Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

David METSU

Le 22 février 2019

Intérêt de l'exploration de la forme libre du Dolutegravir, du Darunavir et de l'Atazanavir chez les patients VIH.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :
ITCO - Laboratoire d'Individualisation des Traitements des Cancers Ovariens et ORL

Thèse dirigée par
Peggy GANDIA et Pierre DELOBEL

Jury

M. Saïk URIEN, Rapporteur
M. Bruno LACARELLE, Rapporteur
M. Etienne CHATELUT, Examinateur
M. Jean Baptiste WOILLARD, Examinateur
Mme Peggy GANDIA, Directrice de thèse
M. Pierre DELOBEL, Co-directeur de thèse

Table des matières

Université Toulouse III - Paul Sabatier 1

Intérêt de l'exploration de la forme libre du Dolutegravir, du Darunavir et de l'Atazanavir chez les patients VIH. 1

Table des illustrations 5

Liste des tableaux 6

Introduction 14

VIH, pharmacologie des antirétroviraux et forme libre : données bibliographiques. 17

I. Caractéristiques virologiques du VIH 18

A. Modes de transmission et premières étapes de la primo-infection 19

B. Réserve et latence – Notion de réservoir 19

C. Localisations anatomiques - Notion de compartiment 20

1. Tissus lymphoïdes associés à la muqueuse gastro-intestinale 21

2. Ganglions 22

3. Système nerveux central 23

4. Tissus génitaux 24

D. Echecs virologiques 26

1. Définition 26

2. Mutations de résistance et pression de sélection 26

E. Evaluation phénotypique de l'efficacité des antirétroviraux sur le virus 28

II. Stratégies thérapeutiques en 2018 30

A. Objectifs prise en charge VIH(59) 30

B. Epidémiologie(69) 31

C. Stratégies thérapeutiques de première intention 32

D. Stratégies d'allègement thérapeutique 35

III. Les antirétroviraux d'intérêt 36

A. Dolutegravir 36

1. Place dans la classe thérapeutique et la stratégie actuelle existants 36

2. Mécanisme d'action 37

3. Evaluation de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation lors des essais cliniques 37

4. Pharmacocinétique 37
5. Diffusion du DTG dans les tissus 40
6. Pharmacocinétique du DTG dans les populations particulières 42
7. Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques 43
8. Interactions médicamenteuses 45
B. Inhibiteurs de protéase 45
1. Place dans la classe thérapeutique et la stratégie actuelle 45
2. Mécanisme d'action 46
3. Darunavir 46
4. Atazanavir 51
5. Interactions associées aux inhibiteurs de protéase 55
IV. Forme libre et forme totale 57
A. Notions de fraction libre 57
B. Intérêts pharmacocinétiques et pharmacodynamiques 59
C. Méthodes de mesure de la concentration 61
1. Méthode de mesure des concentrations libres et totales 62
2. Dialyse à l'équilibre(13) 62
3. Ultrafiltration(13) 64
D. Protéines de transport plasmatique 66
1. Albumine 67
2. Alpha-1-glycoprotéine acide 68
V. Pharmacocinétique de Population 70
A. Introduction à la pharmacocinétique de population 70
B. Le recueil des données 71
C. Les modèles 72
1. Le modèle structurel 72
2. Le modèle statistique 72
3. Le modèle de covariables 73
D. L'évaluation des modèles 73
E. Utilisation d'un modèle de PKPOP 74
F. Les approches paramétriques et non paramétriques 74
Objectifs de l'étude 76
Résultats expérimentaux 77

Discussion 92
I. Validation des méthodes analytiques 92
A. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse 92
B. Dialyse à l'équilibre 93
C. Validation des conditions d'ultrafiltration 94
II. Etude de la liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques 98
A. Facteurs de variabilité à la liaison *in vitro* 98
B. Etude de la liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques 102
III. Exploration de la forme libre du DRV chez les patients VIH : apports du modèle de pharmacocinétique de population. 103
A. Construction du modèle de pharmacocinétique de population et apport de la combinaison des formes libres et totales dans la mise au point 103
B. Application pratique à partir de simulations dans un *what if scenario* 106
IV. Conclusions et perspectives 109
V. Références bibliographiques 111
VI. Annexes 133
A. Partie bibliographique 133
B. Articles et résumés 140
1. Première partie : étude de la forme libre par dialyse à l'équilibre, associée à une méthode de chromatographie liquide couplée à spectromètre de masse. 140
2. Deuxième partie : développement de l'étude de la forme libre par ultrafiltration et de la contre-validation face à la dialyse à l'équilibre 155
3. Troisième partie : détermination *in vitro* des interactions portant sur les sites de liaison. 169
4. Quatrième partie : intérêts de la forme libre dans le suivi thérapeutique pharmacologique des antirétroviraux chez des patients VIH 172
5. Cinquième partie : Etude (i) des relations entre les concentrations libres et totales de DRV chez des patients VIH par une approche de pharmacocinétique de population et (ii) de l'exposition du DRV dans le compartiment liquide cérébro-spinal par des simulations de Monte-Carlo. 187

Table des illustrations

Figure 1 : Communications entre les différents fluides intracrâniens. 24

Figure 2 Pression de sélection des virus résistants en fonction de l'efficience relative de la concentration.. 28

Figure 3: Représentation de la méthode de la dialyse à l'équilibre(189) 64

Figure 4 Principes du phénomène d'ultrafiltration. 64

Figure 5 : Simulation des concentrations libres dans le LCS avec un ratio LCS/plasma de 8,5% (a) et de 4% (b)..... 90

Figure 6 : Interaction sur un site de liaison, associé à un déplacement de la substance, sur les valeurs de fraction libre et de concentrations libres et totales..... 100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stratégies thérapeutiques recommandées en 2018 à l'initiation d'un traitement antirétroviral suite au diagnostic d'une infection au VIH 33

Tableau 2 : Caractéristiques des deux substances pouvant orienter le choix du troisième agent en fonction du contexte virologique et des spécificités physiopathologiques ou thérapeutiques du patient. 34

Tableau 3: f_u déterminées à l'aide de la dialyse à l'équilibre et de l'ultrafiltration pour différentes températures..... 66

Tableau 4 : Résultats de la validation analytique. CV : coefficient de variation. 78

Tableau 5 : Résultats complémentaires sur la validation analytique de la concentration totale. 78

Tableau 6 : Etude de la liaison aux protéines plasmatiques pour les trois antirétroviraux. 78

Tableau 7: Résultats des concentrations libres, totales et de fraction libre.. 79

Tableau 8 : Influence de la température sur la f_u déterminée par DE et comparaison de l'UF à la DE..81

Tableau 9 : Fractions libres moyennes du DTG, du DRV et de l'ATV lors des études d'interaction avec d'autres antirétroviraux. 83

Tableau 10: Valeur issues des estimations des paramètres de liaison. 84

Tableau 11 : Pourcentage de patients atteignant des concentrations libres dans le LCS supérieures aux $IC_{50/90}$ pendant toute la durée de l'interdose..... 91

Tableau 12 Annexe 1-2 : principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur le Dolutegravir 134

Tableau 13 Annexe 1-3 : principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur le Darunavir. 136

Tableau 14 Annexe 1-4 : principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur l'Atazanavir. 137

Tableau 15 Annexe 1-1 : tableau des interactions impliquant les inhibiteurs de protéase. Les variations d'expositions sont celles de concentrations totales. 139

Résumé

Le suivi thérapeutique pharmacologique des antirétroviraux du VIH est actuellement basé sur le suivi des concentrations totales. Des relations entre les concentrations totales des antirétroviraux et leur efficacité ont été mises en évidence dans plusieurs études. Cependant, certains échecs virologiques ne sont pas expliqués par la concentration totale. Il existe donc un intérêt à rechercher un autre marqueur d'exposition pour expliquer ces situations d'échec virologique.

La concentration libre, non liée aux protéines plasmatiques, est considérée comme la forme pharmacologiquement active. Elle est capable de diffuser dans les tissus et de traverser les membranes des cellules pour exercer une activité pharmacologique. Le dolutegravir, le darunavir et l'atazanavir sont fortement liés (supérieur à 85%) aux protéines plasmatiques. Ainsi, seule une faible proportion de concentration libre est disponible pour exercer une activité pharmacodynamique. Il est donc possible qu'une variabilité de la concentration libre, non perçue avec la concentration totale, puisse expliquer une différence d'efficacité entre des patients présentant des concentrations totales identiques. A ce jour, peu d'études ont explorées la forme libre des antirétroviraux, aussi bien d'un point de vue technique que d'un point de vue pharmacocinétique.

Ainsi, les objectifs de l'étude de la forme libre des trois antirétroviraux ont été construits en quatre étapes successives :

(i) valider une méthode de séparation de la forme libre de la forme liée et une méthode de dosage assurant une évaluation fiable des concentrations libres et totales

(ii) comparer les techniques de dialyse à l'équilibre et d'ultrafiltration, en déterminant les conditions analytiques garantissant des résultats comparables entre les deux techniques

(iii) étudier les caractéristiques des liaisons des antirétroviraux aux protéines plasmatique

(iv) étudier les relations entre les concentrations libres et totales chez les patients VIH par une méthode de pharmacocinétique de population

Nous avons d'abord exploré les étapes pré-analytiques susceptibles d'interférer sur la liaison antirétroviral-protéine par dialyse à l'équilibre. Ainsi, nous avons démontré que les liaisons des antirétroviraux aux protéines plasmatiques n'étaient pas sensibles aux conditions pré-analytiques (*Metsu et al Clinica Chimica Acta 2018*).

Nous avons ensuite établit les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats identiques à ceux de la dialyse à l'équilibre. Dans cette seconde partie, nous avons pu démontrer que les facteurs d'ultrafiltration peuvent considérablement modifier les résultats d'ultrafiltration (*Metsu et al soumis dans Scientific Reports*).

Nous avons également exploré les facteurs de variabilité de la liaison protéique (*Metsu et al IWCPAT 2017*). Ce travail a ainsi révélé une sensibilité du dolutegravir aux interactions de compétition sur la liaison protéique avec d'autres substances fortement liées à l'albumine. Les liaisons du darunavir et de l'atazanavir n'étaient pas impactées par les interactions. A partir de données forme librede la littérature et de variations des concentrations en protéines plasmatiques, nous avons proposé des recommandations posologiques pour l'atazanavir et le darunavir chez les femmes enceintes (*Metsu et al Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2017*).

