



Université  
de Toulouse

# UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2014

THESES 2014 TOU3 2094

## THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement  
par

METSU DAVID

INTERET DE L'EXPLORATION DE LA FRACTION LIBRE DE L'ATAZANAVIR ET DU  
DARUNAVIR CHEZ LES PATIENTS VIH

Lundi 08 Décembre 2014

Directeur de thèse : Docteur GANDIA-MAILLY Peggy

### JURY

Président : Pr HOUIN, Georges  
1er assesseur : Pr DELOBEL, Pierre  
2ème assesseur : Dr WOILLARD, Jean-Baptiste

*La science consiste à passer d'un étonnement à un autre,*  
*Aristote*

## Remerciements

---

Je souhaiterais remercier Monsieur le Professeur HOUIN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé dans mon travail tout au long de mon internat au laboratoire.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Docteur GANDIA-MAILLY ma directrice de thèse. Sa patience, sa disponibilité, sa compétence et sa rigueur m'ont permis d'avancer rapidement dans la spécialité de Pharmacologie-Pharmacocinétique. Merci.

Je souhaiterais également remercier Monsieur le Professeur DELOBEL. Je suis honoré de votre présence dans mon jury de thèse. Merci pour votre aide et votre collaboration dans les travaux de recherche sur le VIH.

Merci à vous, Docteur WOILLARD, de m'avoir inculqué ces notions de statistiques, de modélisation et de pharmacogénétique mais aussi de m'avoir accueilli dans de bonnes conditions lors de mon semestre sur Limoges.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur CHATELUT pour ses relectures attentives, ainsi que pour mon intégration dans votre une équipe de recherche.

Merci à toute l'équipe médicale du Laboratoire, Michel, Sylvie, Pascale, pour votre suivi dans tous les domaines de la discipline lors de ces dernières années. Merci également à l'équipe technique et administrative du laboratoire pour votre aide, votre accueil, vos sourires et vos discussions parfois décalées sur certains récipients. Un certain PS souhaiterait que je le remercie humblement et que je le couvre de louanges. Je ne le ferai pas. C'est à lui de me remercier de partager son bureau à présent. Merci également à l'équipe technique et d'ingénieurs du PTA, pour ces mois de validations pré-COFRAC.

Merci à Monsieur le Professeur MARQUET et son équipe médicale et technique de pharmaco/toxico de Limoges, pour son accueil, ses conseils et sa formation expresse et pointue dans le domaine de la pharmacocinétique de population. Je remercie particulièrement Jbouille la fripouille expert du domaine mais qui a su aussi me montrer l'étendue de ses connaissances dans les effets indésirables de l'antibiothérapie per os. Et j'attends toujours ma tour Eiffel.

J'adresse toute mon affection à mes parents et à ma famille qui ont toujours été là pour moi. Je vous remercie profondément.

A ma Camille qui me rend heureux depuis quelques années maintenant. Merci pour ton aide inestimable pour la rédaction de ma thèse.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et toutes les personnes qui m'ont soutenu/supporté tout le long de mon enfance, Nicolas, Jérôme, El gringo et l'Homme, et de mes études de pharmacie, d'internat. Mention spéciale aux PortetHanol, à P... B..., coquine, Domi l'ami des tout petits, Michal, Cri-Cri, Fred, Simon, Aïcha, mais aussi à Mini-moi et Marca. J'en oublie de nombreux...

Et enfin merci au régiopôle, et à son humble et modeste créateur, deuxième plus belle région de France et qui va en profiter pour parasiter la plus belle, pour son accueil chaleureux et sa fine gastronomie.

Puissent ces quelques lignes être le reflet de ma gratitude.

*I walk the line,*

*J.C.*

## Table des matières

Table des illustrations .....	2
Liste des tableaux .....	4
<b>Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>Partie I : Données bibliographiques .....</b>	<b>8</b>
I-    Inhibiteurs de la protéase virale : Atazanavir et Darunavir .....	9
a.    Indications et objectifs du traitement .....	9
b.    Place de l'Atazanavir et du Darunavir en 2014 .....	10
c.    Mécanismes d'action .....	13
d.    Résistance .....	15
e.    Pharmacocinétique .....	17
f.    Liaisons protéiques .....	26
g.    Transporteurs membranaires .....	27
h.    Interactions médicamenteuses .....	37
i.    Effets indésirables .....	38
II-   Concentration et fraction libres .....	40
a.    Fraction libre et notion de liaison protéique .....	40
b.    Techniques séparatives .....	53
c.    Interprétation.....	58
III-  Suivi thérapeutique pharmacologique de l'Atazanavir et du Darunavir .....	61
a.    Définition du suivi thérapeutique pharmacologique .....	61
b.    Bénéfices du suivi thérapeutique pharmacologique .....	62
c.    Situations physiopathologiques pouvant affecter la pharmacocinétique des médicaments .....	64
d.    Indications du STP chez le patient infecté par le VIH .....	66
e.    Outils actuels pour le suivi thérapeutique pharmacologique de l'ATV et du DRV .....	68
<b>Partie II : Exploration de la concentration et de la fraction libre de l'Atazanavir et du Darunavir chez 100 patients VIH positifs .....</b>	<b>73</b>
I-    Objectifs de cette étude .....	74
II-   Patients .....	75

III-	Matériel et Méthodes .....	82
	a. Détermination de la concentration libre de l'Atazanavir et du Darunavir .	82
	b. Dosage de la bilirubine et de l'AAG et recueil des charges virales, des bilans de résistance et le taux de lymphocytes T CD <sub>4</sub> .....	79
	c. Estimation de la concentration totale résiduelle de l'Atazanavir.....	81
	d. Estimation de la fraction libre de Darunavir .....	81
	e. Analyses statistiques .....	83
IV-	Résultats .....	85
	a. Ultrafiltration .....	85
	b. Méthode de dosage de la concentration libre de l'Atazanavir et du Darunavir .....	86
	c. Modèle pharmacocinétique choisi pour estimer la concentration libre de Darunavir .....	87
	d. Données biologiques, concentrations totales et libres, et fraction libres en Atazanavir et Darunavir chez les patients .....	91
	e. Corrélations pharmacocinétique-pharmacodynamique .....	97
	<b>Partie III : Discussion, conclusion et perspectives .....</b>	<b>103</b>
I-	Discussion .....	104
	a. Evaluation de la méthode d'ultrafiltration .....	104
	b. Exploration de la fraction libre de l'Atazanavir .....	105
	c. Exploration de la fraction libre du Darunavir .....	108
II-	Conclusion .....	112
III-	Perspectives .....	113
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>115</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>126</b>

## Liste des abréviations

---

AAG	:	Alpha 1 Glycoprotéine Acide
ASC	:	Aire Sous Courbe
ATV	:	Atazanavir
Bm	:	nombre de sites de fixation
CQI	:	Contrôle de Qualité Interne
Ct	:	Concentration Totale
Ctre	:	Concentration Totale Résiduelle Estimée
Cu	:	Concentration Libre
Cure	:	Concentration Libre Résiduelle Estimée
CV	:	Charge Virale
CV	:	Coefficient de Variation
DE	:	Dialyse à l'Equilibre
DRV	:	Darunavir
EMA	:	European Medicine Agency
F	:	Biodisponibilité
FDA	:	Food and Drug Administration
Fu	:	fraction libre
IP	:	Inhibiteur de Protéase
IQR	:	Rang interquartile
Ka	:	vitesse d'absorption
Kd	:	constant de dissociation
Ke	:	vitesse d'élimination

LPV	:	Lopinavir
OR	:	Odd-Ratio
PK	:	Pharmacocinétique
PKPD	:	Pharmacocinétique-Pharmacodynamique
RMSE	:	Root Mean Square Error
RTV	:	Ritonavir
Sd	:	Ecart type
STP	:	Suivi Thérapeutique Pharmacologique
Vd	:	Volume de distribution
Vd_bin	:	Volume de distribution binarisé
Vdss/F	:	Volume de distribution apparent

Figure 1 : Cycle viral du virus de l'immunodéficience humaine .....	13
Figure 2 : Etape du cycle viral où les IP agissent <sup>19</sup> .....	14
Figure 3 : Transporteurs membranaires entérocytaires impliqués dans le passage de l'ATV et du DRV à travers la barrière intestinale. ....	19
Figure 4 : Comparaison de l'aire sous la courbe moyenne des concentrations en fonction du temps de l'ATV chez des patients sains et infectés par le VIH aux doses recommandées <sup>2</sup> . ...	21
Figure 5 : Transporteurs membranaires et système enzymatique impliqués dans le transport et le métabolisme de la bilirubine et des inhibiteurs de protéase au niveau des hépatocytes. ....	22
Figure 6 : Concentrations de DRV en fonction du temps après administration de DRV par voie intraveineuse (150mg) ou orale (600mg), avec ou sans Ritonavir. ....	23
Figure 7 : Concentrations moyennes de DRV en fonction du temps après une prise de DRV 400 mg avec du Ritonavir.....	24
Figure 8 : Les différents déficits décrits pour les transporteurs d'influx. ....	31
Figure 9 : Principe de la forme libre pharmacologiquement active .....	40
Figure 10 : Représentation de Michaelis Menten mettant en relation la concentration libre avec la liaison protéique. ....	41
Figure 11: Représentation schématique d'un déplacement de liaison <i>in vitro</i> . ....	45
Figure 12 : Représentation schématique d'un déplacement de liaison <i>in vivo</i> .....	49
Figure 13 : Représentation du principe de la dialyse à l'équilibre.....	55

Figure 14 : Principes du phénomène d'ultrafiltration.....	57
Figure 15 : Interprétation clinique d'une compétition de liaison d'après le diagramme proposé par Rolan <sup>108</sup> .....	58
Figure 16: Répartition des heures de prélèvements des patients sous Darunavir.....	82
Figure 17 : Représentation de la densité de probabilité du volume de distribution apparent à l'état d'équilibre ( $V_{dss}/F$ ) et de la constante de vitesse d'élimination ( $K_e$ ) estimés par le modèle pour les 68 échantillons. ....	87
Figure 18 : Témoins de la qualité du modèle .....	88
Figure 19: Profils pharmacocinétiques individuels pour 4 patients.....	89
Figure 20 : Comparaison par la méthode de Bland Altman entre les concentrations libres résiduelles estimées ( $C_{ure}$ ) et mesurées ( $C_{urr}$ ). ....	89
Figure 21 : Comparaison par la méthode de Bland Altman entre les concentrations libres prédites et observées.....	90
Figure 22 : Relation entre les marqueurs de la fraction libre pour l'ATV ( $C_{ure}$ concentration libre résiduelle estimée ; $C_{tre}$ Concentration totale résiduelle estimée ; $f_u$ fraction libre ; AAG alpha 1 glycoprotéine acide) .....	92
Figure 23 : Relation entre les marqueurs de la fraction libre pour le DRV ( $C_{ure}$ concentration libre résiduelle estimée ; $C_{tre}$ Concentration totale résiduelle estimée ; $f_u$ fraction libre ; AAG alpha 1 glycoprotéine acide) .....	94
Figure 24 : Hyperbilirubinémie sous Atazanavir .....	98
Figure 25 : Courbe ROC reliant la $f_u$ du Darunavir et le risque d'avoir une charge virale positive .....	100

Figure 26 : Représentation graphique sous forme de boîte à moustache de la concentration libre résiduelle estimée ( $C_{ure}$ ) en fonction du  $V_{dss}/F$  dichotomisé ( $V_{d\_bini}$ )..... 101

Tableau 1 : Méthodologie d'établissement de la gradation et des niveaux de preuve des recommandations établies dans le rapport Morlat 2013.....	11
Tableau 2 : Retranscription des caractéristiques retrouvées dans le polymorphisme de l'OATP1B1.....	29
Tableau 3 : $f_u$ déterminées à l'aide de la dialyse à l'équilibre et de l'ultrafiltration pour différentes températures.....	57
Tableau 4 : Résultats des calculs du biais (justesse) par rapport à la cible théorique (B) et de la reproductibilité (R) .....	86
Tableau 5 : Résultats pharmacocinétiques et biologiques de l'étude chez les patients sous ATV et DRV .....	96
Tableau 6 : Données pharmacocinétiques et biologiques classées en fonction du statut viral des patients sous ATV .....	96
Tableau 7 : Données pharmacocinétiques et biologiques classées en fonction du statut viral des patients sous DRV .....	97
Tableau 8 : Résultats des analyses univariées pour la charge virale .....	101

## Introduction

L'Atazanavir (ATV) et le Darunavir (DRV) sont deux récents inhibiteurs de la protéase (IP) du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Ils sont utilisés en première ligne thérapeutique en combinaison avec des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse comme le Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF), à 245 mg, et l'Emtricitabine, à 200 mg, une fois par jour<sup>1</sup>. Ces molécules sont particulièrement intéressantes en raison de leur haute barrière de résistance génétique, terme associant le nombre de mutations virales à la diminution de la sensibilité du virus à la molécule, et notamment le DRV pour lequel l'efficacité est diminuée lorsque la protéase virale présente 3 à 4 mutations simultanément<sup>2,3</sup>. Le DRV a également l'avantage de ne pas avoir de résistances croisées avec les autres IP<sup>3</sup>. De plus, ces molécules ont une administration facilitée et des perturbations métaboliques diminuées par rapport aux autres antirétroviraux. En effet, l'Amprénavir, l'Indinavir et le Lopinavir, IP plus anciens, induisent fréquemment des troubles glucidiques et lipidiques<sup>1</sup>. Cependant, l'ATV induit des hyperbilirubinémies à bilirubine libre, sans hépatotoxicité, pouvant diminuer l'observance des patients<sup>4</sup>.

Les molécules éligibles pour le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) sont celles présentant une forte variabilité inter-individuelle associée à une faible variabilité intra-individuelle, un faible index thérapeutique et une forte relation concentration – efficacité et ou toxicité<sup>5</sup>. Ces caractéristiques sont retrouvées avec l'ATV et partiellement avec le DRV<sup>2,3</sup>. Associé au Ritonavir ce dernier est utilisé comme « booster » pharmacocinétique car il améliore la biodisponibilité orale et diminue le métabolisme de l'ATV et du DRV, permettant aux 2 IP une administration quotidienne. Aux doses thérapeutiques (Atazanavir 300 mg et Ritonavir 100 mg, une fois par jour), les concentrations totales résiduelles ( $C_{tr}$ ) moyennes ( $\pm$ sd) observées sont de 862  $\mu$ g/L ( $\pm$  838 $\mu$ g/L), avec un seuil d'efficacité fixé à 150  $\mu$ g/L<sup>2</sup>. Cependant ce mode d'administration augmente le risque d'hyperbilirubinémie<sup>2</sup>. Des  $C_{tr}$  supérieures à 800  $\mu$ g/L engendrent des hyperbilirubinémies à bilirubine libre de grade 2 ou 3 sans augmenter l'efficacité thérapeutique<sup>1</sup>. Concernant le DRV, les doses thérapeutiques (800 mg de DRV et 100 mg de Ritonavir, une fois par jour) amènent à des  $C_{tr}$  moyennes ( $\pm$ sd)

observées de 3578 µg/L (± 1151 µg/L) avec un seuil d'efficacité se situant à 2000 µg/L<sup>1,3</sup>. A cette concentration, le DRV est efficace sans présenter d'effet indésirable<sup>3</sup>.

Le STP chez les patients traités par IP est nécessaire pour une adaptation individuelle de la posologie dans les cas de toxicité ou d'interactions médicamenteuses. Cependant, pour les patients présentant des valeurs de concentrations d'IP situées dans les intervalles recommandées en l'absence d'efficacité (sans résistance virale) ou en présence d'effets indésirables, l'intérêt de la  $C_{tr}$  comparé à d'autres paramètres pharmacocinétiques, notamment la concentration libre plasmatique ( $C_u$ ) et la fraction libre  $f_u$  ( $f_u = \frac{C_u}{C_t}$ ;  $C_t$  étant la concentration totale), peut être discuté. En effet, les deux molécules étant fortement liées aux protéines plasmatiques, et en particulier l'alpha-1-glycoprotéine acide (AAG) (86 % et 94 % pour l'ATV et le DRV respectivement)<sup>6,7,8</sup>. La concentration libre (forme pharmacologiquement active) est très faible. En se basant sur des travaux récemment publiés sur l'Imatinib<sup>9</sup> (10) et le Voriconazole<sup>10</sup> dans notre laboratoire ou dans d'autres unités<sup>11</sup>, nous avons émis l'hypothèse que des patients avec des concentrations totales identiques pourraient présenter des effets pharmacodynamiques (efficacité ou toxicité) différents en raison de concentrations libres différentes. De nombreuses études ont montré que la liaison protéique des molécules aux protéines plasmatiques pourrait être un facteur limitant pour l'entrée dans les cellules. Les concentrations inhibitrices 50 et 90 ( $CI_{50}$  et  $CI_{90}$  respectivement), représentant les concentrations nécessaires pour inhiber 50 % et 90 % de la réplication virale *in vitro*, dépendent de la présence de protéines de liaison. L'ajout de protéines a pour conséquence une augmentation de l' $IC_{50}$  de l'ATV (de 5,7 µg/L à 8-20 µg/L avec ou sans protéine dans la solution de culture, respectivement), rapprochant de ce fait les valeurs d' $IC_{50}$  à celles de la  $C_u$  mesurée *in vivo*. Il est d'autant plus intéressant de souligner que ces estimations d' $IC_{50}$  sont réalisées dans des solutions protéiques contenant 40 % de sérum humain<sup>2,11</sup>. Les deux molécules ont une affinité pour l'AAG bien plus importante comparée à l'albumine sérique<sup>6-8,12</sup>, suggérant que toute variation du taux d'AAG peut influencer significativement la  $f_u$ . L'AAG est une glycoprotéine circulante de synthèse hépatique présentant un polymorphisme<sup>12-14</sup>. Le syndrome inflammatoire, fréquemment rencontré chez les patients infectés par le VIH du fait de l'infection en elle-même ou par une

infection opportuniste, est connu pour augmenter rapidement et significativement la concentration d'AAG<sup>13,14</sup>.

L'objectif principal de notre étude a été d'évaluer la variabilité inter-individuelle de la concentration et de la fraction libre de l'ATV et du DRV chez 43 et 51 patients traités par ATV et DRV, respectivement. Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole original<sup>15</sup> basé sur l'ultrafiltration (Centrifree®) couplé à la chromatographie liquide haute performance avec barrette de diodes. Dans un second temps, les relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques ont été explorées d'une part avec les taux de bilirubine pour l'ATV et d'autre part avec la quantité d'ARN viral circulant pour les deux IP.

## **Partie I :**

### **Données bibliographiques**

## I- Inhibiteurs de la protéase virale : Atazanavir et Darunavir

### a. Indications et objectifs du traitement

En dehors des références citées, l'intégralité de ce chapitre est issue des recommandations du groupe d'experts parues en octobre 2013 sous la direction du Pr Philippe Morlat et sous l'égide du Conseil National du Sida (CNS) et de Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS)<sup>1</sup>.

Afin d'améliorer la survie des patients atteints par le VIH et tendre vers des taux de mortalité similaires à ceux de la population non infectée par le VIH, le traitement antirétroviral s'articule autour de plusieurs objectifs.

L'objectif principal est l'efficacité immuno-virologique, définie par deux termes :

- charge virale indétectable, le seuil étant actuellement fixé à 50 copies d'ARN viral par mL (le seuil dit technique est à 20 copies par mL),
- et un nombre de lymphocytes T CD4 (LTCD4) supérieur à 500 cellules par mm<sup>3</sup> (ou 0,5 giga/L).

Ce traitement antirétroviral, administré à long terme, doit également satisfaire des objectifs secondaires permettant de maintenir cette efficacité durablement. Ainsi, ce traitement doit assurer la meilleure tolérance clinico – biologique, un maintien voire une amélioration de la qualité de vie et finalement une diminution du risque de transmission du virus.

Plusieurs traitements peuvent être proposés en fonction de la cinétique de l'infection et des caractéristiques individuelles. Des études observationnelles, prémises de l'étude START dont les résultats sont attendus pour l'année 2016, suggèrent les bénéfices cliniques, immunologiques et de diminution du risque de transmission d'une trithérapie antirétrovirale

précoce. L'étude START, actuellement en cours, compare l'évolution des patients traités et stratifiés sur le taux de LTCD<sub>4</sub> (< 350 par mm<sup>3</sup> à > 500 par mm<sup>3</sup>). Seuls certains cas d'infections opportunistes motivent un retard dans l'instauration du traitement pour limiter le risque de syndrome inflammatoire de reconstitution immune. Actuellement, tout diagnostic de l'infection par le VIH, même si le sujet est asymptomatique et/ou avec un taux de LTCD<sub>4</sub> supérieur à 500 par mm<sup>3</sup>, conditionne la proposition d'instauration d'une trithérapie antirétrovirale.

L'arsenal thérapeutique est relativement étoffé. On compte en effet plus de vingt antirétroviraux dans six classes médicamenteuses : inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI); inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI); inhibiteurs de la protéase (IP); inhibiteurs de l'intégrase (INI); inhibiteurs de fusion (IF); antagonistes du CCR5 (anti-CCR5).

L'Annexe 1 reprend les différentes stratégies thérapeutiques utilisées en premières lignes et comprenant les spécialités utilisées.

En 2013, schématiquement on retrouve en première ligne l'association de 2 INTI avec un troisième agent. Il existe de nombreuses options validées en termes d'efficacité immunovirologique laissées à la discrétion du thérapeute mais classiquement le troisième agent est un inhibiteur de protéase ± « boosté » par la présence d'un deuxième inhibiteur de protéase, le Ritonavir. Néanmoins, les recommandations précisent que le choix de ce premier traitement doit être individualisé avec le patient pour atteindre un niveau maximal d'observance.

#### **b. Place de l'Atazanavir et du Darunavir en 2014**

L'Atazanavir et le Darunavir sont des molécules de premier choix pour la mise en place d'une trithérapie.

Les recommandations d'utilisation de ces molécules, ainsi que la majorité des recommandations issues du rapport Morlat, reposent sur une gradation des recommandations et un niveau de preuve détaillant les données utilisées pour établir les recommandations.

Le Tableau 1, extrait du rapport Morlat<sup>1</sup>, détaille la méthodologie de construction des recommandations.

Gradations des recommandations	
Échelle	Définition
A	Données disponibles justifiant une recommandation de niveau élevé.
B	Données disponibles justifiant une recommandation de niveau intermédiaire
C	Données disponibles insuffisantes pour justifier une recommandation

Niveaux de preuve : type de données utilisées dans les recommandations	
Échelle	Définition
I	Au moins 1 essai clinique randomisé ; méta-analyses d'essais randomisés
II	Essais cliniques non randomisés ; cohortes ou études cas-contrôle ; méta analyses de cohortes ou d'études cas-contrôle
III	Analyses d'experts sur la base d'autres données disponibles

**Tableau 1** : Méthodologie d'établissement de la gradation et des niveaux de preuve des recommandations établies dans le rapport Morlat 2013.

Ainsi, l'utilisation de l'ATV et du DRV dans les recommandations pour la mise en place du traitement antirétroviral s'appuient un grade A avec un niveau de preuve I (AI).

En terme de schéma thérapeutique, ils sont classiquement prescrits avec l'association fixe Truvada® Tenofovir Disoproxil Fumarate / TDF – Emtricitabine / 3TC) administrés en une prise quotidienne pour favoriser l'observance. Le TDF et le 3TC sont respectivement deux inhibiteurs nucléotidiques et nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) du VIH. Ce sont

des analogues nucléotidiques et nucléosidiques inhibant la transcriptase inverse virale et bloquant la formation d'ADN proviral. Ils subissent trois phosphorylations, dont une virale, avant d'agir par inhibition compétitive sur la transcriptase inverse<sup>16</sup>. Les posologies journalières usuelles sont 300 mg d'ATV et 100 mg de Ritonavir ou 800 mg de DRV avec 100mg de Ritonavir chez le patient naïf.

Du fait de leur forte puissance antirétrovirale, de leur barrière génétique élevée, et de leur bonne tolérance, l'association TDF/3TC avec l'Atazanavir ou le Darunavir, boosté par le Ritonavir, est privilégiée aux autres combinaisons.

L'une d'entre elles est l'association de l'ATV et du Ritonavir (300 mg/100 mg) avec le Kivexa<sup>®</sup> (Abacavir / ABC – Lamivudine / FTC) administré en un seul comprimé quotidien. Cette association dispose également d'un niveau de recommandation AI mais est instaurée uniquement si la charge virale de départ est inférieure à 5 log de copies par mL et si le statut HLA-B\*5701 est négatif. En effet ce génotype est fréquemment associé à des hypersensibilités sévères à l'Abacavir<sup>17</sup> (5% des patients sans contrôle préalable). Cette réaction d'hypersensibilité retardée, de type IV, se manifeste dans les 6 premières semaines du traitement (médiane à 11 jours<sup>17</sup>) par des symptômes comprenant le plus fréquemment de la fièvre et des troubles digestifs voire un malaise. D'autres manifestations plus rares peuvent également apparaître (atteinte respiratoire, rénale, hépatique etc...). La reprise de la molécule après un premier phénomène d'hypersensibilisation amène plus rapidement à une symptomatique plus sévère pouvant être fatale<sup>17</sup>. Néanmoins, cette association est difficilement utilisable chez les patients dont le traitement antirétroviral doit être rapidement mis en place. En effet, les patients diagnostiqués ont souvent des charges virales supérieures à 5 log de copies par mL et le temps de rendu du résultat du génotypage de l'HLA-B empêche une mise en place rapide du traitement.

Ces deux associations d'INNTI et IP doivent être adaptées en fonction des co-traitements. Ainsi, l'action inhibitrice des trois IP sur le système cytochrome P450 3A, carrefour des voies métaboliques de nombreuses classes médicamenteuses, est source de nombreuses interactions médicamenteuses. Il est donc fortement déconseillé d'associer une trithérapie contenant ces deux IP avec certains traitements tels que les œstroprogestatifs,

les immunosuppresseurs utilisés pour la prévention du rejet de greffe et les anti-infectieux de type antifongiques azolés.

### c. Mécanismes d'action

Les inhibiteurs de protéase agissent à l'intérieur des cellules siège de la multiplication virale du VIH, et en particulier les LTCD4 mais aussi les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques<sup>18</sup>. Le résumé du cycle de réplication virale est reporté sur la Figure 1<sup>19</sup>.

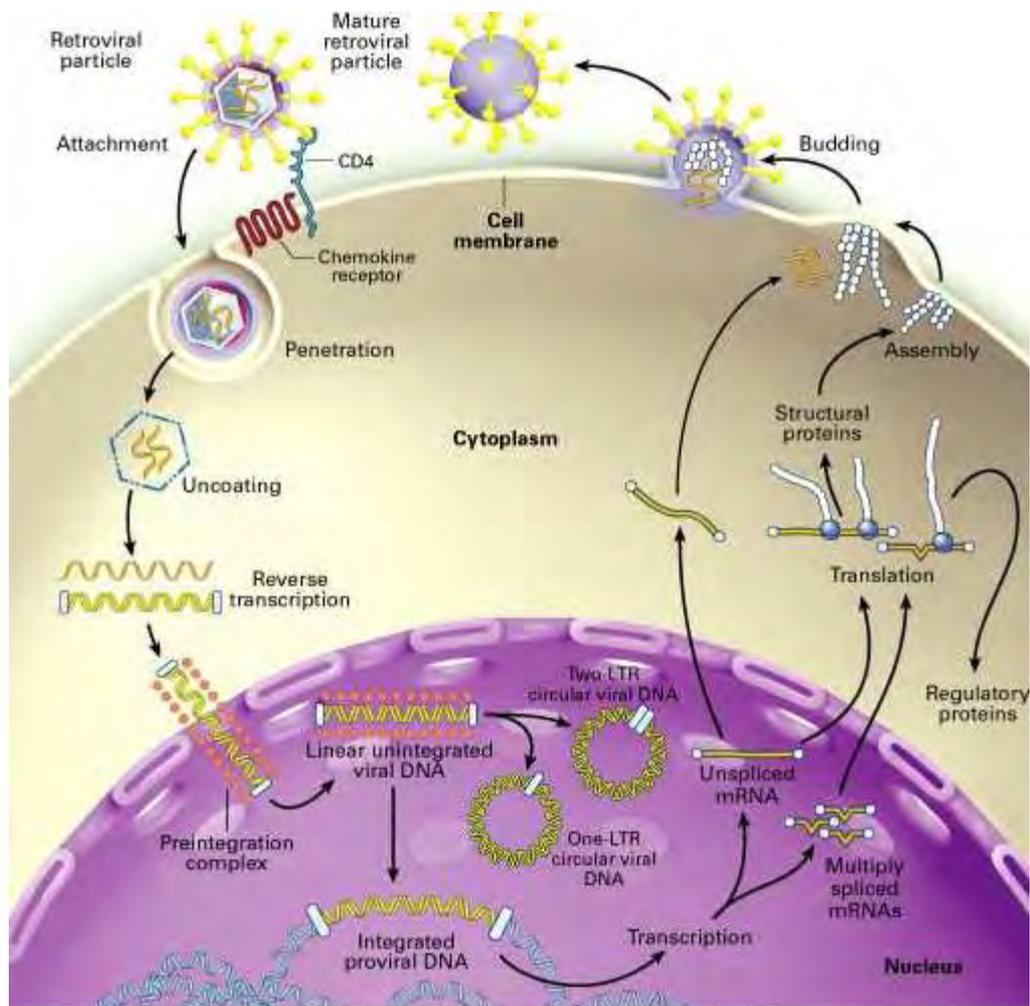


Figure 1 : Cycle viral du virus de l'immunodéficience humaine d'après Furtado et al<sup>19</sup>

La protéase virale, élément essentiel à la réplication virale du VIH, agit pendant l'étape post-traductionnelle<sup>20</sup>. Elle clive les précurseurs des protéines virales ; les polyprotéines vont ensuite s'assembler pour former le core du virion, permettant ainsi le début de la maturation. La protéase agit dans le virion bourgeonnant à la surface des cellules infectées. Les substrats de la protéase virale sont des sites alanine-proline ou tyrosine-proline, sites non reconnus par les protéases humaines. Les IP sont des inhibiteurs compétitifs de la protéase virale. Ils présentent un site phenylalanine-proline mimant le site de la polyprotéine gag-pol habituellement clivée par la protéase. L'inhibition empêche la maturation du virion. Toutefois les IP agissent seulement chez les cellules infectées. Ils n'ont donc pas de rôle préventif sur une cellule saine, à l'inverse d'autres classes d'antirétroviraux (Inhibiteurs Nucléosidiques ou Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse, les anti-CCR5)<sup>20</sup>. Le mécanisme d'action des IP est schématisé sur la Figure 2.

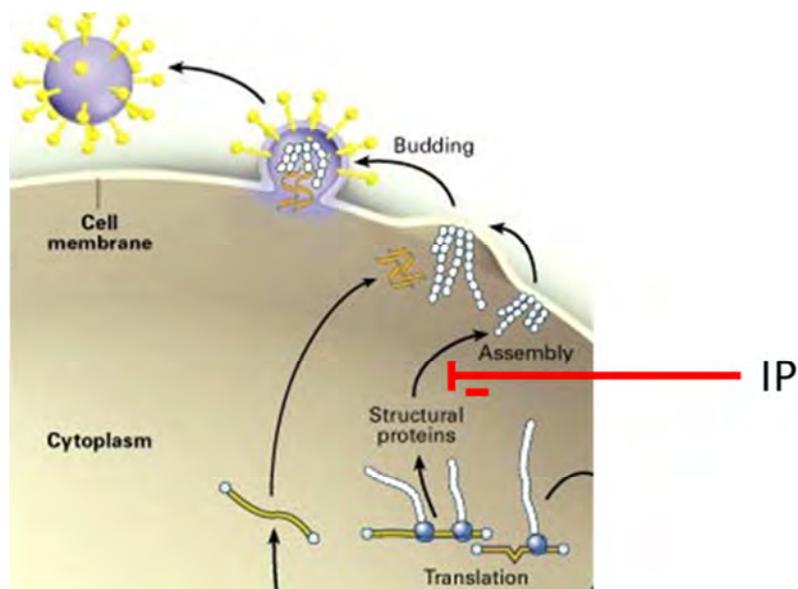


Figure 2 : Etape du cycle viral où les IP agissent<sup>19</sup>.

L'efficacité potentielle des IP est déterminée *in vitro*. Par conséquent, dépourvue de la matrice extracellulaire retrouvée *in vivo* au niveau des cellules cibles, les concentrations inhibitrices 50 et 90 ( $CI_{50}$  et  $CI_{90}$ ) déterminées ne peuvent être utilisées comme des cibles à

part entière. Elles constituent une indication de concentrations à atteindre plutôt qu'une valeur de référence.

Les études concernant la  $CI_{50}$  de l'ATV illustrent ces propos. Ainsi ces essais<sup>21-23</sup>, portant chez des patients naïfs contaminés par des virus sauvages, ont été effectués par trois méthodes différentes, et amènent à des  $CI_{50}$  situées entre 0,6 et 5,7  $\mu\text{g/L}$ , et une  $CI_{90}$  proche de 8  $\mu\text{g/L}$ . L'ajout dans le milieu de culture cellulaire de sérum humain, à hauteur de 40% de la composition totale du milieu, fait augmenter d'un facteur 2,7 à 3,6 la  $CI_{50}$  de l'ATV. Ce constat a également été décrit pour d'autres IP comme l'Amprenavir, l'Indinavir, et le Saquinavir<sup>2</sup>. De plus, si le milieu est composé de protéines de liaison telles que l'alpha-1-glycoprotéine acide (également nommé orosomucoïde) ou l'albumine à des concentrations physiologiques chez l'homme, les  $CI_{50}$  augmentent d'un facteur 13,4 par rapport à la  $CI_{50}$  initialement mesurée ; si bien que la  $CI_{50}$  ajustée à la liaison protéique est estimée entre 5 et 20  $\mu\text{g/L}$ , l'écart étant attribué aux différentes méthodes de mesure.

De façon similaire, des variations de  $CI_{50}$  ont été rapportées avec le DRV<sup>24</sup>. Le DRV placé dans une solution de sérum bovin présente une  $CI_{50}$  comprise entre 0,5 et 2,5  $\mu\text{g/L}$  selon les méthodes expérimentales. La  $CI_{50}$  augmente d'un facteur 20 pour atteindre des valeurs situées entre 12 et 55  $\mu\text{g/L}$  lorsque du sérum humain est ajouté dans le milieu de culture.

Le quotient inhibiteur (QI) est la méthode qui permet de comparer les IP entre eux<sup>25</sup>. Le QI est obtenu en faisant le rapport concentration totale résiduelle /  $CI_{50}$ <sup>25,26</sup>. Ainsi, plus le QI d'un IP est haut, plus cet IP est efficace. Cependant, le QI est difficile à utiliser en pratique clinique car aucun consensus n'a été établi en termes de valeur cible et de méthodes de détermination de la  $CI_{50}$ .

#### d. Résistance

La résistance est liée à la sélection de virus comportant des mutations dans les gènes cibles des antirétroviraux en cas de persistance de la réplication virale en présence du

traitement antirétroviral. L'apparition de mutations sur le gène de la protéase virale est le mécanisme majoritaire de la résistance virale aux IP, conduisant à une enzyme avec une affinité diminuée pour l'IP<sup>1,27</sup>. La diminution de l'affinité de l'IP pour la protéase virale se traduit *in vitro* par une augmentation de la CI<sub>50</sub>. La sélection de virus résistant dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations sub-optimales liées à des difficultés d'observance, interactions médicamenteuses), de la puissance du traitement antiviral, et de la barrière génétique du virus vis-à-vis des antirétroviraux<sup>1</sup>. La barrière génétique est définie par le nombre de changements nucléotidiques nécessaires pour obtenir une apparition de la résistance virale. De ce fait, plus la barrière génétique est élevée, plus le nombre de mutations nécessaires pour avoir une augmentation significative de la CI<sub>50</sub> est élevée.

Toutefois, chaque mutation ne confère pas une résistance car deux phénomènes sont à prendre en compte. D'une part, une mutation peut diminuer l'affinité de l'IP pour la protéase mais aussi l'affinité pour les précurseurs des protéines virales, empêchant la maturation et donc le développement du virus. D'autre part, une mutation à elle seule n'engendre généralement pas une diminution suffisante de l'affinité pour la molécule antivirale. Un même virus doit généralement acquérir plusieurs mutations différentes, sans que son cycle de réplication ne soit altéré, pour réduire l'efficacité de la molécule.

Cependant, cette augmentation de la CI<sub>50</sub> est rarement utilisée pour définir la résistance virale. Cette dernière est, en routine de laboratoire, définie par la recherche des mutations par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou par séquençage des gènes de la protéase virale<sup>1</sup>. Lorsqu'une mutation est identifiée par cette technique, elle est considérée comme responsable de la résistance. C'est le cas pour la substitution I50L<sup>28</sup>, mutation signature de l'ATV, qui confère au VIH une résistance significative à l'ATV lui permettant de conserver sa capacité de multiplication. Hormis cette mutation spécifique, l'ATV est un IP à barrière génétique élevée, le virus devant subir plusieurs mutations, généralement acquises avec des traitements antérieurs avec d'autres IP, pour devenir résistant. Ces modifications dans le gène de la protéase dus aux traitements antérieurs et diminuant la sensibilité du virus à l'ATV sont appelées des mutations croisées.

La barrière génétique du DRV est plus élevée que celle de l'ATV. En effet, la sensibilité du virus pour le DRV peut diminuer à partir de trois mutations simultanées sur le même virus. Du fait de cette caractéristique, le DRV est considéré comme étant un IP de deuxième génération.

Ce profil est la conséquence d'une liaison à la protéase virale différente des autres IP<sup>29</sup>. En effet, la constante de dissociation du complexe DRV – protéase virale est 100 fois plus élevée que celle des autres IP. La conséquence pour le DRV est une demi-vie de dissociation du complexe DRV – protéase virale d'environ 125 heures, beaucoup plus élevée que celles des autres IP. La particularité de la liaison DRV – protéase virale permet donc au DRV de rester actif malgré plusieurs mutations simultanées sur le gène de la protéase virale. La sensibilité diminue à partir de 3 voire 5 mutations sur le gène. A titre de comparaison l'Atazanavir et le Lopinavir, les deux autres IP encore fréquemment utilisés, voient respectivement leur sensibilité diminuer à partir de 2 et 1 mutation(s).

