité de quantifier les métabolites dans certains cas. Des préparations de l'échantillon par SPE off-line (extraction en phase solide n'est pas couplée directement au système analytique) manuelles ou automatisées ont été utilisées. Les temps d'analyse allaient de 1-12 minutes et les limites de quantification étaient de l'ordre de 0.25 ng/ml.

II.6.3.2 d/ LC/MS-MS

Un certain nombre de méthodes par LC-MS/MS ont également été développées ([Tableau 7](#)). La préparation de l'échantillon était réalisée par LLE off-line (extraction liquide-liquide n'est pas couplée directement au système analytique) ou SPE off-line (extraction en phase solide n'est pas couplée directement au système analytique), avec des temps de séparation chromatographique allant de 1.5-4 minutes. Les limites de quantification étaient de l'ordre de 0.1-0.2 ng/ml.

II.6.4 Conclusion

De nombreuses techniques ont été développées pour le dosage sanguin ou plasmatique des immunosuppresseurs dans le cadre du suivi thérapeutique. Les techniques immunologiques sont largement utilisées et présentent l'avantage par rapport aux méthodes séparatives conventionnelles de pouvoir effectuer des analyses avec un débit relativement élevé et une certaine facilité d'emploi. Ces méthodes ont cependant le désavantage de donner des réactions croisées avec certains métabolites, pouvant conduire chez certains types de patients à des surestimations cliniquement significatives des taux réels en principe actif. En raison de leur sélectivité pour les molécules mères, les techniques chromatographiques sont actuellement considérées comme les méthodes de choix pour la quantification de ces médicaments.

II.7. Adaptation de posologie

Le TDM est fortement associée à l'interprétation pharmacocinétique pour avoir l'efficacité clinique et que l'adaptation de traitement se fasse de manière adéquate selon les résultats de TDM [60].

Afin d'adapter les posologies à partir des concentrations mesurées, il existe différentes méthodes. On distingue 4 stratégies d'adaptation posologiques [60] :

- La méthode de la règle de 3, pour des profils cinétiques linéaires, basées sur la calcul de la dose administré pour obtenir la concentration sérique visée. Il est facile à utiliser et ne nécessite qu'un dosage.
- Sur la base de la physiopathologie, des nomogrammes peuvent être construits : le nomogramme de Moellering, qui tient compte de la clairance.
- Adaptation par régression non linéaire, nécessite le dosage du taux résiduel et du taux au pic. A partir d'un graphique logarithmique qui représente les taux en fonction du temps, et qui permet de déterminer le temps de demi-vie d'élimination.
- Enfin, une approche bayésienne dont l'adaptation de la posologie suite à un dosage se base sur les données de population, et sur des calculs probabilistiques .l'adaptation de cette méthode se fonde non seulement sur la connaissance des caractéristiques du médicament dosé (absorption distribution, liaison protéique, clairance hépatique, rénale, etc.) mais aussi de leur variabilité et des facteurs qui les influencent, comme l'âge, les comorbidités, les polymorphismes génétiques, etc. au final, cet approche permet une adaptation posologique pour amener les concentrations dans l'intervalle thérapeutique, avec un seul dosage, et les paramètres tels que le volume de distribution et la clairance peuvent être immédiatement déterminés.

I. Objectif de l'étude

Le dosage des immunosuppresseurs est un élément clé de la prise en charge thérapeutique des patients transplantés, permettant ainsi une adaptation individuelle de la prescription en vue d'améliorer l'efficacité et de limiter la toxicité du médicament, ainsi que le profil pharmacocinétique spécifique de chaque médicament immunosuppresseur. Les interactions potentielles avec de nombreux médicaments (annexe) indiquent que le suivi d'un traitement immunosuppresseur est la partie essentielle du protocole de thérapie.

Par ailleurs, l'étude repose sur 26 patients transplantés pris en charge dans le service de Néphrologie.

Le but de notre travail est de démontrer principalement l'intérêt du suivi thérapeutique des immunosuppresseurs notamment la ciclosporine et le tacrolimus afin d'ajuster la posologie (quantité de médicament administrée chaque jour) et d'éviter l'inefficacité due à un sous-dosage ou la toxicité due à un surdosage chez les greffés rénaux.

II. Matériels et méthodes :

1. Patients

Il s'agit d'une étude rétro-prospective étalée sur 2 mois et demi (01 mars - 15 mai 2014), incluant tous les patients greffés rénaux ou consultant le service de néphrologie du centre hospitalier universitaire Hassan II et traités par les immunosuppresseurs généralement ciclosporine et tacrolimus. Une analyse descriptive des patients a été effectuée.

Pour les variables quantitatives nous avons calculé les moyens \pm leurs écarts-types, minimum et maximum et le pourcentage pour les variables qualitatives.

Lors de la comparaison de groupes, nous avons utilisé le logiciel d'analyse statistique SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) pour calculer la probabilité « p » et la corrélation « r » en fonction des variables à comparer.

Une valeur $p < 0,05$ était considérée statistiquement significative.

2. Recueil des données

Les données anamnestiques, clinique, paracliniques ont été recueillies en utilisant une fiche d'exploitation comportant l'identification du patient : sexe, âge, poids, s'il présente une insuffisance hépatique ou rénale et mentionnant l'histoire de son traitement (dose et heure d'administration).

❖ Etape pré analytique

➤ Prélèvement

Les prélèvements sanguins ont été réalisés le matin (concentration sanguine plasmatique dénommé taux résiduel) sur des tubes contenant un anticoagulant EDTA.

➤ Acheminement

L'acheminement a été effectué grâce à un système pneumatique.

❖ **Etapes analytique ; dosage des molécules ciclosporine et tacrolimus**

Les concentrations sanguines de ciclosporine et tacrolimus ont été quantifiées avec la technologie de dosage immunologique par la méthode CMIA (dosage immunologique sur microparticules en chimiluminescence), qui mesure la ciclosporine et tacrolimus dans le sang total humain avec l'appareil Architect Abbott plus.

L'analyseur ARCHITECT i2000SR (fig.7) est un automate d'immuno-analyses qui permet l'accès continu et aléatoire ainsi que le traitement prioritaire des échantillons et les relances automatiques. Elle est constituée de trois principaux éléments :

a. Module d'analyse i2000SR

Module d'analyse, avec fonction de traitement prioritaire, qui utilise la technologie CMIA pour l'analyse des échantillons.

b. Passeur d'échantillons RSH

Module de transport qui présente les échantillons à analyser ensuite il les relance au(x) module(s) d'analyse.

c. Centre de contrôle

Interface centralisée qui permet à l'utilisateur de contrôler les modules d'analyse et les éléments correspondants.