Des travaux de pharmacocinétique de population, combinant les mesures de concentrations libres et totales chez des patients VIH, ont ensuite été menés. Le premier modèle a été construit à partir des données du darunavir. Dans ce travail, un IMC élevé s'est révélé être une covariable explicative majeure dans la pharmacocinétique du darunavir, en expliquant une variabilité inter-individuelle de la clairance intrinsèque et de la constante de dissociation (*Metsu et al IWCPAT 2018*). A partir de ce modèle et de données de la littérature, nous avons montré, avec des simulations de Monte-Carlo que les patients à IMC élevé avaient une exposition de darunavir libre dans liquide cérébros-spinal inférieure aux autres patients.

Remerciements

J'adresse mes remerciements en premier lieu à Madame le Professeur Peggy Gandia. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur la forme libre des antirétroviraux, sujet qui me passionne maintenant depuis six ans. Vous avez su transformer un novice en pharmacologie en un pharmacocinéticien avec des bases robustes permettant d'appréhender les différents profils pharmacocinétiques des médicaments. Mais il me reste encore beaucoup à apprendre. Le parcours que vous m'avez proposé m'a permis de construire ma pratique professionnelle de façon cohérente : l'ancrage dans la recherche mise au service de la pratique hospitalière.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance et ma grande estime à Monsieur le Professeur Pierre Delobel. Pour votre patience, votre disponibilité mais aussi pour votre passion communicante dans le monde du VIH. J'ai été honoré de travailler avec vous sur cette thématique. Je suis admiratif de l'étendue de vos connaissances dans ce domaine, allant de la pharmacologie à l'immunologie et la virologie mais surtout de la pédagogie et la simplicité avec laquelle vous arrivez à délivrer votre message, et ce, quel que soit votre interlocuteur.

Ce travail a été rendu possible par l'accueil initiatique de Monsieur le Professeur Etienne Chatelut dans son équipe au CRCT. Je vous en remercie sincèrement. Je vous suis reconnaissant pour les premiers échanges qui m'ont permis d'appréhender la thématique de la fraction libre.

Je souhaite remercier le Professeur Alain Bousquet-Mélou pour son accueil dans l'équipe de recherche INTHERES à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Je tiens à témoigner ma très grande reconnaissance et mon estime pour Messieurs les Professeurs Didier Concordet et Pierre-Louis Toutain. Votre expertise, votre analyse et votre rigueur dans les domaines de la modélisation et de la pharmacocinétique ont grandement contribué à la réalisation de ces travaux. Je vous remercie sincèrement pour tout le temps consacré à ces travaux ainsi que pour votre savoir que vous avez si bien partagé. Merci aussi à Madame le Professeur Véronique Gayrard. J'ai eu la chance de bénéficier de vos connaissances sur l'étude de la liaison des substances aux protéines.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire de pharmacocinétique et toxicologie, en particulier les Docteurs Michel Lavit et Thomas Lanot pour leur aide dans la partie analytique de ce travail. Je souhaite également adresser mes remerciements à tous les membres de l'équipe technique du laboratoire, et en particulier à Monsieur Patrick Seraissol, qui m'a initié aux essais en chromatographie. Votre expertise m'a été précieuse pour mener à bien ce travail.

J'adresse tous mes remerciements au Docteur Jean Baptiste Woillard. C'est avec vous que j'ai démarré les travaux de pharmacocinétique de population, même si l'approche non paramétrique n'est peut-être pas été la plus évidente. J'ai été honoré d'apprendre à vos côtés. Votre gentillesse, votre disponibilité et vos connaissances ont rendu l'apprentissage ludique et efficient.

J'exprime toute ma gratitude aux rapporteurs de ce travail, Monsieur le Professeur Bruno Lacarelle et Monsieur le Docteur Saïk Urien. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de le juger. Vos conseils sur la forme libre m'ont permis d'améliorer nettement la qualité de ce manuscrit.

Je remercie sincèrement les membres des services de maladies infectieuses du CHU de Toulouse, mais aussi des centres hospitaliers de Rodez, Cahors, Auch, Albi et Tarbes ainsi que les médecins du CeGGID sans oublier les service de gynécologie-obstétrique et de pédiatrie. Merci pour la richesse de ces échanges sur les problématiques cliniques du suivi des patients VIH qui ont contribué à enrichir ces années de travaux de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du laboratoire de virologie de Monsieur le Professeur Izopet. L'interactivité et la disponibilité des biologistes du laboratoire de virologie m'ont permis d'élargir mes connaissances dans le domaine du VIH. Je souhaite également remercier les équipes des laboratoires de biochimie de Monsieur le Professeur Perret et d'hématologie de Monsieur le Professeur Sié qui m'ont permis d'enrichir et d'approfondir l'analyse des données de fraction libre.

Merci aux étudiants en master qui m'ont accompagné lors des longs essais de dialyse à l'équilibre.

Enfin merci à tous mes amis pour leur soutien. Ceux rencontrés dans l' enfance, pendant mes années à la faculté de pharmacie dans le sud, mais aussi à ceux dont j'ai fait la connaissance depuis ma nouvelle vie dans le sud-ouest.

A Camille, merci pour ton soutien inconditionnel et ton amour

A notre Junior-e, bientôt parmi nous

A mes parents

Liste des abréviations

AAG : Alpha-1-glycoprotéine acide

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIC : *Akaike information criterion*

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Aire sous courbe

ATV : Atazanavir

bid: *bis in die*

B_{max}: Nombre de sites de liaison aux protéines plasmatiques

C_a : Concentration artérielle

C_b: Concentration liée

CL_h: Clairance hépatique

CL_{int}: Clairance intrinsèque

Cl_{int}/F: Clairance intrinsèque apparente

CL_t: Clairance totale

CL_u: Clairance libre

C_{max}: Concentration maximale

C_{min}: Concentration minimale (ou « résiduelle »)

C_t: Concentration totale

C_u: Concentration libre

CV: Charge virale – coefficient de variation

C_v: Concentration veineuse

CYP: Cytochrome P450

DE: Dialyse à l'équilibre

DRV: Darunavir

DTG : dolutegravir

E_h: Coefficient d'extraction hépatique

EMA: *European medicine agency*

ETV: Etravirine

FDA: *Food and drug administration*

f_u : *Unbound fraction*

GALT: *Gut associated lymphoid tissue*

hBCRP: *Human breast cancer resistance protein*

HLA *Human leukocyte antigen*

LC-MS *Liquid chromatography with mass spectrometry detector*

HPLC-UV : *High performance liquide chromatography with UV detector*

IC_{50}: Concentration inhibitrice 50

IC_{90}: Concentration inhibitrice 90

IMC: Indice de masse corporelle

INTI: Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

K_a Constante d'affinité

K_d Constante de dissociation

LAPK : *Laboratory of Applied Pharmacokinetics*

LCS: Liquide cérébro-spinal

LCV: liquide cervico-vaginal

LDL: *Low densitiy lipoprotein*

LTCD4: Lymphocytes T CD4+

LTCD8: Lymphocytes T CD8+

MRP-2: *multidrug resistance– associated protein* 2

OAT: *Organic anion transporter*

OATP: *Organic anion transporting polypeptide*

OCT: *Organic cation transporter*

P-gp: *P-glycoprotein*

PK: *Pharmacokinetic*

PK-PD: *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic*

PKPOP: *Population pharmacokinetic*

PVVIH: Personne vivant avec le VIH

PXR: *Pregnan X receptor*

qd: *Quaque die*

Q_h: Débit hépatique

RAL: Raltegravir

RPV: Rilpivirine

RT-PCR : *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SIDA: Syndrome d'immunodéfience acquise

SNC: Système nerveux central

STP: Suivi thérapeutique pharmacologique

T_{max}: Temps d'atteinte de la concentration maximale

UF: Ultrafiltration

UGT: *UDP-glycosyltransferase*

VE: Vitesse d'entrée

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VPC: *Visual Predictive Check*

VS: Vitesse de sortie

Introduction

Le Dolutegravir (DTG), le Darunavir (DRV) et l'Atazanavir (ATV) sont des antirétroviraux utilisés dans les stratégies thérapeutiques du traitement du virus de l'immmunodéficience humaine (VIH)(1,2). Ils sont combinés à des inhibiteurs nucléos(t)idiques en trithérapie ou en stratégie d'allègement lorsque l'infection est contrôlée(1,2).

Dans certaines circonstances, comme l'échec virologique, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est recommandé pour déterminer l'origine de l'échec(3). Des seuils d'efficacité ont été établis pour les concentrations totales (équivalent à la somme des formes liées et libres) plasmatiques minimales(3). Toutefois, des échecs virologiques sont observés chez des patients en dépit de niveaux de concentrations totales considérés comme efficaces et identiques à ceux de patients en situation de succès virologique(4–7).

Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la pertinence d'un STP basé sur des concentrations totales dans ces situations d'échec virologique et l'existence d'un autre marqueur d'exposition pour évaluer l'efficacité des trois antirétroviraux.

Les trois substances sont présentes dans le plasma sous deux formes. L'une liée à des protéines plasmatiques, comme l'albumine ou l'alpha-1-glycoprotéine acide (AAG). L'autre forme circulant librement dans le plasma. Cette dernière, appelée la forme libre, est considérée comme la forme pharmacologiquement active(8). En effet, c'est la forme capable de diffuser dans les tissus et de traverser les membranes cellulaires pour exercer une activité pharmacologique. La concentration libre représente donc la quantité d'antirétroviral capable de se distribuer dans les tissus, comme les sanctuaires anatomiques où se réplique le virus. Ces sanctuaires correspondent par exemple au système nerveux central, aux ganglions et aux tissus génitaux et digestifs(9). Le DTG (lié à 99%), le DRV (lié à 95%) et l'ATV (lié à >85%) sont des substances fortement liées aux protéines plasmatiques, comme l'albumine (DTG) et l'AAG (DRV, ATV)(10–12). Seule une faible quantité de substance est donc disponible pour diffuser dans les tissus et exercer l'activité antirétrovirale. Cette caractéristique, commune aux trois substances, conduit à l'hypothèse suivante : une variation de la concentration libre, imperceptible par la mesure de concentration totale, est susceptible de conduire à une modification de l'effet pharmacodynamique. Des différences d'efficacité entre des patients

présentant des concentrations totales similaires pourraient ainsi être expliquées par une variabilité inter-individuelle de la concentration libre.