L'analyse génétique du virus est la seule méthode permettant d'évaluer la capacité de résistance virale. Aucune alternative existe concernant l'impact de ces mutations sur l'activité inhibitrice des IP, pouvant rendre difficile certaines interprétations de génotypage.

#### e. Pharmacocinétique

##### *i. Atazanavir*

#### **Absorption**

L'Atazanavir est rapidement absorbé, atteignant sa concentration maximale environ deux heures après son absorption. Plusieurs facteurs de variabilité ont été rapportés. La forme galénique influe sur la biodisponibilité de l'ATV. Cette dernière étant supérieure lors de l'utilisation de la solution buvable par rapport à la forme comprimé<sup>2</sup>. L'absorption de

l'ATV est dépendante du pH<sup>30,31</sup>. Ainsi, plus le pH du système digestif est élevé, moins l'absorption de l'ATV est importante. Cette absorption pH-dépendante explique l'interaction avec les inhibiteurs de la pompe à proton et les inhibiteurs des récepteurs H<sub>2</sub> inhibant la sécrétion d'acide gastrique<sup>2</sup>. Ce mécanisme souligne également l'intérêt de la prise pendant le repas. Ainsi l'aire sous courbe l'organisme (l'ASC<sub>0-inf</sub>), qui représente l'exposition du médicament sur et la concentration maximale (C<sub>max</sub>) sont respectivement augmentées de 70% et 30 % lors d'une prise au cours d'un repas<sup>30</sup>. L'augmentation de la biodisponibilité est également accompagnée d'une variabilité inter-individuelle moindre de ces paramètres, passant de 69% à jeun à 37% lors du repas<sup>6</sup>.

Le passage trans-intestinal de l'ATV repose sur différents transporteurs membranaires. L'ATV est substrat de nombreux transporteurs<sup>32</sup> d'influx (Organic Anion Transporting Polypeptide /OATP) et d'efflux (P-glycoprotéine/Pgp et Multidrug Resistance Protein2/MRP2).

Entérocyte

Lumière intestinale

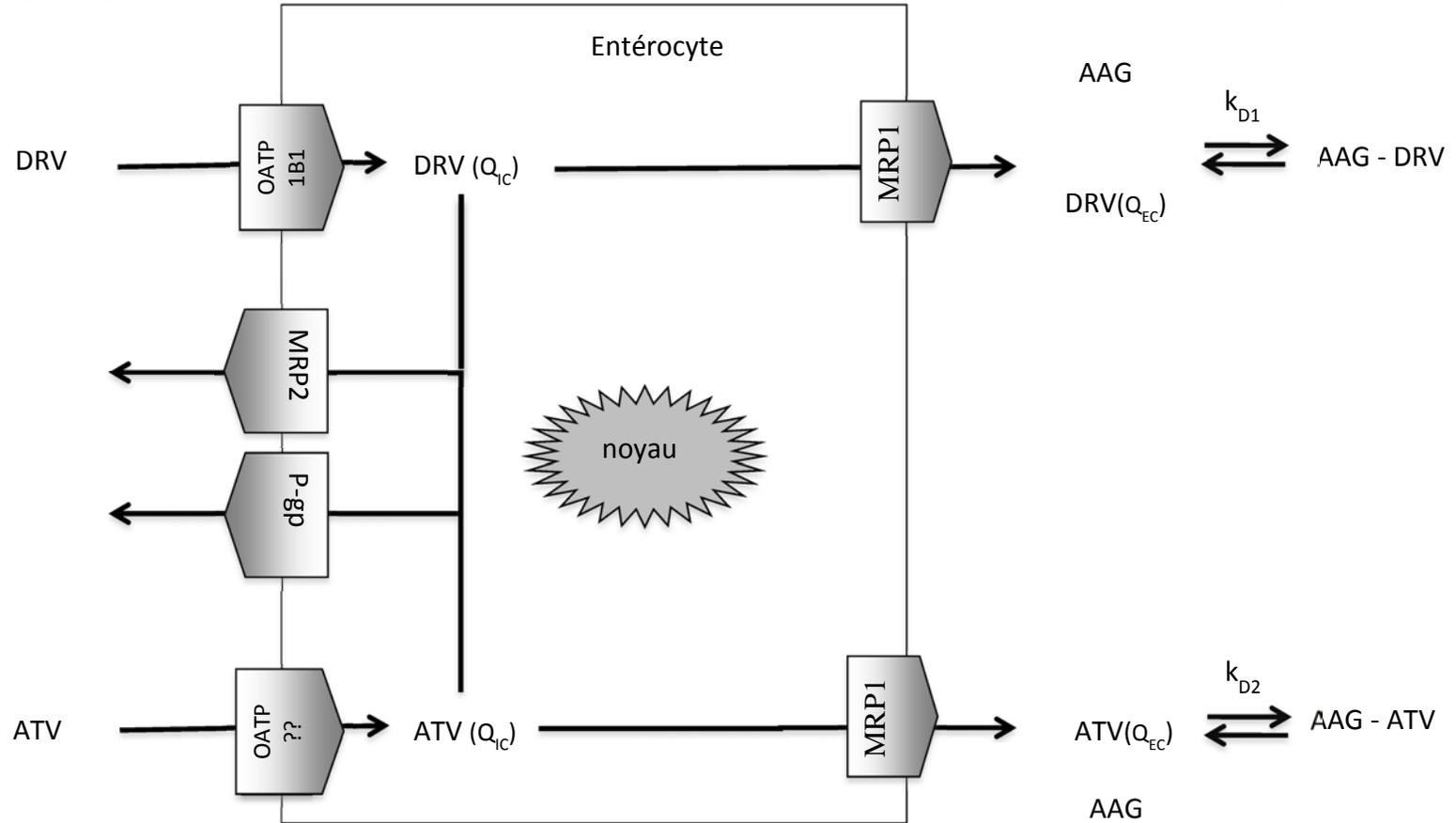


Figure 3 : Transporteurs membranaires entérocytaires impliqués dans le passage de l'ATV et du DRV à travers la barrière intestinale.

AAG :  $\alpha$ 1 glycoprotéine acide, DRV : darunavir, kd : constante d'affinité de l'IP pour l'AAG, OATP : Organic Anion Transport Polypeptid, QIC, QEC: quantité intra et extra-cellulaire de molécule libre, ATV : atazanavir, P-gp : glycoprotéine P, MRP : Multidrug Resistance-associated Protein

Le Ritonavir est utilisé comme « booster » pharmacocinétique. Son administration conduit à une augmentation d'une part de la biodisponibilité orale, par inhibition des CYP 3A et de la Pgp localisés dans les entérocytes et les hépatocytes, et d'autre part de la distribution<sup>2</sup>.

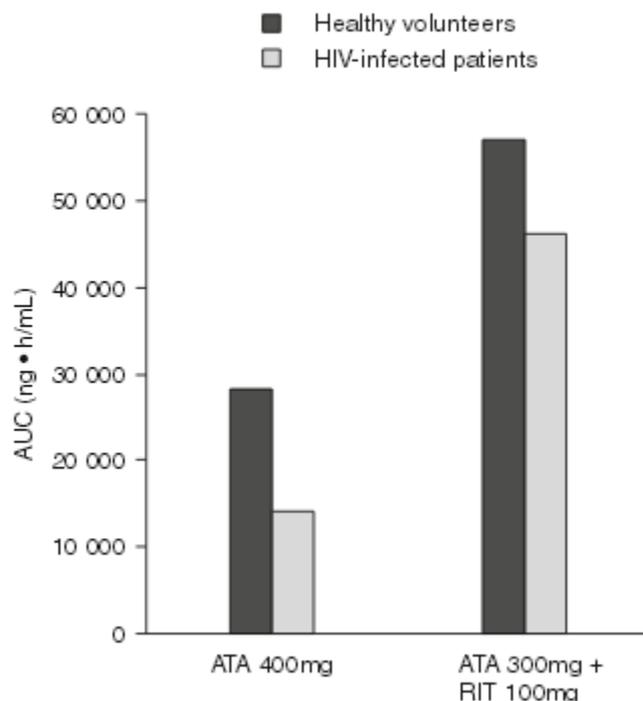
### **Distribution**

L'ATV diffuse relativement mal dans les tissus, notamment le tractus génital et le système nerveux central<sup>33,34</sup>. En outre, cette diffusion présente une forte variabilité inter-individuelle avec un volume de distribution moyen de 88,3 L (CV = 29%)<sup>35</sup>.

Sa liaison aux protéines plasmatique est importante avec une fraction libre (fu) évaluée à 14%<sup>6</sup>. L'alpha-1 glycoprotéine acide (AAG) est la protéine plasmatique majoritairement impliquée dans la fixation de l'ATV<sup>36</sup>.

### **Métabolisme**

L'Atazanavir est métabolisé par les isoenzymes hépatiques CYP 3A4/A5<sup>37,38</sup> en 5 métabolites éliminés par voie biliaire. Récemment, Li et al<sup>38</sup> ont mis en évidence 13 nouveaux métabolites produits par des microsomes humains ou murins. Trois d'entre eux par leur structure contenant des fonctions hydrazine ou aldéhydes, pourraient expliquer certains effets indésirables tel que nausées vomissement ou l'augmentation des transaminases. Ce métabolisme est en grande partie inhibé par l'utilisation du Ritonavir. La Figure 4, représente l'effet du Ritonavir sur l'ASC de l'ATV<sup>2</sup>.



**Figure 4 :** Comparaison de l'aire sous la courbe moyenne des concentrations en fonction du temps de l'ATV chez des patients sains et infectés par le VIH aux doses recommandées<sup>2</sup>.

### Excrétion

Après administration d'une dose de 400 mg, 79% et 13%, dont 20% et 7% de formes inchangées, de l'ATV sont retrouvés dans les fèces et les urines, respectivement<sup>6</sup>.

L'équilibre des concentrations plasmatiques est atteint en 6 jours. Chez des sujets sains, la demi-vie d'élimination est environ de 6-7 heures pour une dose de 400 mg. La pharmacocinétique de l'ATV n'étant pas linéaire pour des doses comprises entre 200 et 800 mg une fois par jour<sup>39</sup> (l'ASC et la  $C_{max}$  augmentent de façon non proportionnelle et plus rapidement que la dose), la demi-vie d'élimination augmente avec la dose administrée<sup>2</sup>.

Chez les patients infectés, l'ATV à 400 mg une fois par jour sans Ritonavir amène à des concentrations totales résiduelles de l'ordre de 273  $\mu\text{g}/\text{L}^2$ . L'ATV à 300 mg une fois par jour associé au Ritonavir conduit à des concentrations totales résiduelles de l'ordre de 862  $\mu\text{g}/\text{L}^2$ .

Les étapes de métabolisme et d'élimination sont représentées sur la figure 5.

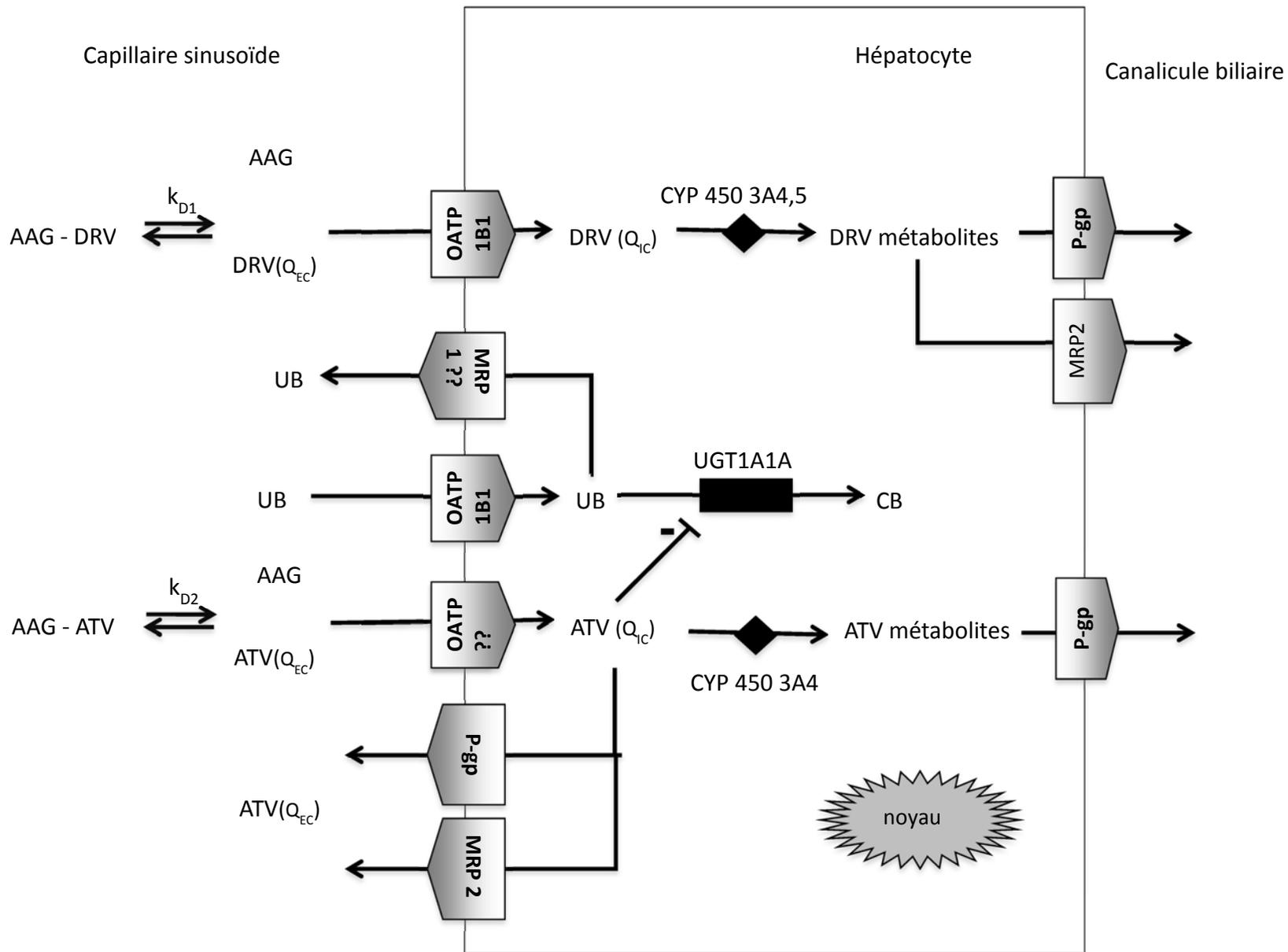


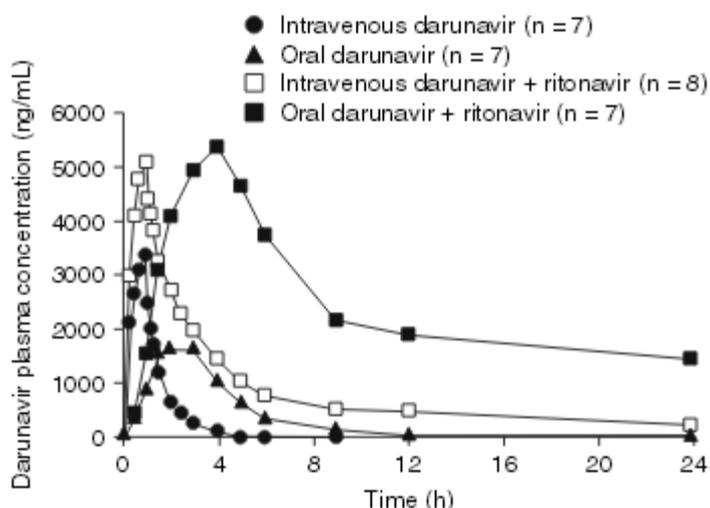
Figure 5 : Transporteurs membranaires et système enzymatique impliqués dans le transport et le métabolisme de la bilirubine et des inhibiteurs de protéase au niveau des hépatocytes.

AAG :  $\alpha 1$  glycoprotéine acide, DRV : darunavir,  $k_d$  : constante d'affinité de l'IP pour l'AAG, OATP : Organic Anion Transport Polypeptide, CYP450 : Cytochrome P 450, QIC, QEC: quantité intra et extra-cellulaire de molécule libre, ATV : atazanavir, P-gp : glycoprotéine P, MRP : Multidrug Resistance-associated Protein ;

## ii. Darunavir

### Absorption

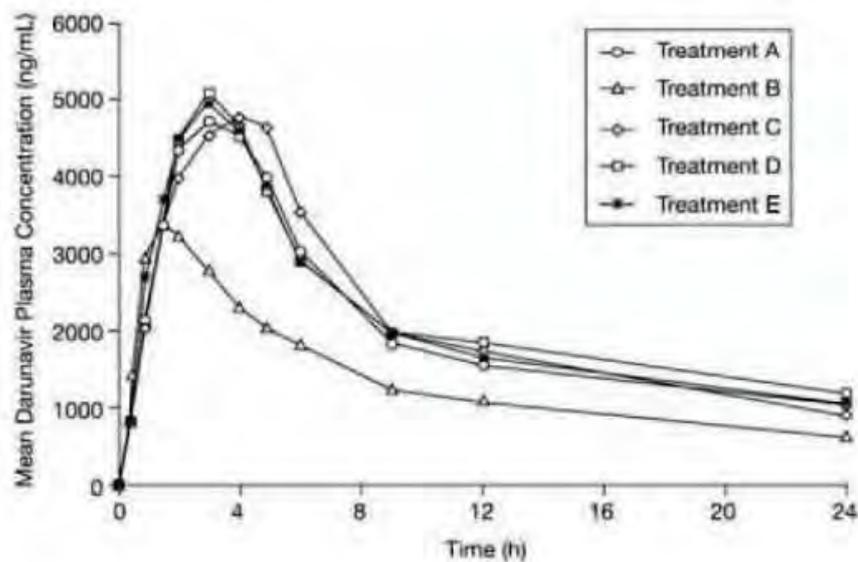
Le Darunavir doit obligatoirement être associé au Ritonavir pour assurer une biodisponibilité orale optimale<sup>1,3</sup>. En absence de Ritonavir, le DRV est métabolisé rapidement par le CYP3A4 intestinal et hépatique<sup>3</sup>. Le DRV est également substrat de la P-gp intestinale qui limite sa biodisponibilité orale<sup>7</sup>. Le Ritonavir évite d'une part un efflux du DRV par la P-gp intestinale et d'autre part son métabolisme par le CYP3A4 intestinal et hépatique. Les différentes cinétiques du DRV avec ou sans association du Ritonavir sont représentées sur la Figure 6<sup>3</sup>. L'adjonction de 100 mg de Ritonavir permet une absorption rapide et efficace avec une  $C_{max}$  comprise entre 2,5 et 4 heures<sup>3</sup>.



**Figure 6** : Concentrations de DRV en fonction du temps après administration de DRV par voie intraveineuse (150mg) ou orale (600mg), avec ou sans Ritonavir.

Pour favoriser la solubilisation du DRV dans le tractus gastro-intestinal, le DRV doit être administré avec la nourriture. Il a ainsi été observé une augmentation de l'ASC et de la  $C_{max}$  de 42% et 35% respectivement pour le groupe repas comparativement au groupe à jeun<sup>3,40</sup>.

La Figure 7, adaptée des travaux de Back et al<sup>41</sup> représente l'effet des différents types d'aliments sur la pharmacocinétique du DRV.



**Figure 7** : Concentrations moyennes de DRV en fonction du temps après une prise de DRV 400 mg avec du Ritonavir.

Les différentes conditions sont : A = petit déjeuner normal ; B = à jeun ; C = petit déjeuner contenant beaucoup de lipides ; D = petit déjeuner riche en protéines ; E = croissant et café.

On constate ici que la composition du repas n'a pas d'influence sur la cinétique du DRV.

Une faible diminution des concentrations de DRV peut être observée après 14 jours de traitement. La réduction des concentrations serait la conséquence d'une auto-induction des CYP 3A4 intestinaux par le DRV<sup>3</sup>.

L'effet du Ritonavir sur la pharmacocinétique du DRV est très significatif. La biodisponibilité orale passe de 37% à 82% avec le Ritonavir, l'ASC et la Cmax augmentent respectivement de 1316% et de 191% et les variabilités inter-individuelles de l'ASC et de la Cmax passent respectivement de 63% à 22% et de 42% à 22%<sup>42</sup>.

L'absorption du DRV dépend de transporteurs membranaires présents à la surface des entérocytes. Le DRV est à la fois substrat de protéines d'influx, comme l'OATP1B1, ou de protéines d'efflux comme la P-gp et MRP2.

### **Distribution**

Le DRV présente, quant à lui, une bonne diffusion tissulaire, majorée en présence de Ritonavir ( $V_d=130,8L$  avec Ritonavir vs  $88,1L$  sans Ritonavir)<sup>3</sup>. Toutefois le DRV diffuse mal dans certains sites anatomiques comme le système nerveux central<sup>43</sup> ou les tissus génitaux<sup>44</sup>. Le DRV est également fortement lié aux protéines plasmatiques ( $f_u=6\%$ ), principalement l'AAG.

### **Métabolisme**

Le Darunavir est principalement métabolisé par le CYP3A4 hépatique. Trois métabolites sont actifs sur le VIH sauvage mais ont une activité inférieure à 10% de l'activité de la molécule mère<sup>45</sup>. Les voies minoritaires d'élimination du DRV font intervenir des phénomènes d'hydrolyse et de glucuronidation.

### **Excrétion**

Le DRV est éliminé majoritairement dans les fèces, le reste étant éliminé dans les urines, que le DRV soit associé ou non au Ritonavir<sup>46,47</sup>. Ainsi, 81,7% contre 79,5% de la quantité totale de DRV est retrouvée dans les fèces, en absence ou en présence de Ritonavir respectivement. L'élimination totale urinaire est elle de 12,2 et 13,9 % en absence ou en présence de Ritonavir. La présence de Ritonavir ne différencie donc par le ratio d'élimination fèces/urines, mais modifie le pourcentage de molécule mère éliminée. En effet, le taux de molécule mère retrouvée inchangée dans les fèces passe de 6,8 à 41,2% avec et sans Ritonavir respectivement.

Une étude chez le rat a montré que le DRV est également excrété dans le lait en *post partum* (le rapport des AUC0-8h lait / plasma du rat était de 2,3 ; 1,9 et 1,7 à 5, 8 et 11 jours *post partum*)<sup>3</sup>.

#### f. Liaisons protéiques

Synthétisé au niveau hépatique, l'alpha-1 glycoprotéine acide (AAG) est une protéine plasmatique permettant le transport de molécules exogènes ou endogènes, grâce à plusieurs sites de liaison, dont un site de liaison unique pour les IP. La variabilité de la concentration d'AAG a un impact direct sur la fraction libre. Cette variabilité peut correspondre à de simples variations de concentration d'AAG, un polymorphisme ou encore la présence ponctuelle d'une molécule endogène ou exogène entrant en compétition avec le site de liaison des IP sur l'AAG<sup>14</sup>.

De multiples situations sont connues pour faire varier la concentration d'AAG<sup>14</sup>. L'AAG est une protéine dont la synthèse augmente pendant l'inflammation. Ainsi, tout contexte inflammatoire (infection, acte chirurgical...) participe à l'augmentation de la concentration d'AAG. Le syndrome néphrotique et certaines insuffisances rénales aiguës et/ou chroniques peuvent aussi augmenter ses taux. *A contrario*, la diminution de sa synthèse, comme dans les cas d'insuffisance hépatique fait chuter son taux plasmatique. Des différences peuvent également s'observer en fonction du sexe, de l'âge, du statut pondéral et de la grossesse.

Peu de données ont été publiées d'une part sur la saturation de l'AAG par les IP et d'autre part sur l'influence de la variabilité des taux d'AAG ou du polymorphisme sur la fraction libre de l'ATV et du DRV.

Récemment, Barrail-Tran et al<sup>12</sup> ont évalué l'impact du polymorphisme de l'AAG sur la pharmacocinétique de l'ATV. Dans cette étude, les différents variants existants (ORM1\*F1, ORM1\*S, et ORM1\*F2) ont conduit à une augmentation du volume de distribution sans que cela ait un impact clinique (volume de distribution deux fois plus élevé chez les patients

ORM1\*S, comparé aux patients ORM1\*F1 dont le volume de distribution était de 79,1 L. Les auteurs ne détaillent pas les résultats sur les concentrations). A ce jour, aucune étude n'a été réalisée chez des patients sous DRV.

Le  $K_d$ , constante reflétant l'affinité de la molécule pour une protéine, des deux IP pour l'AAG étant approximativement 1000 fois inférieur à celui de l'albumine<sup>12</sup>, et les concentrations physiologiques d'AAG étant très supérieures aux concentrations totales maximales des deux IP<sup>2,3,48</sup>, l'albumine ne joue donc pas un rôle prépondérant dans la liaison protéique plasmatique de l'ATV et du DRV.

#### g. Transporteurs membranaires

##### *i. Transporteurs membranaires*

Les transporteurs membranaires sont des protéines présentes à la surface des cellules et permettent l'entrée ou la sortie des molécules substrats. Ces protéines jouent un rôle important dans la pharmacocinétique des IP<sup>2,3</sup>, en intervenant dans les phases d'absorption au niveau des entérocytes, de distribution (passage des barrières tissulaires, entrée ou sortie des cellules), de métabolisme hépatique (entrée et sortie dans les hépatocytes) et d'excrétion (molécule mère et/ou métabolites éliminés dans la bile ou les urines).

Il existe deux types de transporteurs impliquant l'ATV et le DRV<sup>49</sup> : d'une part les transporteurs d'influx, représentés essentiellement par la super-famille des Solute Carrier Transporter (SLC) et d'autre part les transporteurs d'efflux, majoritairement issus de la super-famille des ABC transporteurs (ATP Binding Cassette).

Les transporteurs prennent en charge la forme libre des molécules, représentée par la concentration libre ( $C_u$ ). Ainsi cette  $C_u$  est un reflet de la quantité de molécule disponible pour être acheminée dans les tissus et cellules cibles.

## Transporteurs d'influx

Les transporteurs d'influx impliqués dans le transport de l'ATV et du DRV sont tous issus de la super-famille des SLC<sup>49,50</sup> divisée en plusieurs sous-familles. Les SLCO ou OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) constituent une sous-famille regroupant la majorité des transporteurs d'influx des IP. Ces pompes d'influx se retrouvent sur de nombreuses cellules dont les entérocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-encéphalique mais aussi sur les cellules mononuclées sanguines dont font partie les lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>51</sup>.

A ce jour, les transporteurs spécifiques de l'ATV n'ont toujours pas été identifiés. Les derniers travaux publiés indiquent que ce sont des transporteurs OATP mais l'absence d'inhibiteurs spécifiques permettant de révéler leur implication limite leur identification<sup>32</sup>.

Concernant le DRV, deux transporteurs ont été mis en évidence: OATP 1B1 et 1A2<sup>51,50</sup>. L'OATP 1B1 s'exprime majoritairement à la surface des hépatocytes mais des études récentes les situent également sur les entérocytes<sup>52</sup> et les cellules mononuclées sanguines<sup>53</sup>. Le transporteur OATP 1A2 n'a été détecté qu'à la surface des hépatocytes<sup>51,50</sup>.

L'activité d'influx de ces transporteurs est modulable. Il existe deux catégories de mécanismes pouvant perturber l'activité des protéines d'influx: les phénomènes constitutionnels et acquis.

Les déficits d'activité constitutionnels sont causés par la présence de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) sur les gènes des protéines d'influx. Le SNP est une mutation ponctuelle d'un nucléotide pouvant avoir des conséquences sur la transcription ou la traduction d'un gène. Les SNP se retrouvent pour un faible pourcentage de la population uniquement (par exemple le SNP T521C est présent chez 14% population blanche<sup>54</sup>). Le SNP peut d'une part engendrer un déficit qualitatif, la protéine présentant une conformation modifiée, diminuant son activité d'influx. Ou d'autre part, un SNP peut amener à un déficit quantitatif de protéines d'influx au niveau de la membrane cellulaire par diminution de l'ARN transcrit ou traduit. Certains exemples de polymorphismes génétiques, comme pour l'OATP1B1, peuvent présenter un déficit qualitatif et quantitatif de la protéine<sup>55</sup>. Plusieurs SNP, reliés à

une baisse de l'activité d'une protéine d'influx, sont décrits dans la littérature et transcrits dans le tableau 2<sup>55-57</sup>.

Allèle	Haplotype	Substitution acide aminé	Fréquence allélique	Conséquence sur l'activité	Modification	
					qualitative	quantitative
OATP1B1*1b	A388G	Asn130Asp	30%	Inchangée	NA	NA
OATP1B1*2	T217C	Phe73Leu	2%	Diminuée	Oui	Oui
OATP1B1*3	T245C + A467G	Val82Ala + Glu156Gly	Non déterminé	Diminuée	Oui	Oui
OATP1B1*4	C463A	Pro155Thr	16%	Inchangée	NA	NA
OATP1B1*5	T521C	Val174Ala	14%	Diminuée	Non	Oui
OATP1B1*6	T1058C	Ile353Thr	2%	Diminuée	Oui	Oui
OATP1B1*9	G1463C	Gly488Ala	0%	Diminuée	Oui	Oui
OATP1B1*10	A1964G	Asp655Gly	2%	Inchangée	NA	NA
OATP1B1*12	T217C + A1964G	Phe73Leu + Asp655Gly	Non déterminé	Inchangée	NA	NA
OATP1B1*13	T245C + A467G + A2000G	Val82Ala + Glu156Gly + Glu667Gly	Non déterminé	Inchangée	NA	NA

**Tableau 2** : Retranscription des caractéristiques retrouvées dans le polymorphisme de l'OATP1B1.

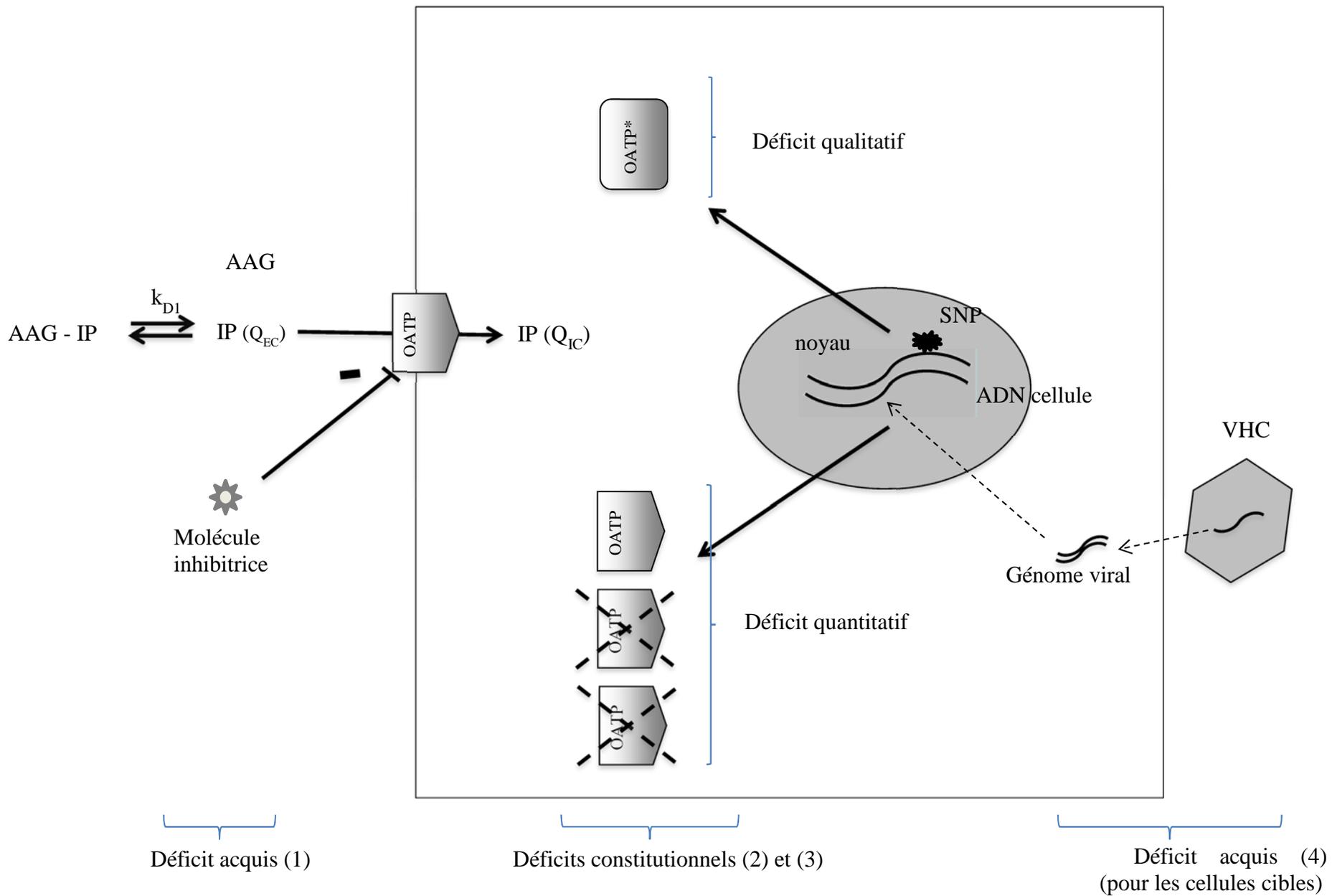
NA : non applicable.

D'autres situations (OATP1B1 \*15 et \*17) combinent plusieurs SNP, dont le T521C, et additionnent les caractéristiques fonctionnelles des SNP<sup>56</sup>.

Actuellement, seul le SNP T521C, est associé à des modifications de la pharmacocinétique des molécules substrats de l'OATP1B1<sup>54,57</sup>. Ainsi, Mwiny et al<sup>58</sup> ont montré que le SNP T521C est relié à une augmentation significative de l'ASC (Aire Sous

Courbe, paramètre pharmacocinétique d'exposition de l'organisme à la molécule) de la Pravastatine chez les sujets présentant ce SNP par rapport aux patients sauvages. Ces résultats ont été confirmés par une étude de Niemi et al<sup>59</sup> qui a également inclus le polymorphisme d'autres protéines de transport, comme la P-gp et la MRP2. Seul le SNP T521C a été corrélé à une augmentation significative de l'ASC de la Pravastatine (augmentation de 106% de l'ASC entre les patients avec ou sans SNP T521C). Cette augmentation a été retrouvée pour un autre substrat, le Répaglinide, pour lequel les augmentations d'ASC sont de 107% et 188% pour les patients hétérozygotes TC ou homozygotes CC par rapport aux sujets sauvages TT<sup>60</sup>. Les inhibiteurs de la protéase du VIH sont également des substrats de l'OATP1B1, comme le Lopinavir (LPV) ou le Darunavir<sup>51</sup>. Ainsi, Kohlrausch et al<sup>61</sup> ont étudié l'impact des haplotypes OATP1B1 \*1b, \*4 et \*5 sur la pharmacocinétique du LPV. Uniquement les patients hétérozygotes ou homozygotes pour le SNP T521C ont présenté une modification de la pharmacocinétique du LPV. Les concentrations résiduelles moyennes observées étaient de 6133 µg/L (Intervalle de confiance à 95% IC95% [5502-6977]) chez les patients TT, de 7094 µg/L (IC95% [6219-8143]) chez les patients TC et de 9123 µg/L (IC95% [7604-13355]) chez les patients homozygotes CC. Cette étude est complétée par les résultats de Schipani et al<sup>62</sup> qui ont associé le SNP T521C comme co-variable dans un modèle de pharmacocinétique de population et ont observé une augmentation de la clairance du LPV chez les patients porteurs de ce SNP (diminution de 14% et de 37% pour les patients hétérozygotes TC et homozygotes CC par rapport au patients sauvages TT). Il existe toutefois des études où le SNP T521C n'est pas corroboré à une modification des paramètres d'exposition des IP. Ainsi, Zhang et al<sup>63</sup> n'ont pas observé de différence significative entre les patients porteurs ou non du SNP T521C. Néanmoins, dans chacune de ces études, seules les concentrations totales sont utilisées comme marqueurs de la modification de la pharmacocinétique de ces molécules. Pour l'heure, aucun résultat d'étude clinique n'a mis en évidence l'impact du SNP T521C sur la pharmacocinétique du DRV, celui-ci ayant un profil proche du LPV pour le transport fonctionnel par l'OATP1B1 d'après les travaux de Kwan et al<sup>65</sup>.

Les déficits fonctionnels acquis sont la conséquence d'une inhibition directe de l'activité des protéines de d'influx par des molécules exogènes



**Figure 8** : Les différents déficits décrits pour les transporteurs d'influx.

AAG : α1 glycoprotéine acide, DRV : darunavir,  $k_d$  : constante d'affinité de l'IP pour l'AAG, OATP : Organic Anion Transport Polypeptide, CYP450 : Cytochrome P 450, QIC, QEC: quantité intra et extra-cellulaire de molécule libre, IP : inhibiteur de la protéase, VHC : Virus de l'Hépatite C, SNP :Single Nucleotide Polymorphism, ADN : acide désoxyribo nucléique.