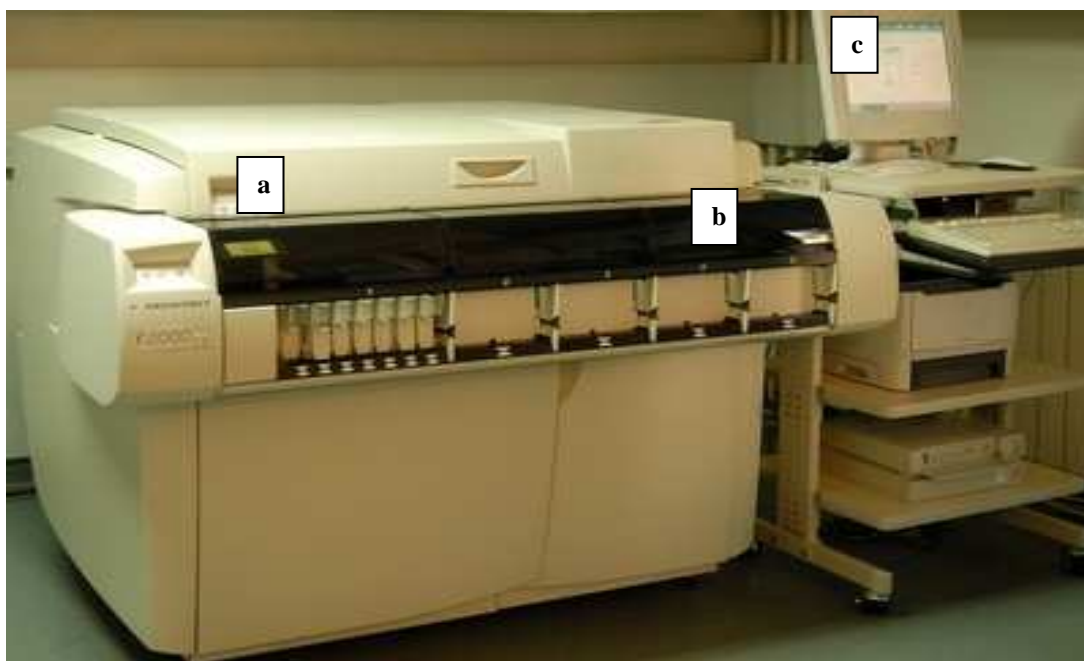


Fig. 7 : Principaux éléments de l'analyseur ARCHITECT i2000SR

3.1 Technologie CMIA

Cette technique permet de déterminer la présence d'antigènes, d'anticorps ou d'analytes dans les échantillons analysés.

3.2 Les réactifs utilisés par la technique CMIA

- Microparticules paramagnétiques recouvertes d'une molécule de capture (antigène, anticorps).
- Conjugué marqué à l'acridinimium
- Solution de préactivation et solution d'activation

3.3 Protocole de dosage

Une séquence de réactions CMIA dure aussi longtemps que se déroulent les interactions entre l'analyte présent dans l'échantillon et les réactifs à des différentes positions de la couronne réactionnelle.

- Un pipeteur échantillon distribue l'échantillon dans des cupules réactionnelles (CR).
- Le pipeteur R1 ajoute les microparticules (microparticules paramagnétiques recouvertes de molécules de capture) à l'échantillon dans la cupule réactionnelle.
- L'agitateur homogénéise le mélange réactionnel, ensuite l'incubé et la substance à doser présente dans l'échantillon se lie aux molécules de capture correspondantes sur les microparticules pour former ainsi le complexe immun.

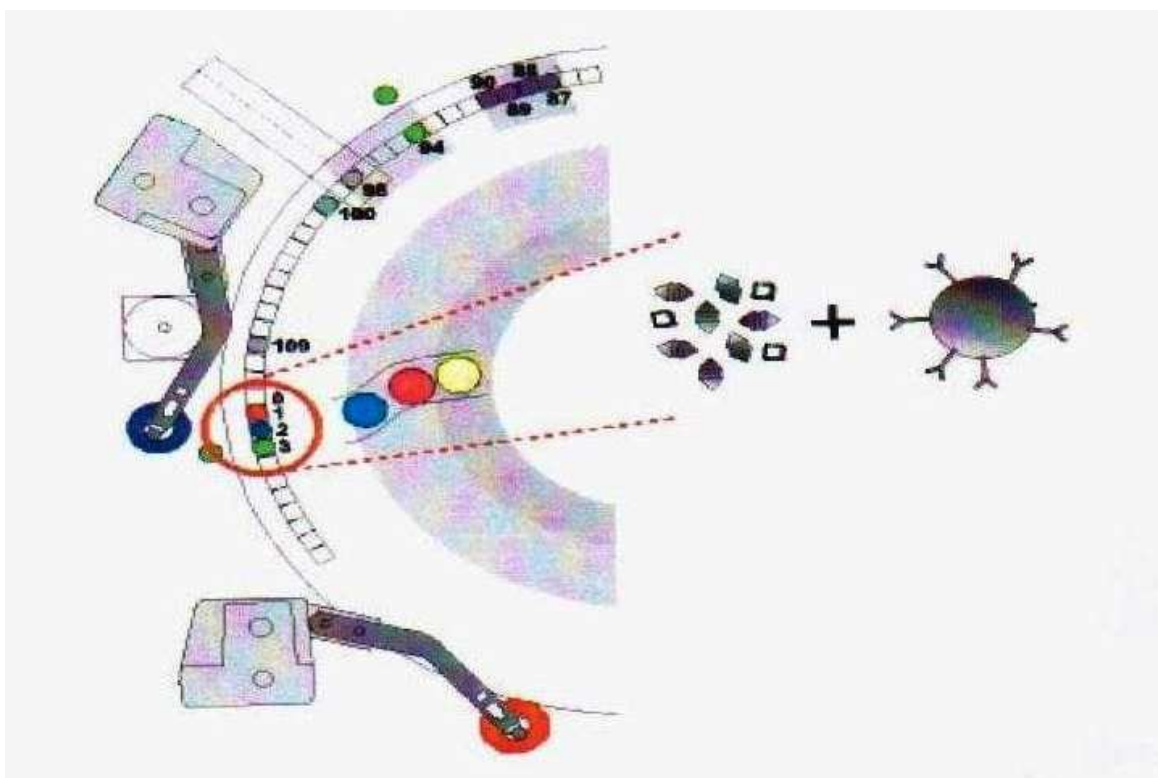


Fig.8 couronne réactionnelle, position 1 – 3

- Un aimant attire les microparticules paramagnétiques (liées) sur une paroi de la cupule réactionnelle. Le distributeur de la zone de lavage 1 lave le mélange réactionnel pour éliminer toutes les particules non liées.

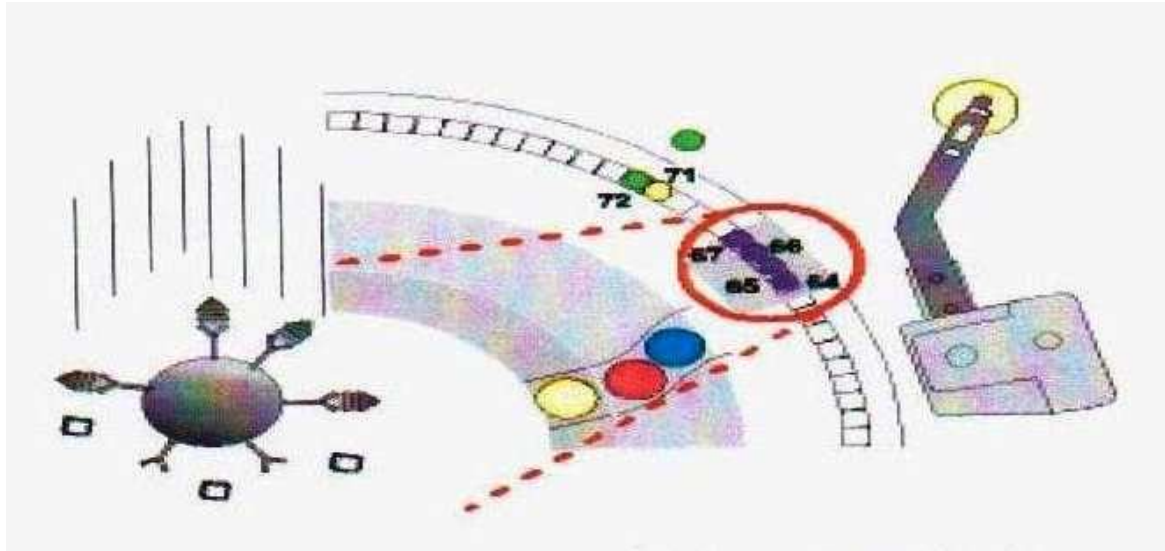


Fig.9 : couronne réactionnelle, position 64 – 67

- Le pipeteur R2 distribue un conjugué chimiluminescent marqué à l'acridinium. Le conjugué se lie au complexe immunitaire pour compléter le mélange réactionnel et l'incube.