Bien que la forme libre soit pharmacologiquement active, cette dernière est peu explorée dans l'étude des relations pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD). Ce désintérêt peut s'expliquer par la lourdeur de la validation pré-analytique et analytique nécessaire pour mesurer la concentration libre(13,14). De fait, peu de données sur la forme libre des trois antirétroviraux sont disponibles. Les études ayant exploré la forme libre se sont majoritairement appuyées sur une méthode rapide et facilement accessible, l'ultrafiltration (UF)(15). Cette méthode souffre néanmoins de défauts techniques, pouvant conduire à une importante variabilité des résultats(13,15). Une autre méthode est disponible pour explorer la forme libre, la dialyse à l'équilibre (DE). En évaluant la liaison à l'équilibre, avec peu d'interférences analytique (*e.g.* liaisons non spécifiques), la DE est considérée comme la méthode de référence(13). Elle est toutefois délaissée en raison du temps nécessaires pour atteindre l'équilibre, considérée comme longue comparée à l'UF (de l'ordre de plusieurs heures pour la DE contre quelques minutes pour l'UF)(13). Pour une analyse fiable des résultats de forme libre, il est donc préférable de valider la technique d'UF face à la méthode de référence, la DE.

L'interprétation des variations des formes libres et totales est parfois erronée et peut dans certaines situations conduire à des adaptations de posologies injustifiées (16). Ainsi, les concentrations libres et totales à l'équilibre vont toutes les deux dépendre de la dose administrée et de l'élimination de la substance. En revanche, seule la concentration totale va dépendre des paramètres de liaison aux protéines plasmatiques, à savoir le nombre de sites de liaison et l'affinité de la liaison(17). Ces deux paramètres sont donc susceptibles d'entraîner une variation sur les concentrations totales, sans modifier les valeurs de concentrations libres. Dans ce cas, on peut parler d'une « désynchronisation » ou d'une divergence de variations entre les formes libres et totales(17). Cette désynchronisation peut conduire à une erreur d'interprétation de l'évolution des concentrations totales. Elle pourrait également expliquer des échecs virologiques observés en dépit de concentrations totales considérées comme efficaces (4–7).

Nous proposons ainsi dans nos travaux une exploration des formes libres du DTG, du DRV et de l'ATV. L'objectif de cette étude est de confirmer une hypothèse pharmacologique, basée sur l'étude de la forme libre, pour expliquer des échecs virologiques non expliqués par la concentration totale.

Peu de données décrivant les méthodes permettant d'isoler la forme libre des trois substances étaient disponibles. Dans un premier temps, il a donc été nécessaire de développer des méthodes de dosage des formes libres et totales pour les trois substances. L'étape analytique achevée, nous avons étudié plus spécifiquement la liaison des trois antirétroviraux. Pour finir, nous avons initié des travaux de pharmacocinétique de population pour décrire et expliquer les divergences de variations entre les formes libres et totales. Ces études de pharmacocinétiques de populations ont également servi à prédire des profils de concentrations libres au cours du temps, et expliquer certains échecs virologiques.

Ainsi, pour remplir l'objectif fixé dans nos travaux, nous avons conduit nos travaux en trois étapes successives :

(i) un développement analytique pour isoler la forme libre et mesurer les concentrations libres et totales des trois antirétroviraux

(ii) l'étude de la liaison entre les antirétroviraux et les protéines plasmatiques

(iii) le développement d'un modèle de pharmacocinétique de population, combinant des mesures de concentrations libres et totales. Le modèle construit est capable de décrire une désynchronisation entre les concentrations libres et totales et de prédire des profils de concentrations libres.

VIH, pharmacologie des antirétroviraux et forme libre : données bibliographiques.

Les données bibliographiques regroupent les informations virologiques, thérapeutiques, pharmacologiques et méthodologiques nécessaires pour interpréter ou justifier les choix de nos travaux.

Les caractéristiques du VIH et les notions de réservoirs, de compartiments et de sanctuaires sont abordées en premier lieu. Le réservoir viral correspond à une population de lymphocytes TCD4 quiescents, infectée par le VIH et contenant un provirus, intégré dans le génome de la cellule et, ayant conservé la capacité de se répliquer. Les compartiments sont des tissus où se multiplient localement les virus, sans échange avec les populations virales d'autres tissus. Enfin, les sanctuaires sont des sites anatomiques où l'exposition en forme libre de l'antirétroviral est considérée comme suboptimale (*e.g.* par la présence d'une barrière anatomique). Les sancutaires et les compartiments sont souvent des sites anatomiques identiques. Pour la suite du manuscrit, les deux termes seront confondus et dénomés compartiments (9,18). Ainsi, les antirétroviraux doivent atteindre ces tissus et compartiments pour inhiber la réplication virale. Ainsi, des concentrations insuffisantes d'antirétroviraux dans les compartiments peuvent être à l'origine d'échecs virologiques. Pour évaluer l'efficacité des traitements, les concentrations des antirétroviraux dans les compartiments sont comparées à des concentrations inhibitrices obtenues *in* vitro (19).

Les stratégies thérapeutiques et l'épidémiologie de l'infection sont ensuite abordées. Ce chapitre montre la place des trois antirétroviraux dans les stratégies actuelles (en 2018) d'initiation, de renforcement ou d'allègement thérapeutique(1,2). La partie épidémiologique s'intéresse elle aux co-morbidités et aux co-prescriptions fréquemment observées, liées au vieillissement des patients, et susceptibles d'influencer la pharmacocinétique des antirétroviraux.

Les caractéristiques pharmacocinétiques des trois antirétroviraux sont ensuite détaillées. Ce chapitre précise en particulier les profils de diffusion des trois substances dans les tissus et l'étude de la forme libre dans certaines sous-populations de patients VIH. Ainsi, chez certaines sous-populations de patients, des études ont observés des cas « désynchronisation » entre les formes libres et totales. Ces situations peuvent ainsi expliquer les limites du suivi thérapeutique pharmacologique basé uniquement sur les mesures de concentrations totales.

Les différents aspects d'interprétation et de mesure des formes libres et totales sont ensuite abordés. Le détail des relations existant entre les concentrations, libres et totales, et les paramètres pharmacocinétiques, comme la clairance ou l'affinité de liaison aux protéines plasmatiques, aide à comprendre les situations susceptibles de conduire à une désynchronisation entre les formes libres et totales. Ces cas de désynchronisation pouvant être liés par exemple à des caractéristiques des protéines de transport plasmatiques, albumine et alpha-1-glycoprotéines acide.

La pharmacocinétique de population peut être un outil d'intérêt pour étudier la relation entre les formes libres et totales. Les modèles de pharmacocinétiques de populations sont également utiles pour prédire des profils de concentrations. Nous abordons dans ce dernier chapitre les caractéristiques de la construction d'un modèle, notamment l'approche non paramétrique, utilisée dans nos travaux.

I. Caractéristiques virologiques du VIH

L'objectif du chapitre est de prendre connaissance des étapes de la réplication virale et sa localisation dans l'organisme. Le VIH se multiplie dans des cellules cibles de l'immunité, principalement les lymphocytes TCD4+ (LTCD4)(20). Certaines de ces cellules, des LTCD4 mémoires, ont la capacité d'entrer dans une phase de quiescence. Les cellules infectées (comprenant un provirus capable de se répliquer), lorsqu'elles sont stimulées, peuvent conduire à des réplications virales à distance. Lors de cette phase de quiescence cellulaire, les antirétroviraux sont inactifs sur le virus, celui-ci ne se répliquant pas(9). Certains de ces LTCD4 mémoires ont la capacité de rester quiescents pendant une longue période (mois, années). Même après cette période de quiescence, lors de la reprise d'une prolifération cellulaire, les provirus sont toujours capables de se répliquer et de produire des virions infectant d'autres cellules cibles. Cette caractéristique du VIH rend obligatoire la prise chronique d'un traitement antirétroviral et correspond à la latence du virus. Par ailleurs, la réplication virale peut être contingentée dans certains tissus, les virus infectant uniquement les cellules cibles (*e.g.* LTCD4) présentes dans ce tissu. Ces tissus sont appelés des compartiments et sont isolés les uns des autres en termes d'infection virale. Chaque compartiment présente une sous-population virale qui lui est propre. Cette infection « localisée » découle de caractéristiques immunologiques (tissu digestif, ganglions) ou anatomiques, avec l'existence de barrières (système nerveux central, tissus génitaux masculins notamment mais aussi tissu digestif et ganglions).

A. Modes de transmission et premières étapes de la primo-infection

La majorité des cas de transmissions du VIH fait suite à un rapport sexuel non protégé entre deux partenaires sérodiscordants (partenaires vivant/ne vivant pas avec le VIH). D'autres modes de transmission existent, comme la transmission materno-fœtale ou la transmission sanguine(21).

Ainsi, chez une personne vivant avec le VIH, le virus est présent dans les sécrétions génitales, masculines ou féminines. Pendant l'acte sexuel infectant, le virus est libéré et entre en contact avec l'épithélium du tissu génital ou digestif. Le virus passe la barrière épithéliale puis infecte secondairement ses cellules cibles (LTCD4 notamment). Les cellules cibles infectées, ou transportant le virus sans être infectées (comme les cellules dendritiques), rejoignent ensuite par voie lymphatique afférente un ganglion situé à proximité. A partir de ce premier ganglion, et par voie lymphatique efférente, le virus est déversé dans la circulation générale et se propage dans différents tissus de l'organisme(20). Les principaux tissus touchés sont les tissus lymphoïdes.

Une fois que le virus s'est propagé dans l'organisme, celui-ci va se répliquer à partir des LTCD4 mémoires. Cette réplication ne peut pas être éradiquée (absence de traitement curatif). La persistance de l'infection est liée à deux caractéristique de l'infection par le VIH : (i) l'existence de réservoirs cellulaires, comme les LTCD4 mémoires, comprenant un provirus intégré dans le génome du lymphocyte et capable de se répliquer, et (ii) la présence de sanctuaires anatomiques (appelés aussi les compartiments), où les antirétroviraux ne diffusent pas complètement.

B. Réserve et latence – Notion de réservoir

Une fois les différents tissus lymphoïdes infectés, les virus se répliquent massivement à partir des LTCD4 mémoires actifs présents en grande quantité dans ces organes(22,23). Cette phase aigüe est suivie d'une réponse immunitaire spécifique et d'une importante réponse innée, assurant un contrôle partiel de l'infection (24). Néanmoins, la déplétion des LTCD4(25,26) associée aux erreurs de transcription lors de la réplication virale assurent une échappatoire au virus face à la réponse immunitaire humorale et cellulaire(27). Suite à l'infection, tous les LTCD4 mémoires des tissus lymphoïdes secondaires ne prennent cependant pas une voie de mort cellulaire. Une faible proportion de LTCD4 redevient des cellules mémoires quiescentes. Ces cellules mémoires, contenant le virus, vont arrêter leur multiplication et entrer en phase de dormance(28). Elles sont capables de rester en phase de quiescence sur une longue période (de quelques jours à plusieurs années)(29) et

sont à l'origine de la latence de l'infection par le VIH. Ces cellules sont surtout présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (moins de 2% présentes dans le sang). L'absence de réplication virale pendant la phase de quiescence des LTCD4 mémoires rend les antirétroviraux inefficaces sur le virus. En effet, ces substances n'inhibent pas la réplication du virus mais bloquent l'infection de nouvelles cellules par le virus.