Plusieurs molécules ont été décrites comme inhibitrices plus ou moins puissantes de l'activité d'influx de ces transporteurs transmembranaires<sup>66,57</sup>. La majorité des études portent sur la classe des statines, hypocholestérolémiants inhibiteurs de l'HMGCoA réductase, molécules substrat de l'OATP1B1. Muck et al<sup>67</sup> ont observé une importante augmentation de la  $C_{max}$  et de l'ASC de la Cerivastatine, statine retirée du marché en raison du nombre important de rhabdomyolyse causée, chez les patients transplantés rénaux sous Ciclosporine (CsA) par rapport aux patients ne prenant pas de CsA ( $C_{max}$  et ASC augmentées d'un ratio de 5 et 3,8 respectivement). La CsA est un inhibiteur de l'OATP1B1 mais également du CYP450 3A4. Cependant Shitara et al<sup>68</sup> ont montré que la constante d'inhibition de la CsA pour l'OATP1B1 est beaucoup plus basse que celle pour le CYP 450 3A4, laissant penser que cette modification des paramètres d'exposition est majoritairement le résultat d'une diminution de l'influx de Cerivastatine. Simonson et al<sup>69</sup> ont retrouvé des résultats similaires pour une autre statine, la Rosuvastatine, chez les patients transplantés rénaux sous CsA par rapport aux patients sans CsA. Ainsi, l'ASC et la  $C_{max}$  de la Rosuvastatine ont été 7,1 et 10,6 fois plus élevées chez les patients sous CsA. Le Gemfibrozyl, appartenant à la classe des Fibrates est un autre inhibiteur de l'OATP1B1. Backman et al<sup>70</sup> ont ainsi observé qu'associé au Gemfibrozyl, l'ASC de la Cerivastatine est augmentée de 559% sans interaction sur le métabolisme de la Cerivastatine. De façon surprenante, la Rifampicine est également décrite comme un inhibiteur de l'activité de l'OATP1B1. Lau et al<sup>71</sup> ont montré qu'une administration unique en intra-veineuse de Rifampicine chez des patients prenant régulièrement de l'Atorvastatine augmentait d'un rapport 8 l'ASC et de 10,5 la  $C_{max}$  de cette statine en comparaison à des patients sans Rifampicine. Néanmoins, lors d'administrations répétées de Rifampicine, le mécanisme d'induction des cytochromes (CYP450 3A4 en particulier) métabolisant l'Atorvastatine se met en place, réduisant ainsi les concentrations de l'Atorvastatine. Les molécules de la classe des macrolides sont également reconnues comme inhibiteurs de l'activité de l'OATP1B1. Jacobson et al<sup>72</sup> ont observé que la Clarithromycine, inhibiteur de l'OATP1B1 et du CYP450 3A4<sup>73</sup>, augmente d'un rapport 2,1 et 2,3 l'ASC et la  $C_{max}$  des patients sous Pravastatine par rapport aux patients sans Clarithromycine.

La co-infection au Virus de l'Hépatite C (VHC) est également un facteur pouvant moduler l'activité de l'OATP1B1. Nakai et al<sup>74</sup> ont constaté une diminution du taux d'ARN messenger dans les hépatocytes de patients infectés par le VHC. L'infection par le VIH peut également moduler l'activité de l'OATP1B1. Vee et al<sup>75</sup> ont montré que le taux d'ARNm d'OATP1B1 exprimé par des cellules exposées au TNF $\alpha$  et l'IL6, cytokines de l'inflammation augmentant lors d'une infection par le VIH, était diminué.

La figure 8 représente les différentes étiologies pouvant amener à des déficits de l'activité des protéines d'influx.

### **Transporteurs d'efflux**

Les protéines d'efflux sont rassemblées dans la superfamille des ABC transporters<sup>49,50</sup>, celle-ci contenant plusieurs sous familles dont deux sont impliquées dans l'efflux cellulaire de l'ATV et du DRV.

L'une d'elles est la sous famille de la MultiDrug Resistance. Il existe dans cette sous famille une protéine d'efflux ayant un impact important sur la pharmacocinétique des IP, la MDR1 ou glycoprotéine P (P-gp) encore appelée ABC B1. Elle présente à la surface de nombreux types cellulaires et notamment sur<sup>50,56</sup>:

Les entérocytes : efflux des molécules absorbées par les entérocytes vers la lumière intestinale

Les hépatocytes : efflux des molécules de l'hépatocytes vers le canalicule biliaire ou vers les capillaires sinusoides.

Les cellules épithéliales du tube contourné proximal : efflux des molécules vers la lumière tubulaire

Leur positionnement sur les entérocytes et les hépatocytes est détaillé dans les Figures 3 et 5, représentant un entérocyte et un hépatocyte respectivement.

Les P-gp présentes à la surface des entérocytes et des hépatocytes diminuent fortement la biodisponibilité orale de l'ATV et du DRV<sup>2,3</sup>. Son influence, associée à celle des CYP3A, est si importante sur la biodisponibilité qu'il est nécessaire d'associer un « booster » pharmacocinétique (Ritonavir) aux deux IP. Le Ritonavir inhibe la P-gp, facilitant ainsi l'absorption des IP au niveau intestinal et limitant leur efflux dans la bile au niveau hépatique.

La P-gp est également présente sur certaines barrières tissulaires, en particulier la barrière hémato-encéphalique, génitale et placentaire<sup>50</sup>. L'activité de la P-gp sur ces sites est telle que même en présence de Ritonavir, les rapports concentrations totales tissulaires sur concentrations totales sanguines sont extrêmement basses<sup>43,76</sup>. Des études<sup>44</sup> ont porté sur différents sites anatomiques:

- ATV dans le plasma séminal : 0,1
- DRV dans le plasma séminal : 0,09 à 0,17
- ATV dans les sécrétions vaginales : 0,16 à 0,14
- DRV dans les sécrétions vaginales : 1,5
- ATV dans le liquide céphalo rachidien : 0,03
- DRV dans le liquide céphalo rachidien : 0,006

La faible diffusion des IP dans certains de ces tissus, notamment le système nerveux central et l'appareil génital, permet au virus de se répliquer. Cette réplication peut se faire à bas bruit sans que la charge virale plasmatique ne se positive<sup>77</sup>.

La P-gp est également distribuée à la surface des LT CD<sub>4</sub> et des autres cellules mononuclées sanguines<sup>78,79</sup>. Son activité d'efflux du lymphocyte vers le milieu extracellulaire empêche l'accumulation intracellulaire de l'ATV ou du DRV, diminuant ainsi l'activité antirétrovirale de ces molécules.

Néanmoins, l'activité de la P-gp peut être soumise à un polymorphisme pouvant moduler son activité. Le SNP C3435T est le plus décrit. Il correspond à une mutation silencieuse retrouvée chez 50% de la population blanche<sup>80</sup>. Plusieurs travaux<sup>81-83</sup> ont démontré le lien existant entre l'accumulation d'IP dans les cellules mononucléées sanguines et l'activité de la P-gp. Ainsi, Jones et al<sup>81,84</sup> ont montré qu'une surexpression de P-gp amène à une diminution de la concentration intracellulaire en IP. En parallèle, d'autres travaux<sup>85,86</sup> ont montré que la concentration intracellulaire en IP pouvait être reliée à des cas d'échecs thérapeutiques. Toutefois, Saitoh et al<sup>87</sup> ont aussi démontré qu'il n'existait pas toujours un lien entre le polymorphisme de la P-gp, pouvant affecter son activité, et les cas d'échecs virologiques. Leschziner et al<sup>88</sup> expliquent ces contradictions par plusieurs facteurs limitants pouvant amener à des contradictions de résultats entre les différentes études *in vitro* et/ou *in vivo*. Ces auteurs citent par exemple la puissance de l'étude avec le nombre de sujets inclus, les techniques utilisées pour étudier le polymorphisme de la protéine ou les différences de recueil des données de co-morbidités ou de co-médications. L'exemple de l'utilisation du Ritonavir permet d'illustrer la contradiction de ces études. L'activité de la P-gp est inhibée par le Ritonavir et l'influence du polymorphisme sur l'activité n'est observable que si un IP est utilisé sans Ritonavir<sup>89</sup>.

La sous-famille des Multidrug Resistance Protein (MRP) comprend des protéines d'efflux, MRP1 et 2, ayant pour substrat l'ATV et le DRV. On retrouve MRP2 à la surface de<sup>49-51</sup> :

- Les entérocytes : efflux de l'entérocyte vers la lumière intestinale
- Les hépatocytes : efflux de l'hépatocyte vers le canalicule biliaire
- Les cellules épithéliales du tube contourné proximal : efflux des molécules vers la lumière tubulaire

MRP1 a elle une distribution cellulaire ubiquitaire<sup>54</sup>.

Ces protéines d'efflux, MRP1 et 2, sont également distribuées sur<sup>49-51</sup> :

Les cellules mononucléées sanguines : efflux du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, empêchant l'accumulation intracellulaire des IP

Les cellules constituant les barrières tissulaires, comme les barrières placentaires ou génitales, empêchant la diffusion des IP vers les tissus correspondant, facilitant ainsi une multiplication à bas bruit du virus

Actuellement, même si l'accumulation intracellulaire des IP est reliée à l'expression de MRP1<sup>81,82,90-92</sup>, il n'a pas été mis en évidence de relation entre le polymorphisme de MRP1 et la pharmacocinétique des IP<sup>54</sup>.

Concernant MRP2, il existe une variabilité fonctionnelle, conséquence d'un polymorphisme génétique. Un seul SNP a été décrit dans la littérature<sup>54</sup>, le SNP C24T, augmentant l'activité de la MRP2. Anderson et al<sup>93</sup> ont relié la présence de ce SNP à une augmentation de 24% de la clairance d'élimination de l'Indinavir en comparaison à la population « sauvage ».

A la variabilité fonctionnelle par polymorphisme génétique, l'infection par le VIH ou de co-infections virales (VHC) peut moduler l'activité des protéines d'efflux. En effet, plusieurs études ont relié directement les infections virales à une modification de l'expression des protéines d'efflux ou du taux d'ARN transcrit. Ainsi Lucia et al<sup>94</sup> ont mis en évidence une diminution de l'expression de la P-gp chez les patients VIH, de même que Meaden et al<sup>95</sup> qui n'ont toutefois pas observé de modification de l'expression de MRP1. Une autre étude de Lucia et al<sup>96</sup> a permis de constater une diminution de la fonction d'efflux préférentiellement au début de l'infection au VIH. Turriziani et al<sup>97</sup> ont quant à eux remarqué une augmentation de l'ARN messager de la P-gp et de la MRP1 dans les cellules mononuclées sanguines pour les patients infectés par le VIH en comparaison des sujets sains. Toutefois, ils soulignent une importante variabilité inter-individuelle dans les résultats obtenus dans les différentes études qui peut être attribuée aussi bien à l'infection par le VIH que par le traitement antirétroviral pouvant inhiber ou induire l'activité de ces molécules. Hinoshita et al<sup>98</sup> ont montré que l'infection par le VIH était reliée à une diminution de l'expression de l'ARN messager de MRP2. Janneh et al<sup>99</sup> 161 observent cependant que l'accumulation des IP ne dépend pas de l'expression des protéines d'efflux (P-gp, MRP1 et MRP2). Ces résultats contradictoires sont, comme pour les résultats du polymorphisme de la P-gp, la conséquence d'une variabilité liée à des facteurs techniques.

L'infection par le VIH, et les co-infections peuvent également intervenir indirectement sur l'activité des protéines d'efflux. L'infection par le VIH fait augmenter le taux de TNF $\alpha$  et d'IL6. Vee et al<sup>100</sup> ont montré que le taux d'ARN messager de plusieurs protéines de plusieurs protéines de transport (P-gp, MRP2 mais aussi OATP1B1) des cellules exposées à ces cytokines était diminué.

#### h. Interactions médicamenteuses

##### *i. Entre IP et les autres antirétroviraux*

Les interactions entre l'ATV ou le DRV et les différents antirétroviraux sont surtout d'ordres pharmacocinétique, avec principalement des interactions concernant le métabolisme par les CYP 3A mais aussi avec les transporteurs membranaires d'influx et d'efflux.

Les différentes interactions médicamenteuses sont rapportées dans les Annexes 2 et 3.

Les paramètres pharmacocinétiques évalués lors des études d'interaction sont principalement l'ASC et/ou les concentrations totales résiduelles.

L'influence sur la liaison aux protéines plasmatiques sera abordée dans le chapitre dédié à la fraction libre.

Parmi toutes les interactions, celle entre l'ATV et le TDF conduit à une diminution de 25% de l'ASC de l'ATV, même en présence de Ritonavir, alors que l'ASC du TDF augmente de 25%. Ces molécules ne partageant pas les mêmes voies métaboliques, Kis et al<sup>32</sup> ont proposé comme hypothèse l'implication des transporteurs transmembranaires. L'ATV augmenterait l'absorption intestinale du TDF par inhibition de la Pgp alors que le TDF inhiberait plusieurs transporteurs (OAT et MRP) de l'ATV. L'ATV aurait également une action inhibitrice sur une estérase entérocytaire impliqué dans le métabolisme du TDF. Un mécanisme similaire serait impliqué au niveau rénal expliquant la néphrotoxicité de l'association ATV-TDF.

## **ii. Entre IP et les molécules hors antirétroviraux**

Les différentes interactions médicamenteuses sont mentionnées en Annexe 2. Les paramètres pharmacocinétiques évalués lors des études d'interaction médicamenteuse sont l'ASC et/ou les concentrations totales résiduelles.

Concernant tout l'ATV, il existe aussi les interactions impliquant l'UGT1A1 (inhibition compétitive). L'Indinavir avec lequel l'Atazanavir n'est jamais associé, et l'Irinotécan pour lequel l'association est contre-indiquée<sup>101</sup>.

### **i. Effets indésirables**

#### **i. Atazanavir**

Les IP de première génération, apparus avant l'ATV et le DRV, étaient connus pour les perturbations métaboliques, en particulier lipidiques et glucidiques, qu'ils entraînaient, associés à des troubles du système digestif<sup>1</sup>. L'apparition de l'ATV et du DRV a permis d'effacer ces troubles améliorant significativement la tolérance au traitement<sup>2,3</sup>.

L'ATV a été, lors des essais thérapeutiques, associé à des troubles du système digestif, tel que des nausées (25 à 35 % des patients), diarrhées (20 % des patients) et douleurs abdominales (20 % des patients) ainsi qu'à des céphalées (20% des patients)<sup>2</sup>. La perturbation biologique la plus fréquemment relevée a été l'hyperbilirubinémie à bilirubine libre (41% des patients) de grades 3 à 4 (correspondant à une augmentation de 2,5 à 4 fois la valeur usuelle supérieure du taux de bilirubine fixée par le laboratoire)<sup>102</sup>, pouvant être cliniquement accompagnée d'ictères (7 à 8% des patients). Néanmoins, ces ictères ont rarement conduits à des interruptions médicales du traitement mais plutôt à une diminution de l'observance au traitement des patients<sup>4</sup>. Des augmentations des niveaux d'ASAT et

d'ALAT ont également été observées (4 à 14% des patients), sans qu'elles soient reliées à la bilirubinémie.

L'hyperbilirubinémie à bilirubine libre à l'ATV est la conséquence d'une inhibition compétitive de l'Uridyl GlucuronylTransférase 1A1 (UGT1A1) hépatique, enzyme métabolisant en particulier la bilirubine libre dans le cytosol des hépatocytes<sup>2</sup>. L'inhibition engendre un syndrome de Gilbert acquis. Le syndrome de Gilbert (non acquis) est la conséquence d'un polymorphisme du gène de l'UGT1A1 pouvant amener à de faibles hyperbilirubinémies à bilirubine libre chez presque 10 % de la population caucasienne<sup>103,104</sup>. La prise d'ATV peut d'ailleurs révéler un syndrome de Gilbert non connu<sup>105</sup>. L'hyperbilirubinémie à ATV n'engendre aucune souffrance hépatique et n'a jamais été reliée aux augmentations transitoires des transaminases observées pendant les essais. En dehors des nouveaux nés, la bilirubine libre circulante n'est pas toxique pour les patients, et aurait même des propriétés anti-oxydantes sur l'albumine, les cardiomyocytes, les hépatocytes en les protégeant des radicaux libres superoxydes<sup>106</sup>.

L'augmentation de la bilirubine totale serait corrélée ( $\rho = 0,72$  ;  $p=0,006$ ) à la concentration totale résiduelle d'ATV<sup>107</sup>.

Pour éviter l'hyperbilirubinémie et notamment l'ictère, la prise d'ATV sans Ritonavir peut diminuer la fréquence des ictères et des concentrations de bilirubine libre. La relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (concentration-toxicité) peut expliquer ce phénomène, les concentrations observées d'ATV sans Ritonavir sont presque quatre fois moins élevées qu'en présence de Ritonavir<sup>1</sup>.

## ***ii. Darunavir***

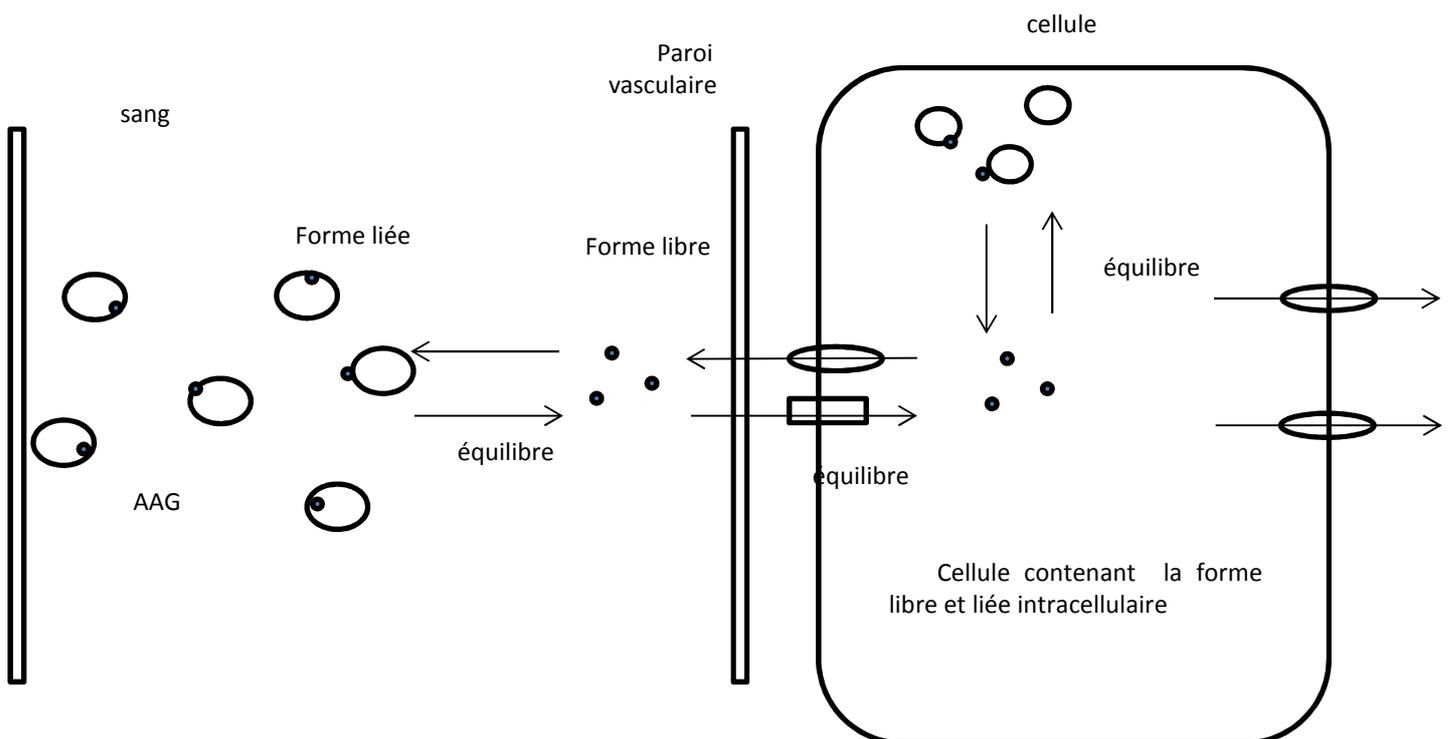
Concernant le DRV, d'après les résultats issus des études POWER I, II et III, il ne semblerait pas exister d'effets indésirables dus à l'exposition au Darunavir<sup>3</sup>.

## II- Concentration et fraction libres

### a. Fraction libre et notion de liaison protéique

Lors de l'administration d'une molécule à un individu, cette dernière se retrouve dans le compartiment sanguin sous une forme liée ( $C_l$ ) et libre ( $C_u$ ) (Figure 9). Le rapport de la concentration libre sur la concentration totale ( $C_t$ ; somme de la concentration libre et liée) correspond à la fraction libre ( $f_u$ ; Eq1).

$$f_u = \frac{C_u}{C_t} = \frac{C_u}{C_l + C_u} \quad \text{Eq1}$$



**Figure 9** : Principe de la forme libre pharmacologiquement active  
Les molécules sont dans le compartiment vasculaire sous la forme liée et libre. Un état d'équilibre existe entre ces deux formes. La forme libre, est celle disponible pour rentrer dans les cellules et avoir son activité pharmacologique. AAG : Alpha 1 glycoprotéine acide

Grâce aux études de liaison, mettant en jeu un ligand L et son récepteur R, on obtient la relation suivante :

$$B = \frac{(B_m \times L)}{(K_d + L)} \quad \text{Eq2}$$

L = ligand

R = récepteur

B = liaison L au R

$B_m$  = liaison maximale de L par le R

$K_d$  = constante de dissociation (inverse de la constante d'association  $K_a$ ) inversement proportionnelle à l'affinité d'un ligand pour son récepteur.

Cette équation permet de tracer la courbe suivante de la Figure X.

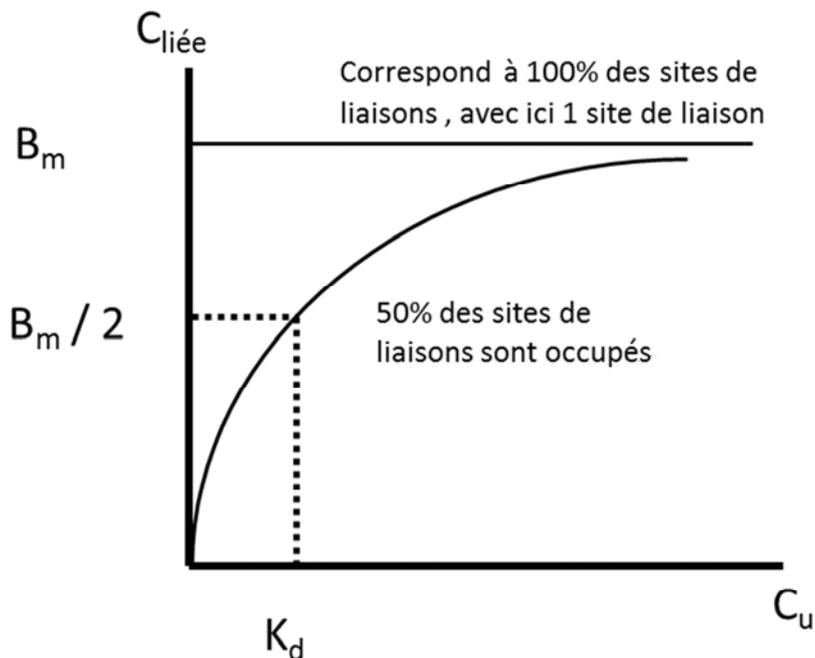


Figure 10 : Représentation de Michaelis Menten mettant en relation la concentration libre avec la liaison protéique.

Nous pouvons remarquer sur cette figure la relation entre  $B_m$  et  $K_d$  : lorsque le  $K_d$  est atteint, la moitié des sites de liaisons sont remplis.

Or, par développement mathématique à partir des équations 1 et 2 :

$$f_u = \frac{Cu}{Cu + Cl} \quad \text{Eq 1}$$

$$f_u = \frac{Cu}{Cu + (Bm \times Cu / Kd + Cu)} \quad \text{Eq 3}$$

$$f_u = \frac{Cu}{\frac{Cu (Kd + Cu) + Bm \times Cu}{(Kd + Cu)}} \quad \text{Eq 4}$$

$$f_u = \frac{Cu \times (Kd + Cu)}{(Cu^2 + Kd \times Cu + Bm \times Cu)} \quad \text{Eq 5}$$

$$f_u = \frac{Kd + Cu}{Cu + Kd + Bm} \quad \text{Eq 6}$$

En règle générale, la  $C_u$  est bien inférieure au  $K_d$ .

Cette condition permet de simplifier Eq 6 :

$$f_u = \frac{Kd}{Kd + Bm} \quad \text{Eq 7}$$

On constate avec l'équation 7 que la fraction libre d'une molécule dépend de son affinité pour une protéine plasmatique, le  $K_d$ , et du nombre de site de liaisons disponibles, le  $B_m$ . Ce sont donc, pour les liaisons protéiques, les deux facteurs influant sur la fraction libre.

### ***i. Modification du $B_m$ et du $K_d$***

Une modification du nombre de sites de liaisons, comme une diminution de la concentration en protéine, conduit à une modification du  $B_m$ . A titre d'exemple, si le nombre de sites diminue, alors la fraction libre augmente.

La modification du  $K_d$  peut également faire varier la fraction libre. En présence d'un agent compétiteur, endogènes (urée, acide gras libre) ou exogènes (Beta-bloquants, Benzodiazépines, Phénotiazines par exemple), pour le même site de liaison que la molécule d'intérêt<sup>14</sup>,  $K_d$  « augmente » conduisant à une augmentation de  $f_u$ .

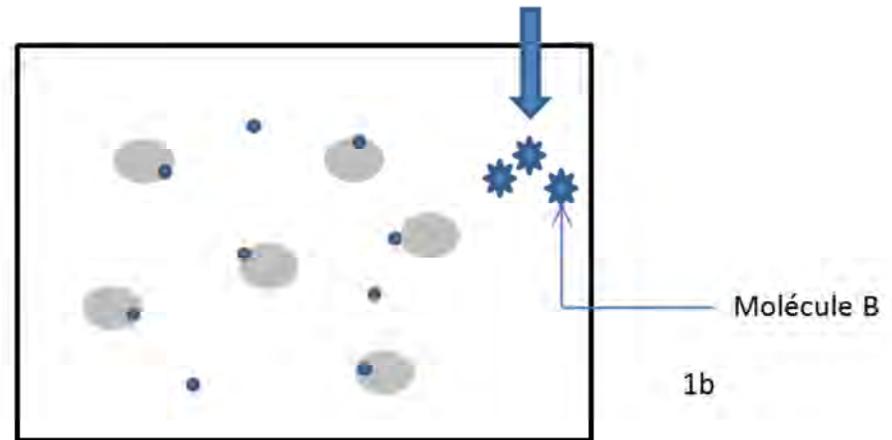
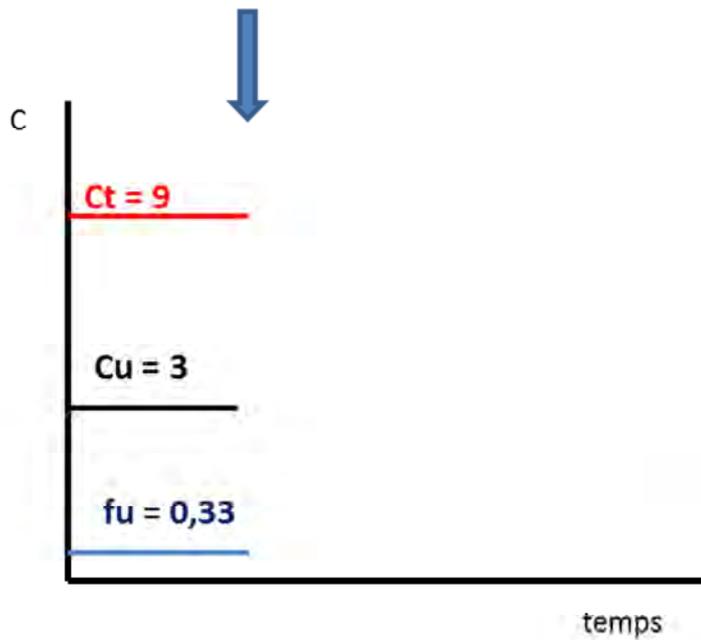
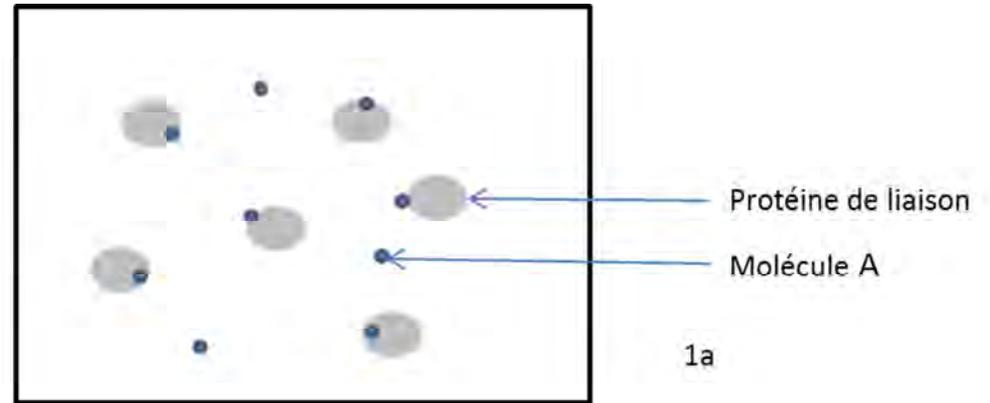
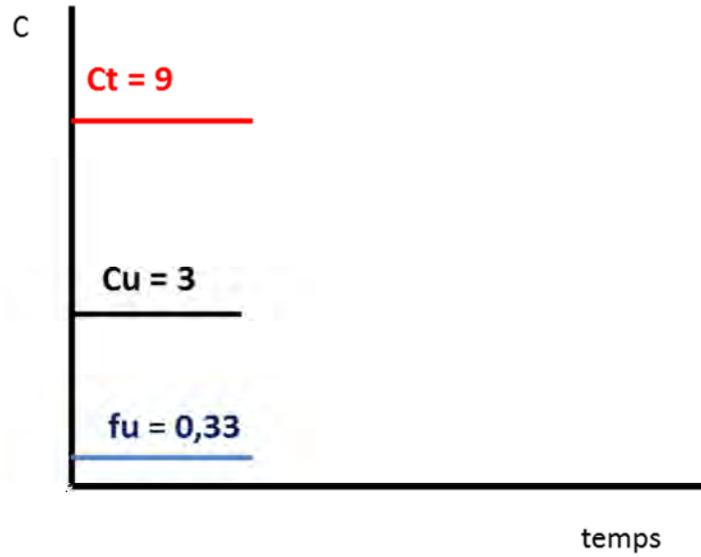
Des exemples de modifications du  $K_d$ , *in vivo* ou *in vitro*, sont représentés sur les figures 9 et 10.

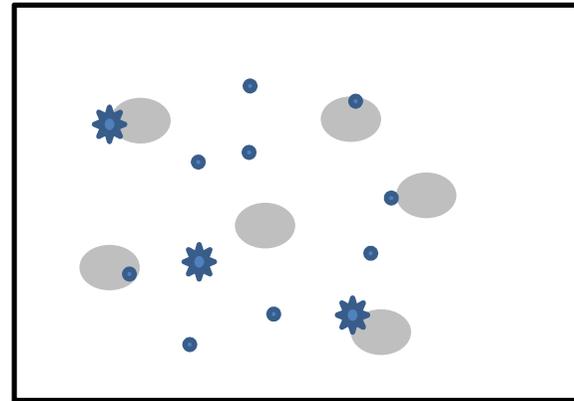
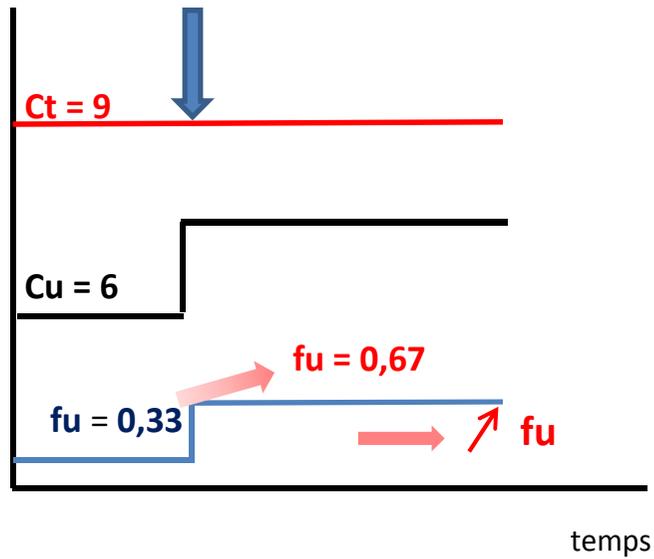
## **ii. Fraction libre *in vitro***

La caractéristique des études *in vitro* est l'absence de système « épurateur » contrairement au système *in vivo*. Ce point est fondamental, celui-ci entraînant à une interprétation différente aux études de liaison *in vivo*. La confusion entre le système *in vitro* et *in vivo* amène à de fausses conclusions.

En présence d'une molécule compétitrice pour la protéine de transport, une partie de la molécule d'intérêt est déplacée et se retrouve sous forme libre dans la solution. En appliquant l'Eq 1, la  $C_u$  augmente alors que la  $C_t$  reste constante (diminution de la concentration liée  $C_{liée}$  et augmentation proportionnellement à la diminution de la  $C_{liée}$  de la  $C_u$ ). Ainsi, de l'ajout d'un compétiteur de liaison *in vitro* résulte une augmentation de la  $f_u$  par augmentation de la  $C_u$ .

En cas de modification des concentrations des protéines plasmatiques de liaison, la variation porte sur le  $B_m$ . Ainsi, une concentration croissante en protéines d'une part augmente le  $B_m$  et la concentration liée et d'autre part diminue la  $C_u$  : cette situation conduit à une diminution de  $f_u$ .





1c

Figure 11: Représentation schématique d'un déplacement de liaison *in vitro*.

1a) Un compartiment en système clos contenant une molécule A sous sa forme liée (67%) et sa forme libre (33 %). 1b) Ajout d'une molécule B entrant en compétition avec la molécule initiale pour le même site de liaison sur la protéine de transport 1c) Augmentation du  $K_d$  de la molécule A pour la protéine et déplacement de la molécule qui voit sa forme liée passer en forme libre. A la suite de l'ajout de la deuxième molécule, la forme liée représente 33% et la forme libre 67 % de la totalité de A. La fraction libre a été augmentée par déplacement de la forme liée.

### iii. Fraction libre *in vivo*

La molécule d'intérêt est soumise à un phénomène d'élimination (métabolisme hépatique basé sur le CYP3A4) qui conduit à une interprétation différente de celle proposée pour des données obtenues *in vitro*. La Figure 9 rend compte du comportement de la fraction libre *in vivo*.

En reprenant le premier exemple du paragraphe précédent, la présence d'une molécule endogène ou exogène déplaçant l'équilibre de liaison n'engendre pas une augmentation de la  $f_u$  de la molécule d'intérêt à l'état d'équilibre. Bien que cette dernière soit déplacée de ses sites de liaison, la  $C_u$  n'augmente que de façon transitoire, de l'ordre de quelques secondes. La quantité déplacée de ses sites est alors redistribuée et éliminée rapidement, en quelques minutes. Ceci conduit *in fine* à une  $f_u$  qui reste identique à la valeur initiale (avant interaction médicamenteuse) sans conséquence clinique connue pour la très brève augmentation de la  $C_u$  avec une diminution de la  $C_t$ , par diminution de la concentration liée, amenant à une augmentation de la  $f_u$ .

Il est toutefois important de souligner que cette situation n'est possible qu'avec les molécules à faible coefficient d'extraction hépatique, celui-ci correspondant à un système épurateur ( $f_u \times Cl_{int}$ ) inférieur au débit sanguin de l'organe épurateur (par exemple le débit sanguin hépatique). Ceci s'explique par les équations suivantes.

Premièrement, la clairance totale d'une molécule s'exprime par l'équation suivante :

$$Cl_{H, totale} = \frac{Qh \times f_u \times Cl_{int}}{Qh + (f_u \times Cl_{int})}$$

Dans le cas des molécules à coefficient d'extraction faible, comme l'ATV ou le DRV, le débit sanguin est supérieur à la capacité d'épuration ( $f_u \times Cl_{int} < Q_H$ )

Ceci conduit à une simplification de l'équation :

$$Cl_{H, totale} = f_u \times Cl_{int}$$

Et si l'on considère uniquement la clairance de la concentration libre, on obtient :

$$Cl_{H, libre} = Cl_{int}$$

Or la concentration circulante ne dépend que de la vitesse d'entrée et de sortie de la molécule dans l'organisme :

$$C_{totale \text{ à l'équilibre}} = \frac{\text{vitesse d'entrée}}{f_u \times Cl_{int}}$$

Donc pour la concentration libre

$$C_{libre \text{ à l'équilibre}} = \frac{\text{vitesse d'entrée}}{Cl_{int}}$$

On en déduit donc :

La  $C_{t,eq}$  et la  $C_{u,eq}$  dépendent du taux d'entrée de la molécule en un temps donné

La  $C_{t,eq}$  dépend de la  $Cl_{int}$  et de la  $f_u$

La  $C_{u,eq}$  dépend uniquement de la  $Cl_{int}$

Par conséquent, en utilisant ces dernières équations, l'unique déplacement de liaison n'impactera pas la  $C_u$ , la  $Cl_{int}$  et la vitesse d'entrée restant constantes. Mais ce déplacement engendrera une modification de la  $C_{t,eq}$  via la  $f_u$ , la  $Cl_{int}$  et la vitesse d'entrée restant toujours constantes. La diminution de la concentration liée amène, d'après l'équation 1, à une augmentation de la  $f_u$  qui, avec l'équation 16, provoque une diminution de la  $C_{t,eq}$ .