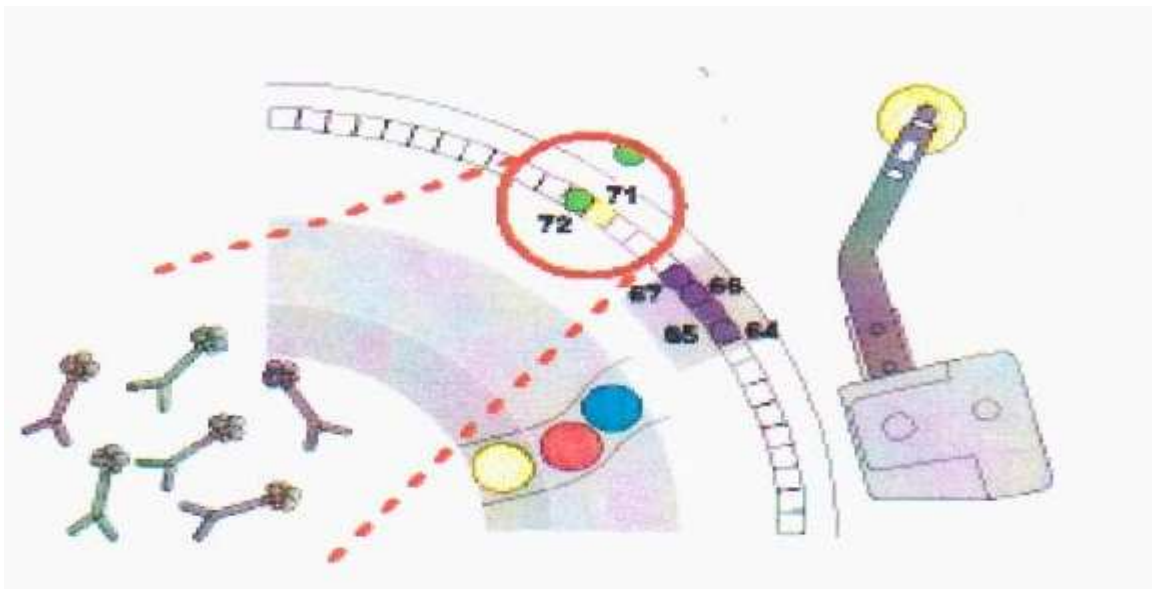


Fig. 10 : couronne réactionnelle, position 71 – 72

- Le distributeur de la zone de lavage 2 lave le mélange réactionnel pour éliminer toutes les particules non liées.

- La buse de solution de préactivation distribue cette solution (peroxyde d'hydrogène) et le système optique CMIA effectue une lecture de bruit de fond. La solution de préactivation sert à :
 - Créer un environnement acide pour éviter le dégagement précoce de l'énergie (émission de lumière).
 - Empêcher la formation d'agrégats de microparticules.
 - Séparer le colorant d'acridinium du conjugué lié au complexe obtenu sur les microparticules et préparer ainsi l'acridinium à l'étape suivante.
- Le distributeur de solution d'activation la distribue (hydroxyde de sodium) dans le mélange réactionnel. Une réaction d'oxydation se produit au moment où l'acridinium est exposé au peroxyde et à la solution alcaline. Cette réaction déclenche la réaction chimiluminescente. Le N-méthylacridone se forme et émet l'énergie (émission de lumière) au fur et à mesure qu'il retourne à son état de base.

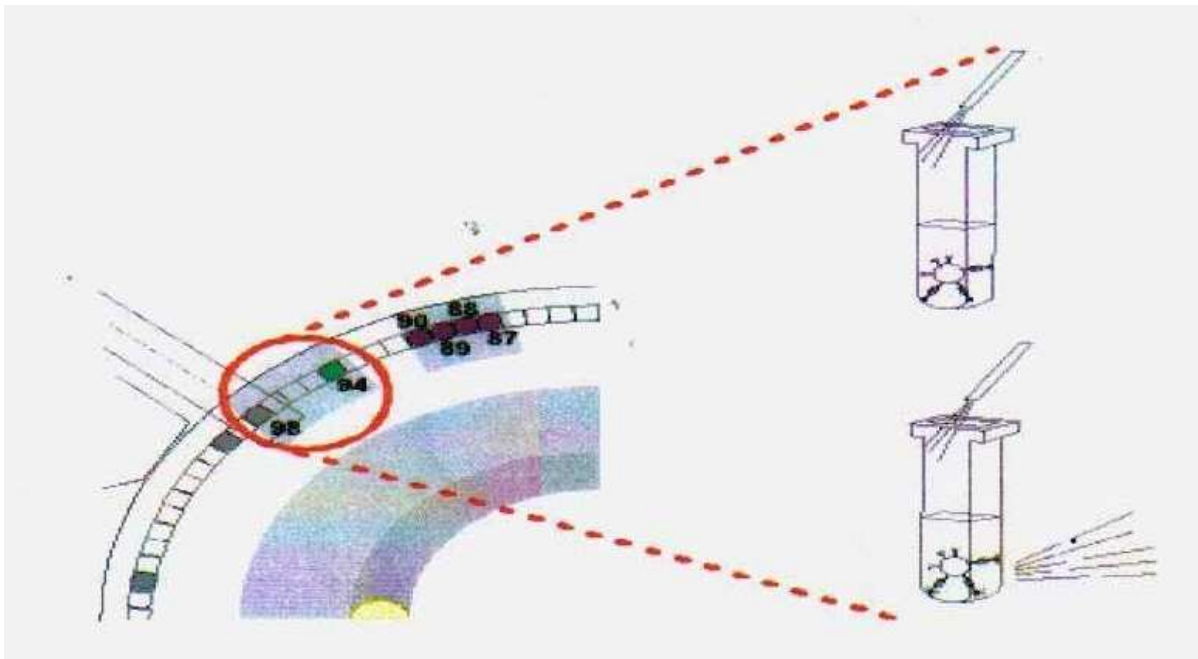


Fig.11 couronne réactionnelle, position 94 – 98

- Le système optique CMIA mesure l'émission chimiluminescente (lecture activée) pendant une période définie pour une détermination quantitative de la concentration de la substance à doser.

III. Résultats

III.1 Etude Rétrospective

Ce travail a été réalisé pour étudier la relation entre la concentration sanguine de ciclosporine/tacrolimus administrés par voie orale et la posologie de chaque médicament. Ces deux paramètres ont été étudiés de façon rétrospective chez des patients qui avaient reçu une greffe de rein.