Une stimulation du système immunitaire peut conduire à la réactivation des LTCD4 mémoires. Cette phase de réveil correspond à une activation suivie d'une multiplication cellulaire. Lors de la transcription de gènes faisant suite à l'activation cellulaire, les gènes du virus contenu dans le génome de la cellule vont être transcrits puis traduit en protéines, conduisant à la production de virions(30,31). Si l'infection de nouvelles cellules par ces virions n'est pas inhibée par les antirétroviraux, une grande quantité de virus sera produits par les LTCD4 nouvellement infectés. Ces virus peuvent ensuite être retrouvés dans le sang, constituant l'échec virologique.

Le réservoir se définit donc comme une sous population de cellules contenant du génome viral dans son ADN, capables de conduire à une réplication virale inexistante avant la réactivation cellulaire(32). La particularité du réservoir réside dans sa capacité à produire des virus, parfois même lorsqu'une stratégie antirétrovirale est bien suivie. Le réservoir est le lieu principal de production, de conservation (au sens de réserve) et de persistance du virus pendant toute la durée de l'infection. Les cellules du réservoir sont retrouvées dans plusieurs tissus. Les antirétroviraux doivent être continuellement présents à des concentrations efficaces au niveau des réservoirs pour contenir l'infection de nouvelles cibles. La concentration libre est la seule forme capable de diffuser dans les tissus puis dans les cellules(8). Elle est donc un témoin de la quantité d'antirétroviral disponible pour inhiber l'action du virus. La concentration libre pourrait ainsi être utilisée pour expliquer les échecs virologiques liés à un contrôle insuffisant du réservoir.

C. Localisations anatomiques - Notion de compartiment

Quatre tissus ou systèmes sont identifiés comme de potentiels sanctuaires anatomiques pour la réplication virale : le tube digestif, les ganglions, le système nerveux central et les tissus génitaux, masculin en particulier(9). Ces tissus sont aussi des compartiments, le virus se répliquant de manière isolée, avec peu ou pas d'échanges avec les autres populations de virus présentes dans l'organisme. Ces populations virales distinctes sont appelées les quasi-espèces(33). Elles évoluent dans le temps plus ou moins indépendamment des autres virus, en fonction de leur localisation dans les tissus et ou

de la pression de sélection antirétrovirale. On parle de « compartimentalisation » du virus(34). Cette « compartimentalisation », avec une évolution indépendante du virus par rapport aux autres tissus de l'organisme, est retrouvée dans les quatre compartiments principaux. Ces compartiments peuvent être liés à la présence d'une barrière anatomique (comme pour le système nerveux central ou les tissus génitaux masculins), réduisant la diffusion des antirétroviraux dans ces tissus. D'autres compartiments, comme les tissu lymphoïdes ou le tube digestif, sont caractérisés par leur profil immunologiques (*e.g.* présence de cellules dendritiques folliculaires dans les ganglions, contenant de grandes quantités d'ARN viral) (9). Néanmoins, pour ces deux tissus, des profils de diffusions limités ont également rapporté avec certains antirétroviraux.

Plusieurs facteurs sont susceptibles de limiter la diffusion des antirétroviraux dans ces compartiments. Certains sont propres aux substances (lipophilie, taille et poids moléculaire de la substance, importance de la liaison aux protéines plasmatiques, substances substrat des protéines d'influx et présence de transports d'efflux) et d'autres spécifiques aux tissus (taux de perfusion sanguine du tissu, distribution des protéines d'influx et/ou d'influx)(9,35). Les polymorphismes de certaines protéines (transport d'influx ou d'efflux), modulant leur activité, sont également susceptibles d'influencer la diffusion des antirétroviraux(36). Enfin, la concentration plasmatique, représentant la quantité d'antirétroviral disponible pour diffuser, peut être le premier facteur limitant la concentration tissulaire. Une faible concentration dans le plasma, une fois l'équilibre pharmacocinétique atteint, est habituellement associé à une exposition intra-tissulaire basse.

1. Tissus lymphoïdes associés à la muqueuse gastro-intestinale

Ces tissus regroupent les amas lymphoïdes retrouvés depuis la cavité buccale jusqu'au rectum(35). Dans l'infection VIH, ce sont les LTCD4 présents dans les *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT ; *e.g.* plaque de Peyer, tissu lymphoïde de l'iléon) de l'iléon au rectum qui sont étudiés(35). Les LTCD4 peuvent également être retrouvés disséminés dans le tissu (*e.g.* dans la lamina propria) et ne font dans ce cas pas partis du GALT. Les LTCD4 de ces tissus sont particulièrement touchés lors de l'infection du VIH, en lien à des caractéristiques immunologiques de ces cellules. Celles-ci présentent un phénotype particulier, plus permissif à l'infection par le VIH (présence d'une intégrine α4β7 liant la gp120 virale). Par ailleurs, les LTCD4 sont fréquemment stimulées dans ces tissus(37). La quantité de LTCD4 mémoires dans ces tissus est ainsi fortement réduite dans les premières semaines suivant l'infection. Les lymphocytes mémoires restants, non détruits pendant la réplication virale,

redeviennent des cellules mémoires, formant ainsi un réservoir viral. Celui-ci est fréquemment considéré comme le réservoir viral le plus important(35,37). Pour éviter un réensemencement continu du réservoir, il est important que les antirétroviraux présentent un profil de diffusion optimal dans ce tissu.

Par ailleurs, l'analyse des différents segments du tube digestif révèle une réplication moins importante dans le colon et le rectum, comparé aux segments en amonts dans le tube digestif(35). Des caractéristiques pharmacologiques de ces portions du tractus digestif pourraient expliquer cette hétérogénéité de la réplication virale dans l'appareil digestif. En effet, la distribution des protéines de transports et des enzymes du métabolisme n'est pas homogène tout au long du tube digestif. Ainsi, les CYP3A(38,39) et des transporteurs d'efflux comme la glycoprotéine-P (P-gp) et la Multidrug Resistance-associated Protein (MRP2) (40,41), sont surtout présents et actifs sur les premiers segments de l'intestin. Ils sont retrouvés en moins grande quantité dans le colon ou le rectum(39,40,42). Ces facteurs sont une limite à une exposition importante des antirétroviraux substrats de ces protéines, comme le DTG, le DRV et l'ATV). Cette répartition des transporteurs et enzymes expliquerait une variabilité de l'exposition dans le tube digestif et donc les différences de réplication rapportées.

2. Ganglions

Les ganglions constituent également un site de réplication indépendant des autres sites d'après l'analyse génétique des quasi-espèces virales(34,43). Les organes lymphoïdes secondaires contiennent ainsi un réservoir de réplication à part entière. La réplication virale serait favorisée par la proximité spatiale des cellules cibles du VIH et des modes de transmissions facilités (transmission cellule à cellule par exemple(44)) mais aussi la présence de cellules dendritiques folliculaires, associée à une absence de pénétration des lymphocytes T CD8 (LTCD8) dans le follicule, réduisant le contrôle immunitaire dans cette région du ganglion. Ce sanctuaire est donc plus immunologique que pharmacologique.

Les prélèvements dans les ganglions sont invasifs. Ces tissus sont donc difficiles d'accès pour étudier la diffusion des antirétroviraux. Peu de données sont ainsi disponibles(43,45) et les facteurs limitant la diffusion des antirétroviraux dans les ganglions ne sont pas connus. Les mesures disponibles font état d'une diffusion limité de la plupart des antirétroviraux dans ces tissus(46). Des études chez le singe traité par antirétroviraux montrent qu'en dépit d'un contrôle de la réplication observé dans le

sang, la réplication demeure importante dans de nombreux ganglions(37). Les mesures de concentration effectuées ont mis en évidence une relation inversement proportionnelle entre la concentration en antirétroviraux et le niveau de réplication(43). Ces données indiquent ainsi qu'un défaut de diffusion dans les tissus est relié à une probabilité augmentée d'échec virologique dans les compartiments.

3. Système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est un compartiment important pour la réplication virale. Il est rapidement touché après l'infection virale et participe considérablement à l'expression clinique de l'infection(37). En effet, le virus et sa réplication sont associés à des troubles neurocognitifs, indépendamment d'une éventuelle iatrogénie antirétrovirale. D'un point de vue immunologique, la réplication du VIH dans ce tissu s'effectue plutôt à partir de macrophages,(47) qui contribuent à la persistance du virus dans l'organisme à partir du SNC. Plusieurs caractéristiques liées à la nature des macrophages limitent l'action des antirétroviraux. Ainsi, le pool de nucléosides disponibles est plus faible dans les macrophages (et d'autant plus qu'ils sont chroniquement infectés) comparé aux LTCD4. Par ailleurs, pour les autres antirétroviraux, les concentrations efficaces 50 rapportées paraissent être plus faibles dans les macrophages, en comparaison avec les LTCD4. De plus, les macrophages sont moins sensibles que les LTCD4 à l'effet cytopathogène du virus. Ces cellules participent ainsi à la persistance du virus et libèrent plus longtemps des virions infectieux. Enfin, les macrophages sont pourvus de nombreuses protéines d'efflux, comme la P-gp ou des protéines de la classe des Multidrug-Resistance Protein (MRP4 et 5).Une réplication virale compartimentée dans le SNC, en dépit d'une charge virale plasmatique indétectable, a été à plusieurs reprises associée à des troubles neurocognitifs chez des patients avec un traitement antirétroviral bien conduit(9,48). Ces résultats, comme pour le GALT, montrent que le SNC est un compartiment à part entière où la réplication virale s'effectue indépendamment des autres tissus lymphoïdes et pouvant être hors de portée des antirétroviraux.

La diffusion des antirétroviraux est relativement limitée dans ce compartiment. Seuls les inhibiteurs nucléosidiques et la nevirapine présentent un profil de diffusion important dans le liquide cérébro-spinal (LCS)(49).