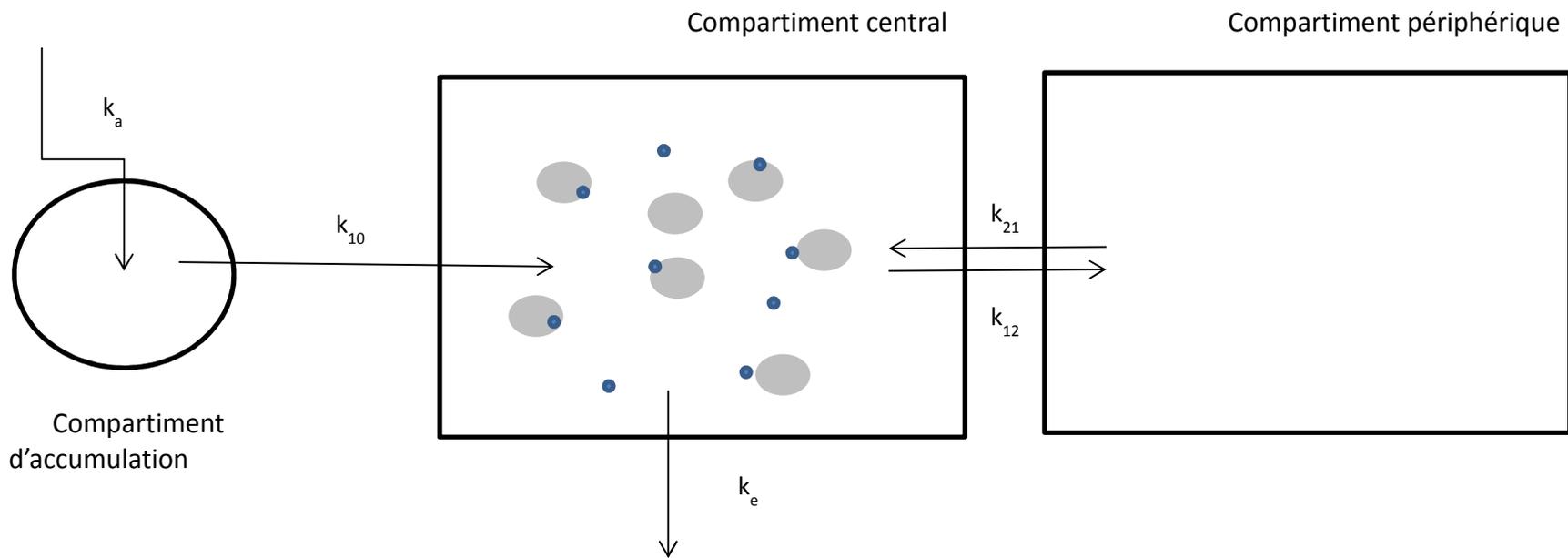
En revanche, si la molécule déplaçant la liaison est aussi capable d'atteindre la capacité d'élimination de l'organe épurateur, comme les enzymes du métabolisme hépatique pour les IP, on observera une augmentation de la  $C_u$  accompagné d'une  $C_t$  constante. La  $C_u$  obtenue, résultante de la  $C_u$  initiale à laquelle s'ajoute la concentration liée déplacée de la protéine, peut ainsi s'élever jusqu'à atteindre des concentrations toxiques.

L'absence d'interaction médicamenteuse cliniquement significative par le seul déplacement de la liaison a depuis longtemps été démontré<sup>108</sup>, cependant il existe encore des articles ambigus à propos de cette interaction<sup>109,110</sup>. Une autre situation pourrait amener à une modification du  $K_d$ . L'AAG présente un polymorphisme. Une modification de sa

structure pourrait modifier l'affinité des IP pour la protéine, en augmentant ou en diminuant la fraction liée. Toutefois, ce polymorphisme étant constant chez l'individu, la seule conséquence de ce polymorphisme serait une variabilité de la  $f_u$  entre les individus et en aucun cas une variabilité dans la  $C_u$ , seule partie pharmacologiquement active, et donc dans la réponse des individus. Malheureusement, la seule ayant étudiée l'impact du polymorphisme de l'AAG sur l'un des deux IP n'y a pas associé le dosage de la concentration libre<sup>12</sup>.

On peut également souligner qu'*in vivo*, le  $K_d$  ( $K_d = 1,53 \times 10^{-3}$  et  $3,3 \times 10^{-3}$  g/L pour l'ATV et le DRV respectivement) des deux IP pour l'AAG est très supérieur aux concentrations plasmatiques libres des deux molécules. Les concentrations libres résiduelles observées dans la littérature sont de 7,1  $\mu\text{g/L}$  et de 54,4  $\mu\text{g/L}$  pour l'ATV et le DRV respectivement<sup>11</sup>. Par ailleurs, le taux plasmatique d'AAG est compris entre 0,5 et 1,2 g/L<sup>48</sup> chez un sujet adulte sain. On retrouve ainsi au moins un facteur 100 entre la concentration d'AAG et les concentrations d'ATV ou de DRV. Ces données expliquent que la liaison de ces deux IP et l'AAG est non saturable dans ces conditions.

Par ailleurs, la situation *in vivo* se distingue de l'*in vitro* par la différence portant sur la composition des milieux : *in vivo*, on retrouve des molécules endogènes et des équilibres physico-chimiques non observés *in vitro*. L'équilibre des liaisons peut être modifié par la présence de molécules endogènes comme l'urée et les acides gras libres<sup>14</sup>. Le  $K_d$  peut également être modifié par les fluctuations du pH sanguin<sup>14</sup>.



L'état initial comprend des molécules liées et des molécules libres, dans un rapport un pour trois.

La liaison est considérée à l'équilibre dans cette situation.  $C_t$  : concentration totale,  $C_u$  : concentration libre,  $f_u$  : fraction libre,  $k_a$  : vitesse d'absorption,  $k_e$  : vitesse d'élimination,  $k_{10}$  : constante d'entrée dans le compartiment central,  $k_{12}$  et  $k_{21}$  : constante d'entrée et de sortie, à l'équilibre, du compartiment central au compartiment périphérique

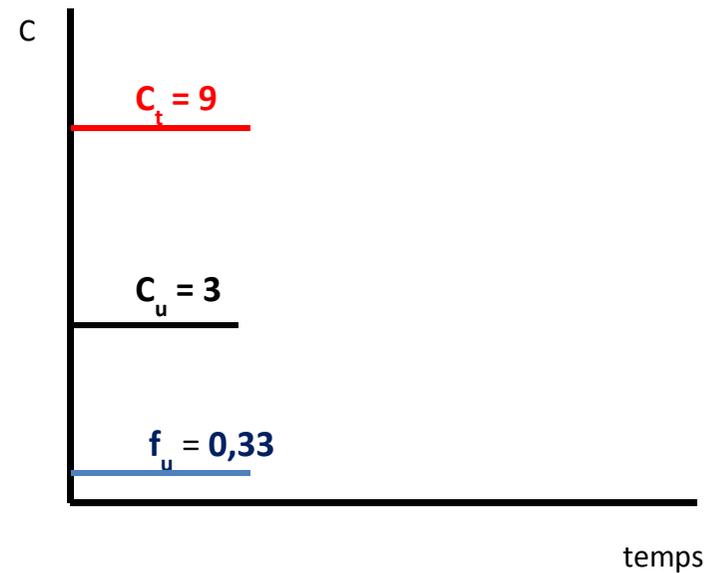
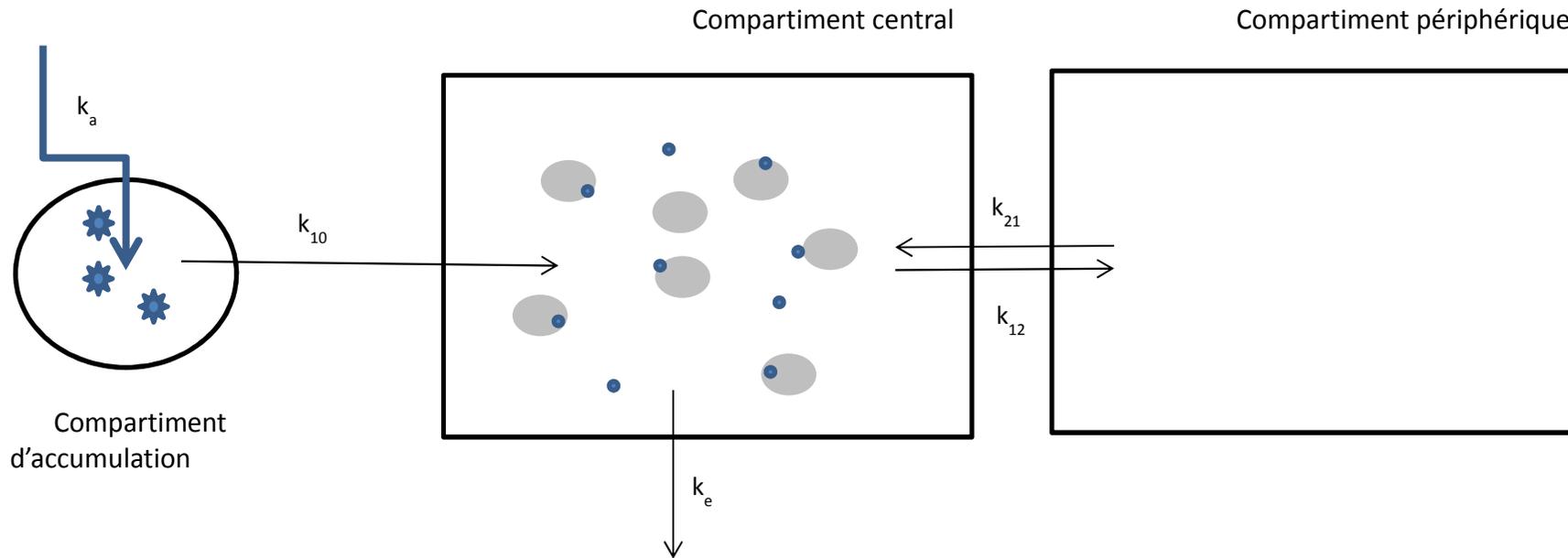
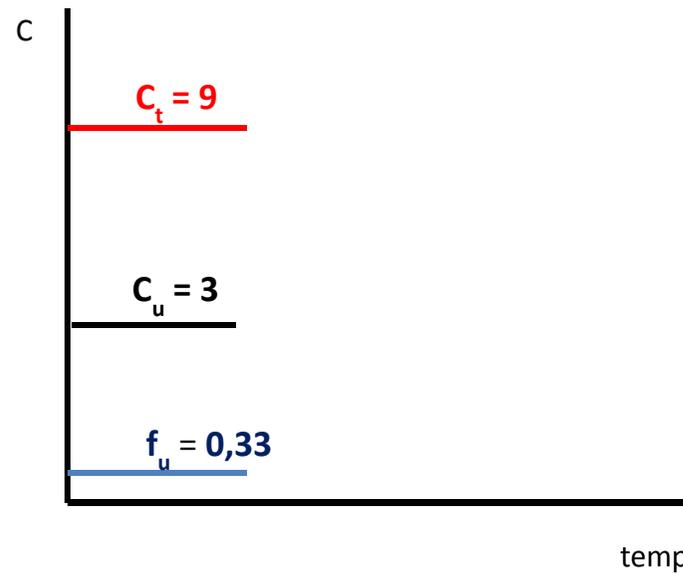


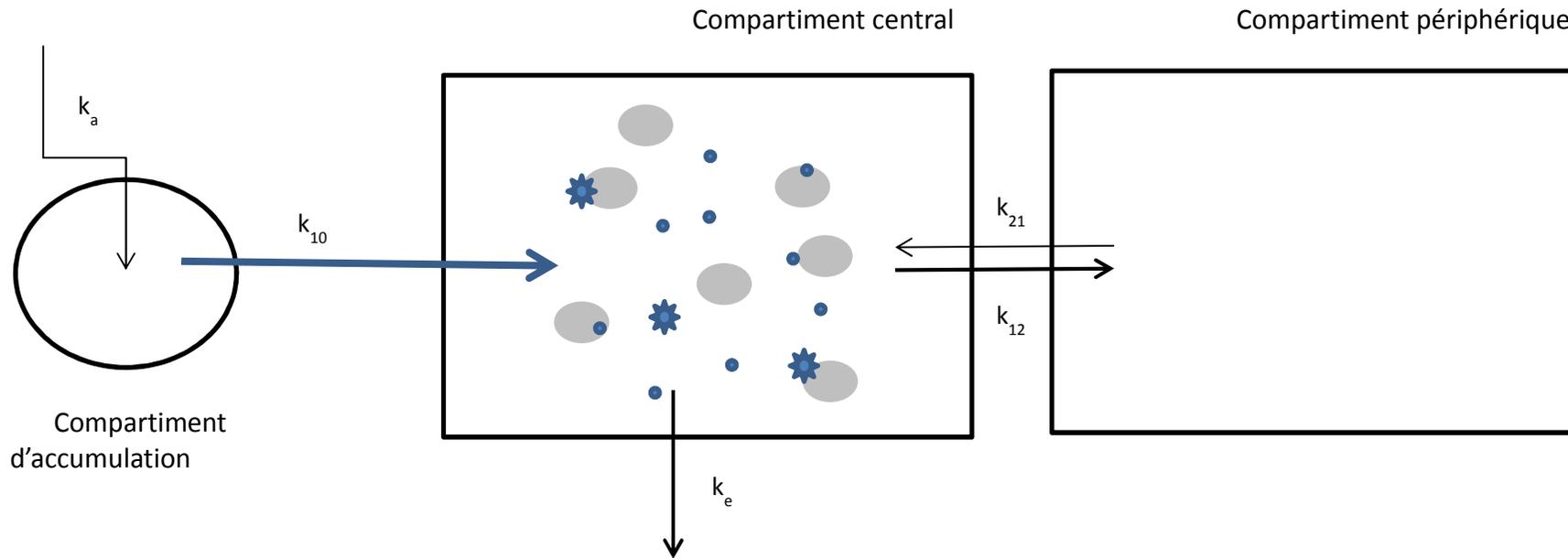
Figure 12 : Représentation schématique d'un déplacement de liaison *in vivo*



Un apport en molécules, endogènes ou exogènes, en compétition pour la liaison apparaît.

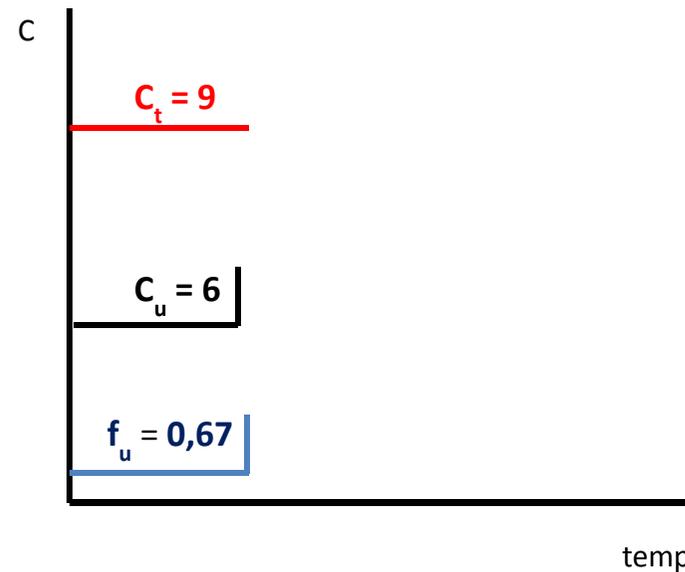
A ce moment, la molécule n'est pas arrivée dans le compartiment sanguin, aucune modification n'est intervenue.

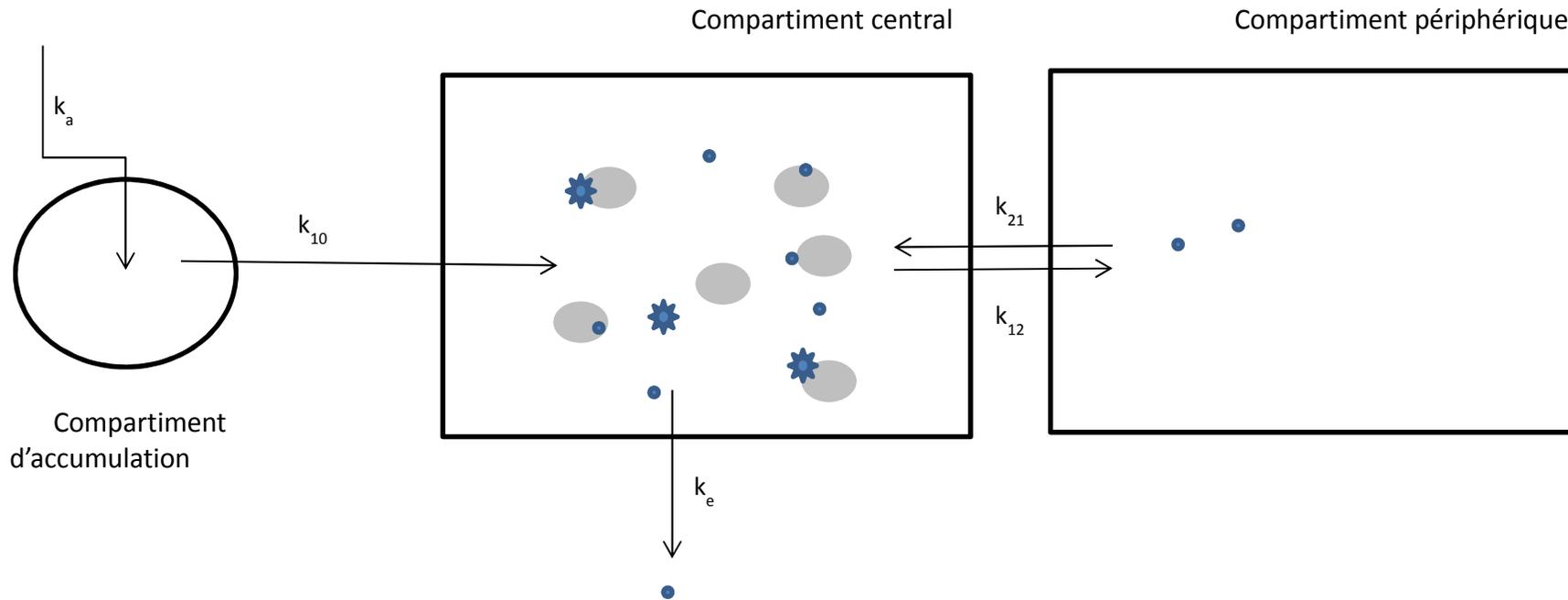




A cet instant, la molécule a diffusé dans le compartiment sanguin et entre en compétition avec la molécule A pour la liaison à la protéine de transport. Le  $K_d$  de la molécule A est augmenté, une partie des molécules initialement liées se retrouvent libres dans le sang de manière temporaire. Le déséquilibre de liaison entraîne une augmentation transitoire de la  $C_u$  ( $3 \rightarrow 6$  molécules) et donc de la  $f_u$  ( $3/9 \rightarrow 6/9 = 0,67$ ) sans modification de la  $C_t$  ( $9 \rightarrow 9$ ).

Ces molécules vont rapidement être prise en charge par le système d'élimination ou redistribuée.

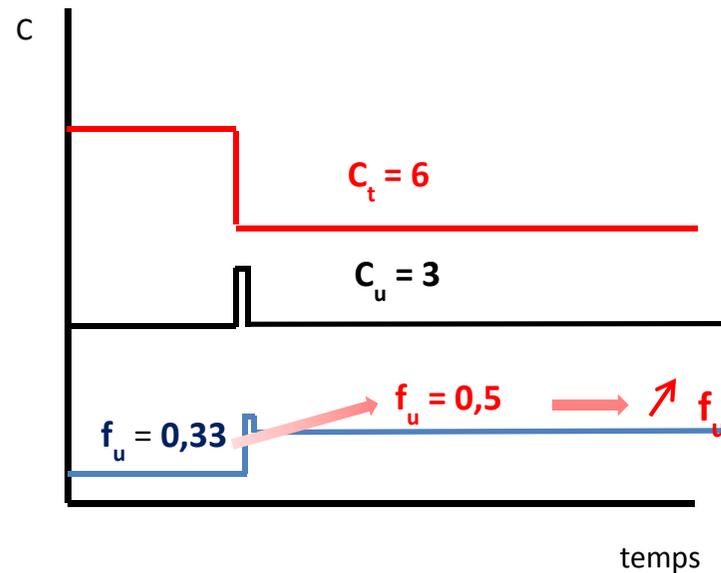




Les molécules initialement liées ont été redistribuées ou éliminées par le système épurateur.

L'équilibre de liaison est reformé, la  $C_u$  revient à son niveau antérieur (6  $\rightarrow$  3 molécules), la  $C_t$  a diminuée par la perte des molécules liées initialement (9  $\rightarrow$  6 molécules), la  $f_u$  (0,5) augmente par diminution de la  $C_t$  (3/9  $\rightarrow$  3/6).

L'apport en molécules compétitrices continue, le système est désormais à l'équilibre.



## b. Techniques séparatives

Il existe deux méthodes principales pour évaluer la fraction libre des molécules fortement liées aux protéines plasmatiques, la dialyse à l'équilibre, la méthode de référence, et l'ultrafiltration, méthode la plus couramment utilisée en routine.

### *i. Dialyse à l'équilibre*

La dialyse à l'équilibre (DE) emploie une cellule de dialyse contenant deux réservoirs séparés par une membrane semi-perméable. L'échantillon de plasma à analyser et le tampon sont placés dans leurs réservoirs respectifs séparés par la membrane semi-perméable. Le système de dialyse peut être placé à température physiologique (37°C) pour atteindre l'équilibre de liaison. Après avoir atteint l'équilibre, les liquides de chaque réservoir sont récupérés et les concentrations de la molécule d'intérêt sont mesurées. A la fin de la dialyse, la concentration du médicament dans le réservoir « tampon » est en équilibre avec la concentration libre dans le réservoir « plasma ». A la fin de la dialyse, la concentration dans le réservoir « plasma » représente la concentration totale. La fraction libre  $f_u$  est alors calculée selon le rapport  $f_u = \frac{C_u}{C_t}$ .

Le temps pour atteindre l'équilibre est un facteur important dans la DE. Pour que les résultats soient interprétables, la concentration libre dans le réservoir « tampon » doit être mesurée à l'équilibre. Ainsi, la première étape consiste à définir le temps pour atteindre l'équilibre. Ce temps est atteint lorsque la  $f_u$  devient constante.

Il est préférable d'effectuer un pré-traitement de la membrane de dialyse, en l'imprégnant avec du tampon sur une durée de 30 minutes à une heure.

Les différentes tailles et volumes de cellules de dialyse influencent la durée pour atteindre l'équilibre. Ainsi, plus le rapport surface de la membrane / volume des réservoirs

est important, plus le temps d'équilibre est atteint rapidement. De plus, une agitation des cellules pendant l'analyse permet d'atteindre l'équilibre de liaison plus rapidement.

La DE peut être utilisée avec de faibles volumes d'échantillons (50  $\mu\text{L}$ ) compatibles avec certaines contraintes cliniques liées au prélèvement (par exemple en pédiatrie). Néanmoins, la technique de dosage doit avoir une limite de quantification suffisamment basse pour mesurer la concentration libre. C'est habituellement le facteur limitant si la molécule n'est pas radiomarquée.

De nombreux facteurs doivent être évalués pour utiliser la DE et obtenir de bons résultats analytiques. Il est par exemple préférable de travailler à un pH physiologique (pH = 7,4), les liaisons protéiques pouvant être pH dépendantes. Les ions présents dans le tampon peuvent également influencer l'équilibre de liaison. Il peut donc parfois être utile de filtrer le plasma et d'utiliser le filtrat obtenu comme tampon pour se rapprocher des conditions physiologiques. Cependant, cette méthode nécessite de plus grands volumes de plasma. Des transferts de liquide peuvent également apparaître du tampon vers le plasma en raison de la pression osmotique exercée par les protéines présentes dans le plasma. Ce transfert a pour conséquence une dilution du compartiment plasmatique et donc des protéines présentes dans le plasma. Ce facteur de dilution peut être corrigé par addition de dextran dans le tampon, en modulant la composition du tampon (utilisation de concentrations plus élevées en orthophosphate de sodium) ou par une équation prenant en compte la dilution.

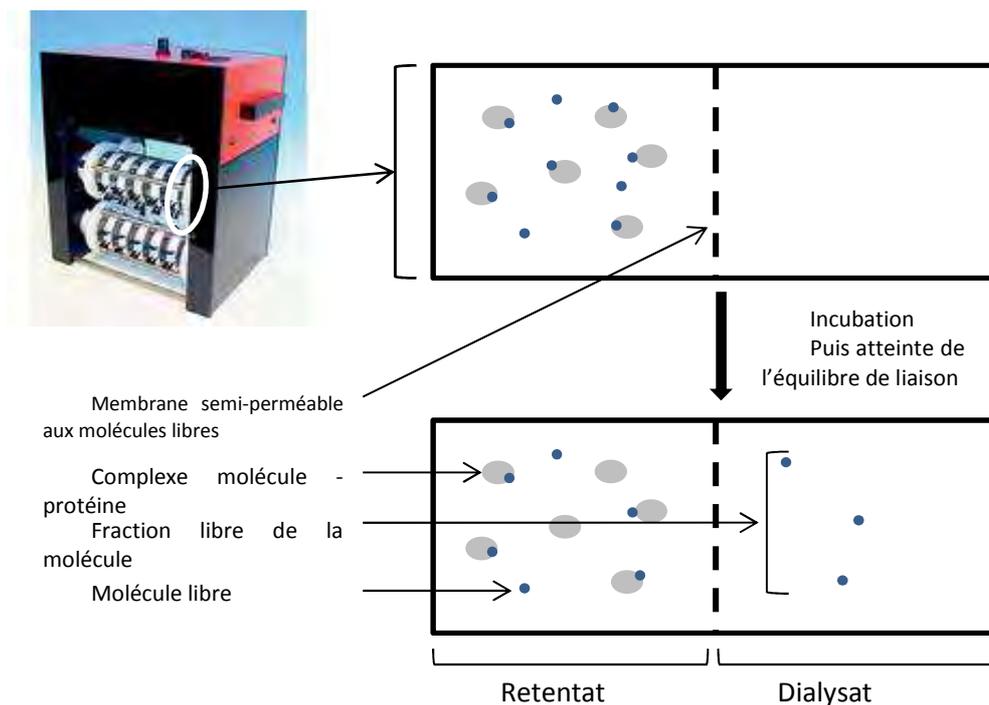
La seconde étape consiste à déterminer la gamme de concentrations pour laquelle la fixation protéique n'est pas saturée. Il s'agit de déterminer la fraction libre de la molécule d'intérêt pour des concentrations totales croissantes dans des conditions expérimentales identiques (même durée, même température, même pH lors de l'incubation).

Un inconvénient majeur de la DE est le temps pour atteindre l'équilibre. Parfois de plusieurs heures au cours desquelles il est impératif de s'assurer de la stabilité de la molécule d'intérêt dans les conditions de température et de pH de la DE. Enfin, des phénomènes d'adsorption sur la membrane semi-perméable et la cellule de dialyse peuvent apparaître. Toutefois, très peu de molécules ont une affinité importante pour la membrane ou la cellule de dialyse. Dans tous les cas, la fixation non spécifique doit être évaluée lors de

la validation de méthode de DE pour connaître son importance sur l'interprétation des résultats. Elle est considérée négligeable si elle ne dépasse pas 10%.

La DE reste à ce jour la méthode de référence malgré les avantages non négligeables de l'ultrafiltration.

Le principe de la dialyse à l'équilibre est représenté dans la figure 13.



**Figure 13** : Représentation du principe de la dialyse à l'équilibre

## ii. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est la technique la plus utilisée dans la routine hospitalière pour mesurer la concentration libre et calculer la fraction libre chez les patients. L'échantillon de plasma est déposé dans un compartiment qui est séparé du réceptacle de l'ultrafiltrat par un filtre. La porosité du filtre permet le passage de l'eau et des molécules de taille inférieure au tamisage. Les molécules de poids moléculaires plus élevé, par exemple les protéines plasmatiques, ne passent pas le filtre pendant la centrifugation. La concentration mesurée

dans le réceptacle inférieur est considéré comme la concentration libre  $C_u$ , la concentration totale devant être mesurée à part. De la même manière qu'avec la DE, la  $f_u$  est calculée par le rapport :  $f_u = \frac{C_u}{C_t}$ .

Il est recommandé de pré-laver le filtre du dispositif avant utilisation. Différentes solutions peuvent être envisagées pour le pré-lavage (eau ou soude). Après avoir déposé la solution dans le réservoir primaire, une centrifugation est réalisée, l'ultrafiltrat obtenu est jeté puis le dispositif est utilisé rapidement pour effectuer l'ultrafiltration du plasma.

L'ultrafiltration présente l'avantage d'être rapide et facile d'utilisation. Il n'est également pas nécessaire de recourir à l'utilisation de tampon non physiologique. Elle peut être utilisée pour différentes matrices biologiques, y compris des homogénats de tissus.

Cependant, l'inconvénient majeur de l'ultrafiltration est l'augmentation de la concentration du plasma au fur à mesure que l'eau plasmatique est filtrée. Il est recommandé d'adapter la technique pour ne recueillir que 10 à 15 % du volume initial. Il est toutefois nécessaire d'utiliser un volume initial important, notamment pour les molécules à concentration libre très faible, pour ne pas être sous la limite de quantification de la méthode analytique utilisée. Certaines études ont néanmoins montré que la  $C_u$  n'est pas modifiée en dépit d'une concentration du plasma en tête de cheminée lors de l'ultrafiltration<sup>112,113</sup>.

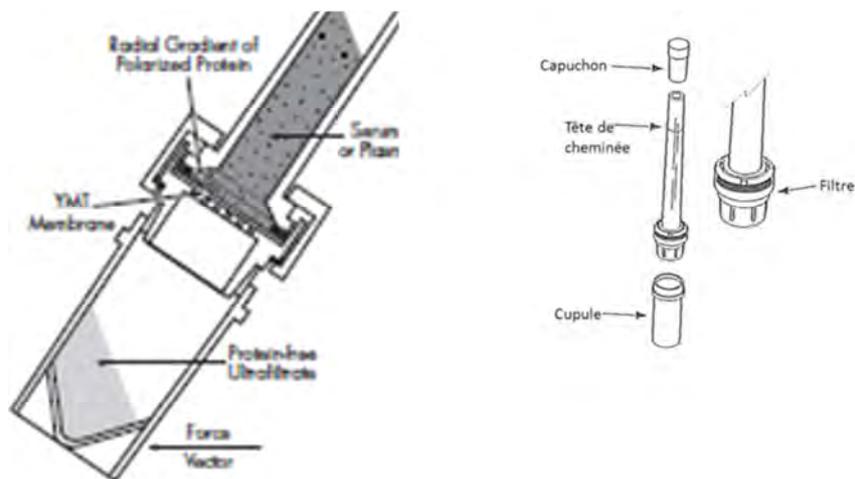
Les inconvénients de l'ultrafiltration peuvent rejoindre ceux de la dialyse à l'équilibre. En effet des phénomènes de liaisons non spécifiques avec le filtre ou le dispositif d'ultrafiltration peuvent apparaître. Une limite de 10% de fixation non spécifique est tolérée. La température lors de l'ultrafiltration doit également être prise en compte, celle-ci pouvant intervenir dans l'équilibre de liaison. Ce paramètre est d'autant plus important que l'état d'équilibre ne doit pas être modifié au cours de l'ultrafiltration. Il existe de nombreux exemples où la différence de température lors de l'ultrafiltration amène à une variabilité de l'estimation de la fraction libre, sans qu'elle soit retrouvée en dialyse à l'équilibre. Ces exemples sont reportés dans le Tableau 3.

Molécules	Techniques	Température		Référence
		24°C	37°C	
Thiopental	Ultrafiltration (fu%)	14,2	26,3	Jung et al <sup>114</sup>
	Dialyse à l'équilibre (fu %)	15,9	14	
Théophylline	Ultrafiltration (fu%)	40.9	45.0	Brors et al <sup>115</sup>
	Dialyse à l'équilibre (fu %)	34.3	37.7	

**Tableau 3** :  $f_u$  déterminées à l'aide de la dialyse à l'équilibre et de l'ultrafiltration pour différentes températures.

Il existe également des différences liées à la méthode de détermination de la fraction libre. Bertilsson et al<sup>116</sup> ont étudié la concentration libre de la demethylchlor-imipramine. Ces auteurs ont déterminé une  $f_u$  de 3,9% en utilisant l'ultrafiltration et de 8,2% en utilisant la dialyse à l'équilibre. Des résultats similaires ont été rapportés par Tiula et al<sup>117</sup> sur la fraction libre de la Phénytoïne (8,89% en ultrafiltration contre 9,65 % en dialyse à l'équilibre).

La figure 14 représente le dispositif et l'étape d'ultrafiltration.



**Figure 14** : Principes du phénomène d'ultrafiltration.

Figures issues de la notice du fournisseur<sup>118</sup>.

### c. Interprétation

#### i. *Fraction libre et pharmacocinétique par déplacement de liaison*

Comme cela a été décrit précédemment, la présence d'une molécule entrant en compétition avec le site de liaison d'un des deux IP va faire augmenter le  $K_d$  de l'IP d'intérêt pour l'AAG. La hausse du  $K_d$  va, d'après l'équation 7, faire augmenter la  $f_u$ . Cette augmentation se traduit dans la routine par une diminution de la concentration totale  $C_t$  liée à une perte des molécules liées initialement aux protéines. Cependant, la  $C_u$  demeure inchangée et conserve donc son efficacité pharmacologique.

Rolan<sup>108</sup> a proposé un arbre décisionnel, représenté par la Figure 15, aidant à l'interprétation clinique d'un déplacement de liaison .

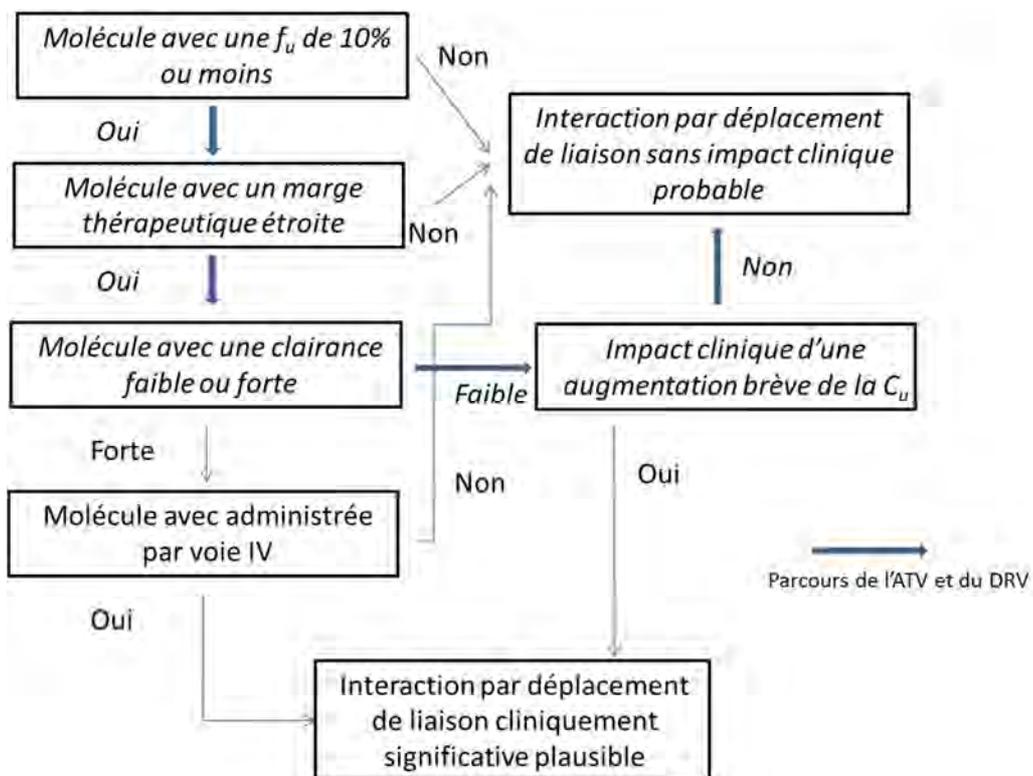


Figure 15 : Interprétation clinique d'une compétition de liaison d'après le diagramme proposé par Rolan<sup>108</sup>.

Ce diagramme peut être appliqué aux deux inhibiteurs de protéase qui présentent une liaison protéique importante, une marge thérapeutique étroite et une clairance d'élimination faible. On peut donc en déduire qu'une interaction médicamenteuse par déplacement de liaison sera sans conséquence cliniquement.

Les interactions médicamenteuses qui conduisent à des effets cliniques<sup>109,110,108,119</sup> sont généralement la conséquence d'une diminution de la clairance intrinsèque et/ou de la sécrétion tubulaire.

## ***ii. Fraction libre pharmacodynamie***

### **Entrée dans les réservoirs virologiques**

La pénétration des IP dans les cellules implique des transporteurs (OATP1B1 pour le DRV ; OATP non décrit pour l'ATV). La distribution des transporteurs n'est pas la même dans tous les tissus, engendrant de ce fait une certaine hétérogénéité des concentrations en IP dans les différents tissus d'intérêt.

Les premières études<sup>120</sup> ont révélé une mauvaise diffusion du DRV dans le liquide céphalo-rachidien, associées toutefois à des concentrations libres de DRV bien supérieures à la  $CI_{50}$ . Cependant la comparaison de la  $C_u$  rachidienne du DRV à la  $CI_{50}$  du VIH est difficilement utilisable comme témoin d'efficacité de l'encéphalite à VIH, l'encéphale et le LCR étant deux entités bien distinctes.

Les études<sup>76</sup>, qui ont porté sur la quantification de DRV dans le sperme et dans les sécrétions vaginales, ont fait état de concentrations libres supérieures à la  $CI_{50}$ .

### **Entrée dans les lymphocytes**

Les lymphocytes T  $CD_4$ , cellules cibles principales de la réplication du VIH, impliquent la présence de transporteurs actifs permettant l'entrée des IP dans le milieu intracellulaire.

Une fois internalisés dans le cytosol de la cellule, les IP se retrouvent dans la même situation que dans le plasma : une partie de la molécule est liée à des protéines intracellulaires et une autre partie est libre. Peu d'études<sup>121-125</sup> font état de la concentration intracellulaire de l'ATV ou du DRV. Ce manque d'information est lié à la difficulté de doser les concentrations intracellulaires comme cela a pu être décrit pour d'autres molécules comme la Ribavirine<sup>126</sup>. A ce jour, la détermination des concentrations intracellulaires n'est pas réalisée en « routine » mais uniquement en recherche.