III.1.1 description de la population d'étude

Notre étude concerne 26 patients hospitalisés ou consultant le service de Néphrologie du CHU-Fès et recevant la ciclosporine ou le tacrolimus.

D'après notre étude, on constate que les hommes représentent un grand pourcentage parmi les patients inclus avec 73%, alors que les femmes ne représentent que 27% (fig12). **La moyenne d'âge (\pm écart type) était de 42 ± 13 ans** avec des extrêmes allant de 19 ans jusqu'à 67 ans.

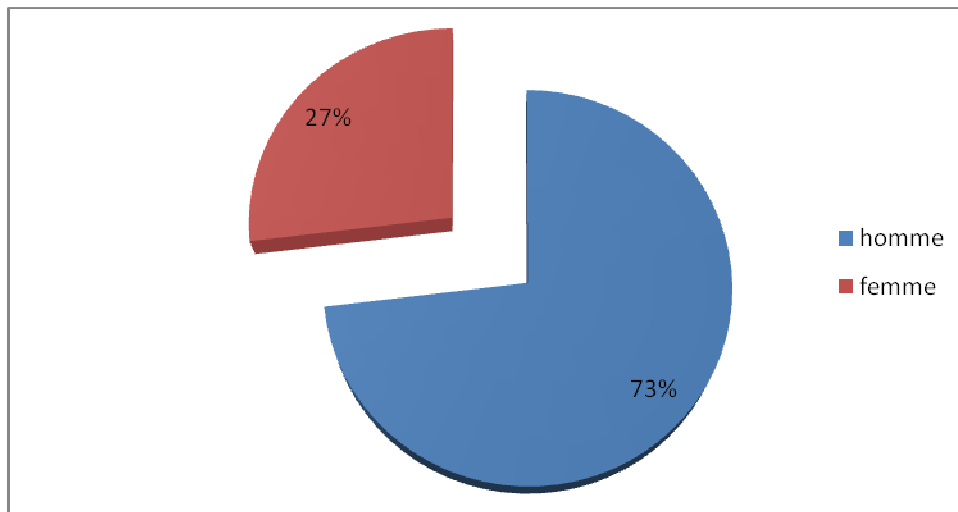


Fig.12 : répartition des cas traités par les immunosuppresseurs en fonction du sexe.

Le nombre de patients traités par la ciclosporine était de 14 personnes (54%).Ce qui était presque similaire au nombre de patients traités par le tacrolimus (n=12) et qui représente un taux de 46% (fig 13).

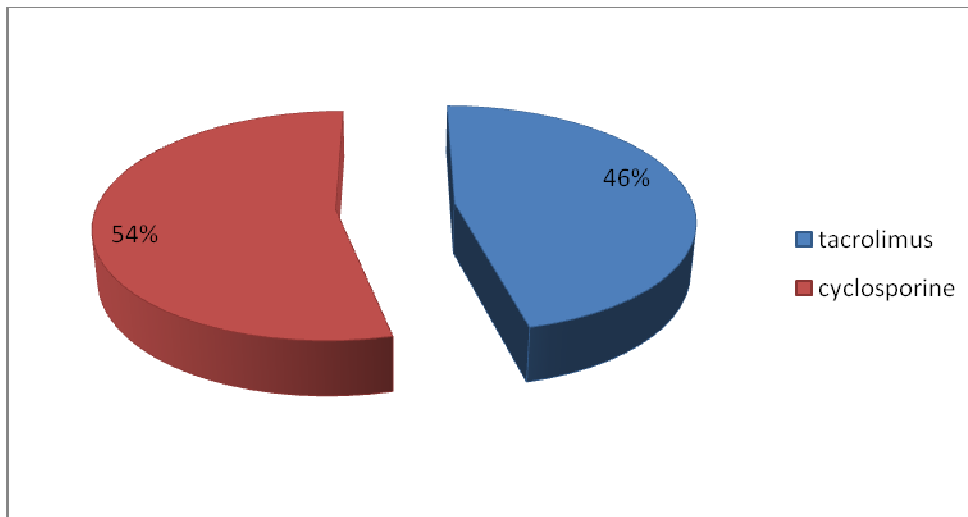


Fig.13 : répartition des immunosuppresseurs selon les patients consultant au CHU-Fès

III.1.2 Résultats des dosages des concentrations plasmatiques

III.1.2.a / Ciclosporine

Cette étude concerne 84 dosages de 14 patients qui ont subi une transplantation de rein. Ces patients sont sous Ciclosporine (CsA), ils ont été suivi durant la période post-transplantation pour maintenir la concentration de CsA dans la zone thérapeutique (annexe 3) afin d'éviter les effets indésirables du médicament.

Ces valeurs nous a permis d'étudier la corrélation entre la posologie (dose) et la concentration résiduelle C_0 de CsA (Fig.14).

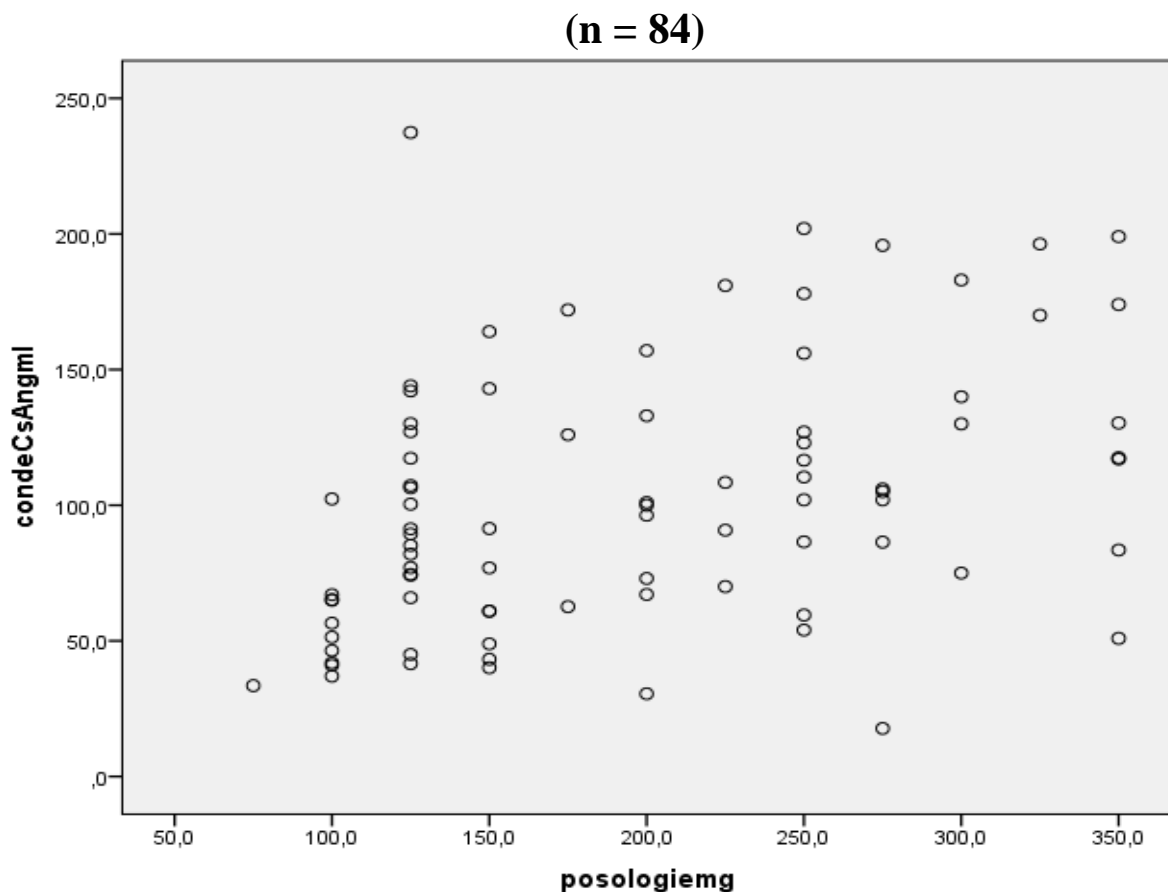


Fig.14 : Corrélation entre posologie et concentration résiduelle de la ciclosporine

La figure ci-dessus montre qu'il n'y a pas une linéarité entre les deux variables (concentration/dose). Cela doit être complété par la détermination du coefficient de corrélation (tableau 6).