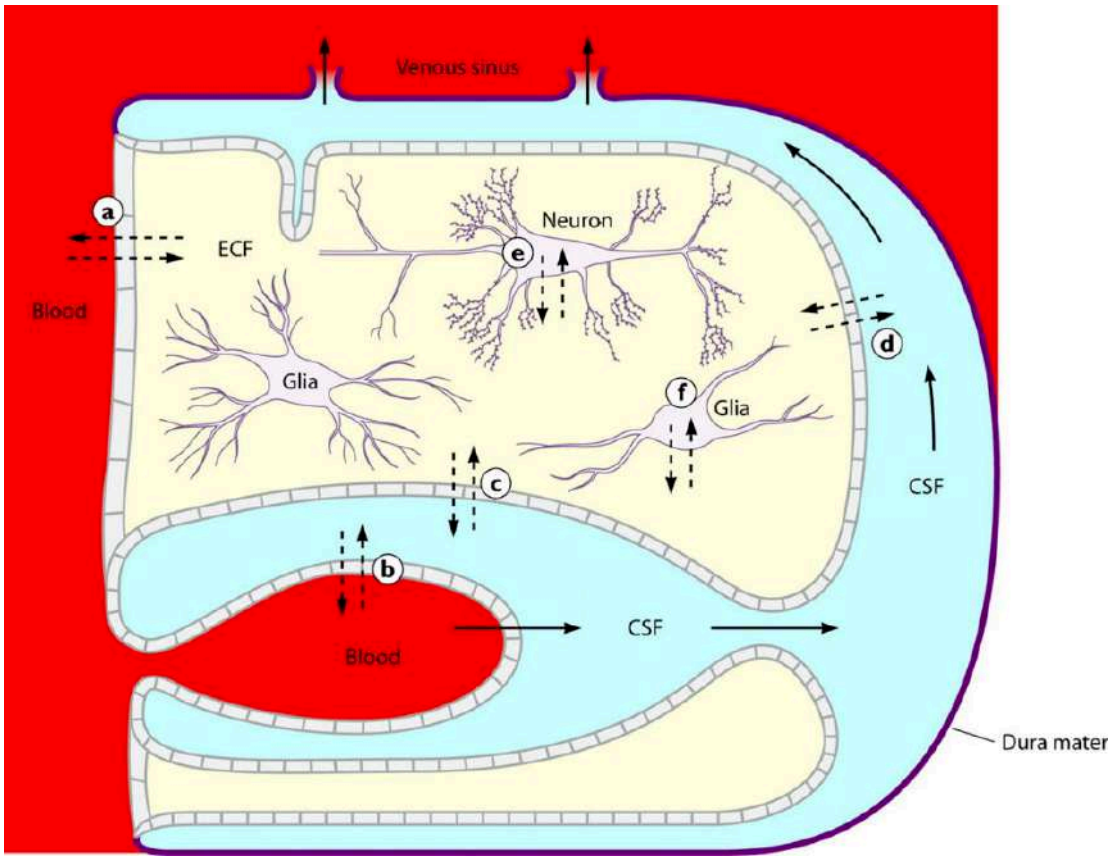


Figure 1 : Communications entre les différents fluides intracrâniens. Les flèches pleines représentent le flux du liquide céphalo-spinal (LCS ou CSF), les flèches pointillées les échanges entre (a) la sang et le tissu cérébral (b) le sang et le plexus choroïde (c) le LCS et le tissu cérébral(50). La grande majorité des études mesurent les concentrations dans le LCS, les profils de diffusion dans l'encéphale sont encore méconnus.

De nombreuses protéines d'efflux (*e.g.* P-gp et l'human Breast Cancer Resistance Protein (hBCRP) notamment) sont présentes à la surface des différentes barrières anatomiques(51). Cette forte proportion de protéines d'efflux constitue une limite à la bonne diffusion des antirétroviraux.

Une limite existe dans l'étude de la diffusion des antirétroviraux dans ce compartiment. En effet, les études de diffusion se basent sur des mesures d'antirétroviraux dans le LCS. Or le rôle du LCS comme témoin de la diffusion dans le SNC n'est pas tout à fait établie. Il existe plusieurs barrières contrôlant l'accès au tissu cérébral (encéphalique, méningée et méningo-encéphalique) et les profils de diffusion ne sont décrits que pour une seule de ces barrières.

4. Tissus génitaux

La présence de virus dans le tissu génital est à l'origine des transmissions entre les individus. Le VIH est notamment présent dans le sperme et le risque de transmission est proportionnel au niveau de

charge virale dans le plasma séminal. La réplication virale dans ce tissu est encore incomplètement comprise. En effet, les traitements antirétroviraux n'agissent pas sur les virus présent dans certaines cellules, qui contiennent toujours du virus en dépit d'un traitement antirétroviral bien conduit et à des concentrations considérées comme efficaces (observations faites sur un modèle simien)(52). Cependant, le compartiment tissu génital est complexe, celui-ci étant composé de plusieurs tissus, difficilement accessibles (*e.g.* testicules, prostate, urètre, épididymes). Par ailleurs, comme dans le SNC, les macrophages participeraient à la persistance du virus dans les tissus génitaux masculins (résistance à l'effet cytopathogène du virus, faible phosphorylation des inhibiteurs nucléosidiques, distribution des transports d'efflux différente comparée aux LTCD4).

L'utilisation d'antirétroviraux efficaces assure habituellement une charge virale indétectable dans le sang mais aussi dans le sperme. Cependant, le tissu génital masculin peut également être assimilé à un compartiment, même si les données disponibles sont parfois contradictoires. L'absence de virus dans le sang peut être paradoxalement associée à une réplication virale dans le tissu génital, avec la présence d'une charge virale mesurable dans le sperme(53,54). Le virus peut également être retrouvé dans les sécrétions vaginales et être à l'origine d'une infection virale. Cependant, sa fonction de réservoir à la réplication virale est moins claire que pour le tissu génital masculin. Comme avec les autres compartiments, il existe une barrière sang/tissu génital sur laquelle sont retrouvées des protéines d'efflux comme la P-gp(55–57). Les protéines d'influx, comme les Organic Anion Transporter 1 et 3 (OAT1/3) et l'Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1), sont également présentent dans les tissus génitaux. Si, les niveaux d'expression de la plupart des transporteurs dans ces tissus restent mal détaillés(57), la P-gp semble être fortement exprimée au niveau de la barrière sang/testicule(58). La présence de ces protéines d'efflux conduit à des profils de diffusion différents entre les antirétroviraux. La faible diffusion de certains antirétroviraux (notion de sancturisation) participe ici à la compartimentalisation du virus(57).

Ainsi, pour être efficaces, un antirétroviral, ou une association d'antirétroviraux, doivent présenter un profil de diffusion suffisamment important pour inhiber l'infection de nouvelles cellules par le virus dans les compartiments. La forme libre pourrait ainsi se révéler être un témoin intéressant pour évaluer la quantité d'antirétroviral disponible pour les compartiments. En effet, une faible concentration libre dans le plasma est très probablement associée à une faible exposition dans les tissus. Les nombreux facteurs de variabilité de diffusion, comme les protéines de transport peuvent

également moduler la quantité d'antirétroviral présent dans les compartiments. Cependant, ces facteurs de variabilité ne sont pas intégrés dans nos travaux.

D. Echecs virologiques

1. Définition

Lors de la prise en charge du patient, le suivi de l'efficacité du traitement antirétroviral est organisé par la mesure régulière des charges virales plasmatiques. Le calendrier de suivi est conditionné en fonction du stade de l'infection (patient naïf, patient viro-contrôlé, échec virologique, etc…)(59). La charge virale plasmatique correspond à une mesure de l'ARN viral présent dans le sang par une technique de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative). Une « copie » équivaut à la mesure d'un brin d'ARN VIH. Les seuils de quantification bas dépendent des techniques utilisées et sont compris en 2018 entre 20 et 50 copies/mL de plasma(59).

Un échec virologique, en dehors des six premiers mois d'initiations de traitement, est défini par la mesure de deux charges virales supérieures au seuil de quantification bas sur deux échantillons consécutifs prélevés à distance(2).

Les échecs sont habituellement expliqués par une exposition insuffisante aux antirétroviraux. Cette sous-exposition peut être consécutive à une observance incomplète, une prise inadéquate (prise alimentaire associée obligatoire pour certaines substances) ou une interaction médicamenteuse(2). La présence de mutations préexistantes sur le génome du virus peut également être à l'origine d'un échec virologique(2).

Les principales conséquences d'un échec virologique sont la sélection et l'accumulation de mutations de résistance par le virus, une diminution de l'immunité associée au LTCD4 (destruction plus importante de ces cellules) et d'une augmentation du risque de transmission du virus(2).

2. Mutations de résistance et pression de sélection

Lors de la réplication virale, la transcriptase inverse commet des fautes de transcription, avec environ une erreur tous les 10^5 nucléotides(27). Certaines de ces mutations confèrent une résistance au virus contre les antirétroviraux, par exemple par une réduction de l'affinité entre la substance et sa cible (*e.g.* la protéase ou l'intégrase virale). Cependant, ces mutations génèrent un « coût » sur l'aptitude

du virus à se répliquer. En effet, un virus présentant une ou plusieurs mutations a une capacité de réplication diminuée, comparée à un virus sans mutation (ou sauvage(60)). Cette différence introduit la notion de pression de sélection, dépendant également de la concentration en antirétroviral au contact du virus.

Ainsi, il existe trois situations de réplication des virus en fonction des concentrations des antirétroviraux(34) :

(i) à des concentrations élevées, la réplication des virus sauvages et mutés (pour certains) est contrôlée.
(ii) à des concentrations nulles, la réplication des virus sauvages et mutés se fait indistinctement, sans pression des antirétroviraux. Cependant, les virus mutés sont pénalisés dans leur réplication par une ou plusieurs mutations. Dans ce cas, seul le virus sauvage émerge dans le sang. Cette situation est habituellement observée chez des patients en rupture thérapeutique (c'est-à-dire ayant arrêt la prise des antirétroviraux). Le risque est d'entrer dans un stade SIDA lorsque la déplétion en LTCD4 devient trop importante (<200/mm^3, pour une normale >500/mm^3).
(iii) à des concentrations infra-thérapeutiques, la réplication virale est placée sous la pression exercée par les antirétroviraux. La concentration est suffisante pour inhiber la réplication des virus sauvages. En revanche, elle est insuffisante pour contrôler la réplication des virus résistants. Ce niveau d'exposition sub-thérapeutique correspond à une zone de forte pression de sélection, pour des virus mutants. Le risque clinique est proche de celui de l'absence de prise. Mais il existe une différence comparé à une absence de prise. En effet, le faible niveau d'exposition va conduire à la sélection de virus résistant au traitement antirétroviral en cours. Par ailleurs, ces mutations vont être « archivées » dans le réservoir, empêchant l'utilisation ultérieure (mois, années) des antirétroviraux dont la sensibilité virale est réduite par l'apparition des résistances. Ce cas est le plus péjoratif, car il combine le risque de pathologies opportunistes et la sélection de mutations de résistance. Il s'observe généralement dans les cas d'observance irrégulière. Mais on peut aussi le retrouver lors d'interactions médicamenteuses, avec réduction de l'absorption orale ou induction enzymatique, et de diffusion insuffisante dans un compartiment, comme le système nerveux central. En suivant ces données de pression de sélection et en l'appliquant à l'étude de diffusion dans les compartiments, une diffusion limitée, quasi nulle, est associée à un échec sans mutation de résistance. En revanche, une diffusion plus importante, mais insuffisante, est associée à un échec avec des virus présentant

des mutations de résistance. Les trois catégories de réplications en fonction des concentrations sont représentées dans la figure 2.