### III- Suivi thérapeutique pharmacologique de l'Atazanavir et du Darunavir

#### a. Définition du suivi thérapeutique pharmacologique

L'objectif d'un traitement est d'arriver à son but thérapeutique, en évitant/limitant toute toxicité. Toutefois, la réponse au traitement (pour une même posologie) n'est pas toujours la même chez l'ensemble des individus traités. Elle peut être influencée par des facteurs démographiques (poids, taille, âge, ethnie...) ou clinico-biologique (clairance à la créatinine...).

Pour un grand nombre de molécules, cette variabilité inter-individuelle des concentrations/paramètres pharmacocintétique n'existe pas ou est non significative cliniquement. Dans ces deux situations, on peut considérer qu'à une posologie donnée, tous les patients traités à la même posologie ont un traitement efficace et non toxique. Il existe ainsi une relation entre la dose administrée et l'effet thérapeutique attendu.

A l'inverse, il existe un certain nombre de molécules pour lesquelles la variabilité inter-individuelle des concentrations/paramètres pharmacocintétique est significative. Il faut donc adapter la posologie à chaque individu en fonction des caractéristiques influentes (habituellement appelées « covariables explicatives » en pharmacocinétique de population) pour obtenir un traitement efficace et non toxique. Ceci est d'autant plus important pour les molécules dites à faible index thérapeutique, c'est à dire des molécules où la frontière entre efficacité et toxicité est étroite.

Si l'adaptation de posologie repose sur des marqueurs pharmacocinétiques (concentrations résiduelles, ASC, clairance...) de l'efficacité/toxicité, le suivi de ces marqueurs PK associé à l'adaptation même de posologie porte le nom de suivi thérapeutique pharmacologique (STP).

Ainsi, le STP permet d'améliorer la prise en charge d'un patient en optimisant l'utilisation d'un médicament. Il assure, par la connaissance d'une « éventuelle » zone thérapeutique et

l'existence d'une relation PK–PD (efficacité et/ou toxicité), d'adapter la posologie d'une molécule. Cette adaptation des doses permet d'avoir un traitement efficient tout en évitant l'exacerbation des effets pharmacologiques concentration-dépendants.

Pour qu'une molécule soit candidate à un STP, elle doit remplir plusieurs conditions<sup>127</sup> :

- Etre une molécule à faible index thérapeutique
- Absence de relation dose – efficacité et/ou dose – toxicité
- Existence d'une relation PK (concentration, paramètre...) – PD (efficacité et/ou toxicité)
- Absence de signes clinico – biologiques permettant de réaliser un suivi fiable
- Existence d'une méthode de dosage accessible en « routine »
- Existence d'une importante variabilité inter-individuelle des concentrations/paramètres PK
- Absence ou faible variabilité intra-individuelle des concentrations/paramètres PK (pas d'effet « inter-occasion »)

L'ATV et le DRV répondent à chacune des sept conditions exposées ci-dessus, faisant de ces molécules des candidates idéales au STP.

#### **b. Bénéfices du suivi thérapeutique pharmacologique**

Le STP a démontré son intérêt dans plusieurs situations<sup>127</sup>. Il permet ainsi de :

- Reconnaître les cas de non-observance thérapeutique

La non-observance d'un traitement par un patient peut avoir de graves conséquences cliniques, en particulier avec les antirétroviraux. En effet, la prise irrégulière du traitement

antirétroviral peut amener à soumettre le virus à une pression de sélection<sup>128</sup>. Cela a pour conséquence l'apparition d'une résistance virale au traitement. La présence de résistances croisées et le faible nombre d'alternatives thérapeutiques fait prendre le risque au patient d'être en échappement thérapeutique. Plusieurs techniques permettent de déceler la non-observance d'un patient : le décompte des comprimés délivrés et la discussion avec le patient. Mais d'après Chandra et al.<sup>129</sup>, le STP et l'observation de concentrations sub-thérapeutiques chez un patient est une technique intéressante pour dépister l'inobservance. Toutefois l'étude révèle qu'il est nécessaire d'y associer dans un deuxième temps la surveillance du patient. Dans l'étude de Mattson et al.<sup>130</sup>, les auteurs ont fixé des critères d'exploration de la non-observance qui sont des concentrations nulles ou sub-thérapeutiques, et des concentrations présentant une importante variabilité (pour un temps donné).

- Personnaliser le traitement.

La variabilité de la réponse au traitement ou des concentrations/paramètres PK du principe actif n'est pas uniquement expliquée par la non-observance au traitement. Cette variabilité peut être apportée par les caractéristiques physiopathologiques du patient. En effet, des facteurs comme la biodisponibilité orale, la clairance d'élimination de la molécule, la liaison protéique mais aussi les particularités génétiques sont connus pour être responsables d'une variabilité dans la réponse à un traitement. Ainsi, Spear et al<sup>131</sup> ont rapporté que 30 à 60 % des non-répondeurs à un traitement pharmacologique peuvent être expliqués par ces facteurs. La variabilité amenée par la liaison protéique est explorée par la mesure de la concentration libre et le calcul de la fraction libre chez tous les patients traités. Son utilisation dans le STP des IP pourrait expliquer la variabilité de non-réponse au traitement et aider à personnaliser le traitement de l'ATV et du DRV.

Eviter la toxicité ou l'inefficacité thérapeutique en raison d'interactions médicamenteuses

Certaines associations médicamenteuses sont non recommandées voir contre-indiquées pour éviter toute toxicité. L'association entre l'Atazanavir et le Tenofovir est l'exemple d'interaction médicamenteuse nécessitant un STP, tout du moins en début de traitement. En

effet, l'association est connue pour diminuer de 25% l'exposition (aire sous courbe sous la courbe des concentrations en fonction du temps) de l'Atazanavir tout en augmentant de 25% l'exposition du Tenofovir. Le STP permet ainsi une adaptation de posologie pour augmenter si nécessaire la posologie de l'ATV et diminuer celle du TDF, en fonction des concentrations mesurées.

- Intérêt pharmacoéconomique

Le STP permet d'éviter des cas de toxicité liée au traitement et réduire une hospitalisation voire éviter une prise en charge en milieu hospitalier/clinique. Les aminoglycosides (Amikacine, Gentamycine...) sont un des exemples d'intérêt pharmaco-économique du STP. Il a été plusieurs fois décrit<sup>132,133</sup> qu'un STP efficace permet de diminuer la néphrotoxicité des aminoglycosides et ainsi diminuer la durée d'hospitalisation pour la prise en charge de cette néphrotoxicité. Actuellement, aucun résultat d'étude sur l'intérêt pharmaco-économique du STP de l'ATV ou du DRV.

- c. Situations physiopathologiques pouvant affecter la pharmacocinétique des médicaments**

La concentration d'une molécule dans le sang dépend de son absorption et de son élimination. Les situations physio-pathologiques suivantes sont connues pour affecter soit l'absorption soit l'élimination (métabolique, rénale...) et conduire à une variabilité des concentrations/paramètres PK de la molécule d'intérêt<sup>127</sup>.

- Variabilité génétique

Les molécules sont métabolisées par des enzymes majoritairement présentes dans les hépatocytes. La famille des cytochromes P450 est celle qui est le plus impliquée dans les phénomènes de métabolisation. L'ATV et le DRV sont majoritairement métabolisés par le CYP3A4<sup>2,3</sup>. Même si plusieurs polymorphismes ont été décrits pour le CYP3A4<sup>134</sup>, les résultats des études reliant le polymorphisme à l'exposition (ASC) ont souvent été

contradictoires<sup>53</sup>. Actuellement, un seul SNP (CYP3A4\*22) est relié à une efficacité diminuée pour la CsA. Aucun résultat n'a été publié sur l'influence de ce SNP sur la pharmacocinétique de l'ATV et du DRV.

- Genre

De nombreuses différences physiologiques entre l'homme et la femme peuvent expliquer les différences pharmacocinétiques observées. Le poids total, le volume sanguin, la vidange gastrique, la liaison protéique et l'activité enzymatique sont des facteurs de variabilité des concentrations/paramètres PK des molécules. Venuto et al<sup>135</sup> ont ainsi mis en évidence des différences de clairance pour l'ATV entre les hommes et les femmes. Les femmes avaient une clairance plus faible que les hommes et l'échec virologique étant relié à la clairance.

- Effet de l'âge

Les âges extrêmes peuvent également influencer la pharmacocinétique des médicaments. Le volume d'eau corporel est augmenté chez les nouveau-nés et les enfants, et diminué chez les personnes âgées par rapport aux sujets adultes. Cette caractéristique peut avoir une conséquence sur les molécules lipophiles comme l'ATV ou le DRV. Les cytochromes majoritairement présents à la naissance (CYP3A5/7) ne sont pas les mêmes qu'à l'âge adulte (CYP 3A4 majoritairement). La fonction rénale est diminuée chez le nouveau-né et chez les personnes âgées comparées à l'adulte sain. Pour l'ATV, il a été observé des différences pharmacocinétiques liées à l'âge<sup>136</sup>. Ainsi, un groupe de patients de plus de 55 ans (moyenne 59,7 ans  $\pm$  3,4 ans) a montré une ASC diminuée de 12% et une Cmax augmentée de 9% comparé à un groupe de patients plus jeunes.

- Urémie

L'altération de la fonction rénale amène à une rétention azotée. L'accumulation d'urée dans le compartiment sanguin peut conduire au niveau de la liaison protéique. Elle peut également conduire à une inhibition enzymatique (diminution de la clairance métabolique) et/ ou de la P-glycoprotéine, associé à une augmentation du risque de toxicité avec des molécules à élimination hépatique<sup>137</sup>. Ainsi il a été montré chez les animaux que l'urémie

diminue significativement (50 à 84 %) le métabolisme intestinal et hépatique (CYP450)<sup>138</sup>. Il existe toutefois des discordances en fonction de la voie métabolique étudiée<sup>139</sup>.

- Atteinte hépatique

Une atteinte de la fonction hépatique ne va pas jouer que sur la capacité enzymatique des hépatocytes. En effet, les protéines de liaison plasmatique, AAG et albumine, sont synthétisées au niveau du foie. Un défaut de synthèse protéique conduit à une diminution de la liaison protéique. Le shunt de l'espace porte, par exemple dans les cas de cirrhose, peut faire augmenter la biodisponibilité par diminution de l'effet du premier passage hépatique.

- Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiaques, en phase aiguë ou chronique, peuvent s'accompagner d'une diminution de la perfusion tissulaire, d'un déséquilibre hydro-électrolytique et d'une diminution de la motilité intestinale. Ces variations physiopathologiques impactent à leur tour les phases d'absorption, de distribution et d'élimination.

- Atteinte thyroïdienne

. Burk et al.<sup>140</sup> ont rapporté l'influence de la thyroxine sur la P-glycoprotéine. Ainsi cette étude révèle que les patients en hypothyroïdie devenant normo-thyroïdien voient leur taux d'ARN messager de P-gp augmenté 1,8 fois.

#### d. Indications du STP chez le patient infecté par le VIH

Concernant les antirétroviraux, trois indications sont formulées dans le rapport du Professeur Morlat<sup>1</sup>.

- Suivi d'un nouveau traitement

Le dosage est recommandé dès que les concentrations circulantes ont atteint l'état d'équilibre. Idéalement pour l'ATV et le DRV, la période se situe entre 15 jours et un mois

après le début du traitement. Cette recommandation suit un niveau de preuve B III (Tableau 1). Elle doit être appliquée dans certaines conditions d'instauration du traitement :

En cas d'interaction médicamenteuse attendue entre les traitements déjà administrés et le traitement antirétroviral

En cas d'insuffisance hépatique et/ou en cas d'infection à un virus de l'hépatite B ou C

Chez un individu avec un indice de masse corporelle élevée

Chez l'enfant, notamment en cas de mutations virales présentes chez le virus

Chez la femme enceinte en début de traitement ou si un échec virologique apparaît lors de la grossesse

#### **En cas de situation de malabsorption**

Chez les patients ayant une altération de la fonction rénale, et particulièrement si la trithérapie comporte du Tenofovir, du fait de sa néphrotoxicité.

#### **Apparition d'un échec virologique**

Deux cas d'échecs virologiques sont à différencier. En premier lieu, celui observé à l'initiation du traitement. En effet, une diminution insuffisante de la charge virale est considérée comme un échec virologique. La présence d'un rebond virologique après une période où la charge virale a été indétectable est considérée également comme une situation d'échec virologique<sup>1</sup>.

Le dosage plasmatique de la concentration totale résiduelle permet de dépister les étiologies pharmacologiques pouvant amener à un échec virologique, telles que les problèmes de non-observance, malabsorption intestinale ou interactions médicamenteuses.

#### **Toxicité du traitement**

Dans le cadre de cette thèse, elle ne concerne que l'ATV, le DRV n'ayant pas montré de phénomène de toxicité concentration – dépendante.

Ainsi, une concentration résiduelle totale élevée en ATV peut être responsable d'hyperbilirubinémies à bilirubine libre. Elles sont fréquemment observées pour une concentration supérieure à 800 µg/L<sup>1</sup>. Dans ce cas, une diminution de la posologie peut être effectuée sous contrôle de la concentration une fois le nouvel état d'équilibre atteint, c'est-à-dire sous 2-3 jours.

e. **Outils actuels pour le suivi thérapeutique pharmacologique de l'ATV et du DRV**

*i. Concentration totale résiduelle plasmatique*

Les concentrations plasmatiques totales résiduelles sont les seules à bénéficier de zones de référence<sup>1</sup>.

Ainsi, pour être efficace, la concentration plasmatique totale résiduelle de l'ATV doit être supérieure à 200 µg/L. Elle ne doit toutefois pas dépasser les 800 µg/L, concentration à partir de laquelle la probabilité de voir apparaître des hyperbilirubinémies à bilirubine libre de grades 3 ou 4 augmente sans apporter une efficacité supplémentaire<sup>1</sup>.

Lorsque l'ATV est administré à la posologie de 300 mg une fois par jour associé à 100 mg de Ritonavir, la concentration totale résiduelle moyenne est de 862 µg/L (CV% = 97,2%). Néanmoins, comme le suggère le coefficient de variation, le seuil de toxicité de l'ATV peut rapidement être franchi chez certains patients.

Un deuxième schéma thérapeutique sans Ritonavir peut être proposé, en cas d'hyperbilirubinémie notamment, dans lequel l'ATV est administré seul à 400 mg. La concentration totale résiduelle moyenne est de l'ordre de 273 µg/L (CV% =109,2%). Avec ce schéma thérapeutique, la forte variabilité inter-individuelle des concentrations totales suppose qu'une proportion non négligeable de patients risque d'être exposée à des concentrations inefficaces susceptibles par ailleurs de conduire à un phénomène de résistances virales.

Le DRV, toujours associé au Ritonavir selon les recommandations en vigueur<sup>1</sup>, présente un seuil d'efficacité thérapeutique fixé à 2000 µg/L. Le DRV n'ayant pas présenté de toxicité aux concentrations observées pendant les essais cliniques<sup>3</sup>, aucun seuil de concentration maximale n'a été déterminé à ce jour.

Pour le DRV, deux modes d'administration sont recommandés. Le premier consiste en une administration biquotidienne de 600 mg associée à 100 mg de Ritonavir. Ce schéma thérapeutique conduit à une concentration totale résiduelle médiane de 3539 µg/L (minimale= 1255 µg/L; maximale= 7368 µg/L). L'alternative posologique consiste en une prise quotidienne de 800 mg associée à 100 mg de Ritonavir. La concentration totale résiduelle médiane observée est de 2041 µg/L (minimale = 368 µg/L; maximale= 7242 µg/L)<sup>1</sup>.

De la même manière qu'avec l'ATV, une importante variabilité des concentrations totales résiduelles a été rapportée avec les deux schémas posologiques, parfois associées à des concentrations infra-thérapeutiques. Ces données suggèrent un suivi thérapeutique du DRV pour atteindre systématiquement le seuil de concentration de 2000 µg/L.

Néanmoins, que ce soit pour l'ATV ou le DRV, le STP basé sur la seule mesure de la concentration totale résiduelle amène à une difficulté majeure : les prélèvements sanguins réalisés en consultation de suivi sont rarement réalisés à un temps correspondant à la concentration résiduelle réelle. A ce jour et en ne se basant que sur la concentration mesurée, il est difficile d'effectuer un STP adapté. Trois solutions existent pour résoudre ce problème. La première consiste à imposer que le prélèvement sanguin soit réalisé au temps correspondant à la « résiduelle ». Cette proposition, rigide d'un point de vue organisationnel, est rarement appliquée. La seconde solution consiste à estimer la concentration totale résiduelle à partir de la demi-vie d'élimination moyenne déterminée dans la population traitée<sup>1</sup>. Cette approche est discutable, en particulier à cause de la variabilité inter-individuelle de ce paramètre. Ainsi pour le DRV la t<sub>1/2</sub> moyenne est de 15h, avec un intervalle entre 12,7 et 21h<sup>3</sup>. En raison de sa cinétique non linéaire (sur un intervalle de dose allant de 200 à 800 mg)<sup>39</sup>, la demi-vie de l'ATV varie avec la dose utilisée, avec des résultats moyens de 5,31, 7,06 et 9,91h pour des doses de 200, 400 et 80 mg respectivement (chez les sujets sains à l'équilibre pharmacocinétique)<sup>2</sup>. Une dernière solution, beaucoup

plus adaptée à la réalité du terrain, fait appel à la pharmacocinétique de population. C'est cette solution que nous allons présenter dans le prochain chapitre.

## ***ii. Pharmacocinétique de population par approche Bayésienne***

Il existe pour certaines molécules une relation linéaire entre la dose administrée et la concentration mesurée dans le sang. Cependant, même en présence d'une relation linéaire, on peut rencontrer, entre les individus, une variabilité des concentrations mesurées pour une même dose.

Cette variabilité entre les individus s'observe avec les concentrations résiduelles mesurées de l'ATV et du DRV. Ainsi pour reprendre l'exemple de l'ATV, à une posologie de 300 mg associé à 100 mg de Ritonavir, les concentrations plasmatiques totales résiduelles moyennes observées sont de 862  $\mu\text{g/L}$  (+/- sd = 838  $\mu\text{g/L}$ )<sup>1</sup>. De même, pour une posologie de 400 mg d'ATV, les concentrations totales résiduelles moyennes observées sont de 273  $\mu\text{g/L}$  (+/- sd = 298  $\mu\text{g/L}$ )<sup>1</sup>. Ainsi les patients sous ATV, molécule qui présente une marge thérapeutique étroite située entre 200 et 800  $\mu\text{g/L}$ <sup>1</sup>, peuvent, pour chacune des deux posologies, présenter des concentrations plasmatiques résiduelles inefficaces, efficaces ou toxiques.

Il est donc nécessaire de prendre en compte cette variabilité pour définir la posologie conduisant à une concentration efficace et non toxique pour chaque patient : on parle d'individualisation thérapeutique

L'outil de pharmacocinétique de population (PK-POP) prend en compte cette variabilité inter-individuelle. Le modèle de PK-POP doit répondre à plusieurs objectifs :

Estimer les paramètres pharmacocinétiques moyens de population (volume de distribution  $V_d$ , vitesse d'élimination  $k_e$ ...);

Analyser la variabilité inter-individuelle, correspondant à la différence des concentrations observées entre les patients pour une même dose administrée ;

Analyser la variabilité intra-individuelle, correspondant à la différence des concentrations observées pour un patient entre plusieurs concentrations prélevées à la même heure à des jours différents dans les mêmes conditions d'administration ;

Déterminer les facteurs de variabilité inter-individuelle. Ces facteurs sont appelés les covariables explicatives. Ce sont des facteurs physiologiques (poids, âge, sexe...) ou pathologiques (insuffisance hépatique, insuffisance rénale...), pouvant expliquer la variabilité des paramètres PK. Ainsi, le poids peut faire varier le volume de distribution et l'insuffisance hépatique peut faire diminuer la vitesse d'élimination pour les molécules à métabolisme hépatique. Si ces covariables sont jugées statistiquement pertinentes, elles sont alors intégrées dans le modèle de PK-POP.

La construction d'un modèle nécessite de nombreuses données pour quantifier la variabilité des paramètres pharmacocinétiques. Il existe deux démarches pour y parvenir : (i) la constitution d'une base de données avec peu de patients chez lesquels sont prélevés de nombreux échantillons dans l'intervalle entre deux prises, permettant la description de la cinétique de la molécule chez chaque patient de la population ; (ii) la seconde possibilité consiste à créer une base de données à partir de nombreux échantillons issus de nombreux patients pour lesquels un ou deux prélèvements ont été réalisés à des temps différents entre deux prises. Dans le même temps, les covariables des patients sont recueillies.

Les prélèvements de chaque individus vont permettre de créer un modèle pharmacostatistiques qui permet d'estimer les paramètres PK moyens de la population, la variabilité inter et intra-individuelle ainsi que l'influence potentielle des covariables.

Le développement d'un modèle de pharmacocinétique de population suit trois grandes étapes. Dans un premier temps, un modèle PK initial, dit modèle structural, est sélectionné pour analyser et estimer les paramètres PK à partir des concentrations mesurées. Le choix d'un modèle, à partir d'une bibliothèque de modèles disponibles, se fait sur des critères statistiques (maximisation de la fonction vraisemblance) et pharmaco-statistiques (relation entre les concentrations mesurées et celles prédites par le modèle par exemple). Dans un second temps les covariables recueillies sont intégrées dans le modèle. Elles sont sélectionnées par des tests statistiques (analyse univariée) pour expliquer la variabilité des

paramètres PK. Le modèle final doit contenir le moins de covariables possible pour obtenir un modèle simple (principe de parcimonie statistique). Les différents modèles contenant les covariables sont comparés puis le modèle final est sélectionné par des tests statistiques (maximisation de la fonction vraisemblance).

Le modèle final obtenu permet ainsi de faire de l'estimation Bayésienne, en associant le modèle PK-POP construit, représentant l'information PK de la population, et les données du patient, la ou les concentration(s) mesurée(s), la dose, les horaires d'administration et de prélèvement(s) ainsi que les covariables nécessaires au modèle.

L'analyse Bayésienne consiste en l'analyse des paramètres *a posteriori*, issus du patient (concentration(s) mesurée(s), dose, covariables...), à partir d'informations *a priori*, issus du modèle de PK-POP contenant les paramètres PK moyens. Les données résultant du patient sont utilisées pour estimer ses paramètres PK, à partir des paramètres PK de la population du modèle, et ainsi estimer des concentrations. Pour reprendre l'exemple des IP étudiés, le modèle de PK-POP utilisé par IADA permet d'estimer une concentration résiduelle d'ATV à partir de la concentration mesurée quelle que soit l'heure de prélèvement, si les horaires d'administration, de prélèvements ainsi que la dose et l'éventuelle association à du Ritonavir sont bien renseignés.

## **Partie II :**

# **Exploration de la concentration et de la fraction libre de l'Atazanavir et du Darunavir chez 100 patients VIH positifs**

## I- Objectifs de cette étude

L'objectif principal de l'étude a été d'explorer la variabilité de la concentration totale et libre ainsi que de la fraction libre de l'ATV et du DRV dans une population de patients traités. Tous les patients inclus dans cette étude bénéficiaient d'un STP par dosage de la concentration totale ( $C_t$ ) au Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse dans le cadre de la routine hospitalière. Grâce à la réalisation d'une biothèque et après validation d'une méthode de dosage, la concentration libre ( $C_u$ ) a pu être dosée pour les deux molécules.

Les objectifs secondaires de cette étude ont été :

- de rechercher les facteurs de variabilité de la fraction libre. Notre choix s'est porté sur les principales protéines plasmatiques de transport, l'alpha 1 glycoprotéine acide (AAG).
- d'explorer les relations pharmacocinétique – pharmacodynamique.
  - a- A partir de leur statut virologique (charge virale positive ou négative), les patients ont été classés dans deux groupes. Les paramètres  $f_u$ ,  $C_u$  et  $C_t$  ont ensuite été comparés entre ces deux groupes.
  - b- Pour l'ATV, la relation concentration résiduelle (totale et libre) et hyperbilirubinémie (bilirubine libre) a été explorée.
- D'évaluer l'influence des paramètres démographiques (âge, sexe, poids) sur la  $C_t$ , la  $C_u$  et la  $f_u$ .

## **II- Patients.**

Pour l'ATV, 47 échantillons issus de 43 patients ont été dosés avec seulement 29 échantillons correspondant réellement à la concentration résiduelle. Cette dernière correspond à la concentration déterminée juste avant une nouvelle administration (administration répétée). Tous les patients inclus avaient des concentrations à l'état d'équilibre, avec une durée moyenne de traitement de 25 mois (1 – 80 mois). Trente-cinq échantillons sur les 47 avaient un résultat de charge virale associé.

Pour la DRV, sur les 68 échantillons issus de 57 patients traités, seulement 20 échantillons correspondaient réellement à une concentration résiduelle. Pour les autres prélèvements, les temps de prélèvement étaient échelonnés sur tout l'intervalle de temps séparant deux prises. Cinquante et un échantillons sur les 68 initiaux avaient une évaluation de la charge virale associée. Les patients de l'étude étaient à l'équilibre pharmacocinétique avec une durée moyenne de traitement de 18,9 mois (3 – 56 mois).

Les paramètres âge et sexe ont été renseignés de façon systématique.

### III- Matériel et Méthodes

#### a. Détermination de la concentration libre de l'Atazanavir et du Darunavir

##### *i. Méthode séparative : ultrafiltration*

La méthode d'ultrafiltration a été réalisée selon un protocole standard décrit ci-après. Pour cela, nous avons utilisé des tubes « cheminée » Centrifree® (30 kD) fournis par la société Millipore (Merck Millipore®, Darmstadt, Allemagne). Ce même protocole a été appliqué à tous les prélèvements de patients.

Dans un premier temps, nous avons évalué la fixation non spécifique de l'ATV et du DRV, notamment l'adsorption de ces molécules sur le filtre d'ultrafiltration, pour deux niveaux de concentrations (bas et haut) passée en duplicate. Ces niveaux ont été préparés dans de la phase mobile surchargée en DRV ou ATV. Les conditions d'ultrafiltration ont été celles définies dans le protocole standard décrit ci-dessous. La concentration finale dans l'UF a été rapportée à la concentration initiale, le pourcentage de fraction non spécifiques étant calculé par la formule :  $FNS = (1 - \frac{\text{fraction finale}}{\text{fraction initiale}})$ .

Dans un second temps, nous avons déterminé la concentration libre en ATV et en DRV dans les échantillons de patients selon le protocole standard suivant. Le plasma hépariné a été décongelé à 37°C au bain-marie (5 minutes), avant d'être vigoureusement agité 10 secondes, centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes à 20°C puis ultrafiltré. Avant ultrafiltration (UF), le filtre du tube « cheminée » a subi un pré-lavage avec 500 µL d'eau distillée placés en tête de cheminée. Le tube a alors été centrifugé à 2000 g pendant 30 minutes à 20°C. L'eau ultrafiltrée a été récupérée puis jetée. L'ultrafiltration a été réalisée en plaçant 500 µL de plasma en tête de cheminée. Si le volume de l'échantillon était insuffisant (inférieur à 500 µL), l'ultrafiltration a alors été réalisée avec un volume de 250 µL de plasma. Le plasma a été ultrafiltré à 2000 g pendant 30 minutes à 25°C. Cent microlitres d'ultrafiltrat recueilli dans la cupule de réception ont été évaporés sous azote pendant 10 minutes à 45°C.

Le résidu sec a été repris par 100 µL de phase mobile et 20 µL de solution d'étalon interne à 10 mg.L-1. Quatre-vingt microlitres de cette nouvelle solution ont été injectés dans la colonne.

Lors de la mise en place du protocole d'ultrafiltration, adapté d'un protocole issu de la littérature<sup>11</sup>, des travaux ont été réalisés sur différentes étapes de l'analyse. Des essais sur le pré-traitement du filtre avant ultrafiltration ont été réalisés, consistant en une centrifugation du dispositif d'ultrafiltration avec de l'eau distillée ou de la soude (NaOH). Après le pré-lavage, des CQI ont été ultrafiltrés pour connaître l'influence du pré-traitement sur les résultats de fraction libre. De même, des essais d'ultrafiltration ont été réalisés à deux niveaux de température, 25°C et 37°C, lors de l'ultrafiltration de CQI.

## ***ii. Méthodes analytiques***

Les molécules, sous forme de poudre pure, utilisées pour la préparation des contrôles de qualité internes (CQI) et pour la gamme d'étalonnage, ont été fournies par Bristol-Myers-Squibb (BMS New York, Etats Unis d'Amérique) pour l'ATV et Janssen-Cilag (Johnson and Johnson, New Brunswick, Etats Unis d'Amérique) pour le DRV.

Pour réaliser les gammes de concentrations et les contrôles de qualité, les poudres d'ATV et de DRV ont été directement solubilisées dans du plasma vierge mis à disposition par l'Etablissement Français du Sang.

Les concentrations libres et totales de l'ATV et du DRV sont mesurées par la même technique de chromatographie liquide avec un détecteur UV-barette de diiode (HPLC-UV BD). Seules les étapes précédant le passage en chromatographie diffèrent. Le dosage de la concentration libre nécessite une étape d'ultrafiltration alors que le dosage de la concentration totale débute par une étape d'extraction liquide-liquide. Les concentrations cibles (libre ou totale) étant différentes, les gammes d'étalonnage et les contrôles de qualité interne ont des valeurs différentes.

Une gamme d'étalonnage en 6 points allant de 10 (limite basse de quantification, LOQ) à 2000 µg.L-1 (limite haute de quantification) a été choisie afin de couvrir l'étendue des concentrations libres (résiduelle et pic) attendues aux posologies usuelles. Pour la validation analytique, la gamme d'étalonnage et les CQI ont été préparés extemporanément dans le plasma. Une étude de répétabilité et de reproductibilité a permis de valider la méthode analytique. La reproductibilité, exprimée en coefficient de variabilité ( $CV\% = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$ , moyenne des mesures au cours du temps ; écart à la moyenne), a été évaluée à partir de 5 gammes d'étalonnage passées sur 5 jours différents et de 10 CQI (2 CQI par jour pendant 5 jours) pour chacun des 3 niveaux (37,5 ; 750 ; 1500 µg.L-1). La répétabilité, permettant de calculer la justesse, ou biais, de la méthode

(Biais =  $\frac{\text{Concentration mesurée} - \text{Concentration théorique}}{\text{Concentration théorique}} \times 100$ ) a été calculée lors d'une journée de reproductibilité en passant 5 CQI pour chacun des 3 niveaux. La précision, calculée grâce aux résultats de la reproductibilité, correspond au coefficient de variation des valeurs de CQI obtenu pour chaque niveau de CQI (Précision CV(%) =  $\frac{s}{m} \times 100$  s étant l'écart type et m la moyenne). La Food and Drug Administration<sup>141</sup> a publié des valeurs limites pour le biais et la précision lors de validation de méthode. Ainsi, le seuil d'acceptabilité des résultats est fixé à 20%.

La stabilité des deux IP à -20°C sur une durée de 1 an ainsi qu'au cours de 3 cycles de congélation/décongélation avait été préalablement démontrée au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique.

Les deux IP ont été séparés à l'aide d'une colonne en phase inverse C18, en gradient de phase (composition : 60 % tampon pH=4,1 / 40 % acétonitrile). L'utilisation d'une phase mobile « acide méthanoïque (pH=4,1)/acétonitrile » a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode analytique et augmenter l'espérance de vie de la colonne. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diode ( $\lambda=254$  nm). Le traitement des données a été assuré par le logiciel Chromquest® (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats Unis d'Amérique).

La méthode de dosage des concentrations totales est similaire. Elle est toutefois précédée par une étape d'extraction avant la séparation chromatographique. Au plasma de l'échantillon est ajouté l'étalon interne (A86093) et du solvant d'extraction (Acétonitrile et n-Hexane dans un rapport 9/1). La solution est centrifugée, la phase supérieure est récupérée, évaporée à sec sous azote puis remis en solution par une phase de reprise (Acétonitrile Méthanol et du Tétraméthylammonium rapport 1,7/0,5/7,8). La phase de reprise contenant l'extrait dissout est ensuite lavée par du n-Hexane. La n-Hexane est ensuite éliminé, la solution restante est injectée dans la colonne de chromatographie, l'élution étant assurée par la même phase mobile que pour le dosage de concentration libre. La gamme de concentration, en 6 points, s'étalonne de 50 µg/L à 20000 µg/L. Les cibles des CQI sont 375, 750 et 15000 µg/L.

b. **Dosage de la bilirubine, de l'AAG et recueil des charges virales, des bilans de résistance et le taux de lymphocytes T CD<sub>4</sub>**

Le dosage plasmatique de la bilirubine totale (BT), somme de la bilirubine conjuguée (BC) et non conjuguée, a été réalisé sur un automate de biochimie AUC2700® (Olympus Corporation, Tokyo, Japon). Cette méthode de dosage est la méthode utilisée pour les dosages de « routine ». La bilirubine conjuguée et non conjuguée sont dissoutes dans le réactif puis sont oxydées en présence de l'agent de transfert d'électrons KHC3 pour former un chromophore stable (cholecyanine) absorbant dans l'infrarouge bleu-vert et détecté à 700 nm. La bilirubine conjuguée est combinée à un sel de diazonium stabilisé dans un milieu acide pour former l'azobilirubine, dont l'absorbance à 570 nm est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon. Ainsi, la bilirubine non conjuguée, ou libre (BL), est calculée par la formule suivante  $BL (\mu M) = BT (\mu M) - BC (\mu M)$ . Les limites inférieures de quantification de la bilirubine totale et conjuguée sont de 0,68 µM et 0,24 µM, respectivement. Les valeurs de bilirubine libre ont été déterminées avant la mise en place et pendant la prise d'ATV.

Le dosage d'AAG a été réalisé sur l'automate BNProspec® (Siemens HealthCare®, München, Allemagne). Cette méthode de dosage est la méthode utilisée pour les dosages de « routine ». La détermination de l'AAG est basée sur une réaction turbidimétrique spécifique se produisant entre l'antisérum polyclonal anti-AAG et son antigène correspondant. La turbidité de l'immuno-complexe est proportionnelle à la concentration d'AAG. La plage de mesure analytique va de 0,19 à 6 g/L. Le taux d'AAG a été déterminé sur les mêmes échantillons plasmatiques que ceux utilisés pour la détermination de la concentration libre.

Le taux de CD4, la charge virale et le bilan des mutations virales du patient ont été recueillis à partir de son dossier biologique, ces échantillons ayant été prélevés en même temps que ceux utilisés pour le STP (C<sub>t</sub>) de l'ATV et du DRV.

Le taux d'ARN circulant du VIH (charge virale) a été déterminé par PCR sur COBAS (Roche Diagnostic®, Hoffman-La Roche®, Bâle, Suisse), méthode de dosage utilisée « en routine ». Le gène *gag p41* (codant pour une protéine de la capsid virale) est ciblé par l'amorce et les sondes de fluorescence viennent marquer l'ARN du VIH-1 amplifiés. La gamme de mesure va de 1,3 à 7,0 log<sub>10</sub> copies/mL. Dans notre étude, le patient est considéré en échec virologique si la charge virale est supérieure au seuil de quantification, fixé à 20 copies / mL (20 copies/mL = 1,3 log<sub>10</sub> copies/mL).

Le taux de lymphocytes T CD<sub>4</sub> a été déterminé sur un cytomètre en flux BD FACSCanto II® selon une méthode de dosage utilisée « en routine ». Le sang total, contenant de l'EDTA, est incubé à l'abri de la lumière et à température ambiante après être mis dans un tube BD Trucount® Multitest® CD3/CD8/CD45/réactif CD4. La solution BD FACS®lysing est alors ajoutée. La solution obtenue est analysée sur le cytomètre en flux. Tous les réactifs sont fournis par Becton-Dickinson® (Franklin Lake, Etats Unis d'Amérique). La gamme de mesure va de 6 à 2079 cellules/mm<sup>3</sup>.

### c. Estimation de la concentration totale résiduelle de l'Atazanavir

Sur 47 échantillons analysés, seulement 29 correspondaient réellement à une concentration résiduelle. Ce faible nombre de résiduelles vraies rendait les données quasi inexploitable et nous a poussés à utiliser deux modèles de pharmacocinétique de population issus de la littérature<sup>142,143</sup> : (i) le premier a permis d'estimer les concentrations d'ATV, (ii) le second celles du RTV utilisé comme « booster » de l'ATV et covariable dans le modèle de l'ATV. Ce modèle combiné ATV/RTV de PKPOP a permis d'estimer *in fine* la concentration totale résiduelle ( $C_{tre}$ ) d'ATV à partir d'une  $C_t$  mesurée entre deux administrations (indépendamment de l'heure de prélèvement). Ce modèle a permis d'estimer d'une part une résiduelle pour l'ensemble des prélèvements ayant une valeur supérieure à la LOQ et d'autre part de déterminer la concentration libre résiduelle ( $C_{ure}$ ) correspondante. Pour estimer  $C_{ure}$ , nous nous sommes basés sur les travaux de Fayet et al.<sup>11</sup> qui ont démontré que la  $f_u$  était constante sur une gamme de concentrations allant de 168 à 2940  $\mu\text{g/L}$  et qu'elle était indépendante du temps. En prenant en compte ces données et le fait que notre gamme de  $C_t$  était comprise (à 5 concentrations près, 4 étant inférieures, 1 supérieure à ce domaine de concentrations) dans cet intervalle, nous avons calculé la  $C_u$  à partir de la formule  $C_{ure} = f_u \times C_{tre}$ .

### d. Estimation de la fraction libre de Darunavir

Les prélèvements pour le STP du DRV sont habituellement réalisés lors des consultations médicales. Ainsi, peu de prélèvements correspondent réellement à une concentration résiduelle (Figure 16). Pour rendre possible l'interprétation des résultats, nous n'avons pas pu appliquer la même démarche que celle choisie pour l'Atazanavir car les modèles publiés imposaient de disposer de certaines covariables non disponibles pour l'ensemble des

patients inclus dans cette étude. Notre choix s'est alors orienté vers la mise au point et la validation d'un modèle de pharmacocinétique de population à partir des échantillons recueillis, modèle permettant l'estimation de la concentration libre.