Tableau 6 : corrélation de Pearson de la molécule ciclosporine

		Conc. CsA (ng/ml)
Posologie (mg)	Corrélation de Pearson	0,400**
	Sig. (bilatérale)	0,001
	N	84

** . La corrélation est significative à $p < 0.05$

Le coefficient de Pearson est faible $r = 0,4$ et significatif ($p = 0,001$). Il correspond au coefficient de détermination $r^2 = 0,16$; on multiplie ce dernier par 100 pour obtenir la variance partagée entre les deux variables.

Cela signifie que 84% de la variance n'est pas partagée par les deux variables. On conclut que la relation entre C_0 et la dose est très faible.

III.1.2.b / Tacrolimus

Notre étude concerne 43 dosages de 12 patients qui ont subi une transplantation rénale. Ils sont sous tacrolimus (TAC).

Le TAC a sans doute bénéficié de suivi thérapeutique pour le même objectif de celui de la ciclosporine. La figure ci-dessous nous a permis d'étudier la corrélation entre la concentration résiduelle et la dose du médicament.

(n = 43)

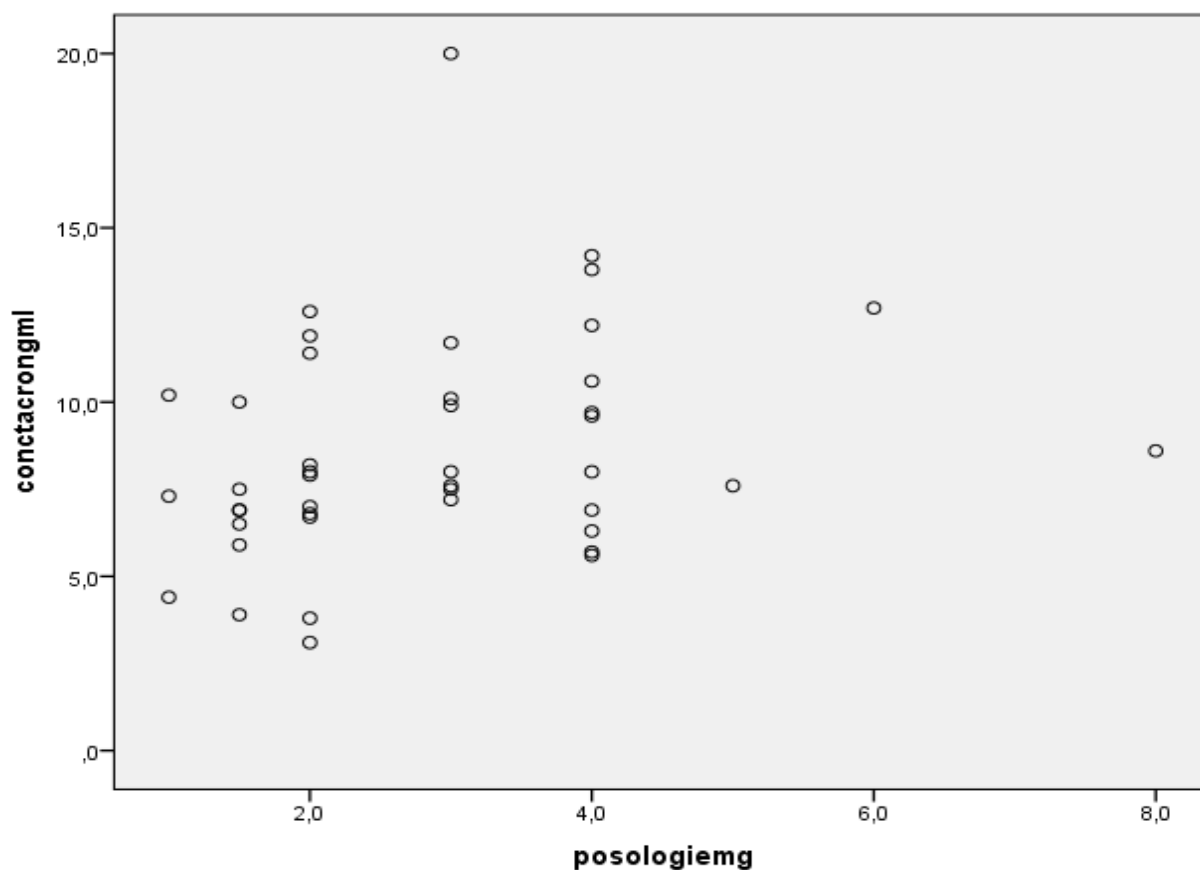


Fig.15 : Corrélation entre posologie et concentration du tacrolimus

On remarque qu'il n'y a pas de linéarité entre la concentration résiduelle C_0 et la posologie de tacrolimus.

Tableau 7 : corrélation de Prearson de la molécule tacrolimus

		Conc. TAC (ng/ml)
Posologie (mg)	Corrélation de Pearson	0,27
	Sig. (bilatérale)	0,08
	N	43

Le coefficient de Pearson est très faible $r= 0,27$ et non significatif ($p=0,08$). Il correspond au coefficient de détermination $r^2=0,073$; Cela signifie que 92.7% de la variance n'est pas partagée par les deux variables. On conclut qu'il n'existe pas de relation entre C_0 et la dose. Même si cette relation semble un peu importante, elle n'est pas significative ($p=0.08$).

A l'examen de ces variables, on voit que la concentration sanguine de tacolimus augmente chez des patients qui ont pris une telle dose, alors qu'elle diminue chez les autres qui ont pris la même dose, ainsi on comprend mieux pourquoi le coefficient de corrélation n'est pas significatif.

III.2 ETUDE PROSPECTIVE

La nécessité d'améliorer l'efficacité de l'immunosuppresseur après transplantation rénale nous a conduit à étudier le tacrolimus (TAC) à l'aide d'une fiche d'exploitation (annexe) dans une étude prospective de la patiente S.A, âgée de 54 ans, et qui a subi une transplantation rénale le 13/03/2014 à CHU HASSAN Fès.

Pour aider à optimiser la posologie, on a utilisé la technique CMIA pour déterminer les taux de TAC dans le sang total. Lors de l'administration orale, les taux sanguins ont été déterminés juste avant la dose suivante. Puis, ils ont été suivis pendant la période post-transplantation pour maintenir la concentration en principe actif dans la zone thérapeutique afin de prévenir les effets indésirables importants en cas de surdosage, et d'éviter le risque de rejet de la greffe en cas de sous-dosage.

a/ Evolution de la concentration sanguine de tacrolimus au cours du temps

On remarque après l'administration du tacrolimus, l'existence de certaines concentrations résiduelles (C_0) hors norme du médicament (annexe 3). Ceci reflète l'importance de ce dosage dans l'adaptation de posologie afin de prévenir les effets indésirables. Mais il faut noter qu'une augmentation ou diminution (volontaire ou accidentelle) de la dose au patient aura alors peu de chance de provoquer l'apparition des effets toxiques.