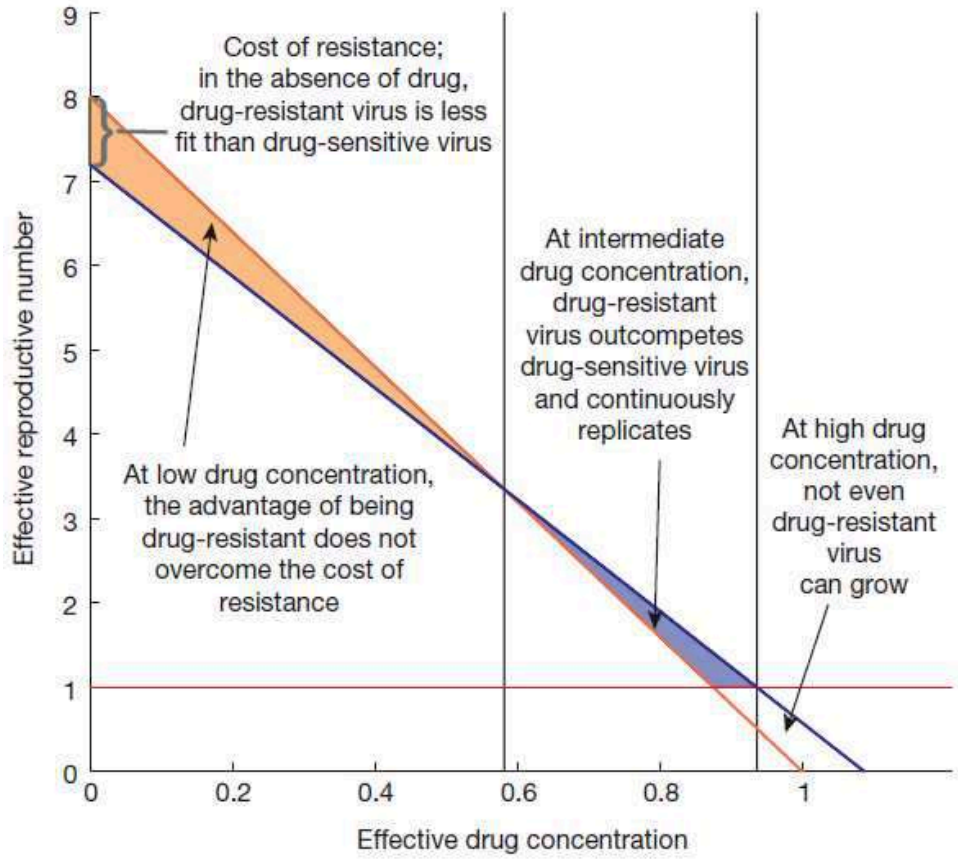


Figure 2 Pression de sélection des virus résistants en fonction de l'efficience relative de la concentration. La zone orange, avec une très faible exposition en antirétroviraux, correspond à une pression de sélection faible ou nulle, avec émergence de virus sensible. La zone bleue, avec une exposition sub-thérapeutique, correspond à une pression de sélection importante pour des virus avec des mutations de résistance. Au-delà, à forte concentration, le virus ne se réplique pas(34).

En résumé, les échecs virologiques peuvent être classés en deux catégories, les échecs à virus avec ou sans sélection de mutation de résistance. Ainsi, dans nos travaux, nous avons distingué ces deux catégories d'échecs pour étayer l'interprétation de la diffusion des antirétroviraux dans les tissus.

E. Evaluation phénotypique de l'efficacité des antirétroviraux sur le virus

La sensibilité d'un virus à un antirétroviral peut être étudiée par des analyses *in vitro*(19). Elle correspond à une analyse du phénotype de sensibilité/résistance à un antirétroviral par culture cellulaire. Des concentrations d'antirétroviraux inhibant 50% ou 90% de la réplication virale dans le milieu de culture sont ainsi mesurées. Ces concentrations sont appelées les concentrations

inhibitrices 50 ou 90 (IC_{50}, IC_{90}). Les concentrations plasmatiques totales des antirétroviraux sont habituellement comparées aux $IC_{50/90}$ pour évaluer l'efficacité des substances. Cependant, une grande proportion des antirétroviraux sont fortement liés aux protéines plasmatiques (excepté les inhibiteurs nucléos(t)idiques)(61). Or, les milieux de culture ne contiennent pas de protéines plasmatiques susceptibles de lier les antirétroviraux. Ainsi, les $IC_{50/90}$ ne sont probablement pas des marqueurs appropriés pour évaluer l'efficacité des concentrations plasmatiques totales des antirétroviraux fortement liés aux protéines plasmatiques. Pour pallier à cette limite, une procédure dite « *protein-adjusted* $IC_{50/90}$ » a été proposée(62). La procédure consiste à ajouter 50% de sérum d'origine humaine et 10% de sérum d'origine bovine. Ce protocole est ainsi considéré comme une représentation des conditions de liaison entre les antirétroviraux et les protéines plasmatiques. Ces $IC_{50/90}$ ajustés à la liaison protéique sont désormais utilisés pour être comparées aux concentrations totales mesurées dans le plasma. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé la liaison dans le plasma aux liaisons protéiques obtenues dans ces conditions expérimentales.

Deux autres paramètres virologiques permettent d'évaluer l'efficacité des antirétroviraux, le quotient inhibiteur et la barrière génétique. Le quotient inhibiteur est un terme appliqué dans les thérapeutiques anti-infectieuses en général. Il correspond au rapport entre la concentration en antirétroviral et le niveau de susceptibilité du virus à la substance. Les quotients inhibiteurs sont généralement calculés par le rapport entre une concentration minimale plasmatique mesurée et une $IC_{50/90}$(19). La barrière génétique correspond à la capacité du virus à acquérir des mutations conférant une résistance vis-à-vis d'un antirétroviral donné(63). La barrière génétique va dépendre du cumul de mutations nécessaires pour obtenir une résistance (une pour la plupart des inhibiteurs nucléosidiques, jusqu'à cinq pour le DRV) (64). La plupart des antirétroviraux ont une barrière génétique faible, c'est-à-dire qu'une seule mutation peut conférer une résistance à l'antirétroviral. Les inhibiteurs de protéase, notamment le DRV, et dans une moindre mesure le Dolutegravir (DTG), sont considérées comme des antirétroviraux à barrière génétique élevée(65).

Dans nos travaux, nous nous sommes référés aux IC_{50} et IC_{90} comme seuils d'efficacité pour évaluer les concentrations libres mesurées et prédites. Ces résultats sont présentés dans la partie modélisation du manuscrit.

II. Stratégies thérapeutiques en 2018

Des recommandations nationales sont proposées et mises à jour régulièrement par un groupe d'experts(66). Les membres du groupe encadrent les instructions pour la prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et établissent les objectifs thérapeutiques et les stratégies de prise en charge.

A. Objectifs prise en charge VIH(59)

Les recommandations nationales du Centre National de lutte contre le SIDA et les hépatites virales (CNS) insistent sur une prise en charge rapide de l'individu diagnostiqué. En effet, les études START(67) et TEMPRANO(68) ont démontré l'intérêt d'initier le traitement quel que soit le statut immuno-virologique du patient (charge virale sanguine (CV) ou taux de LTCD4).

L'objectif principal du traitement antirétroviral au plan individuel est d'éviter la progression vers le stade de Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA)(59). Les antirétroviraux permettent d'atteindre cet objectif en inhibant la réplication virale et donc en réduisant la CV. L'objectif virologique est de parvenir en quelques mois, puis de maintenir, une CV inférieure à la limite de quantification (20 à 50 copies/mL selon les techniques). En atteignant cette cible virologique, la restauration du nombre LTCD4 (et de sa proportion par rapport aux LTCD8) est favorisée. De plus, le risque d'apparition de virus avec des mutations associées à une résistance antirétrovirale est réduit et la morbidité liée au virus est diminuée.

Par ailleurs, une introduction rapide du traitement conduirait (i) à limiter la taille du réservoir viral, (ii) à assurer un profil virologique favorable et (iii) limiter l'inflammation dans certains tissus (digestifs par exemple).

Le STP participe aux objectifs de prise en charge du PVVIH(3). En mesurant les concentrations et en adaptant les posologies ou la thérapeutique, le STP optimise la tolérance clinico-biologique aux antirétroviraux. Par ailleurs, en cas d'échec virologique, le STP est un des outils disponibles pour rechercher l'étiologie de l'échec. Dans la stratégie globale de prise en charge, le rôle du STP est de personnaliser le traitement antirétroviral. Un des objectifs de l'étude de la forme libre est d'évaluer la capacité de ce marqueur à contribuer à l'individualisation du traitement dans certaines situations d'échec ou de toxicité.

B. Epidémiologie(69)

En France, en 2015, près de 6000 diagnostics d'infection au VIH ont été réalisées, principalement chez des hommes (environ 70%). Ce nombre est stable depuis 2011, après une baisse rapportée entre 2004 et 2011.

En 2013, on estimait en France que 84% des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) connaissaient leur statut sérologique vis-à-vis du VIH. Parmi ces 84%, 90% recevaient un traitement antirétroviral (soit 75% des PVVIH). Dans ce dernier groupe de patients traités, 90% avaient une CV inférieure à 50 copies/ml (soit 68% des PVVIH, c'est-à-dire environ 49000 personnes).

La population de PVVIH en 2015 en France avait un âge médian de 49,7 ans, avec 49 et 16% des PVVIH qui avaient plus de 50 et 60 ans, respectivement. L'efficacité des thérapeutiques antirétrovirales est associée à une augmentation de la survie à l'infection et donc à un vieillissement de la population. En effet, en 2011, seul 35 et 11% des PVVIH avaient plus de 50 et 60 ans, respectivement. Les PVVIH présentent également des profils de comorbidités proches de ceux de la population générale. Ainsi en 2014, d'après la cohorte Aquitaine, 25,4% des PVVIH présentaient un indice de masse corporelle (IMC) entre 25 et 29,9 kg/m^2 (valeurs définissant le surpoids) et 7,8% un IMC $\geqslant$30 kg/m^2 (valeur définissant l'obésité)(70). Des facteurs de risques cardiovasculaires, comme l'hypertension artérielle (47,9% des PVVIH), le diabète (14,2% des PVVIH) ou une hypercholestérolémie à LDL (20,2% des PVVIH) sont également retrouvés en forte proportion chez les PVVIH. Par ailleurs, 11,1% des PVVIH avaient connu un évènement cardiovasculaire (coronaropathie, AVC, artériopathie). Enfin, 14,3% des patients présentaient un débit de filtration glomérulaire inférieur à 60 mL/min (1,4% inférieur à 30 mL/min).