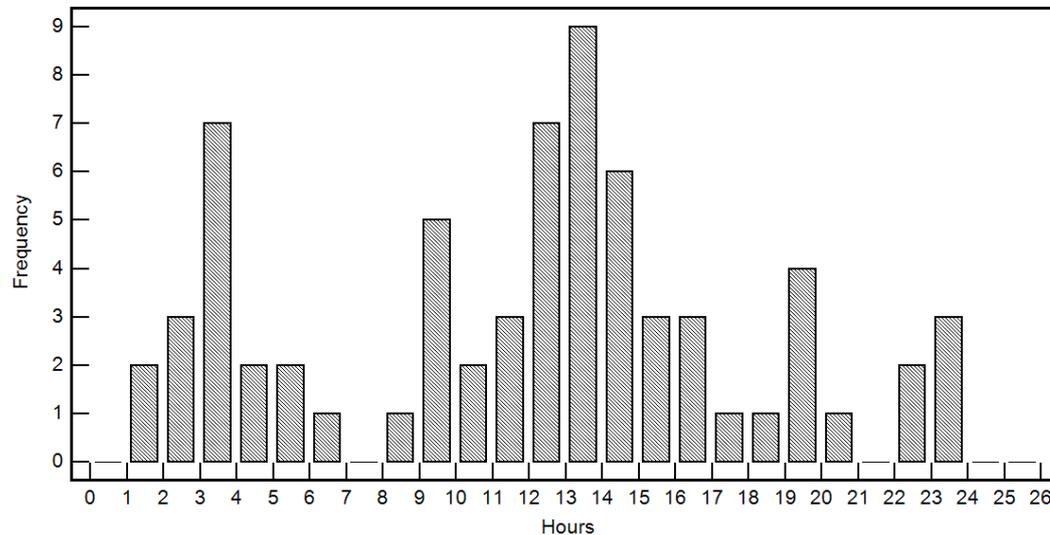


Figure 16: Répartition des heures de prélèvements des patients sous Darunavir.

L'étude a été réalisée sur 68 échantillons provenant de 57 patients. Aucune variabilité intra-individuelle n'a été prise en compte c'est-à-dire chaque échantillon a été considéré comme unique (indépendant). Le modèle a été développé grâce à Pmetrics, un package du logiciel R récemment développé par Neely M du Laboratory of Applied Pharmacokinetics (LAPK)<sup>144</sup> qui sert d'interface R pour le logiciel NPAG (non parametric adaptive grid).

Nous avons utilisé un modèle comprenant un seul compartiment et trois paramètres : la constante d'absorption ( $K_a$ ), le volume de distribution ( $V_d$ ) et la constante d'élimination ( $K_e$ ). Le modèle a été évalué graphiquement en jugeant sa capacité à décrire les profils pharmacocinétiques des patients. D'une part nous avons représenté (i) la droite des concentrations individuelles prédites (individual predicted concentrations (IPRED) en fonction des concentrations observées, (ii) résidus normalisés en fonction des IPRED, du temps et distribution des résidus). D'autre part, des graphiques de Bland Altman ont été utilisés pour comparer les IPRED et les concentrations observées ainsi que pour comparer les concentrations libres résiduelles estimées et observées pour les 20 échantillons

correspondant à des vraies résiduelles. Enfin, le biais relatif (ou justesse correspondant à l'équation Biais (%) =  $\frac{(C_{estimée} - C_{observée})}{C_{observée}} \times 100$ ) et la précision (ou RMSE pour Root Mean

Square Error calculée par la formule  $RMSE (\%) = \sqrt{\left( \frac{\sum \left( \frac{(C_{estimée} - C_{observée})}{C_{observée}} * 100 \right)^2}{68} \right)}$ ) ont été calculés.

Pour l'étude de la relation PK-PD entre les paramètres pharmacocinétiques et l'efficacité thérapeutique, la charge virale a été exprimée en unité log de base 10 et dichotomisée en deux groupes en fonction du seuil de quantification de la charge virale (20 copies/mL).  $V_{dss}/F$  a été calculé par l'équation  $Cl * MRT$  (MRT correspondant temps de résidence moyen),  $Cl/F$  (clairance, en L/h) calculée par l'équation  $Dose / ASC$ , MRT calculé par l'équation  $1/ke$  et le temps de demi vie par l'équation  $\ln 2/ke$ .

#### e. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R, version 3.1.1 (R foundation for statistical computing, <http://www.r-project.org>).

La distribution des données ne suivant pas une loi Normale, nous avons déterminé la médiane et les 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> quartiles pour les concentrations plasmatiques totales et libres (mesurées et estimées), la fraction libre, la charge virale, les concentrations de bilirubine (libres et totales), et les concentrations d'AAG.

Les tests de Spearman et de Wilcoxon-Mann/Whitney ont été utilisés pour tester les corrélations et comparer les moyennes, respectivement. Les tests ont tous été réalisés en bilatéral et ont été considérés comme statistiquement significatifs pour  $p < 0,05$ .

Afin de quantifier la relation PK-PD entre la charge virale (CV) et les paramètres pharmacocinétiques ( $K_a$ ,  $V_{dss}$ ,  $K_e$ ,  $Cl_{calc}$ ) ou les paramètres de d'expositions ( $C_{ure}$ ,  $C_{tre}$ ,  $ASC$ ,  $f_u$ ), des modèles de régression logistiques ont été utilisés. Le modèle de régression logistique

ressemble à la régression linéaire mais traite le cas d'une variable expliquée sous une forme binaire, ici charge virale positive ou négative. Chaque variable (c'est-à-dire les paramètres pharmacocinétique ou d'exposition) a été testée indépendamment dans une analyse univariée et celles caractérisées par un  $p < 0,10$  ont été inclus dans un modèle intermédiaire. Le modèle final a été déterminé en comparant les modèles en se basant le critère d'Akaike pour la comparaison des modèles. Une courbe de ROC a été construite, à partir du modèle de régression logistique, afin de déterminer un seuil de  $f_u$  associé au risque d'avoir une charge virale positive. La relation entre la concentration libre résiduelle estimée,  $C_{ure}$ , et le volume de distribution dichotomisé en deux groupes en fonction de la charge virale,  $V_{d\_bin}$ , utilisé après observations des résultats de modélisation mettant en évidence deux sous population distinctes, a été étudiée avec une régression linéaire.

## IV- Résultats

### a. Ultrafiltration

Nous avons testé les différents paramètres (prélavage du filtre, température de centrifugation, temps de centrifugation, volume déposé en tête de cheminée) pouvant influencer le phénomène d'ultrafiltration. Les résultats de ces essais ont permis de fixer les conditions optimales d'ultrafiltration.

Comme préconisé par le fournisseur, et après avoir constaté un important passage d'impuretés révélées par le chromatogramme, nous avons testé plusieurs types de prélavage du filtre (eau distillée *versus* soude 1N). Les résultats ont montré une diminution de la quantité d'impuretés présentes sur le chromatogramme. Aucune différence n'ayant été mise en évidence entre l'utilisation d'eau distillée et de soude, l'eau a été le « solvant » retenu pour effectuer le prélavage.

L'influence de la température sur la  $f_u$  a été testée à 25°C et 37 °C. Une différence significative a été observée pour le DRV ( $p=0.04$ ), mais aucune différence significative n'a été soulevée pour l'ATV ( $p=0.09$ ).

Pour évaluer l'impact du temps de centrifugation, nous avons testé trois temps (15, 30 et 45 minutes). Les  $f_u$  mesurées à ces différents temps n'ont pas été différentes (ATV :  $f_u=7.9\%$ ,  $CV=3.1\%$  ; DRV :  $f_u=13.3\%$   $CV=5.1\%$ ). Toutefois, nous avons souligné que le volume d'ultrafiltrat récupéré augmentait proportionnellement avec le temps de centrifugation.

Ainsi les conditions d'ultrafiltration fixées pour l'étude de la concentration et de la fraction libres de l'ATV et du DRV ont été (i) un prélavage du filtre à l'eau distillée, (ii) avec une ultrafiltration à 25°C, (iii) pendant 30 minutes.

L'ATV et le DRV étant des molécules fortement liées aux protéines plasmatiques, et afin de faciliter la solubilisation de la forme libre de l'ATV et du DRV après ultrafiltration (et éviter

ainsi toute fixation/perte sur les parois de la cupule de réception), nous avons testé l'influence sur  $f_u$  de différentes matrices placées au fond de la cupule de réception: plasma vierge, eau distillée, tampon Sorensen, phase de reprise (celle de la méthode de dosage), phase mobile (celle de la méthode de dosage). Aucune différence n'a été observée sur les  $f_u$  en présence et en l'absence de matrice. Nous avons donc sélectionné la condition la plus simple, l'absence de matrice au fond de la cupule de réception.

Afin d'évaluer la fixation non spécifique, la  $C_u$  de l'ATV et du DRV a été mesurée sur 4 échantillons différents et à 2 concentrations différentes (200 et 1000  $\mu\text{g/L}$ ), pour chaque molécule. La FNS a été estimée à 8,4% pour l'ATV (CV=6.1%) et à 8.6% pour le DRV (CV=5.1%), sans différence significative entre les faibles et les fortes concentrations (ATV  $p=0.35$ , DRV  $p=0.37$ ).

**b. Méthode de dosage de la concentration libre de l'Atazanavir et du Darunavir**

Les résultats de validation de la méthode de dosage de la concentration libre de l'ATV et du DRV sont reportés dans le tableau 4.

	Pente de la gamme		CQ Bas (37,5 $\mu\text{g/L}$ )		CQ Intermédiaire (750 $\mu\text{g/L}$ )		CQ Haut (1500 $\mu\text{g/L}$ )	
	Moyenne $\mu\text{g/L}$	R(%)	B(%)	R(%)	B(%)	R(%)	B(%)	R(%)
ATV	0,002436	5,1	4,5	7,2	4,8	6,9	5,4	6,0
DRV	0,003225	4,4	-8,5	9,1	-7,5	7,3	7,2	7,4

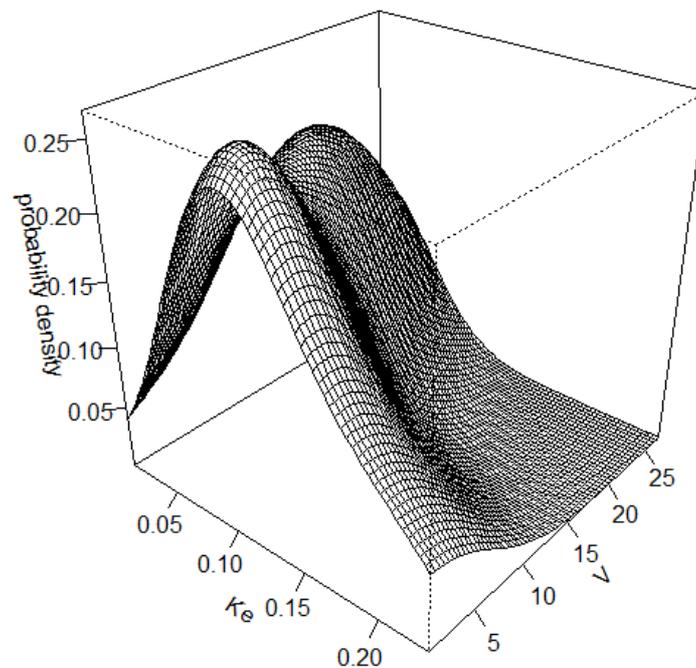
**Tableau 4** : Résultats des calculs du biais (justesse) par rapport à la cible théorique (B) et de la reproductibilité (R)

Selon les critères de validation établis par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (European Medical Agency), les résultats obtenus ont permis de valider la méthode de

dosage de la concentration libre de l'ATV et du DRV sur une gamme de concentrations allant de 10 à 2000 µg/L.

c. **Modèle pharmacocinétique choisi pour estimer la concentration libre de Darunavir**

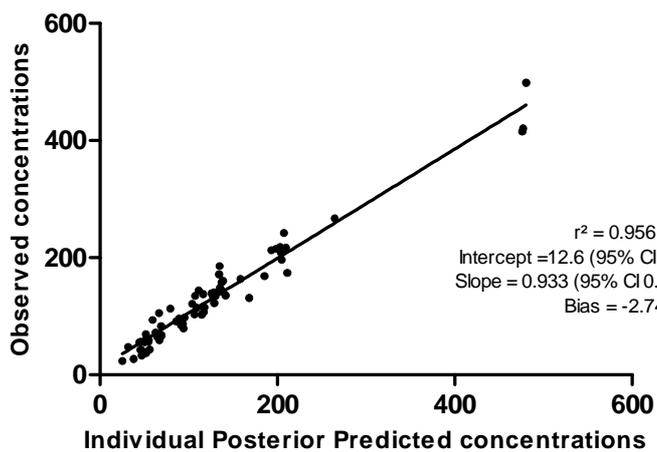
La Figure 17 représente la densité de probabilité de distribution conjointe du  $V_{dss}/F$  et du  $K_e$ . L'observation de deux dômes sur l'axe du  $V_{dss}/F$  suggère une distribution bimodale de  $V_{dss}/F$  à  $K_e$  constant.



**Figure 17** : Représentation de la densité de probabilité du volume de distribution apparent à l'état d'équilibre ( $V_{dss}/F$ ) et de la constante de vitesse d'élimination ( $K_e$ ) estimés par le modèle pour les 68 échantillons.

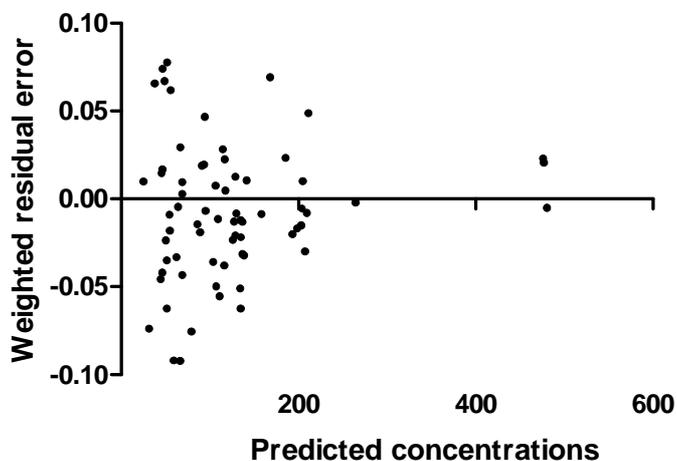
Les concentrations individuelles prédites (IPRED) en fonction des concentrations observées (Figure 18a), la distribution normale des résidus pondérés en fonction des IPRED

(Figure 18b) et les exemples de courbes individuelles (Figure 19) montrent que le modèle décrit de manière adéquate les données, avec un biais relatif de -2,33 % et une précision de 17%. L'analyse des graphiques de Bland Altman (Figures 20 et 21) montre que le modèle estime correctement les concentrations libres.

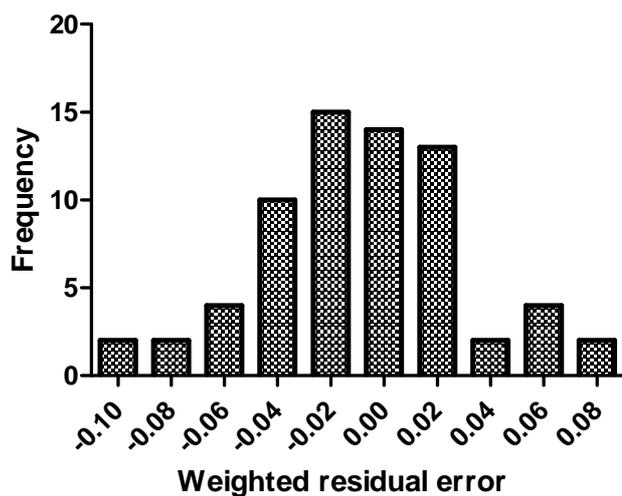


**Figure 18** : Témoins de la qualité du modèle

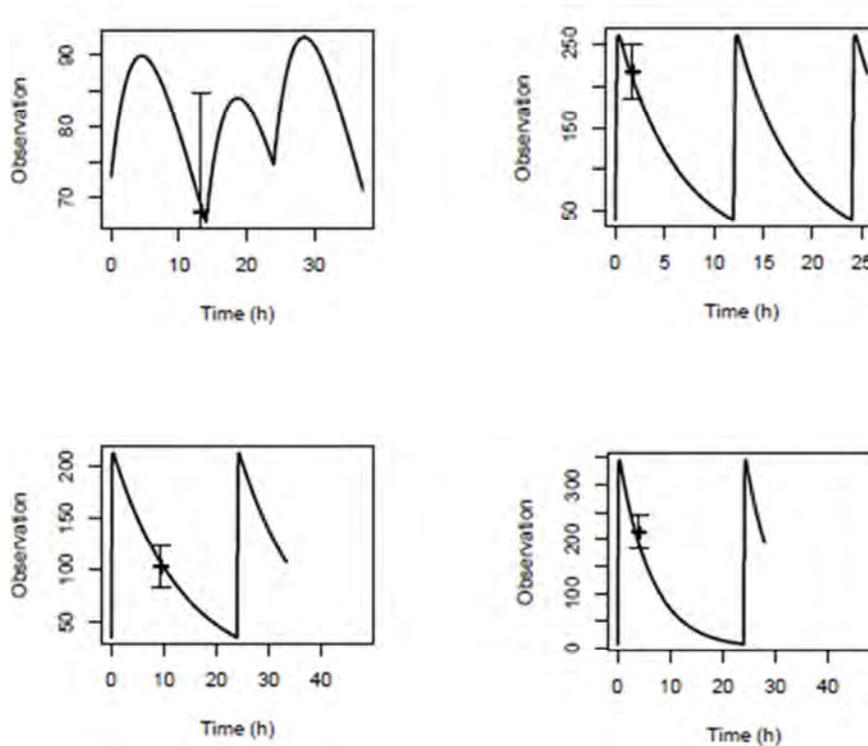
a) Concentrations observées ( $\mu\text{g/L}$ ) en fonction des concentrations individuelles prédites IPRED ( $\mu\text{g/L}$ )



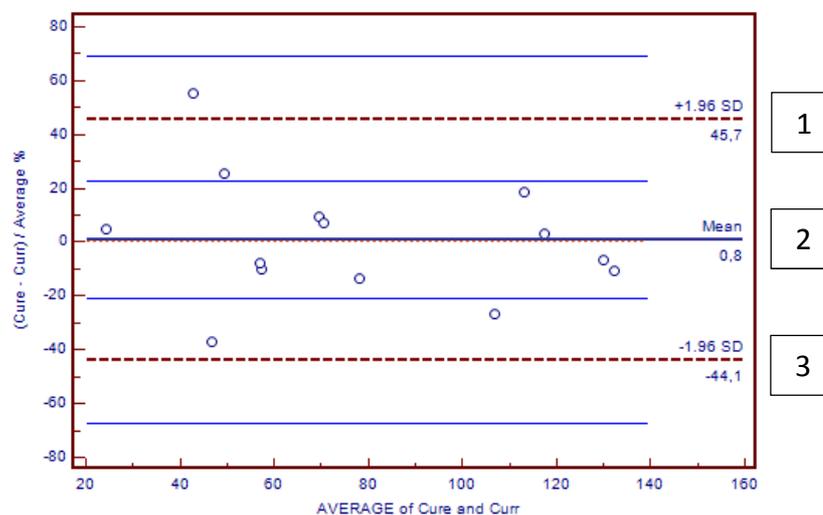
b) Distribution des résidus pondérés en fonction des IPRED



c) Distribution des résidus pondérés selon une loi Normale centrée réduite  $N(0;1)$



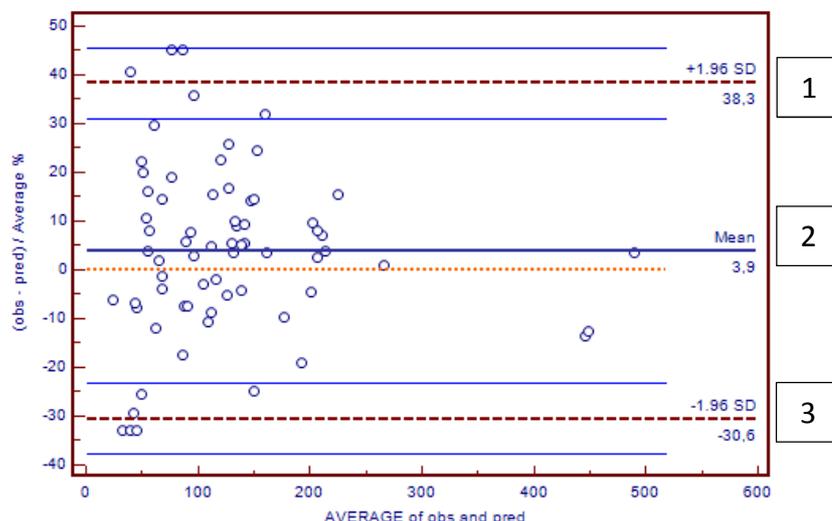
**Figure 19:** Profils pharmacocinétiques individuels pour 4 patients  
 Le trait plein représente les concentrations libres estimées par le modèle et les croix les concentrations libres observées.



**Figure 20 :** Comparaison par la méthode de Bland Altman entre les concentrations libres résiduelles estimées ( $C_{ure}$ ) et mesurées ( $C_{urr}$ ).

(1) ligne pointillée : limite d'agrément supérieure, ici +2 sd de la différence moyenne entre les concentrations mesurées et estimées, lignes pleines de part et d'autre : intervalle de confiance de la limite d'agrément (2) ligne pointillé : correspond au 0, trait plein : biais ou la moyenne de la différence entre les concentrations mesurées et estimées (3) ligne pointillée : limite d'agrément inférieure, ici -2 sd de la différence moyenne entre les

concentrations mesurées et estimées, lignes pleines de part et d'autre : intervalle de confiance de la limite d'agrément.



**Figure 21** : Comparaison par la méthode de Bland Altman entre les concentrations libres prédites et observées.

(1) ligne pointillée : limite d'agrément supérieure, ici +2 sd de la différence moyenne entre les concentrations observées et estimées, lignes pleines de part et d'autre : intervalle de confiance de la limite d'agrément (2) ligne pointillée : correspond au 0, trait plein : biais ou la moyenne de la différence entre les concentrations mesurées et estimées (3) ligne pointillée : limite d'agrément inférieure, ici +2 sd de la différence moyenne entre les concentrations observées et estimées, lignes pleines de part et d'autre : intervalle de confiance de la limite d'agrément.

d. **Données biologiques, concentrations totales et libres, et fraction libres en Atazanavir et Darunavir chez les patients**

i. ***Atazanavir***

Les données biologiques figurent dans les Tableaux 5 et 6. Les résultats obtenus pour la  $C_{ure}$ , la  $C_{tre}$  et la  $f_u$  figurent dans le Tableau 5. Les relations entre d'une part les concentrations totales ( $C_{tre}$ ) et libres ( $C_{ure}$ ), et d'autre part entre la fraction libre ( $f_u$ ) et les concentrations

totales ( $C_{tre}$ ) et d'AAG sont représentées sur les figures 20. Une forte corrélation relie la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$  ( $\rho = 0,72$ ,  $p < 0,001$ ) et une tendance se dessine entre la  $f_u$  et la  $C_{tre}$  ( $\rho = 0,41$  ;  $p=0.0047$ ).

Seuls 35 patients de l'étude ont une charge virale réalisée en même temps que le dosage de la  $C_{tr}$ . On dénombre 13 patients en échec virologique, l'échec étant défini par une charge virale supérieure à 20 copies/mL, et 22 patients avec une charge virale négative. Aucun des patients en échec virologique pour lequel un bilan de résistance virale a été réalisé n'a montré de mutations susceptibles de diminuer la sensibilité du virus au ATV (9 bilans réalisés sur les 35 échantillons à CV positive). Les résultats des paramètres pharmacocinétiques et biologiques, répartis selon la charge virale des patients, sont reportés dans le tableau 4. La relation entre la  $f_u$  et l'AAG est représentée sur la figure 22c.

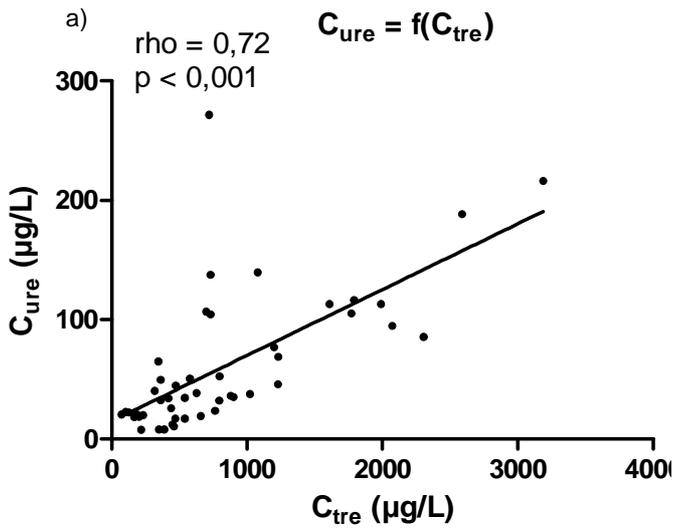
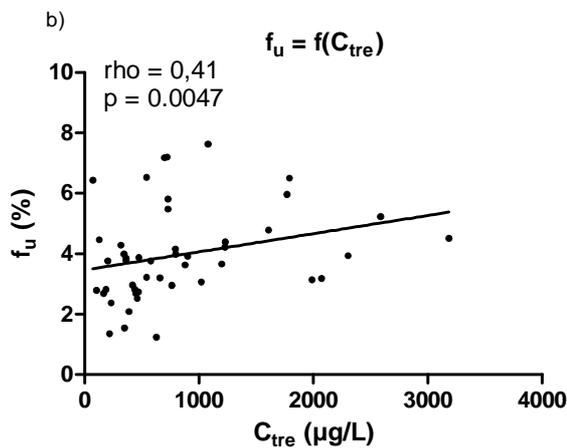
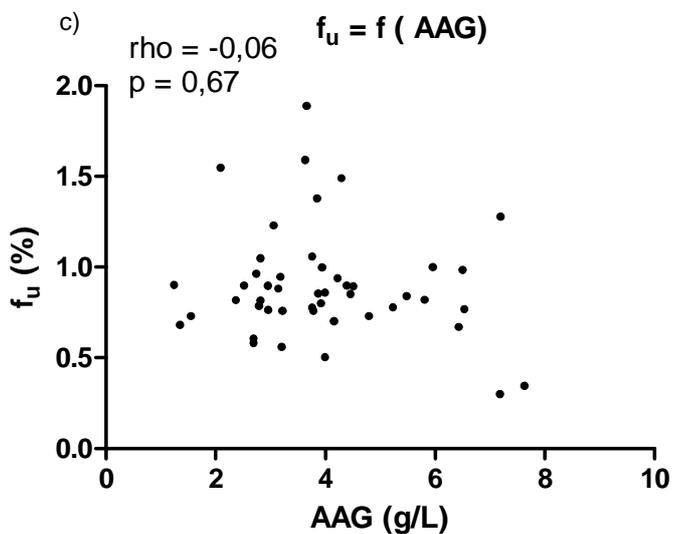


Figure 22: Relation entre les marqueurs de la fraction libre pour l'ATV ( $C_{ure}$  concentration libre résiduelle estimée ;  $C_{tre}$  Concentration totale résiduelle estimée ;  $f_u$  fraction libre ; AAG alpha 1 glycoprotéine acide)

a) Concentration libre résiduelle estimée ( $C_{ure}$ ) d'Atazanavir en fonction de la concentration totale résiduelle ( $C_{tre}$ ) d'Atazanavir.



b) Fraction libre ( $f_u$ ) de l'Atazanavir en fonction de la concentration totale résiduelle estimée ( $C_{tre}$ ) d'Atazanavir.



c) Fraction libre ( $f_u$ ) de l'ATV en fonction de la concentration d'alpha 1 glycoprotéine acide (AAG).

## *ii. Darunavir*

Les données biologiques figurent dans les Tableaux 5 et 7. Les résultats obtenus pour la  $C_{ure}$ ,  $C_{tre}$  et la  $f_u$  sont reportées dans le Tableau 5. Les relations entre d'une part les concentrations totales ( $C_{tre}$ ) et libres ( $C_{ure}$ ), et d'autre part entre la fraction libre ( $f_u$ ) et les concentrations totales ( $C_{tre}$  et  $C_{ure}$ ) sont représentées sur les Figures 23. Il existe une forte corrélation entre la  $C_{tre}$  et  $C_{ure}$  ( $\rho = 0,82$ ,  $p < 0,001$ ) et une relation liant la fraction libre ( $f_u$ ) et la concentration d'AAG. Aucun des patients en échec virologique pour lequel un bilan de résistance virale a été réalisé n'a montré de mutations susceptibles de diminuer la sensibilité du virus au DRV (15 bilans réalisés sur les 51 échantillons à CV positive).

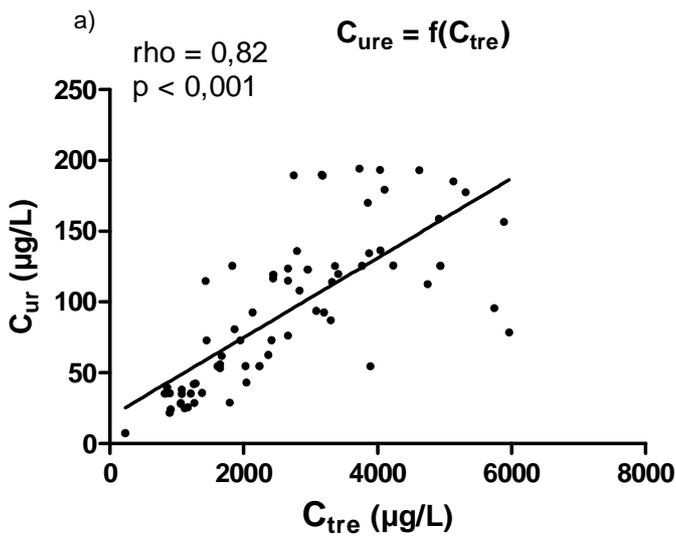
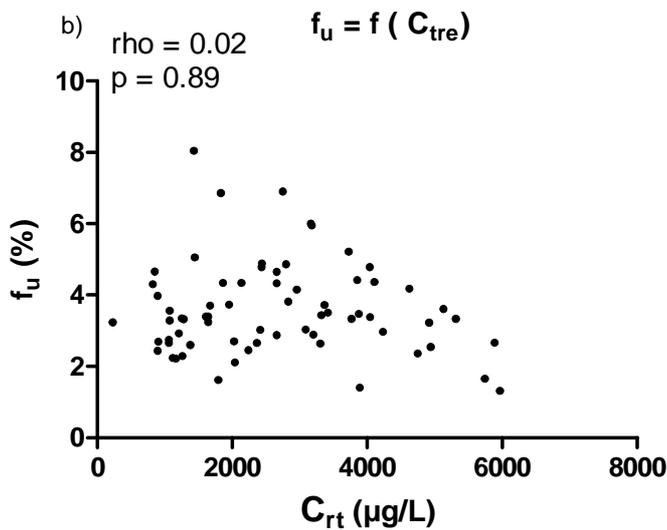
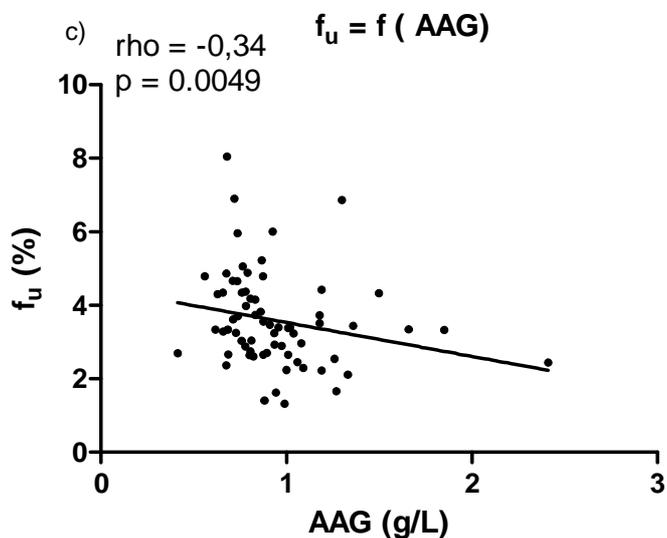


Figure 23 : Relation entre les marqueurs de la fraction libre pour le DRV ( $C_{ure}$  concentration libre résiduelle estimée ;  $C_{tre}$  Concentration totale résiduelle estimée ;  $f_u$  fraction libre ; AAG alpha 1 glycoprotéine acide)

a) Concentration libre résiduelle de Darunavir estimée par le modèle de pharmacocinétique de population ( $C_{ure}$ ) en fonction de la concentration totale résiduelle de DRV estimée ( $C_{tre}$ ).



b) fraction libre ( $f_u$ ) du Darunavir en fonction de la concentration totale résiduelle estimée ( $C_{tre}$ ) du Darunavir.



c) fraction libre ( $f_u$ ) du Darunavir en fonction de la concentration en alpha 1 glycoprotéine acide (AAG).