La moyenne des concentrations (\pm écart type) de TAC était de $9,82 \pm 3,26$ ng/ml avec un coefficient de détermination $r^2=0,098$ (fig.16).

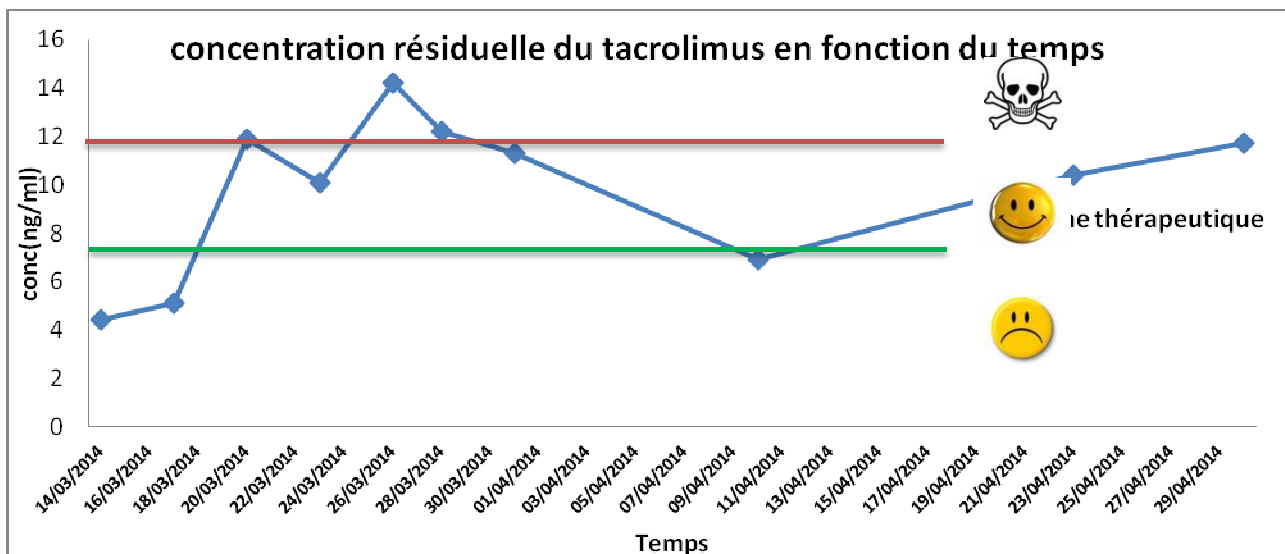


Fig.16 Evolution des concentrations résiduelles C_0 de TAC (CMIA) au cours du temps

La courbe montre que le taux de la concentration résiduelle sanguine de TAC augmente dans la période post-transplantation tout en essayant d'adapter cette concentration avec la norme

(<6 mois: 7-12 µg/l) pour atteindre l'efficacité du médicament

b/ Evolution de la posologie du tacrolimus au cours du temps

La posologie doit reposer principalement sur les évolutions cliniques du rejet et de la tolérance chez chaque patient individuel ainsi que la pharmacocinétique du tacrolimus (annexe 2).

Tableau 8: ajustement posologique de TAC pendant la période post-transplantation

Date	Conc. TAC (ng/ml)	Dose TAC (mg)
14/03/2014	4,4	8
17/03/2014	5,1	10
20/03/2014	11,9	12
23/03/2014	10,1	12
26/03/2014	14,2	9
28/03/2014	12,2	9
31/03/2014	11,3	7
10/04/2014	6,9	7
23/04/2014	10,4	9
30/04/2014	11,7	7
moyenne	9,82	9
écart type	3,257401828	1,885618083

D'après nos résultats, on constate que les doses de tacrolimus varient en fonction de la concentration sanguine. Habituellement, elles sont réduites au cours de la période post-transplantation (tableau 8)

IV. Discussions

Cette étude rétro-prospective des immunosuppresseurs, notamment la ciclosporine et le tacrolimus montre que la surveillance des concentrations de ces médicaments est nécessaire parce qu'il n'y a pas une relation directe entre la posologie et la concentration sanguine obtenue. Cela semble s'expliquer par :

- Variabilités inter-individuelles : d'un individu à l'autre, la même posologie du médicament donnera des concentrations différentes en fonction de :
 - Fonction métabolique de l'individu
 - Pharmacogénétique : conséquences des variations cinétiques, et dynamique héréditaire en termes d'efficacité et toxicité.
 - Age : défaillance des organes pour le sujet âgé.
 - Sexe : la physiologie de l'homme et différente de celle de la femme.
- Variabilités intra-individuelles : pour un même individu, la même posologie donnera des concentrations différentes, cela peut être expliqué par :
 - Pharmacocinétique (annexe 1,2).
 - Co-administration du médicament.
 - Repas.
 - Grossesse.
- Des variations de concentrations sanguines peuvent s'observer selon l'origine (fabricant) ou le mode de préparation de la ciclosporine.

Dans la greffe de rein, il est extrêmement important, pour éviter le rejet, que la concentration de ciclosporine/tacrolimus soit suffisamment haute, donc efficace, aussitôt après la greffe.

La ciclosporine/tacrolimus induisent un certain nombre d'effets secondaires toxiques qui peuvent être évités si les concentrations sanguines sont surveillées avec une baisse de la posologie du médicament dès que les concentrations se montrent trop fortes.

L'étude de la probabilité des ces médicaments nous a donné des résultats significatifs, mais les informations étaient insuffisantes pour évaluer l'efficacité du tacrolimus par rapport à la cyclosporine.

CONCLUSION

L'utilisation des traitements immunosuppresseurs, notamment ciclosporine et tacrolimus, a permis à la transplantation d'organes de devenir un recours thérapeutique chez des patients souffrant d'insuffisance rénale.

Le suivi thérapeutique de ciclosporine et tacrolimus montre une absence de corrélation entre la concentration résiduelle et la dose de chaque médicament d'une part, et d'autre part il ne permet pas de connaître l'effet de l'association de ces traitements sur le système immunitaire.

Malheureusement, l'utilisation de ces traitements n'a pas encore trouvé de protocole stable en termes de posologie et d'association des différents médicaments. La balance entre le risque de rejet et les effets secondaires de ces traitements reste un réel problème parce que ces immunosuppresseurs se caractérisent par une fenêtre thérapeutique étroite et une grande variabilité pharmacocinétique inter et intra-individuelle aux cours du temps.

De nombreuses techniques ont été développées pour le dosage sanguin des immunosuppresseurs dans le cadre du suivi thérapeutique. Les techniques immunologiques sont largement utilisées et présentent l'avantage par rapport aux méthodes séparatives conventionnelles de pouvoir effectuer des analyses avec un débit relativement élevé et une certaine facilité d'emploi.