La population de PVVIH présente ainsi de nombreuses comorbidités, notamment métaboliques. Elles sont associées à des thérapeutiques susceptibles de conduire à des interactions avec les antirétroviraux. Ces interactions, mais aussi les co-morbidités, peuvent modifier l'absorption, le métabolisme ou l'élimination des antirétroviraux(10–12). Dans ce cas de figure uniquement, les concentrations libres et totales sont toutes les deux impactées par l'interaction. En revanche, si une interaction ou co-morbidité influence les paramètres de liaison de l'antirétroviral aux protéines plasmatiques, une « désynchronisation » ou une divergence de la variation des formes libres et totales pourrait être observée. Dans ce cas de figure, une mesure isolée de la concentration totale est difficilement interprétable, cette dernière n'étant plus un témoin fidèle de la forme libre. De fait,

la mesure de la concentration libre peut présenter dans ces situations un intérêt dans le STP. Nous avons donc, lors de nos travaux, collectées les données démographiques, de co-morbidités et les co-médications des PVVIH afin d'identifier les situations pouvant modifier l'équilibre de liaison.

C. Stratégies thérapeutiques de première intention

Les stratégies thérapeutiques antirétrovirales recommandées en première intention en 2018 pour la prise en charge d'un sujet diagnostiqué sont reportées dans le tableau 1(1). L'initiation se fait avec la combinaison de deux inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI) (abacavir + lamivudine ou tenofovir + emtricitabine) associés à un troisième agent. Le troisième agent est issu d'une des trois classes suivantes : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) (rilpivirine), inhibiteurs de protéase (DRV) ou inhibiteurs de l'intégrase (raltegravir, elvitegravir, DTG).

2 INTI	**INNTI**	**Nombre comprimés / nombre de prises par jour**	**Commentaires**
tenofovir alafenamide/ emtricitabine 25/200 mg	rilpivirine 25 mg	1/1	-Si CV<5 log -Attention si CD4<200/mm3 -Contre indiqué si DFGe<30 mL/min (80 pour TAF) -Prise alimentaire obligatoire -IPP contre-indiqué
tenofovir DF/ emtricitabine Gé 245/200 mg		2/1	
2 INTI	**INSTI**	**Nombre comprimés / nombre de prises par jour**	**Commentaires**
tenofovir DF/ emtricitabine Gé 245/200 mg	dolutegravir 50 mg	2/1	-Précaution si DFGe<80 mL/min et surveillance fonction rénale -Peu d'interactions PK
abacavir/lamivudine 600/300 mg		1/1	-Uniquement si HLA-B*5701 négatif -Peu d'interactions PK
tenofovir alafenamide/ emtricitabine 10/200 mg	elvitegravir 150 mg	1/1	-Contre indiqué si DFGe<30 mL/min -Interactions avec cobicistat -Prise alimentaire obligatoire
tenofovir DF/ emtricitabine Gé 245/200 mg	raltegravir 1200 mg	3/1	-Précaution si DFGe<80 mL/min et surveillance fonction rénale -Peu d'interactions PK
2 INTI	**IP**	**Nombre comprimés /**	**Commentaires**

		nombre de prises par jour	
tenofovir DF/ emtricitabine Gé 245/200 mg	darunavir 800 mg	3/1	-Précaution si DFGe<80 mL/min et surveillance fonction rénale -Peu d'interactions PK -Intérêt pour initiation rapide nécessaire ou cas graves -Prise alimentaire obligatoire

Tableau 1 : stratégies thérapeutiques recommandées en 2018 à l'initiation d'un traitement antirétroviral suite au diagnostic d'une infection au VIH(1). Avec INTI : inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse ; CV : charge virale ; CD4 : LTCD4 ; TDF : Tenofovir disoproxyl fumarate ; TAF : Tenofovir alafenamide ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé ; IPP : inhibiteur de la pompe à proton ; INSTI : inhibiteur de l'intégrase (integrase strand transfert inhibitor) ; IP : inhibiteur de la protéase ; Gé : générique ; PK : pharmacocinétique.

Ainsi, parmi les cinq stratégies thérapeutiques recommandées en première intention, nous retrouvons deux des trois substances dont nous avons exploré la forme libre lors de notre étude. Les différentes caractéristiques orientant le choix d'une initiation par DRV ou DTG sont résumées dans le tableau 2. L'ATV était une antirétroviral disponible en première intention dans les stratégies d'initiation lors des recommandations établies en 2013 et ce jusqu'en 2016(71). L'ATV est donc encore retrouvé dans de nombreuses trithérapies de PVVIH.

Le choix de la stratégie relève de paramètres virologiques (résistances connues dans la population, niveau de CV à l'initiation) mais aussi des co-morbidités et co-traitements présents chez le patient avant le traitement.

Avantages	Inconvénients
Darunavir	
Meilleur profil sur les virus avec des mutations de résistance	Trois comprimés par jour (en une prise)
Quotient inhibiteur élevé	Prise alimentaire obligatoire
Recul suffisant pour une utilisation pendant la grossesse	Effets indésirables digestifs du ritonavir, modifications de certains paramètres métaboliques (hyperlipidémie, hyperglycémie).
Intérêt dans les charges virales élevées, chez les patients fortement immunodéprimés	Interactions médicamenteuses avec le ritonavir. Inhibition : CYP3A, CYP2D6, P-gp, MRP-1, OATP1B1, hBCRP Induction : UGT1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9,

	CYP2C19
Dolutegravir	
Peu de virus résistant lors de la primo-infection	2 comprimés par jour (en une prise) en attendant l'exploration du polymorphisme de l'allèle *HLA-B*5701*
Quotient inhibiteur élevé	Troubles neuro-cognitifs
Cinétique de décroissance virale rapide	
Un comprimé par jour (si allèle *HLA-B*5701* exploré et absent)	
Peu d'interactions médicamenteuses PK	
Profil métabolique neutre	
Profil de sécurité d'utilisation	

Tableau 2 : Caractéristiques des deux substances pouvant orienter le choix du troisième agent en fonction du contexte virologique et des spécificités physiopathologiques ou thérapeutiques du patient. CYP : cytochrome P450 ; P-gp : glycoprotéine P ; OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides ; MRP : Multidrug Resistance-associated Protein ; hBCRP : human Breast Cancer Resistance Protein ; UGT : Uridine diphosphate-glucuronyltransferase.

Le DRV et le DTG affichent tout deux des atouts et des faiblesses dans le cadre d'une initiation d'un traitement. Les obstacles à l'initiation au DRV sont principalement liés au ritonavir (RTV), dont l'association est obligatoire pour son effet de potentialisateur pharmacocinétique (ou *booster*)(12). En effet, le RTV présente de nombreux effets indésirables, digestifs notamment(72). Son utilisation à long terme débouche fréquemment à l'émergence de troubles métaboliques, avec des effets délétères sur un plan lipidique (augmentation les LDL et des triglycérides) et glucidique (hyperglycémie)(72). Ses propriétés d'inhibition (recherchées) mais aussi d'induction enzymatique compliquent la gestion des associations médicamenteuses(72). La prise alimentaire obligatoire est l'inconvénient principal lié spécifiquement au DRV(12).

A l'inverse du DRV, le DTG ne doit pas être associé avec un potentialisateur pharmacocinétique. Le profil de sécurité d'utilisation de la substance est favorable, avec peu d'effets indésirables(1). Les troubles neurocognitifs (sensation ébrieuse, cauchemar, vertige), sont les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés avec le DTG(10). Le DTG peut être administré avec deux INTI en un seul comprimé, en une prise par jour, sous la forme suivante : DTG 50 mg/ abacavir 600 mg / lamivudine 300 mg. Néanmoins, il est recommandé de rechercher l'allèle *HLA-B*5701* avant toute initiation d'une thérapeutique contenant de l'abacavir(1), cet allèle augmentant la probabilité de réaction d'hypersensibilité(73).

L'étude de la forme libre du DRV et du DTG se justifiait donc par l'importante fréquence d'utilisation de ces substances dans les stratégies d'initiation. L'ATV était une option des stratégies de première ligne lorsque l'étude a débuté. De nombreux PVVIH suivent encore une stratégie contenant de l'ATV. Nous avons donc décidé de maintenir l'étude de la forme libre de cette substance.

D. Stratégies d'allègement thérapeutique

Les derniers antirétroviraux disponibles ont augmenté l'efficience du traitement antirétroviral. Cependant, l'absence de thérapie curative et les effets inconnus des traitements sur le long terme ont soulevé l'intérêt de l'allègement thérapeutique(2). L'allègement consiste à réduire la dose, la fréquence d'administration ou le nombre de substances utilisées. En réduisant la quantité des antirétroviraux administrés tout en conservant une efficacité identique à celle d'une trithérapie(2), l'objectif de l'allègement est de réduire le risque de survenue d'effets indésirables au long terme. Ces derniers peuvent apparaître après plusieurs années de traitement et se manifestent notamment sous la forme de troubles des bilans lipidiques et glucidiques (particulièrement avec le ritonavir), d'un risque de survenu d'évènement cardiovasculaire majoré, ou d'une atteinte du système osseux et rénal. L'allègement a également pour objectif de réduire le risque d'interactions médicamenteuses. Le DTG, le DRV et l'ATV sont inclus dans des stratégies d'allègement recommandées ou en cours d'évaluation(2). Les différentes stratégies disponibles permettent d'individualiser l'allègement thérapeutique, en fonction de l'histoire de la maladie, des éventuelles co-morbidités et co-médications.

Dans les recommandations, il est proposé de rechercher, et notamment pour l'ATV, des antécédents d'encéphalite. Ce contrôle pose indirectement la question de la quantité d'antirétroviral présente dans le compartiment SNC. La mesure de la concentration libre, évaluant la quantité d'antirétroviral disponible pour les compartiments, pourrait ainsi participer à une individualisation des stratégies d'allègement.