	ATV			DRV		
	Médiane	IQR 25	IQR 75	Médiane	IQR 25	IQR 75
f <sub>u</sub> (%)	3,8	2,8	4,5	3,4	2,7	4,3
C <sub>ure</sub> (µg/L)	37,9	20,6	94,6	89,9	42,3	125,5
C <sub>tre</sub> (µg/L)	628	362,7	1078,1	2435,6	1414,0	3730,3
AAG (g/L)	0,85	0,76	0,99	0,87	0,73	1,06
Bilirubine totale (µM)	32,6	16,3	44,8	NA	NA	NA
Bilirubine libre (µM)	26,0	12,7	36,7	NA	NA	NA
Age (années)	45	36	50	44,5	41,6	52,9
Sexe	N = 29 hommes et 14 femmes			N = 48 hommes et 9 femmes		
CV (Log <sub>10</sub> copies / mL)	13/35 CV positives (CV médiane = 1,9) IQR (1,5 ; 2,6)			32/51 CV positives (CV médiane = 2,06) IQR (1,65 ; 2,39)		
LT CD <sub>4</sub> (cellules / mm <sup>3</sup> )	486	375	855	482,5	312,8	726,5

**Tableau 5** : Résultats pharmacocinétiques et biologiques de l'étude chez les patients sous ATV et DRV

IQR : rang interquartile ; CV : charge virale ; LT CD<sub>4</sub> : lymphocytes T CD<sub>4</sub> ; AAG : Alpha 1 glycoprotéine acide

	CV positive			CV négative		
	Médiane	IQR 25	IQR 75	Médiane	IQR 25	IQR 75
f <sub>u</sub> (%)	3,8	3,4	4,4	3,4	4,8	5,0
C <sub>ure</sub> (µg/L)	36,2	19,7	57,9	51,2	22,3	113,0
C <sub>tre</sub> (µg/L)	541,4	275,0	804,0	746,2	330,1	1648,7
AAG (g/L)	0,86	0,77	0,95	0,82	0,70	0,99
Bilirubine libre (µM)	36,3	23,3	43,5	30,8	16,8	54

**Tableau 6** : Données pharmacocinétiques et biologiques classées en fonction du statut viral des patients sous ATV

IQR : rang interquartile ; CV : charge virale ; AAG : Alpha 1 glycoprotéine acide

	CV positive			CV négative		
	Médiane	IQR 25	IQR 75	Médiane	IQR 25	IQR 75
$f_u$ (%)	3,5	2,8	4,7	2,9	2,5	3,4
$C_{ure}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	114,9	37,4	125,6	54,8	38,9	90,4
$C_{tre}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	2435,6	1234,7	3212,6	2233,5	1313,7	3332,3
$C_{tre}$ / Dose	3,7	1,7	6,0	3,7	1,6	5,4
$k_e$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,02	0,02	0,07	0,06	0,04	0,08
$k_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,22	0,17	1,09	0,24	0,21	5,19
Cl ( $\text{L.h}^{-1}$ )	0,10	0,09	0,28	0,27	0,10	0,43
ASC ( $\text{mg.h.L}^{-1}$ )	1653,5	1209,1 3	1735,5	1634,9	868,3	1713,1
AAG	0,85	0,72	1,08	0,93	0,81	1,01

**Tableau 7 :** Données pharmacocinétiques et biologiques classées en fonction du statut viral des patients sous DRV

IQR : rang interquartile ; CV : charge virale ; AAG : Alpha 1 glycoprotéine acide

#### e. Corrélations pharmacocinétique-pharmacodynamique

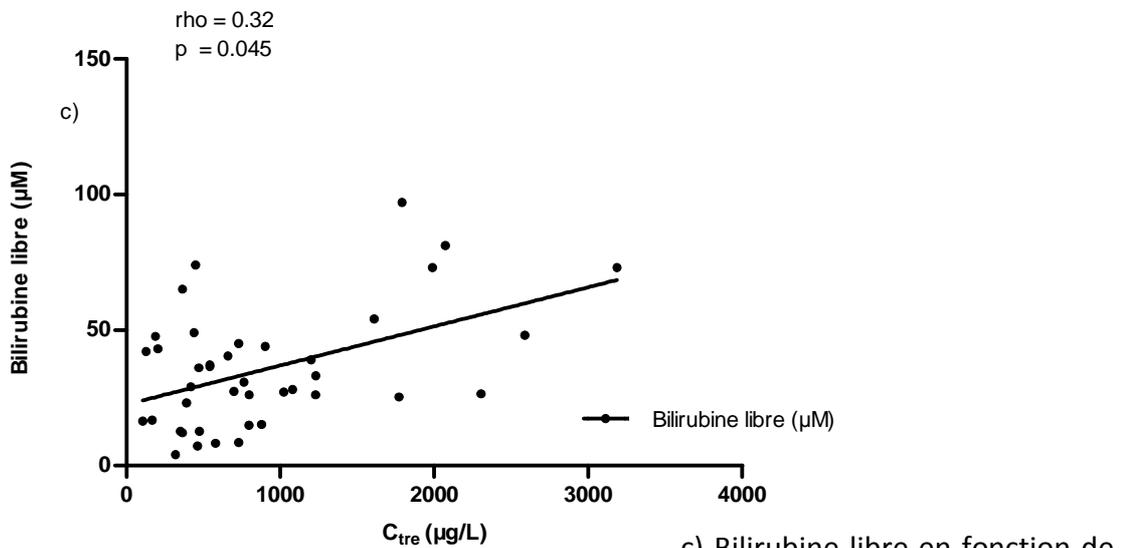
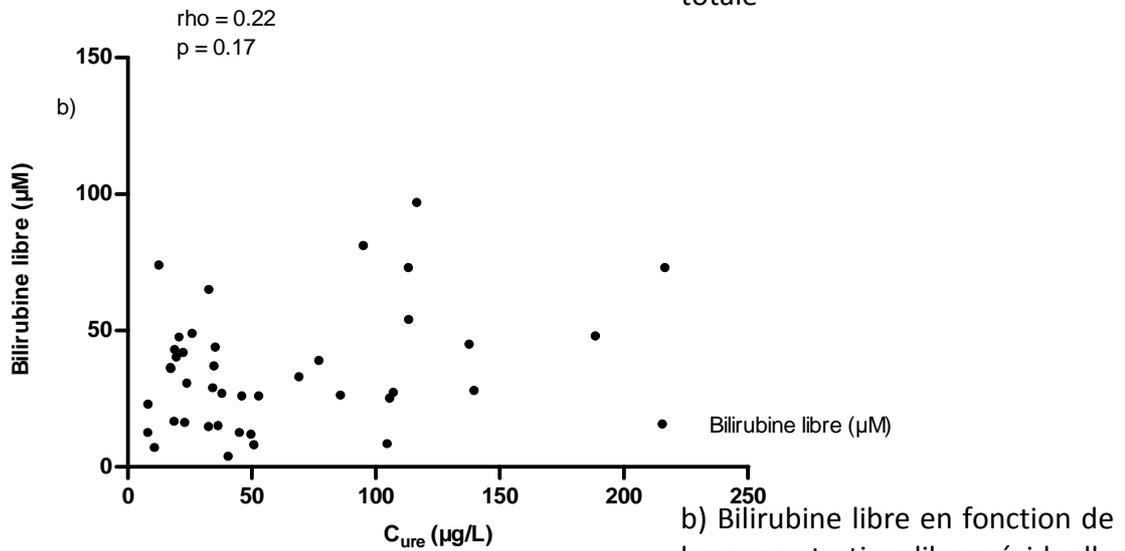
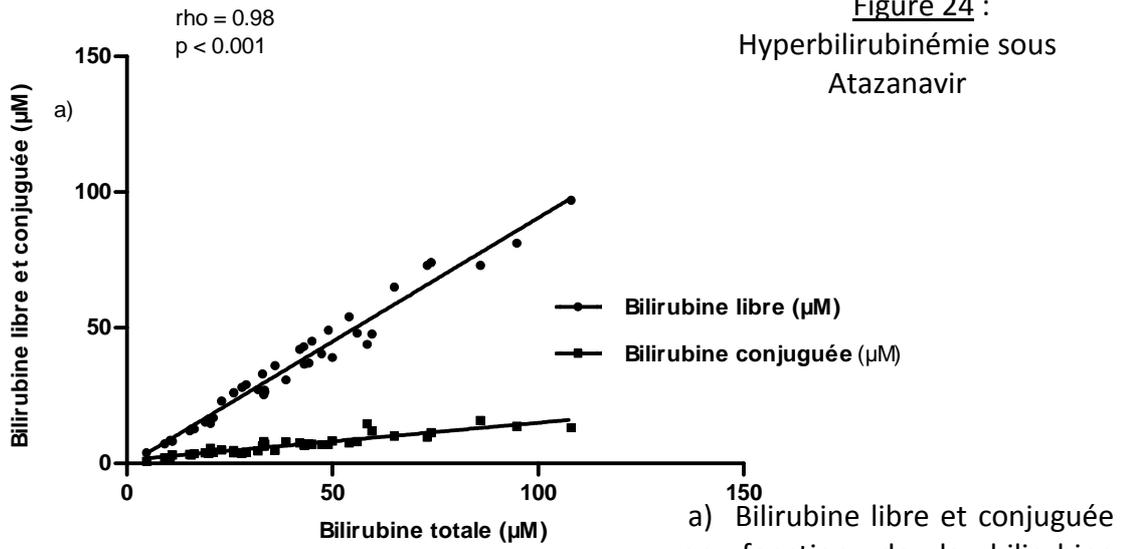
##### i. **ATV**

Il n'existe aucune corrélation entre la  $f_u$  et le taux d'AAG ( $\rho = -0,06$ ,  $p = 0,67$ ) pour des concentrations d'AAG allant de 0,30 à 1,89 g/L (Figure 22a). On observe toutefois une tendance dans la relation entre la  $f_u$  et la  $C_{tr}$  sur une gamme de concentrations allant de 75 à 3184,5  $\mu\text{g/L}$  ( $\rho = 0,41$ ,  $p=0,005$ ).

Sur les 47 échantillons, 42 disposaient de valeurs de bilirubine libre. Sur l'étendue des valeurs de bilirubine libre, une tendance ( $\rho = 0,32$ ,  $p = 0,045$ ) entre la  $C_{tre}$  et la bilirubine libre a été observée (Figure 24b) alors qu'aucune tendance n'a été observée entre la  $C_{ure}$  et la bilirubine libre ( $\rho = 0,22$ ,  $p = 0,17$ ) (Figure 24c). La Figure 24a montre que l'intégralité des hyperbilirubinémies totales était des hyperbilirubinémies à bilirubine libre. De même, on

retrouve une tendance entre la  $C_{tre}$  et la bilirubine totale ( $\rho = 0,37$ ,  $p = 0,016$ ) alors qu'aucune tendance n'a été constatée entre la  $C_{ure}$  et la bilirubine totale ( $\rho = 0,22$ ,  $p = 0,17$ ). Lorsque l'on ne considère que les hyperbilirubinémies libres supérieures à  $17 \mu\text{M}$ , la tendance entre la  $C_{tre}$  et la bilirubine libre s'efface ( $\rho = 0,09$ ,  $p = 0,63$ ) et il n'existe toujours aucune tendance entre la  $C_{ure}$  et la bilirubine libre ( $\rho = 0,17$ ,  $p=0,38$ ). Les relations entre les concentrations libres ou totales d'ATV et la bilirubine libre sont représentées sur la Figure 24.

Figure 24 :  
Hyperbilirubinémie sous  
Atazanavir



Lorsque l'on compare les deux groupes de patients catégorisés en fonction de leur statut virologique (répondeurs vs non répondeurs), aucune différence significative n'a été observée pour la  $f_u$  ( $p = 0,68$ ), la  $C_{ure}$  ( $p = 0,21$ ) et la  $C_{tre}$  ( $p = 0,19$ ). De même aucune différence n'a été retrouvée entre les groupes concernant les concentrations d'AAG ( $p = 0,51$ ) et les taux de bilirubine libre ( $p = 0,85$ ).

## **ii. DRV**

Nous avons mis en évidence une relation inverse reliant la  $f_u$  et le taux d'AAG ( $\rho = -0,34$  ;  $p = 0,0049$ ) pour une gamme de concentration d'AAG allant de 0,41 à 2,41 g/L. La relation entre la  $f_u$  et l'AAG est représentée sur la figure 23.

Les résultats de l'analyse univariée de la CV sont représentés dans le Tableau 8. L'analyse univariée a montré un effet significatif de la  $f_u$  sur la probabilité pour un patient d'avoir une charge virale positive. L'analyse ROC (Figure 25) a permis de déterminer un seuil de  $f_u$  de 3,39% (associé à une ASC ROC de 0,702 ( $IC_{95\%}$  [0,558 ; 0,822])), une sensibilité de 59,4% et une spécificité de 78,9%. Une sensibilité de 59,4% signifie que lorsque la  $f_u > 3,39$ , on a 59,4 risque sur 100 d'avoir une charge virale positive. En raison de sa distribution bimodale, observée dans la Figure 17, le  $V_{dss}/F$  a été dichotomisé en fonction d'un seuil fixé à  $V_{dss}/F = 10$  L ( $V_{dss}/F > 10$  L versus  $V_{dss}/F \leq 10$  L) par analyse visuelle de la répartition des  $V_{dss}/F$  individuels (données non présentées). L'influence du  $V_{dss}/F$  binarisé ( $Vd_{bin}$ ) sur la  $C_{ure}$  a été déterminée par régression linéaire et un effet significatif du  $V_{dss}/F$  binarisé sur la  $C_{ure}$  a été mis en évidence ( $V_{dss}$  haut versus  $V_{dss}$  bas :  $\beta \pm sd = -68 \pm 20,81 \mu\text{g/L}$  ;  $p = 0,00192$  ; Figure 26 boîte à moustache).

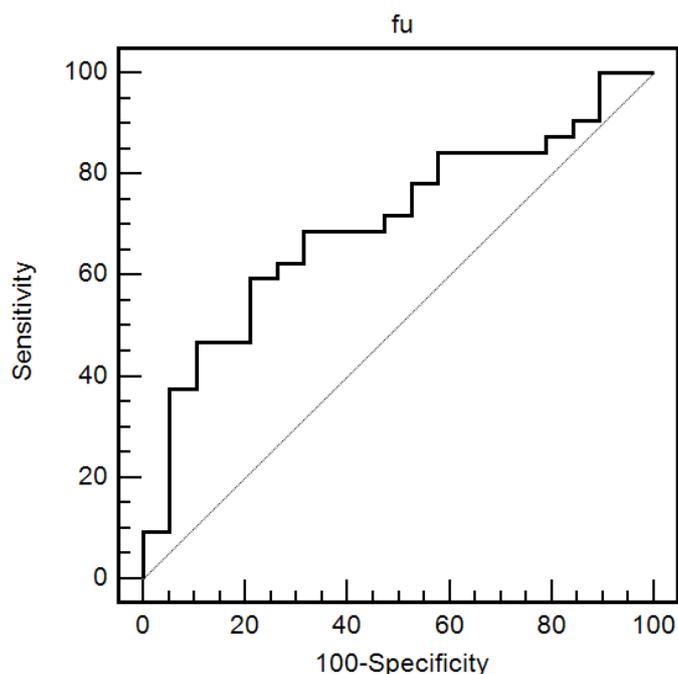
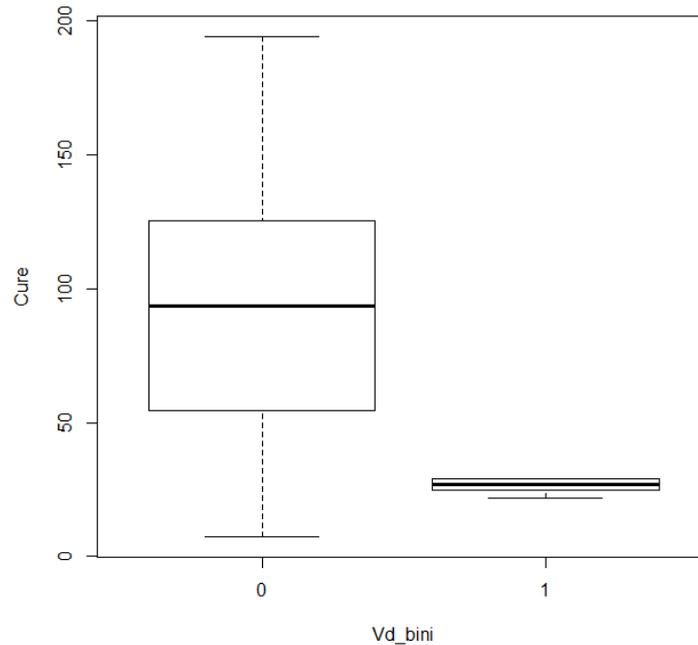


Figure 25 : Courbe ROC reliant la  $f_u$  du Darunavir et le risque d'avoir une charge virale positive

Cv_bin (neg/pos)	OR	IC95%	p value (Logistic Regression Model)
$f_u$ (univarié)	1,91	1,07;3,4	0,0282
$V_{d\_bin}$ (univarié)	3,33	0,36, 30,95	0,835
$C_{tre}/Dose$ (univarié)	1,04	0,82;1,31	0,751
AAG (univarié)	1,04	0,17;6,39	0,969
ASC (univarié)	1,0003	0,9995;1,001	0,500
$k_a$ (univarié)	0,98	0,9;1,06	0,5899
$k_e$ (univarié)	0	0;207,82	0,1961

Tableau 8 : Résultats des analyses univariées pour la charge virale

CV\_bin : Charge virale dichotomisée en deux groupes négatif / positif ;  $f_u$  fraction libre ;  $V_{d\_bin}$  Volume de distribution binarisé selon les deux sous population mises en valeurs (seuil fixé à 10L) ;  $C_{tre}$  concentration totale résiduelle estimée ; AAG Alpha 1 Glycoprotéine Acide ; ASC Aire Sous Courbe ;  $k_a$  vitesse d'absorption ;  $k_e$  vitesses d'élimination ; OR Odd ratio ; IC Intervalle de Confiance



**Figure 26** : Représentation graphique sous forme de boîte à moustache de la concentration libre résiduelle estimée ( $C_{ure}$ ) en fonction du  $V_{dss}/F$  dichotomisé ( $V_{d\_bini}$ )  
 Le groupe  $V_{d\_bini} = 0$  représente les  $V_{dss}/F$  bas ( $\leq 10$  L ;  $n = 62$ ) et le groupe  $V_{d\_bini} = 1$  représente les  $V_{dss}/F$  hauts ( $> 10$  L ;  $n = 6$ ),

Bien que les résultats aient été non significatifs pour l'analyse univariée, le  $V_{dss}/F$  dichotomisé ( $V_{dss\_bin}$ ) et la  $C_{tre}/Dose$  ont été intégrés dans l'analyse multivariée comme facteurs d'ajustement. La  $C_{ure}$  a été ici ajustée au  $V_{dss\_bin}$ , après observation des deux sous populations observées dans la Figure 26, et à la  $C_{tre}$ , pour limiter l'interférence des  $C_{tre}$  inférieurs au seuil d'efficacité pouvant expliquer certains échecs thérapeutique. La régression logistique multivariée montre que la  $C_{ure}$ , ajustée sur le  $V_{dss}$  binarisé,  $V_{d\_bin}$ , et sur la  $C_{tre}/Dose$  étaient significativement associés à la charge virale (augmentation du risque par augmentation d'une unité de  $C_{ure}$  OR = 1,02 (IC<sub>95%</sub> = [1,01 ; 1,03] ;  $p = 0,0309$ ). Aucune interaction statistique n'a été observée entre  $C_{ure} * V_{dss\_bin}$  ( $p = 0,5718$ ) et  $C_{ure} * C_{tre}/Dose$  ( $p = 0,432$ ).

## **Partie III :**

### **Discussion, conclusion et perspectives**

## I- Discussion

Lors de notre étude, nous avons exploré d'une part la variabilité inter-individuelle des concentrations totales et libres, ainsi que de la fraction libre de l'ATV et DRV chez des patients atteints du VIH , et d'autre part les relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques (PK-PD) entre les données pharmacocinétiques et les données biologiques utilisées comme marqueur d'efficacité (charge virale) et de toxicité (bilirubine pour l'Atazanavir) de la concentration libre et de la fraction libre de l'ATV et DRV chez des patients atteints du VIH.

Nous avons dû procéder en deux étapes. La première étape a consisté à mesurer les concentrations libres pour chaque prélèvement, étant donné que les concentrations totales avaient été déterminées préalablement au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique (CHU Purpan) dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique de l'Atazanavir et du Darunavir. La seconde étape a consisté à estimer toutes les concentrations mesurées, libres et totales, pour l'ATV ou le DRV, en concentration résiduelle, par les modèles de PKPOP avant d'être interprétées. En effet, comme cela a été précisé dans cette thèse, bien que la concentration résiduelle soit utilisée comme paramètre de référence<sup>1</sup> pour adapter la posologie de l'Atazanavir ainsi que du Darunavir, certaines contraintes conduisent la plupart du temps à prélever le patient bien avant d'avoir atteint cette concentration résiduelle.

### a. Evaluation de la méthode d'ultrafiltration

Nous avons choisi d'utiliser l'ultrafiltration pour déterminer la concentration et la fraction libres de l'Atazanavir et du Darunavir. Actuellement, l'ultrafiltration est la technique majoritairement utilisée dans les laboratoires de routine car elle présente comme avantage sur la dialyse à l'équilibre (méthode de référence) un temps d'analyse limité (moins d'une heure au total). Toutefois, des différences d'évaluation dans la fraction libre peuvent

apparaître entre les deux techniques. Les résultats de  $f_u$ , obtenus dans notre étude sont différents des résultats décrits dans la littérature, surtout pour l'ATV<sup>11</sup> et de façon moindre pour le DRV<sup>111,120</sup>. Cette différence peut s'expliquer par les étapes précédant la partie purement analytique. En effet, l'équipe de Fayet et al<sup>11</sup> avait déterminé la  $C_u$  de l'ATV par ultrafiltration couplée à la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse. Hormis la différence de détecteur, la seule divergence entre nos travaux concernait le délai entre la réception de l'échantillon et son dosage, Fayet et al<sup>11</sup> semblent avoir réalisé leur dosage sur des prélèvements frais (dès réception) alors que notre travail a porté sur des prélèvements décongelés (après une période de congélation moyenne de 6 mois à -20°C). Ces divergences ne sont pas gênantes pour l'interprétation de nos résultats puisque nous avons appliqué la même méthodologie à l'ensemble des échantillons. Dans de futurs travaux, nous envisageons de comparer la fraction libre déterminée par dialyse à l'équilibre et à celle déterminée par ultrafiltration, sur des échantillons frais et décongelés. Les résultats d'une telle étude, jamais publiés à ce jour pour ces deux molécules, permettront de conclure sur l'influence de la méthode appliquée pour évaluer la fraction libre.

#### **b. Exploration de la fraction libre de l'Atazanavir**

Les résultats obtenus ont mis en évidence des variabilités inter-individuelles importantes : 38,8 %, 94,6% et 94,4% pour la  $f_u$ , la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$  de l'ATV, respectivement, La variabilité plus limitée de la  $f_u$ , comparée à celle de la  $C_{ure}$  ou de la  $C_{tre}$ , est liée à la forte corrélation entre la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$  ( $\rho = 0,72$ ,  $p < 0,001$ ). Les résultats ont également montré une corrélation entre la  $C_{tre}$  et la  $f_u$  ( $\rho = 0,41$ ,  $p = 0,005$ ). En revanche, les résultats obtenus permettent d'exclure toute influence du taux d'AAG pour des concentrations compris entre 0,30 et 1,89 g/L sur la  $f_u$  ( $\rho = -0,06$ ,  $p = 0,67$ ). Plusieurs raisons peuvent justifier cette absence de relation. Tout d'abord, la valeur du  $K_d$  de l'ATV ( $K_d = 2,17 \times 10^{-6}$  M)<sup>12</sup> est largement supérieure aux concentrations libres circulantes en ATV pour des doses usuelles, limitant un possible phénomène de saturation (Eq7). Deuxièmement, un polymorphisme de l'AAG ou des interactions médicamenteuses peuvent modifier le  $K_d$ . L'impact des interactions

médicamenteuses sur la  $f_u$  n'a pas été évalué dans ce travail de thèse par manque de données. En revanche, l'impact du polymorphisme de l'AAG sur la pharmacocinétique de l'ATV a été étudié par Barrail Tran et al<sup>12</sup>. Ce polymorphisme ne semble avoir aucune conséquence sur les paramètres d'exposition ( $C_t$  résiduelle et ASC) de l'ATV, mais uniquement sur le volume de distribution. Toutefois cette étude n'a pas mesuré la  $C_u$  de l'ATV et ne détaille pas les différences de concentrations entre les différents phénotypes d'AAG observés. Il est donc difficile de déduire l'influence réelle du polymorphisme de l'AAG sur la  $f_u$  de l'ATV. Troisièmement, les patients inclus dans notre étude avaient de façon générale un taux d'AAG élevé et peu variable. Le taux d'AAG augmente dans de nombreuses conditions pathologiques (syndromes inflammatoires, atteintes de la fonction rénale)<sup>14</sup> et en cas de co-administrations médicamenteuses (Amitriptyline, Carbamazépine)<sup>14</sup>. Ce taux diminue en cas d'insuffisance hépatique ou dans certains stades terminaux de néoplasie<sup>14</sup>. Certaines situations physiologiques, comme un âge avancé (au-delà de 75 ans) et l'obésité, peuvent faire augmenter le taux d'AAG, alors que celui-ci diminue chez la femme enceinte. L'AAG n'ayant qu'un seul site de liaison pour l'ATV<sup>12</sup>, ces différentes conditions de variations du taux d'AAG sont autant de conditions faisant varier le  $B_m$  (capacité de liaison). Or toute variation du  $B_m$  est susceptible de faire varier la  $f_u$  (Eq7). Dans notre population, un très faible nombre de patients avaient un taux d'AAG en dehors des bornes physiologiques ( $n = 3$  avec  $AAG < 0,5$  g/L et  $n = 7$  avec  $AAG > 1,2$  g/L pour l'ATV), avec toutefois des valeurs (0,30 - 1,89 g/L) assez proches de ces bornes. Même chez les patients avec une charge virale positive, les taux d'AAG étaient situés entre 0,67 et 1,59 g/L. L'absence d'une fluctuation importante des taux d'AAG, et donc du  $B_m$ , peut ainsi justifier l'absence de corrélation entre la  $f_u$  et le taux d'AAG. Nous envisageons dans de futurs travaux d'explorer plus en détail le lien possible entre AAG et  $f_u$  chez des patients présentant des valeurs extrêmes d'AAG,

Aucune relation PK-PD concernant l'efficacité virologique n'a pas été observée chez les patients sous ATV. Ainsi, aucun des paramètres pharmacocinétiques  $f_u$  et  $C_{ure}$  de l'ATV n'a permis de discriminer les patients en échec ou en réussite virologique. Il est d'autant plus étonnant de souligner que les échecs virologiques ne sont pas associés à des  $C_{tre}$  inférieures au seuil minimal fixé de  $200\mu\text{g/L}^1$ . Il est possible que les échecs virologiques soient la conséquence d'une résistance virale à l'ATV, certains bilans n'étant pas accessibles, et

ou aux autres molécules composant le traitement antirétroviral. Malheureusement, cette information n'était pas disponible.

De la même façon, nous n'avons retrouvé aucune relation PK-PD entre concentration libre et hyperbilirubinémie libre chez les patients sous Atazanavir. L'ATV est connu pour engendrer des hyperbilirubinémies à bilirubine libre par inhibition de l'UGT1A1, enzyme permettant la conjugaison de la bilirubine libre pour permettre son élimination<sup>147</sup>. Toutefois, la majorité des études s'intéressent seulement à la bilirubine totale, ne distinguant pas de ce fait les différentes étiologies d'hyperbilirubinémies totales, et aucune relation n'a été mise en évidence. Cependant, une limite supérieure de concentration de l'ATV a été retenue, à 800 µg/L<sup>1</sup>, où l'efficacité n'est pas améliorée mais où le risque d'hyperbilirubinémie est susceptible d'augmenter. Néanmoins, aucune étude ne s'est concentrée sur la relation pouvant lier la  $C_{ure}$ , partie pharmacologiquement active et susceptible d'inhiber l'UGT1A1, et la bilirubine libre. Pour rechercher une relation entre la  $C_{ure}$  et la bilirubine libre, nous avons en premier lieu éliminé les biais pouvant amener à des augmentations de bilirubine libre indépendamment du traitement par ATV. Il existe une étiologie majeure causant des hyperbilirubinémies à bilirubine libre, le syndrome de Gilbert<sup>103,104</sup>. Ce syndrome est la conséquence d'une mutation sur l'UGT1A1, diminuant son activité et provoquant des hyperbilirubinémies libres généralement infracliniques. Fréquemment rencontré dans la population, nous avons recherché les patients avec une hyperbilirubinémie à BL avant l'inauguration du traitement par ATV. Étonnamment, un seul patient présentait une hyperbilirubinémie à BL, résultat bien en deçà des fréquences décrites dans la littérature pour le syndrome de Gilbert. Cette divergence peut s'expliquer par le manque d'antécédents pour la population étudiée (17 patients avec des bilans biologiques réalisés avant le début du traitement) mais aussi par une fluctuation de l'échantillon. L'absence de relation entre concentration libre et bilirubine libre laisse à penser que l'origine des hyperbilirubinémies à BL peut être la conséquence de plusieurs mécanismes associés incluant l'inhibition de l'UGT1A1. La BL est transportée dans les hépatocytes via un transporteur d'influx, OATP1B1 (Organic Anion Transport Polypeptide 1B1), pouvant être inhibés par des inhibiteurs de protéase comme l'Atazanavir, le Lopinavir ou le Ritonavir<sup>105,148,149</sup>. Cependant, cette inhibition à elle seule n'explique pas les hyperbilirubinémies à BL : les traitements

comprenant du Lopinavir ou du Ritonavir ne causant pas de d'hyperbilirubinémies à BL malgré des  $K_i$  proches pour l'OATP1B1 entre les 3 IP ( $K_{iATV}=1,5 \mu\text{M}$ ,  $K_{iLPV}=0,5 \mu\text{M}$  and  $K_{iRTV}=1,4 \mu\text{M}$ )<sup>105,148</sup>. Notre hypothèse consiste à dire que l'hyperbilirubinémie à BL serait la conséquence d'une part de l'inhibition de l'UGT1A1 et d'autre part de l'inhibition et/ou d'un polymorphisme de l'OATP1B1<sup>57,150</sup>, par l'ATV. De plus, cette hyperbilirubinémie à BL pourrait être potentialisée par une accumulation intracellulaire d'ATV (Figure 5). En effet, l'efflux de l'ATV repose sur deux transporteurs, la P-glycoprotéine et MRP2<sup>50</sup>, qui peuvent soit être inhibées<sup>54,151</sup> soit présenter un polymorphisme<sup>152</sup> conduisant à une accumulation intracellulaire de l'ATV. Cette hypothèse expliquerait l'absence de relation entre la  $C_{ure}$  et la BL.

### c. Exploration de la fraction libre du Darunavir

La  $f_u$  du DRV a été très peu explorée. Les données issues de la littérature portent exclusivement sur des études réalisées sur de petits groupes de patients pour comparer la  $f_u$  et la  $C_u$  entre le compartiment sanguin et d'autres tissus<sup>145,146</sup>. Aucune étude publiée ne s'est intéressée aux relations PK-PD impliquant la  $C_u$  et la  $f_u$ . Les rares travaux publiés ont montré des valeurs de  $f_u$  proches de celles obtenues dans notre étude<sup>145,146</sup> avec une technique similaire à la nôtre.

#### *i. Estimation de la $C_{ure}$ par le modèle de pharmacocinétique de population*

A partir de nombreux prélèvements, issus d'un faible nombre de prélèvements par patient, un modèle estimant la  $C_{ure}$  a pu être construit. Les différents témoins de la qualité du modèle, comme la corrélation entre les concentrations observées et prédites, une distribution normale des résidus pondérés, centrée sur 0, avec de faibles valeurs de biais et de RMSE indiquent un modèle estimant bien les paramètres PK et la  $C_{ure}$ .

Néanmoins, l'utilisation de cinétiques riches (c'est à dire des patients prélevés plusieurs fois entre deux prises) aurait permis le développement d'un meilleur modèle. Ces cinétiques riches auraient également permis le calcul de l'ASC par la méthode des trapèzes (méthode de référence) et de comparer les résultats aux ASC estimées par un modèle. De ce fait, nous ne pouvons pas nous avancer sur la qualité de l'estimation de l'ASC *via* le modèle actuel.

## ***ii. Interprétation des résultats***

Nos résultats ont montré une variabilité inter-individuelle importante de la  $C_{tre}$  (54%), de la  $C_{ure}$  (58 %) et de la  $f_u$  (38%). Une corrélation importante a été retrouvée entre la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$  ( $\rho = 0,82$ ) expliquant la moindre variabilité de la  $f_u$ . L'absence de relation entre la  $f_u$  et la  $C_{tre}$  montre l'absence de saturation de la liaison protéique, la  $f_u$  restant constante aux concentrations élevées de  $C_{tre}$ . Ce résultat n'est pas surprenant si l'on compare les valeurs théoriques du  $K_d$  du DRV aux valeurs de  $C_{ure}$ . Ainsi, la variabilité de la  $f_u$  n'est pas expliquée par la  $C_{tre}$ . En revanche, une relation inverse est apparue entre la  $f_u$  et l'AAG (Eq 7). Ce résultat est surprenant, la majorité des patients présentant des valeurs d'AAG situées dans les normes physiologiques. Comme pour l'ATV, il sera indispensable de vérifier cette relation sur des valeurs extrêmes d'AAG.

Le modèle de PK population a mis en évidence plusieurs caractéristiques dans notre population. Tout d'abord, deux sous-populations ont été mises en évidence en fonction de leur  $V_{dss}/F$ . La présence de ces deux sous-populations nous a conduits à réaliser une dichotomisation des patients (paramètre  $V_{d\_bin}$ ). Cette distribution bimodale du  $V_{dss}/F$  pourrait expliquer la variabilité de la concentration libre résiduelle estimée ( $C_{ure}$ ) : la  $C_{ure}$  est plus basse chez les patients à  $V_{dss}/F$  élevé. Ce résultat est également observé pour la concentration totale résiduelle estimée (valeurs non rapportées) sans différence de posologie entre les groupes à  $V_{dss}/F$  haut et bas. Le paramètre hybride  $V_{dss}/F$  peut être augmenté par une augmentation du  $V_{dss}$  et ou une diminution de la biodisponibilité  $F$ . Le polymorphisme de l'AAG peut, par exemple, expliquer une augmentation du  $V_{dss}$ , comme les

travaux de Barrail-Tran et al<sup>12</sup> ont pu le montrer pour l'ATV. Toutefois, le modèle actuel, pour lequel l'estimation des ASC peut être affinée, nous empêche d'interpréter l'origine de la variabilité observée avec ce paramètre pharmacocinétique. De ce fait, il sera uniquement exploité comme variable d'ajustement dans l'interprétation des Cure chez les patients groupés en fonction de leur statut virologique.

Dans notre étude, les relations PK-PD ont consisté en la recherche d'un marqueur pharmacocinétique différent de la concentration totale résiduelle pour expliquer l'efficacité du DRV. En effet, nous avons observé dans notre population des patients à charge virale positive malgré une concentration totale résiduelle estimée ( $C_{tre}$ ) supérieure au seuil d'efficacité de la molécule. La  $C_u$ , représentant la forme pharmacologiquement active de la molécule, nous nous attendions à une  $C_{ure}$  abaissée chez les patients à charge virale positive. Or nos résultats ont montré que le risque d'être en échec virologique était associé à une valeur de  $f_u$  plus importante associée à une  $C_{ure}$  augmentée sans modification de la  $C_{tre}$ .

Toutefois, d'autres facteurs sont susceptibles de faire augmenter la  $f_u$ . En effet, une diminution de la  $C_{tre}$  ferait augmenter la  $f_u$ , selon l'équation  $f_u = \frac{C_u}{C_t}$ . La variation du taux d'AAG, équivalent à une variation du  $B_m$ , selon la formule  $f_u = \frac{K_d}{(B_m + K_d)}$ , pourrait également faire varier la  $f_u$ . Cependant, dans notre étude, aucun de ces deux paramètres n'était relié à une augmentation du risque d'avoir une charge virale positive.

Le modèle développé dans notre étude a également permis l'estimation de l'aire sous courbe (ASC) de la partie libre du DRV. L'ASC est un marqueur pharmacocinétique représentant l'exposition de l'organisme au DRV. A ce jour, il existe peu d'études ayant estimé l'ASC (forme totale) du DRV<sup>153</sup>. Dans notre étude, contrairement à la  $C_{ure}$  et à la  $f_u$ , l'ASC de la forme libre du DRV n'était pas associée à un risque plus élevé pour le patient d'avoir une charge virale positive. L'explication pourrait être un nombre insuffisant de points utilisé pour développer le modèle conduisant à une estimation encore trop approximative de l'ASC de la forme libre du DRV.

Dans la population de notre étude, nous avons donc observé des patients à charge virale positive présentant une fraction libre plus élevée comparé aux patients à charge virale

négative. De manière inattendue, cette différence de  $f_u$  est expliquée par la  $C_{ure}$  et non par la  $C_{tre}$ . Ainsi les patients à  $C_{ure}$  élevée sont ceux plus à risque d'avoir une charge virale positive. Il existe donc un facteur entraînant une augmentation de la  $C_{ure}$  et en parallèle un facteur entraînant un échec virologique. A ce jour, l'hypothèse proposée pour expliquer ces résultats, consiste à dire que les deux phénomènes, l'un d'ordre PK avec l'augmentation de la  $C_{ure}$  sans variation de la  $C_{tre}$ , et l'autre d'ordre pharmacodynamique avec un échec virologique, sont causés par un facteur commun. Même si à l'heure actuelle aucune donnée de la littérature n'a soulevé une telle hypothèse, que ce soit pour le DRV ou un autre IP, il est envisageable qu'un transporteur membranaire ayant pour substrat le DRV et étant présent aussi bien à la surface des hépatocytes que des cellules mononuclées sanguines puissent être à l'origine de cette corrélation PK-PD. L'OATP1B1, transporteur transmembranaire d'influx, est d'une part présent sur ces deux types cellulaires et d'autre part présente un polymorphisme génétique déjà révélé comme facteur de variabilité PK mais aussi PD pour certaines molécules (statines et Lopinavir par exemple). Cette piste devra être explorée sur un échantillon plus large de patients sous DRV.

## II- Conclusion

En raison de l'importante corrélation entre la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$ , la  $C_u$  résiduelle et la  $f_u$  ne paraissent pas être des marqueurs plus pertinents que la  $C_t$  résiduelle pour le STP de l'ATV. Même si la  $C_t$  résiduelle est actuellement le marqueur permettant l'adaptation de posologie, l'ASC représente le paramètre pharmacocinétique de référence de façon générale dans le cadre du STP. En routine, son estimation implique nécessairement l'utilisation d'un modèle de pharmacocinétique de population comme cela est réalisé pour les immunosuppresseurs ou certains anticancéreux, Il faudra alors vérifier que l'utilisation de l'ASC améliore le STP de l'ATV.

Malgré la corrélation entre la  $C_{ure}$  et la  $C_{tre}$  du DRV, une différence significative de la  $C_{ure}$  entre les patients avec et sans échec virologique a pu être observée, suggérant la possibilité d'utiliser la  $C_{ure}$  comme *marqueur d'inefficacité*, en complément de la  $C_t$  résiduelle, dans le cadre du STP du DRV. Néanmoins, une étude prospective sur un plus grand nombre de patients avec des cinétiques de DRV complètes, associée à des travaux de pharmacogénétique étudiant le polymorphisme des transporteurs du DRV, est nécessaire pour étayer l'hypothèse proposée et renforcer la possibilité d'utiliser la  $C_{ure}$  comme outil du STP.

### III- Perspectives

L'exploration de la Cur et de la fu de l'ATV et du DRV a permis d'obtenir des résultats intéressants aussi bien d'un point de vue PK que PK-PD. Cette première étude invite à poursuivre la thématique de la fraction libre et d'envisager des travaux supplémentaires pour répondre aux interrogations soulevées par les résultats obtenus initialement. Il sera donc important dans un premier temps de :

(i) comparer l'ultrafiltration à la dialyse à l'équilibre, méthode de référence pour l'évaluation de la fraction libre. Cette comparaison permettra également de quantifier l'influence de certains paramètres comme la température mais aussi le pH sur l'équilibre de liaison entre les deux IP et l'AAG. En parallèle, il sera nécessaire d'adapter la méthode de dosage de l'ATV et du DRV sur une technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse pour améliorer la spécificité mais surtout la sensibilité et assurer ainsi la quantification de la concentration libre.

(ii) confirmer l'hypothèse portant sur les transporteurs transmembranaires en s'assurant de la localisation de l'OATP1B1 sur les cellules mononuclées sanguines, en exploitant par exemple des techniques de cytométrie en flux. A ces travaux devront s'incorporer l'étude de l'influence du polymorphisme génétique des transporteurs, aussi bien d'influx que d'efflux, sur la pharmacocinétique du DRV. A cette étude pourrait s'associer le dosage des concentrations intracellulaires des cellules mononuclées sanguines pour vérifier la modification de la distribution cellulaire lors d'une perturbation du transport transmembranaire.

Il sera ensuite également impératif :

(iii) de développer des modèles de pharmacocinétique de population pour estimer les concentrations libres et totales résiduelles ainsi que l'ASC. Ces modèles sont en cours de développement et pourront être, comme pour l'ATV, prochainement être intégrés dans la routine hospitalière. Des modèles pour d'autres antirétroviraux sont également envisageables.

(iv) d'étendre l'exploration de la fraction libre à d'autres antirétroviraux, L'Efavirenz, la Rilpivirine et le Dolutegravir sont, d'un point de vue pharmacocinétique, des candidats à ces travaux. En effet ces trois molécules, fréquemment utilisées comme troisième agent de la trithérapie, sont fortement liées aux protéines plasmatiques.

(v) d'étudier l'intérêt de la concentration libre plasmatique et urinaire pour l'exploration des néphropathies, notamment lithiasiques, liées à l'ATV.