I. Ciclosporine

• Pharmacocinétique

Les formes capsules molles et solutions buvables sont bio-équivalents

	Sandimmun®	Néoral®
	Capsules à 25, 50 et 100 mg et solution buvable à 100 mg/ml	Capsules à 10, 25, 50 et 100 mg et solution buvable à 100mg/ml
Biodisponibilité (forme orale)	20 – 50% Diminuée chez les patients noirs (en moyenne de 35%) et chez les enfants greffés hépatiques, en particulier de moins de 5 ans.	En moyenne supérieure de 29% à celle de Sandimmun®
Pic de concentration	1 à 6 heures	Cmax obtenu en 1 heure de moins sous Néoral® comparé à Sandimmun® Cmax moyenne sous Néoral® > de 59% à celle observée sous Sandimmun®
Demi – vie	Biphasique : Demi-vie α -rapide de 1 à 2 h ; Demi-vie β d'environ 19h	Biphasique : Demi-vie α -rapide de 1 à 2 h ; Demi-vie β d'environ 8h
Fixation protéique	90%	
Métabolisme	Fortement métabolisé par le cytochrome P450 3A4 au niveau de la paroi intestinale, du foie et du rein (métabolites actifs et inactifs, l'ensemble des métabolites représentant moins de 10% de l'activité immunosuppressive de la molécule mère)	
Elimination	Essentiellement biliaire	
Etat d'équilibre	6% éliminés dans les urines dont 0.1 % sous forme inchangée 1 à 4 jours	

• Interactions médicamenteuses de la ciclosporine

a. Médicaments (ou produits) qui augmente la concentration sanguine de ciclosporine :

- Macrolides et apparentés : érythromycine (abbotticine[®], ery[®], erythrocin[®] ...), josamycine (josacine[®]), pristinamycine (pyostacine[®]), roxithromycine (claramid[®], rulid[®]), midécamycine (mosil[®]), clarithromycine (naxy[®], zeclar[®]).
- Antifongiques azolés : kétoconazole (nizoral[®]), itraconazole (sporanox[®]), fluconazole (béagyne[®], triflucan[®])
- Inhibiteurs calciques : nifédipine (loxen[®]), diltiazem (tildiem[®], diacor[®]), vérapamil (isoptine[®], ocadrik[®], tarka[®]).
- Corticoïdes, surtout administrés par voie IV.

- Contraceptifs oraux.
- Antiprotéases du VIH : ritonavir (norvir[®], kaletra[®]), nelfinavir (viracept[®]), indinavir (crixivan[®]), saquinavir (fortovase[®], invirase[®]), amprenavir (agenerase[®]), lopinavir (keletra[®]).
- Autres : amiodorane (cordarone[®], corbionax[®]), méthotrexate (ledertrexate[®], novatrex[®]), cimétidine ($\geq 800\text{mg/j}$; tagamet[®], stomédine[®]), sirolimus (rapamune[®]).
- Danazol (danatrol[®]).
- Jus de pamplemousse (par inhibition du cytochrome p450 3A4).

b. Médicaments qui diminuent la concentration sanguine de ciclosporine

- Antiépileptiques : carbamazépine (tégrétol[®]), phénobarbital (gardéнал[®], aparoxal[®],...), phénytoïne (di-hydan[®], pyorédol[®]), primodone (mysoline[®]).
- Rifampicine (rifadine[®], rimactan[®]), rifabutine (ansatipine[®]).
- Anti-rétroviraux non-nucléosidiques : efavirenz (sustiva[®]), névirapine (viramune[®]).
- Triméthoprime IV (wellcoprim[®], bactrim[®], eusaprim[®]), clindamycine (dalacine[®]).
- Orlistat (xenical[®], alli[®]).
- Octréotide (sandostatine[®]), lanréotide (somatuline[®]).
- Millepertuis (arkogélules[®] millepertuis, procalmil[®]).

II. Tacrolimus

• Pharmacocinétique

Biodisponibilité (forme orale)	10 à 20% : reflux par la glycoprotéine P intestinale et métabolisme présystémique par le cytochrome P450 3A4 (CYP 3A4)
Pic de concentration	1 à 3 heures
Demi – vie	Chez le sujet sain : 43 heures Chez le transplanté hépatique : environ 12 heures Chez le transplanté rénal : environ 15 heures
Fixation protéique/hématies	Liaison à l'albumine et à l'alpha1 glycoprotéine ; forte incorporation dans les hématies.
Métabolisme	Important et variable par le CYP 3A4 intestinal et hépatique. Huit métabolites 13-O-déméthylé, dont l'activité pharmacologique est toutefois minime (6,4 % de celle du tacrolimus).
Elimination	Biliaire (cycle entérohépatique)

• Interactions médicamenteuses du tacrolimus

a. Médicaments (ou produits) qui augmente la concentration sanguine du tacrolimus :

- Macrolides et apparentés : érythromycine (abbotticine[®], ery[®], erythrocin[®] ...), clarithromycine (naxy[®], zeclar[®]).
- Antifongiques azolés : kétoconazole (nizoral[®]), itraconazole (sporanox[®]), fluconazole (béagyne[®], triflucan[®])
- Inhibiteurs calciques : nicardipine (loxen[®]), nifédipine (adanate[®], ténordate[®]), diltiazem (tildiem[®], diacor[®]), vérapamil (isoptine[®], ocadrik[®], tarka[®]).
- Antiprotéases du VIH : ritonavir (norvir[®], kaletra[®]), nelfinavir (viracept[®]), indinavir (crixivan[®]), saquinavir (fortovase[®], invirase[®]), amprenavir (agenerase[®]), lopinavir (keletra[®]), tipranavir (aptivus[®]).
- Voriconazole (vfend[®]), danazol (danatrol[®]).
- Jus de pamplemousse (par inhibition du cytochrome p450 3A4).

b. Médicaments qui diminuent la concentration sanguine de ciclosporine

- Antiépileptiques : carbamazépine (tégréto[®]), phénobarbital (gardéna[®], aparoxal[®],...), phénytoïne (di-hydan[®], pyorédol[®]), primodone (mysoline[®]).
- Rifampicine (rifadine[®], rimactan[®]), rifabutine (ansatipine[®]).
- Anti-rétroviraux non-nucléosidiques : efavirenz (sustiva[®]), névirapine (viramune[®]).
- Millepertuis (arkogélules[®] millepertuis, procalmil[®]).

III. Protocole de suivi thérapeutique des immunosuppresseurs

- **Immunosuppression : protocole**

Néoral(CsA)	Prograf(TAC)
<p>A débuter dès J1 J1 : 8mg/Kg/j J2 : C0 = 150 – 200 mg J3 à M5 : C0 = 150 mg</p>	<p>A débuter dès J0 0,1 mg/Kg/j*2 prises 1ère dose pré-opératoire, 2ème dose post-opératoire</p>

- **Intervalles thérapeutiques**

Les intervalles dépendent en partie de la méthode de dosage utilisée.