## Bibliographie

1. France, Ministère des affaires sociales et de la santé (2012-....), Morlat P. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH Rapport 2013: recommandations du groupe d'experts*. Paris: DILA - Direction de l'information légale et administrative : La documentation française; 2013.
2. Le Tiec C, Barrail A, Goujard C, Taburet A-M. Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 1035–50.
3. Rittweger M, others. Clinical pharmacokinetics of darunavir. *Clin Pharmacokinet* 2007; **46**: 739–56.
4. Smith DE, Jeganathan S, Ray J. Atazanavir plasma concentrations vary significantly between patients and correlate with increased serum bilirubin concentrations. *HIV Clin Trials* 2006; **7**: 34–8.
5. Acosta EP, King JR. Methods for integration of pharmacokinetic and phenotypic information in the treatment of infection with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 373–7.
6. Food and Drug Administration FDA. Reyataz. Safety Labeling Changes Approved By FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER). [FDA web site]. November 29, 2011. Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/021567s026lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021567s026lbl.pdf). Accessed June 5, 2014.
7. European Medicines Agency EMA label Prezista® [EMA web site] May 20, 2014. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000707/WC500041756.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000707/WC500041756.pdf). Accessed June 5, 2014.
8. France, Ministère des affaires sociales et de la santé (2012-....), Morlat P. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH Rapport 2013: recommandations du groupe d'experts*. Paris: DILA - Direction de l'information légale et administrative : La documentation française; 2013.
9. Gandia P, Arellano C, Lafont T, et al., Should therapeutic drug monitoring of the unbound fraction of imatinib and its main active metabolite N-desmethyl-imatinib be developed? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; **71**: 531-6.
10. Florent A, Gandia P, Seraissol P, et al., Determination of plasma unbound fraction of voriconazole in patients treated with a prophylactic or a curative treatment. *Ther. Drug Monit*. 2014; **36**: 752-8.
11. Fayet A, Béguin A, de Tejada BM, et al., Determination of unbound antiretroviral drug concentrations by a modified ultrafiltration method reveals high variability in the free fraction. *Ther Drug Monit* 2008; **30**: 511–22.

12. Barrail-Tran A, Mentre F, Cosson C, *et al.* Influence of Alpha-1 Glycoprotein Acid Concentrations and Variants on Atazanavir Pharmacokinetics in HIV-Infected Patients Included in the ANRS 107 Trial. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 614–9.
13. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; **1482**: 157-171.
14. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* 2001; **33**: 161-235.
15. Arellano C, Gandia P, Lafont T, *et al.*, Determination of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib, validation of an UPLC-MSMS assay and ultrafiltration method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; **907**: 94-100.
16. Yarchoan R, Broder S. Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. A progress report. *N Engl J Med.* 1987 ; **316**: 557-64.
17. Mallal S, Nolan D, Witt C, *et al.* Association between presence of HLA-B\* 5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *The Lancet* 2002; **359**: 727–32.
18. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* 1990; **64**: 864–72.
19. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1614–22.
20. Flexner C, others. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1281–92.
21. Colonna RJ, Thiry A, Limoli K, Parkin N. Activities of Atazanavir (BMS-232632) against a Large Panel of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clinical Isolates Resistant to One or More Approved Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1324–33.
22. Drusano GL, Bilello JA, Preston SL, *et al.* Hollow-fiber unit evaluation of a new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, BMS-232632, for determination of the linked pharmacodynamic variable. *J Infect Dis* 2001; **183**: 1126–9.
23. Piliero J. The utility of inhibitory quotients in determining the relative potency of protease inhibitor. *AIDS.*2002; **16**: 799-800.
24. De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, *et al.* TMC114, a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor Active against Protease Inhibitor-Resistant Viruses, Including a Broad Range of Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2314–21.

25. Condra JH, Petropoulos CJ, Ziermann R, Schleif WA, Shivaprakash M, Emini EA. Drug resistance and predicted virologic responses to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor therapy. *J Infect Dis* 2000; **182**: 758–65.
26. Piliero PJ. The utility of inhibitory quotients in determining the relative potency of protease inhibitors. *Aids* 2002; **16**: 799–800.
27. King NM, Melnick L, Prabu-Jeyabalan M, *et al.* Lack of synergy for inhibitors targeting a multi-drug-resistant HIV-1 protease. *Protein Sci* 2009; **11**: 418–29.
28. Colonna R, Rose R, McLaren C, Thiry A, Parkin N, Friborg J. Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naïve HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis* 2004; **189**: 1802–10.
29. Lefebvre E, Schiffer CA. Resilience to resistance of HIV-1 protease inhibitors: profile of darunavir. *AIDS Rev* 2008; **10**: 131.
30. Goldsmith DR, Perry CM. Atazanavir. *Drugs* 2003; **63**: 1679–93.
31. Havlir DV, O’marro SD. Atazanavir: new option for treatment of HIV infection. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1599–604.
32. Kis O, Zastre JA, Hoque MT, Walmsley SL, Bendayan R. Role of Drug Efflux and Uptake Transporters in Atazanavir Intestinal Permeability and Drug-Drug Interactions. *Pharm Res* 2013; **30**: 1050–64.
33. Van Leeuwen E, ter Heine R, van der Veen F, Repping S, Beijnen JH, Prins JM. Penetration of Atazanavir in Seminal Plasma of Men Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 335–7.
34. Best BM, Letendre SL, Brigid E, *et al.* Low atazanavir concentrations in cerebrospinal fluid: *AIDS* 2009; **23**: 83–7.
35. Colombo S, Buclin T, Cavassini M, *et al.* Population Pharmacokinetics of Atazanavir in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3801–8.
36. Le Tiec C, Barrail A, Goujard C, Taburet A-M. Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 1035–50.
37. Wempe MF, Anderson PL. Atazanavir Metabolism According to CYP3A5 Status: An In Vitro-In Vivo Assessment. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 522–7.
38. Li F, Lu J, Wang L, Ma X. CYP3A-Mediated Generation of Aldehyde and Hydrazine in Atazanavir Metabolism. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 394–401.
39. Food and Drug Administration FDA. Reyataz. Safety Labeling Changes Approved By FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER). [FDA web site]. November 29, 2011. Available at:

[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/021567s026lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021567s026lbl.pdf). Accessed June 5, 2014.

40. Sekar V, Kestens D, Spinoza-Guzman S, *et al*. The effect of different meal types on the pharmacokinetics of Darunavir (TMC114) / Ritonavir in HIV negative volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2007; **47**: 479-84.
41. Back D, Sekar V, Hoetelmans RM. Darunavir: pharmacokinetics and drug interactions. *Antivir Ther*. 2008; **13**: 1-13.
42. Rittweger M, others. Clinical pharmacokinetics of darunavir. *Clin Pharmacokinet* 2007; **46**: 739–56.
43. Delille CA, Pruett ST, Marconi VC, *et al*. Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations: The Journal of Clinical Pharmacology. *J Clin Pharmacol* 2014; **54**: 1063–71.
44. Else LJ, Taylor S, Back DJ, *et al*. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites the fetal compartment (placenta and amniotic fluid) *Antivir Ther*. 2011; **16**: 1139-47.
45. FDA Prezista Reference ID : 3403336.
46. Molina J-M, Hill A. Darunavir (TMC114): a new HIV-1 protease inhibitor. *Expert Opin Pharmacother* 2007; **8**: 1951–64.
47. Vermeir M, Lachau-Durand S, Mannens G, Cuyckens F, van Hoof B, Raouf A. Absorption, Metabolism, and Excretion of Darunavir, a New Protease Inhibitor, Administered Alone and with Low-Dose Ritonavir in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos* 2009; **37**: 809–20.
48. Dati F, Schumman G, Thomas L, *et al*. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM470). *Eur J Clin Chem Biochem*. 1996; **34**: 517-20.
49. Griffin L, Annaert P, Brouwer KLR. Influence of drug transport proteins on the pharmacokinetics and drug interactions of HIV protease inhibitors. *J Pharm Sci* 2011; **100**: 3636–54.
50. Kis O, Robillard K, Chan GNY, Bendayan R. The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol Sci* 2010; **31**: 22–35.
51. Minuesa G, Huber-Ruano I, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Clotet B, Martinez-Picado J. Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol Ther* 2011; **132**: 268–79.
52. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, *et al* Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; **81**: 362-70.

53. Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, *et al.* Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: A resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 2006; **36**: 963–88.
54. Michaud V, Bar-Magen T, Turgeon J, Flockhart D, Desta Z, Wainberg MA. The Dual Role of Pharmacogenetics in HIV Treatment: Mutations and Polymorphisms Regulating Antiretroviral Drug Resistance and Disposition. *Pharmacol Rev* 2012; **64**: 803–33.
55. Tirona RG, Leake BF, Merino G, *et al.* Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35669–75.
56. König J, Müller F, Fromm MF. Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. *Pharmacol Rev* 2013; **65**: 944–66.
57. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Role of the liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; **1**: 429–45.
58. Mwinyi J. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) \*5 and \*1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 415–21.
59. Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, *et al.* High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1): *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 429–40.
60. Niemi M, Backman J, Kajosaari L, *et al.* Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**: 468–78.
61. Kohlrausch FB, de Cássia Estrela R, Barroso PF, Suarez-Kurtz G. The impact of *SLCO1B1* polymorphisms on the plasma concentration of lopinavir and ritonavir in HIV-infected men. *Br J Clin Pharmacol* 2010; **69**: 95–8.
62. Schipani A, Egan D, Dickinson L, *et al.* Estimation of the effect of *SLCO1B1* polymorphisms on lopinavir plasma concentration in HIV-infected adults. *Antivir Ther* 2012; **17**: 861–8.
63. Zhang X, Tierney C, Albrecht M, *et al.* Discordant Associations Between *SLCO1B1* 521T→C and Plasma Levels of Ritonavir-boosted Protease Inhibitors in AIDS Clinical Trials Group Study A5146: *Ther Drug Monit* 2013; **35**: 209–16.
64. Zhang J. Human T cell cytokine responses are dependent on multidrug resistance protein-1. *Int Immunol* 2006; **18**: 485–93.
65. Kwan WS, Hartkoorn RC, Salcedo-Sora E, *et al.* Determining the substrate specificities of *SLCO1A2* and *SLCO1B1* for antiretroviral drugs. 9th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, New Orleans, April 2008, AbstractO4.

66. Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011; **26**: 220-7.
67. Mück W, Mai I, Fritsche L, *et al.* Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; **65**: 251-61.
68. Shitara Y. Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**: 610-6.
69. Simonson S. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 167-77.
70. Backman J. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**: 685-91.
71. Lau YY, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effect of OATP1B Transporter Inhibition on the Pharmacokinetics of Atorvastatin in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007; **81**: 194-204.
72. Jacobson TA. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol* 2004; **94**: 1140-6.
73. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. DRUG-DRUG INTERACTION BETWEEN PITAVASTATIN AND VARIOUS DRUGS VIA OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2006; **34**: 1229-36.
74. Nakai K, Tanaka H, Hanada K, *et al.* Decreased Expression of Cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and Drug Transporters Na<sup>+</sup>-Taurocholate-Cotransporting Polypeptide, Organic Cation Transporter 1, and Organic Anion-Transporting Peptide-C Correlates with the Progression of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *Drug Metab Dispos* 2008; **36**: 1786-93.
75. Vee ML, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of Drug Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor- or Interleukin-6. *Drug Metab Dispos* 2009; **37**: 685-93.
76. Else LJ, Taylor S, Back DJ, *et al.* Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites the fetal compartment (placenta and amniotic fluid). *Antivir Ther.* 2011; **16**: 1139-47.
77. Belmonte L, Baré P, de Bracco MM, *et al.* Reservoirs of HIV replication after successful combined antiretroviral treatment. *Curr Med Chem.* 2003; **10**: 303-12.
78. Chinn LW, Gow JM, Tse MM, Becker SL, Kroetz DL. Interindividual variability in the effect of atazanavir and saquinavir on the expression of lymphocyte P-glycoprotein. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 61-7.

79. Janneh O, Hartkoorn RC, Jones E, *et al.* Cultured CD4T cells and primary human lymphocytes express hOATPs: intracellular accumulation of saquinavir and lopinavir. *Br J Pharmacol* 2008; **155**: 875–83.
80. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* 2009; **1794**: 860–71.
81. Jones K, Bray PG, Khoo SH, *et al.* P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance? *Aids* 2001; **15**: 1353–8.
82. Meaden ER. P-glycoprotein and MRP1 expression and reduced ritonavir and saquinavir accumulation in HIV-infected individuals. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 583–8.
83. Ford J, Cornforth D, Hoggard PG, *et al.* Intracellular and plasma pharmacokinetics of nelfinavir and M8 in HIV-infected patients: relationship with P-glycoprotein expression. *Antivir Ther* 2004; **9**: 77–84.
84. Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, Back DJ. Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *Aids*. 2001; **15**: 675–81.
85. Bilello JA, Bilello PA, Stellrecht K, *et al.* Human serum alpha 1 acid glycoprotein reduces uptake, intracellular concentration, and antiviral activity of A-80987, an inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1491–7.
86. Nascimbeni M, Lamotte C, Peytavin G, Farinotti R, Clavel F. Kinetics of antiviral activity and intracellular pharmacokinetics of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2629–34.
87. Saitoh A, Capparelli E, Aweeka F, *et al.* CYP2C19 Genetic Variants Affect Nelfinavir Pharmacokinetics and Virologic Response in HIV-1–Infected Children Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2010; **54**: 285.
88. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2006; **7**: 154–79.
89. De la Tribonnière X, Broly F, Deuffic-Burban S, *et al.* ABCB1 allele polymorphism is associated with virological efficacy in naïve HIV-infected patients on HAART containing nonboosted PIs but not boosted PIs. *HIV Clin Trials* 2008; **9**: 192–201.
90. van der Sandt IC1, Vos CM, Nabulsi L, *et al.* Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and the in vitro blood–brain barrier. *AIDS*. 2001; **15**: 483–91.

91. Janneh O, Owen A, Chandler B, *et al.* Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP. *Aids* 2005; **19**: 2097–102.
92. Zastre JA, Chan GN, Ronaldson PT, *et al.* Up-regulation of P-glycoprotein by HIV protease inhibitors in a human brain microvessel endothelial cell line. *J Neurosci Res.* 2009; **87**: 1023-36.
93. Anderson PL, Lamba J, Aquilante CL, Schuetz E, Fletcher CV. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **42**: 441–9.
94. Lucia MB, Cauda R, Landay AL, *et al.* Transmembrane P-glycoprotein (P-gp/P-170) in HIV infection: analysis of lymphocyte surface expression and drug-unrelated function. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995; **11**: 893-901..
95. Meaden ER, Hoggard PG, Maher B, *et al.* Expression of P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein in Healthy Volunteers and HIV-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 ; **17**: 1329-32.
96. Lucia MB, Savarino A, Straface E, *et al.* Role of lymphocyte multidrug resistance protein 1 in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; **40**: 257-66.
97. Turriziani O, Gianotti N, Falasca F, *et al.* Expression levels of MDR1, MRP1, MRP4, and MRP5 in peripheral blood. *J Med Virol.* 2008; **80**: 766-71.
98. Hinoshita E, Taguchi K, Inokuchi A, *et al.* Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2001; **35**: 765-73.
99. Janneh O, Owen A, Chandler B, *et al.* Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood. *AIDS.* 2005; **19**: 2097-102.
100. Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, *et al.* Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos.* 2009; **37**: 685-93.
101. Havlir DV, O'Marro SD. Atazanavir new option for treatment of HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2004; **38**: 1599-604.
102. McDonald C, Uy J, Hu W, *et al.* Clinical Significance of Hyperbilirubinemia Among HIV-1–Infected Patients Treated with Atazanavir/Ritonavir Through 96 Weeks in the CASTLE Study. *AIDS Patient Care STDs* 2012; **26**: 259–64.
103. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, *et al.* The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; **333**: 1171–5.

104. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, et al. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet*. 1996; **347**: 578-81.
105. Rotger M, Taffé P, Bleiber G, et al. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis* 2005; **192**: 1381-6.
106. Kapitulnik J. Bilirubin: An Endogenous Product of Heme Degradation with Both Cytotoxic and Cytoprotective Properties. *Mol Pharmacol* 2004; **66**: 773-9.
107. Nso AP, Larru B, Bellón JM, et al. HIV-Infected Adolescents: Relationship Between Atazanavir Plasma Levels and Bilirubin Concentrations. *J Adolesc Health* 2011; **48**: 100-2.
108. Rolan PE. Plasma protein binding displacement interactions—why are they still regarded as clinically important? *Br J Clin Pharmacol* 1994; **37**: 125-8.
109. Khaliq Y, Gallicano K, Tisdale C, et al. Pharmacokinetic interaction between mefloquine and ritonavir in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2001; **51**: 591-600..
110. Howard PA, Ellerbeck EF, Engelman KK, Patterson KL. The nature and frequency of potential warfarin drug interactions that increase the risk of bleeding in patients with atrial fibrillation. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002; **11**: 569-76.
111. Delille CA, Pruetz ST, Marconi VC, et al. Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations. *J Clin Pharmacol*. 2014; **54**: 1063-71.
112. RL Judd, AJ Pesce. Free drug concentrations are constant in serial fractions of plasma ultrafiltrate. *Clin Chem*. 1982; **28**: 1726-7.
113. Whitlam JB, Brown KF. Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *J Pharm Sci*. 1981; **70**: 146-50.
114. Jung D, Mayersohn M, Perrier D. The ' ultra-free ' ultrafiltration technique compared with equilibrium dialysis for determination of unbound thiopental concentrations in serum. *Clin Chem* 1981; **27**: 166-8.
115. Brors O, Sager G, Sandnes D, Jacobsen S. Binding of theophylline in human serum determined by ultrafiltration and equilibrium dialysis. *Br J Clin Pharmacol* 1983; **15**: 393-7.
116. Bertilsson L, Braithwaite R, Tybring G, et al. Techniques for plasma protein binding of demethylchlorimipramine. *Clin Pharmacol Ther*. 1979; **26**: 265-71.
117. Tiula E. A pressure ultrafiltration method for serum free drug determination. Comparison with equilibrium dialysis using normal and uraemic sera. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1984; **6**: 51-5.
118. Dispositifs d'ultrafiltration Centrifree®. 2012 EMD Millipore Corporation. Guide de l'utilisateur.

119. Bousquet-Mélou A, Toutain P. Les interactions impliquant les protéines plasmatiques ne sont plus ce qu'elles étaient. *La Lettre du pharmacologue*. 2012; **26**: 44-50.
120. Yilmaz A, Izadkhashti A, Price RW, *et al*. Darunavir Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Blood in HIV-1–Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**: 457–61.
121. Janneh O, Bray PG, Jones E, *et al*. Concentration-dependent effects and intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 906–16.
122. D’Avolio A, Carcieri C, Cusato J, *et al*. Intracellular accumulation of atazanavir/ritonavir according to plasma concentrations and OATP1B1, ABCB1 and PXR genetic polymorphisms. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3061-6.
123. Ter Heine R, Mulder JW, Van Gorp ECM, Wagenaar JFP, Beijnen JH, Huitema ADR. Intracellular and plasma steady-state pharmacokinetics of raltegravir, darunavir, etravirine and ritonavir in heavily pre-treated HIV-infected patients: Plasma and intracellular pharmacokinetics of new antiretroviral drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2010; **69**: 475–83.
124. Colombo S, Beguin A, Telenti A, *et al*. Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir, efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005; **819**: 259–76.
125. Roucairol C, Azoulay S, Nevers M-C, *et al*. Quantitative Immunoassay To Measure Plasma and Intracellular Atazanavir Levels: Analysis of Drug Accumulation in Cultured T Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 405–11.
126. Homma M, Matsuzaki Y, Inoue Y, *et al*. Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon and ribavirin-induced anemia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; **2**: 337–9.
127. Dasgupta, A. (Ed.). (2012). *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*. Academic Press.
128. Pennings PS. HIV Drug Resistance Problems and Perspectives. *Infect Dis Rep*. 2013; **5**: e5.
129. Chandra RS, Dalvi SS, Karnad PD, *et al*. Compliance monitoring in epileptic patients. *J Assoc Physicians India*. 1993; **41**: 431-2.
130. Mattson RH, Cramer JA, Collins JF Aspects of compliance\_ taking drugs and keeping clinic appointments. *Epilepsy Res Suppl*. 1988; **1**: 111-7.
131. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 201–4.
132. Slaughter RL, Cappelletty DM. Economic impact of aminoglycoside toxicity and its prevention through therapeutic drug monitoring. *Pharmacoeconomics*. 1998; **14**: 385-94.

133. Crist KD, Nahata MC, Ety J. Positive impact of a therapeutic drug-monitoring program on total aminoglycoside dose and cost of hospitalization. *Ther Drug Monit.* 1987; **9**: 306-10.
134. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, *et al.* The new CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4\*22) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2012; **22**: 373-80.
135. Venuto CS, Mollan K, Ma Q, *et al.* Sex differences in atazanavir pharmacokinetics and associations with time to clinical events: AIDS Clinical Trials Group Study A5202. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3300–10.
136. Dumond J, Adams J, Prince H, *et al.* Pharmacokinetics of two common antiretroviral regimens in older HIV-infected patients: a pilot study: PK of ARVs in older patients. *HIV Med* 2013; **14**: 401–9.
137. Dreisbach AW. The Influence of Chronic Renal Failure on Drug Metabolism and Transport. *Clin Pharmacol Ther* 2009; **86**: 553–6.
138. Dreisbach AW, Lertora JJ. The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; **4**: 1065-74.
139. Nolin TD, Frye RF, Le P, *et al.* ESRD Impairs Nonrenal Clearance of Fexofenadine but not Midazolam. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 2269–76.
140. Burk O, Brenner SS, Hofmann U, *et al.* The Impact of Thyroid Disease on the Regulation, Expression, and Function of ABCB1 (MDR1/P Glycoprotein) and Consequences for the Disposition of Digoxin. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **88**: 685–94.
141. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
142. Dickinson L, Boffito M, Back D, *et al.* Population pharmacokinetics of ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients and healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 1233–43.
143. Schipani A, Dickinson L, Boffito M, *et al.* Simultaneous Population Pharmacokinetic Modelling of Atazanavir and Ritonavir in HIV-Infected Adults and Assessment of Different Dose Reduction Strategies: *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; **62**: 60–6.
144. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate Detection of Outliers and Subpopulations With Pmetrics, a Nonparametric and Parametric Pharmacometric Modeling and Simulation Package for R: *Ther Drug Monit* 2012; **34**: 467–76.
145. Croteau D, Rossi SS, Best BM, *et al.* Darunavir is predominantly unbound to protein in cerebrospinal fluid and concentrations exceed the wild-type HIV-1 median 90% inhibitory concentration. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 684–9.

146. Lambert-Niclot S, Peytavin G, Duvivier C, *et al.* Low Frequency of Intermittent HIV-1 Semen Excretion in Patients Treated with Darunavir-Ritonavir at 600/100 Milligrams Twice a Day plus Two Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors or Monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4910–3.
147. Zhang D, Chando TJ, Everett DW, *et al.* In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 1729–39.
148. Annaert P, Ye ZW, Stieger B, Augustijns P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* 2010; **40**: 163–76.
149. Campbell SD, de Morais SM, Xu JJ. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chem Biol Interact* 2004; **150**: 179–87.
150. Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, *et al.* Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects. *Hepatol. Res.* 2004;**30**: 91-95.
151. Janneh O, Anwar T, Jungbauer C, *et al.* P-glycoprotein, multidrug resistance-associated proteins and human organic anion transporting polypeptide influence the intracellular accumulation of atazanavir. *Antivir Ther.* 2009; **14**: 965-74.
152. Nóvoa SR, Barreiro P, Rendón A, *et al.* Plasma levels of atazanavir and the risk of hyperbilirubinemia are predicted by the 3435C→ T polymorphism at the multidrug resistance gene 1. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 291–5.
153. Dickinson L, Jackson A, Garvey L, *et al.* Simultaneous population pharmacokinetic modelling of darunavir and ritonavir Once daily in HIV-infected patients: evaluation of lower ritonavir dose. *J Int AIDS Soc* 2012; **15**.

## Annexes

Tableau 1. : Associations d'antirétroviraux indiquées

2 INTI	INNTI	Niveau preuve	Commentaires
<b>tenofovirDF/ emtricitabine 1 cp/j</b>	efavirenz 600 mg x 1	AI	Disponible en un comprimé/j Surveillance rénale. Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min Efavirenz à ne pas prescrire à des femmes enceintes ou susceptibles de le devenir
<b>tenofovirDF/ emtricitabine 1 cp/j</b>	rilpivirine 25 mg x 1	AI	Disponible en un comprimé/j Surveillance rénale. Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min Uniquement si CV < 5 log copies/mL Précaution si CD4 < 200/mm <sup>3</sup> Prise au cours d'un repas
<b>abacavir/ lamivudine 1 cp/j</b>	efavirenz 600 mg x 1	AI	Efavirenz à ne pas prescrire à des femmes enceintes ou susceptibles de le devenir Uniquement si CV < 5 log copies/mL Uniquement si HLA-B*5701 négatif
2 INTI	IP/r		
<b>tenofovirDF/ emtricitabine 1 cp/j</b>	atazanavir/r 300/100 mg x 1	AI	Surveillance rénale rapprochée. Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min.
<b>tenofovirDF/ emtricitabine 1 cp/j</b>	darunavir/r 800/100 mg x 1	AI	Surveillance rénale rapprochée Précaution si clairance de la créatinine < 80 ml/min.
<b>abacavir/ lamivudine 1 cp/j</b>	atazanavir/r 300/100 mg x 1	AI	Uniquement si CV < 5 log copies/mL Uniquement si HLA-B*5701 négatif

Tableau 2 : interactions pharmacocinétiques pour le Darunavir

Molécule associée	Posologie		n	PK	Moyenne des rapports (IC à 90%) des paramètres pharmacocinétiques du darunavir avec / sans médicament co-administré [aucun effet = 1,00]		
	darunavir/ritonavir				C <sub>max</sub>	ASC	C <sub>min</sub>
<b>Inhibiteur Protéase</b>							
Atazanavir	300mg 1/j	400mg/100mg 2/j	13	↔	1,02 (0,96, 1,09)	1,03 (0,94, 1,12)	1,01 (0,88, 1,16)
Indinavir	800mg 2/j	400mg/100mg 2/j	9	↑	1,11 (0,98, 1,26)	1,24 (1,09, 1,42)	1,44 (1,13, 1,82)
Lopinavir/ritonavir	400/100mg 2/j	300mg/100mg 2/j	9	↓	0,61 (0,51, 0,74)	0,47 (0,40, 0,55)	0,35 (0,29, 0,42)
Saquinavir	1000mg 2/j	400mg/100mg 2/j	14	↓	0,83 (0,75, 0,92)	0,74 (0,63, 0,86)	0,58 (0,47, 0,72)
<b>Autres antirétroviraux</b>							
Efavirenz	600mg 1/j	300mg/100mg 2/j	12	↓	0,85 (0,72, 1,00)	0,87 (0,75, 1,01)	0,69 (0,54, 0,87)
Nevirapine	200mg 2/j	400mg/100mg 2/j	8	↑	1,40 (1,14, 1,73)	1,24 (0,97, 1,57)	1,02 (0,79, 1,32)
Tenofovir disoproxil fumarate	300mg 1/j	300mg/100mg 2/j	12	↑	1,16 (0,94, 1,42)	1,21 (0,95, 1,54)	1,24 (0,90, 1,69)
<b>Autres molécules</b>							
Clarithromycine	500mg 2/j	400mg/100mg 2/j	17	↔	0,83 (0,72, 0,96)	0,87 (0,75, 1,01)	1,01 (0,81, 1,26)
Ketoconazole	200mg 2/j	400mg/100mg 2/j	14	↑	1,21 (1,04, 1,40)	1,42 (1,23, 1,65)	1,73 (1,39, 2,14)
Omeprazole	20mg 1/j	400mg/100mg 2/j	16	↔	1,02 (0,95, 1,09)	1,04 (0,96, 1,13)	1,08 (0,93, 1,25)
Paroxetine	20mg 1/j	400mg/100mg 2/j	16	↔	0,97 (0,92, 1,02)	1,02 (0,95, 1,10)	1,07 (0,96, 1,19)
Ranitidine	150mg 2/j	400mg/100mg 2/j	16	↔	0,96 (0,89, 1,05)	0,95 (0,90, 1,01)	0,94 (0,90, 0,99)
Sertraline	50mg 1/j	400mg/100mg 2/j	13	↔	1,01 (0,89, 1,14)	0,98 (0,84, 1,14)	0,94 (0,76, 1,16)

ASC = aire sous courbe; C<sub>max</sub> = concentration plasmatique maximale; C<sub>min</sub> = concentration plasmatique minimale; n = nombre de sujets; PK = effets sur la pharmacocinétique du DRV; ↑ augmente; ↓ diminue; ↔ non modifié

Molécule associée	Posologie	n	PK	Moyenne des rapports (IC à 90%) des paramètres pharmacocinétiques du darunavir avec / sans médicament co-administré [aucun effet = 1,00]			
				darunavir/ritonavir	C <sub>max</sub>	ASC	C <sub>min</sub>
<b>Inhibiteur Protéase</b>							
<b>Atazanavir</b>	300mg/100mg ritonavir 1/j administré seul; 300mg 1/j administré avec darunavir/ritonavir	400mg/100mg 2/j	13	↔	0,89 (0,78, 1,01)	1,08 (0,94, 1,24)	1,52 (0,99, 2,34)
<b>Indinavir</b>	800mg/100mg ritonavir 2/j administré seul; 800mg 2/j administré avec darunavir/ritonavir	400mg/100mg 2/j	9	↑	1,08 (0,95, 1,22)	1,23 (1,06, 1,42)	2,25 (1,63, 3,10)
<b>Lopinavir/ritonavir</b>	400mg/100mg 2/j	300mg/100mg 2/j	9	↑	1,22 (1,12, 1,32)	1,37 (1,27, 1,49)	1,72 (1,46, 2,03)
<b>Saquinavir</b>	1000mg/100mg ritonavir 2/j administré seul ; 1000mg 2/j administré avec darunavir/ritonavir	400mg/100mg 2/j	12	↔	0,94 (0,78, 1,13)	0,94 (0,76, 1,17)	0,82 (0,52, 1,30)
<b>Autres antirétroviraux</b>							
<b>Efavirenz</b>	600mg 1/j	300mg/100mg 2/j	12	↑	1,15 (0,97, 1,35)	1,21 (1,08, 1,36)	1,17 (1,01, 1,36)
<b>Nevirapine</b>	200mg 2/j	400mg/100mg 2/j	8	↑	1,18 (1,02, 1,37)	1,27 (1,12, 1,44)	1,47 (1,20, 1,82)
<b>TDF</b>	300mg 1/j	300mg/100mg 2/j	12	↑	1,24 (1,08, 1,42)	1,22 (1,10, 1,35)	1,37 (1,19, 1,57)
<b>Autres molécules</b>							
<b>Atorvastatine</b>	40mg 1/j administré seul; 10mg 1/j administré avec darunavir/ritonavir	300mg/100mg 2/j	15	↑	0,56 (0,48, 0,67)	0,85 (0,76, 0,97)	1,81 (1,37, 2,40)
<b>Clarithromycine</b>	500mg 2/j	400mg/100mg 2/j	17	↑	1,26 (1,03, 1,54)	1,57 (1,35, 1,84)	2,74 (2,30, 3,26)
<b>Ketoconazole</b>	200mg 2/j	400mg/100mg 2/j	15	↑	2,11 (1,81, 2,44)	3,12 (2,65, 3,68)	9,68 (6,44, 14,55)

ASC = aire sous courbe; C<sub>max</sub> = concentration plasmatique maximale; C<sub>min</sub> = concentration plasmatique minimale; n = nombre de sujets; PK = effets sur la pharmacocinétique du DRV; ↑ augmente; ↓ diminue; ↔ non modifié

Molécule associée	Posologie	darunavir/ritonavir	n	PK	Moyenne des rapports (IC à 90%) des paramètres pharmacocinétiques du darunavir avec / sans médicament co-administré [aucun effet = 1,00]		
					C <sub>max</sub>	ASC	C <sub>min</sub>
<b>Autres molécules</b>							
<b>Paroxetine</b>	20mg 1/j	400mg/100mg 2/j	16	↓	0,64 (0,59, 0,71)	0,61 (0,56, 0,66)	0,63 (0,55, 0,73)
<b>Pravastatine</b>	40mg	600mg/100mg 2/j	14	↑	1,63 (0,95, 2,82)	1,81 (1,23, 2,66)	NA
<b>Sertraline</b>	50mg 1/j	400mg/100mg 2/j	13	↓	0,56 (0,49, 0,63)	0,51 (0,46, 0,58)	0,51 (0,45, 0,57)
<b>Sildenafil</b>	100mg administré seul; 25mg administré avec darunavir/ritonavir	400mg/100mg 2/j	16	↑	0,62 (0,55, 0,70)	0,97 (0,86, 1,09)	NA

ASC = aire sous courbe; C<sub>max</sub> = concentration plasmatique maximale; C<sub>min</sub> = concentration plasmatique minimale;  
n = nombre de sujets; PK = effets sur la pharmacocinétique du DRV; ↑ augmente; ↓ diminue; ↔ non modifié

Tableau 3 : Interactions avec l'Atazanavir

Molécule co-administrée	Effet sur le ratio ASC de l'Atazanavir <sup>b</sup>	Médicament co-administré <sup>b</sup>
<b>Amprenavir</b>	↓	↔
<b>Efavirenz</b>	↓ 74% (0,26 [0,22, 0,32])	↔
<b>Efavirenz/ritonavir</b>	↑ 39% (1,39 [1,02, 1,88]) atazanavir 300/ritonavir 100mg 1/j	↔
<b>Ritonavir</b>	↑ 3-fois (3,38 [3,13, 3,63])	↔
<b>Saquinavir (SGC)<sup>b</sup></b>	↔	↑ 5-fold (5,49 [4,04, 7,47])
<b>Didanosine et stavudine</b>	↓ 87% (0,13 [0,08, 0,21])	↔Didanosine (0,98 [0,92, 1,05]) ↔Stavudine (1,00 [0,97, 1,03])
<b>Didanosine et stavudine 1 heure avant atazanavir</b>	↔ (1,03 [0,64, 1,67])	↔
<b>Didanosine gastro-résistant</b>	↓ 10% (0,89 [0,83, 0,96])	↑ 25% (1,26 [1,15, 1,37]) – didanosine 500mg + atazanavir + repas vs atazanavir à jeun
<b>Tenofovir</b>	↓ 25% (0,75 [0,70, 0,81])	↑ 25% (1,24 [1,21, 1,28])
	↓ 25% (0,75 [0,58, 0,97]) atazanavir 300/ritonavir 100mg 1/j	Non déterminé, atazanavir 300/ritonavir 100mg 1/j
<b>Clarithromycine</b>	↑ 25% (1,28 [1,16, 1,43])	↑ 2-fold (1,94 [1,75, 2,16]) ↓ 70% (0,30 [0,26, 0,34]) – hydroxyclearithromycine
<b>Rifabutine</b>	↔ (1,15 [0,98, 1,34])	↑ 2-fold (2,10 [1,57, 2,79]) ↑ 22-fold (22,01 [15,97, 30,34]) – 25-O- desacetyl rifabutine
<b>Diltiazem</b>	↔ (1,00 [0,95, 1,05])	↑ 2-fold (2,25 [2,09, 2,16]) ↑ 2,5-fold (2,65 [2,45, 2,87]) – desacetyl diltiazem
<b>Ethinylestradiol</b>	NR	↑ 1,5-fold (1,48 [1,31, 1,68])
<b>Norethisterone</b>	NR	↑ 2-fold (2,10 [1,68, 2,62])

a Les valeurs sont exprimées en (ASC ratio [90% CI]), b Dose d'Atazanavir 400mg 1/j  
ASC = aire sous courbe; NR = non reproté; ↑ augmente; ↓ diminue; ↔ non modifié

**RESUME en français**

La concentration libre ( $C_u$ ), forme pharmacologiquement active de la molécule, est un potentiel marqueur pharmacocinétique permettant d'améliorer le Suivi Thérapeutique Pharmacologique standard, basé sur les concentrations totales ( $C_t$ ) résiduelles, de deux inhibiteurs de la protéase du VIH, l'Atazanavir et le Darunavir. La  $C_u$  et la  $C_t$  ont été mesurées par chromatographie liquide avec un détecteur UV. Des modèles de pharmacocinétiques de population ont permis l'estimation des concentrations libres et totales résiduelles. A partir de ces résultats, nous avons étudié les relations (i) pharmacocinétiques, permettant d'explorer la variabilité de la fraction libre et de la  $C_u$  et (ii) pharmacocinétiques-pharmacodynamiques, pour explorer l'efficacité grâce à la charge virale et les hyperbilirubinémies sous ATV. La  $C_u$ ,  $C_t$  et la  $f_u$  ont présenté une importante variabilité inter-individuelle. Etonnamment, les patients à charge virale positive sous DRV avaient des  $f_u$  et  $C_u$  plus élevées. Les hyperbilirubinémies ne sont pas expliquées par les concentrations libres ou totales.

---

**Titre et résumé en Anglais : Evaluation of the plasma unbound fraction of Darunavir and Atazanavir in HIV patients**

Plasma unbound concentration ( $C_u$ ), the pharmacological active form of a drug, could be a pharmacokinetic alternative to improve the standardized therapeutic drug monitoring (TDM) of two HIV protease inhibitors, Atazanavir (ATV) and Darunavir (DRV), based on plasma total trough concentration.  $C_u$  and  $C_t$  were measured by liquid chromatography with UV detection. Population pharmacokinetic models allowed the estimation of unbound and total trough concentrations. From these results, we studied (i) pharmacokinetic relationships, to explore the variability in free fraction and  $C_u$  and (ii) pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships, to explore the efficiency, according patients viral load, and hyperbilirubinemia with ATV.  $C_u$ ,  $C_t$  and  $f_u$  showed, for both molecules, a large inter-individual variability. Surprisingly, patients with virologic failure under DRV had higher  $f_u$  and  $C_u$ . Neither ATV total nor unbound concentrations could explain hyperbilirubinemia.

---

**DISCIPLINE administrative : Pharmacologie - Pharmacocinétique**

---

**MOTS-CLES :**

**Atazanavir – Darunavir – fraction libre plasmatique – Suivi Thérapeutique Pharmacologique – liaison protéique**

---

**LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE CLINIQUE  
INSTITUT FEDERATIF DE BIOLOGIE, CHU PURPAN  
330 AVENUE DE GRANDE BRETAGNE  
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE CEDEX 9**

**Directeur de thèse : Docteur GANDIA-MAILLY Peggy**