Tacrolimus
greffe rein:

0 - 6 mois: 7-12 µg/l
 6 - 12 mois: 7-10 µg/l
 > 12 mois: 6-8 µg/l

Ciclosporine

greffe rein:

initial: 150-250 µg/l
entretien (> 12 mois): 100-150 µg/l

RÉFÉRENCE

- [1] Edwards EB, Bennett LE, Cecka JM. Effect of HLA matching on the relative risk of mortality for kidney recipients : a comparison of the mortality risk after transplant to the mortality risk of remaining on the waiting list. *Clin Transplant* 1997 ; 64(9) : 1274-1277.
- [2] Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2).
- [3] Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715–29.
- [4] Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 2004;20:529–38.
- [5] Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;31:335–40.
- [6] Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant* 2004;4:1019–25.
- [7] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711–23.
- [8] Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;31:335–40.
- [9] Thervet E. Sirolimus therapy following early cyclosporine withdrawal in transplant patients: mechanisms of action and clinical results. *Int J Nanomedicine* 2006;1:269–81.
- [10] Hong JC, Kahan BD. Immunosuppressive Agents in Organ Transplantation : Past, Present, and Future. *Seminars in Nephrology* 2000 ; 20(2) : 108-25.
- [11] Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants : Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *American Journal of Kidney Diseases* 1996 ; 28(2) : 159-72.
- [12] Kelly P, Kahan BD. Review : Metabolism of Immunosuppressant Drugs. *Current Drug Metabolism* 2002 ; 3 : 275-87.
- [13] Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer Immunosuppressive Drugs : A Review. *J Am Soc Nephrol* 1999a ; 10 : 1366-80.
- [14] Taylor DO. Immunosuppressive therapies after heart transplantation : best, better, and beyond. *Heart Transplantation* 2000 ; 15 : 108-14.
- [15] Clipstone NA, Crabtree GR. Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:20–30.
- [16] G. Baumann, J.- F. Borel. Mécanismes moléculaires de l'action des agents immunosupresseurs. *Médecine/Sciences* 1992 ; 8 : 366-71.
- [17] Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;321:1725-38.
- [18] Borel JF. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien. Klin. Wochenschr.* vol. 114, no 12, 2002, p. 433-7.
- [19] P. Niaudet. Traitement immunosupresseur. *Néphrologie et Thérapeutique* 2011 ; 7 : 592-598.
- [20] Masri MA, Barbari A, Stephan A, Rizk S, Kilany H, Kamel G. Measurement of lymphocyte cyclosporine levels in transplant patients. *Transplant Proc* 1998;30:3561-2.
- [21] Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Hochstrasser D, Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;857:92-9.

- [22] Barbari A, Stephan A, Masri M, Mourad N, Kamel G, Kilani H, et al. Cyclosporine lymphocyte level and lymphocyte count: new guidelines for tailoring immunosuppressive therapy. *Transplant Proc* 2003;35:2742-4.
- [23] Barbari AG, Masri MA, Stephan AG, Mourad N, El-Ghoul B, Kamel GS, et al. Cyclosporine lymphocyte maximum level: a new alternative for cyclosporine monitoring in kidney transplantation. *Exp Clin Transplant* 2005;3:293-300.
- [24] Barbari AG, Masri MA, Stephan AG, El Ghoul B, Rizk S, Mourad N, et al. Cyclosporine lymphocyte maximum level monitoring in de novo kidney transplant patients: a prospective study. *Exp Clin Transplant* 2006;4:400-5.
- [25] Kamisako T, Leier I, Cui Y, Konig J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology* 1999;30:485-90.
- [26] Nassima YAHIAOUI. Suivi thérapeutique du tacrolimus durant les trois mois post-greffe : Etude rétrospective sur la cohorte des allogreffes rénales 2010 et 2011 au CHU de Grenoble. dumas-00776548, version 1 - 15 Jan 2013.
- [27] P. Corteel. Caractéristiques immuno-analytiques du dosage sanguin du tacrolimus. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2013) 28, 144—147.
- [28] Ansermot N. Suivi thérapeutique de la cyclosporine. 2007 Thèse 3912- Hôpitaux universitaires Genève.
- [29] Undre NA, Stevenson P, Schafer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: clinically relevant aspects. *Transplant Proc* 1999;31:21S-4S.
- [30] Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Schiebel HM, Linck A, Sewing KF. Simplified high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for measurement of tacrolimus and its metabolites and cross-validation with microparticle enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 1995;17:504-10.
- [31] Liu WT, Ren Y, Wang J, Eng RT, Wong PY. The detection of tacrolimus and its metabolites in whole blood of transplant patients by an improved HPLC-Abbott tacrolimus II immunoassay. *Journal of Clinical Ligand Assay* 1998;21:68-75.
- [32] Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:404-30.
- [33] Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:13-58.
- [34] Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gu` rkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007;357:2562–75.
- [35] Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant* 2007;7:1506–14.
- [36] Tricot L, Lebbe C, Pillebout E, Martinez F, Legendre C, Thervet E. Tacrolimus-induced alopecia in female kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 2005;80:1546–9.
- [37] Dall A, Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3(Suppl. 2):S68–75.
- [38] Magee CC, Pascual M. Update in renal transplantation. *Arch Intern Med* 2004;164:1373-88.
- [39] Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JJ, Christiaans MH, Vos PF, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant* 2004;4:937-45.
- [40] Taylor DO, Barr ML, Radovancevic B, Renlund DG, Mentzer RM, Jr., Smart FW, et al. A randomized, multicenter comparison of tacrolimus and cyclosporine immunosuppressive regimens in cardiac transplantation: decreased hyperlipidemia and hypertension with tacrolimus. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:336-45.
- [41] Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997;63:977-83.

- [42] De Bonis M, Reynolds L, Barros J, Madden BP. Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:690-5.
- [43] BOUAZIZ J.-D. , BAGOT M. & RYBOJAD M. Greffon contre l'hôte.
- [44] Morris RG, Tett SE, Ray JE. Cyclosporin A monitoring in Australia : consensus Recommendations. *Ther Drug Monit* 1994 ; 16 : 507-6.
- [45] Jusko WJ et al. Consensus Document : Therapeutic Monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drugs monit* 1995b ; 17 : 606-14.
- [46] Streit F et al. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its métabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem* 1996 ; 42 : 1417-25.
- [47] Shibata N, Minouchi T, Hayashi Y, Shibata H, Ono T, Shimakawa H. Effects of temperature and endogenous factors in blood on concentrations of cyclosporin in plasma measured by high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1989;37:1877-80.
- [48] Grevel J, Kahan BD. Area under the curve monitoring of cyclosporine therapy: the early posttransplant period. *Ther Drug Monit* 1991;13:89-95.
- [49] David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit* 2001;23:100-14.
- [50] Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999;68:1356-61.
- [51] Sindhi R, LaVia MF, Paulling E, McMichael J, Burckart G, Shaw S, et al. Stimulated response of peripheral lymphocytes may distinguish cyclosporine effect in renal transplant recipients receiving a cyclosporine+rapamycin regimen. *Transplantation* 2000;69:432-6.
- [52] Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002;24:330-50; discussion 29.
- [53] Jorga A, Holt DW, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004;36:396S-403S.
- [54] Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 2001;313:241-53.
- Wong KM, Shek CC, Chau KF, Li CS. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000;35:660-6.
- [55] Wong KM, Shek CC, Chau KF, Li CS. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000;35:660-6.
- [56] Marquet P., Léger F., Pisano P., billaud E., suivi thérapeutique de la ciclosporine. In : : suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments, collection Option/Bio, Ed Elsevier, Paris, 2004 : 279-93.
- [57] Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E, Shaw LM. Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine and Tacrolimus. *Clin Biochem* 1998 ; 31 : 309-16.
- [58] Barbier Y. Les immunodosages, de la théorie à la pratique. Editions de l'Acomen, Lyon, 1989.
- [59] Johnston A, Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:339-50.
- [60] Widmer N, Principes d'adaptation posologique dans le contexte du TDM. (03/06/2011) ; Available from : <http://pharmacoclin.hug-ge.ch/formation/NW180411.pdf>.