III. Les antirétroviraux d'intérêt

Le DTG, le DRV, et dans une moindre mesure l'ATV en 2018, sont trois antirétroviraux utilisés dans les stratégies de trithérapies ou d'allègement thérapeutiques(1,2). Les différents essais cliniques pour ces deux stratégies ont démontré l'efficacité et l'innocuité de ces trois antirétroviraux. Cependant, certains patients peuvent connaître un épisode d'échec virologique. Une partie de ces échecs peut être prévenu en connaissant la pharmacocinétique des substances et en évitant des situations conduisant à des expositions infra-thérapeutiques. Mais certains échecs ne sont pas expliqués par les marqueurs d'exposition habituels, reposant des mesures de concentrations totales. Les données pharmacocinétiques récentes développées dans ce chapitre constituent le rationnel de l'étude de la forme libre des antirétroviraux.

A. Dolutegravir

Substance efficace et occasionnant peu d'effets indésirables, le DTG est l'un des antirétroviraux les plus utilisés actuellement (27% des troisièmes agents utilisés ; données 2018 du CHU de Toulouse). Antirétroviral relativement récent (commercialisation en France depuis 2014), il a montré son intérêt dans la forme combinée à deux INTI en trithérapie(1). Le DTG est également utile dans les stratégies d'allègement en bithérapie(2) avec la rilpivirine, et potentiellement avec un inhibiteur nucléosidique comme la lamivudine. En revanche, le DTG n'a pas montré de bénéfice pour une stratégie en monothérapie(2). En effet, des échecs virologiques, avec sélection de mutations de résistance, ont été fréquemment observés.

1. Place dans la classe thérapeutique et la stratégie actuelle existants

Le DTG, d'un poids moléculaire de 419.378 g/mol(74), est considéré comme un INSTI de seconde génération, celui-ci restant efficace sur des virus résistants au raltegravir et à l'elvitegravir (1,75). Il a l'avantage de pouvoir ou non être utilisé en association fixe avec l'abacavir et la lamivudine, sans l'utilisation de potentialisateur pharmacocinétique(1,10,76). Toutefois, une double dose est nécessaire pour une efficacité optimale en présence de certaines mutations associées à des résistances ou lors d'interactions pharmacocinétiques(75,76).

2. Mécanisme d'action

La classe des inhibiteurs de l'intégrase représente la dernière famille d'antirétroviraux développée et disponible dans les stratégies thérapeutiques. Après la fusion du virion avec la membrane, le brin d'ARN viral est libéré puis est rétro-transcrit en ADN double brin (étape ciblée par les inhibiteurs nucléos(t)idiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse). Cet ADN est ensuite transporté dans le noyau pour être intégré dans le génome de la cellule hôte. C'est cette étape qui est ciblée par les INSTI(77).

3. Evaluation de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation lors des essais cliniques

Plusieurs études et essais cliniques ont évalué l'efficacité du DTG en trithérapie dans différentes conditions. Son efficacité a été exploré chez des patients naïfs de traitements, ayant été pris en charge par d'autres classes thérapeutiques, des patients en échec virologiques ou chez des enfants. Dans les différentes études, le DTG a montré sa non-infériorité ou sa supériorité (sur l'efavirenz par exemple) sur le plan virologique. Dans les essais d'allègement, associant le DTG à la lamivudine ou à la rilpivirine, la bithérapie permettait d'obtenir des résultats comparables à la trithérapie, en termes d'efficacité virologique. Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12 en annexe 1-1(78–90).

4. Pharmacocinétique

Les études de pharmacocinétique du DTG reposent pour la plupart sur les mesures de concentrations totales. Cette première partie décrit les phases d'absorption, de liaison, de métabolisme et d'élimination. Les études de diffusion du DTG dans les tissus et les profils pharmacocinétiques du DTG chez des sous-populations de PVVIH sont détaillées ensuite.

Les essais de dose chez le sujet sain ont montré que la pharmacocinétique du DTG était linéaire dans un intervalle de dose compris entre 10 et 50 mg (91). Une augmentation de posologie de 50 à 100 mg en une prise n'était pas associée à une augmentation proportionnelle de l'exposition totale (augmentation de l'aire sous courbe (ASC) inférieure à celle attendue avec l'augmentation de posologie).

Après administration de 50 mg de DTG en une prise par jour chez des PVVIH, les marqueurs d'exposition à l'équilibre (moyenne [coefficient de variation (CV) en %]) ont été de : $ASC_{(0-24)}$ = 53,6 [27%] mg*h/L, C_{max} = 3,67 [20%] mg/L, et C_{min} = 1,11 [46%] mg/L(76,92).

L'absorption du DTG est rapide (T_{max} = 2,5 h). La prise d'un repas, et la composition de celui-ci, modifient l'absorption et l'exposition du DTG(93). Ainsi, comparé à une prise à jeun, la prise pendant un repas de composition pauvre, moyenne et riche en lipides augmentait l'ASC (+33%, +41%, +66%), la C_{max} (+46%, +52% et +67%) et la C_{min} (+33%, +45% et +73%) du DTG. Toutefois ces résultats sont issus de mesures chez des sujets sains et aucune étude n'a été menée chez des PVVIH. Ces données ne sont donc pas directement transposables aux PVVIH. En effet, les sujets sains et les patients présentent des profils pharmacocinétiques distincts(92). Aucune hypothèse n'a été avancée pour expliquer ces différences, également observées avec d'autres antirétroviraux.

Le DTG est fortement lié aux protéines plasmatiques (>99%)(76,92). L'albumine est la principale protéine de transport du DTG dans le compartiment vasculaire. L'alpha-1-glycoprotéine acide participerait dans une moindre proportion à la liaison du DTG dans le sang (absence de données détaillées). L'étude de la liaison du DTG reste toutefois limitée à ce jour. En effet, aucune étude ne décrit à ce jour l'affinité des liaisons ou le nombre de sites de liaison sur les protéines plasmatiques.

L'Uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransférase (UGT) 1A1 est la principale enzyme impliquée dans le métabolisme du DTG (94). D'autres voies mineures interviennent, comme le cytochrome P450 3A4 (CYP450) et les UGT1A3 et 1A9. Le DTG n'exerce pas d'action inhibitrice ou inductrice sur ces trois enzymes ni sur d'autres CYP (1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2B7). Les métabolites ne présentent pas d'activité antirétrovirale d'intérêt.

Une étude de pharmacogénétique a analysé l'effet de différents polymorphismes de l'UGT1A1 sur la pharmacocinétique du DTG(95). Une augmentation de l'ASC (+46% en moyenne) et une diminution de la clairance d'élimination apparente (-32% en moyenne) a été observée chez les patients porteurs des allèles *UGT1A1 *28/28, *28/37* et **37/37*. Ces allèles sont associés à une réduction de l'activité de l'UGT1A1(96). En revanche, dans cette même étude, aucune relation n'a été observée entre les différents allèles des *CYP34A4/5* et du *PXR*, protéine régulant entre autre l'expression du CYP3A4, et l'exposition du DTG.

Le DTG est éliminé principalement dans les fécès (64%), sous forme de substance mère et de métabolites. Le DTG est également excrété dans les urines (31,6%), surtout sous forme d'un

métabolite glucuroconjugué, issu du métabolisme par l'UGT1A1. Des métabolites issus de réactions d'oxydation (voie CYP3A4) sont également éliminés par voie rénale(97).

Le DTG est le substrat de deux protéines d'efflux, la P-gp et l'hBCRP(94). Le DTG n'a pas d'effet inducteur ou inhibiteur *in vitro* sur d'autres protéines d'efflux (comme la *multidrug resistance–associated protein* 2 (MRP-2) ou l'*organic cation transporter* (OCT-1)). En revanche, *in vitro*, le DTG inhibe l'OCT-2, protéine présente sur les cellules tubulaires rénales. Cette inhibition est retrouvée chez les PVVIH. Elle conduit à une augmentation de la créatininémie (+20% en moyenne) par inhibition de la sécrétion tubulaire luminale. Cet effet inhibiteur est aussi associé à des interactions médicamenteuses, avec la metformine notamment (76). A ce jour, aucune étude *in vitro* n'a mis en évidence le rôle d'une protéine d'influx dans le transport du DTG.

Aucune étude n'a recherché de relation entre les différents génotypes réduisant l'activité de la P-gp ou de l'hBCRP. Cependant, les polymorphismes de ces protéines influençant leur activité modifient la pharmacocinétique d'autres antirétroviraux(36). Ces polymorphismes sont donc susceptibles d'affecter la pharmacocinétique et la diffusion du DTG dans les compartiments.

Les données des études SPRING2 et SAILING montrent des variabilités inter-individuelles importantes des concentrations totales plasmatiques minimales (coefficient de variation de 60 et 131%)(6). La variabilité inter-individuelle chez les PVVIH dans les études de « vrai-vie » retrouve des valeurs proches à celles décrites dans les essais cliniques (coefficient de variation = 83%)(98).

Un modèle de pharmacocinétique de population a été construit à partir de données pharmacocinétiques riches, issues des essais cliniques(99). Ce modèle a été développé pour (i) décrire la pharmacocinétique du DTG, (ii) rechercher des covariables expliquant la variabilité inter-individuelle et (iii) conduire des analyses de pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) d'efficacité et d'innocuité. Le modèle décrivant le mieux les données comprend un compartiment et une constante d'absorption, associé à un *lag-time,* et une constante d'élimination. Plusieurs covariables ont été identifiées. Les patients fumeurs avaient une clairance apparente d'élimination plus élevée, en comparaison aux patients non-fumeurs ou ayant arrêté de fumer. Pour les auteurs, la consommation de tabac a été identifiée comme facteur inducteur de plusieurs enzymes, dont le CYP3A4 et potentiellement l'UGT1A1. Une différence du profil pharmacocinétique était observée entre les individus des deux sexes. Cette différence a été expliquée par les auteurs par une disparité de la distribution des protéines d'efflux P-gp et hBCRP entre les hommes et les femmes au niveau du

tube digestif. Les auteurs ont observé une relation proportionnelle entre l'augmentation de l'âge et de la clairance. Cependant, ce résultat doit être confirmé, seule une faible proportion d'individus avait plus de 55 ans (<5%). Enfin, les concentrations les plus élevées de bilirubine étaient reliées à une clairance apparente d'élimination plus faible. Pour expliquer ce résultat, les auteurs ont proposé un mécanisme d'inhibition compétitive de la bilirubine sur le métabolisme du DTG. La recherche du polymorphisme de l'UGT1A1, comme effectué dans l'étude de Chen *et al*(95), pourrait également expliquer ce résultat.

5. Diffusion du DTG dans les tissus

La diffusion du DTG dans les tissus identifiés comme des compartiments contribue à l'interprétation des échecs virologiques. Des études ont exploré la diffusion du DTG dans les principaux compartiments, par des mesures de concentration dans le liquide cérébro-spinal (LCS) ou le plasma séminal.

La diffusion du DTG dans le LCS a été évaluée dans une étude chez des patients VIH naïfs de traitement. Les mesures de concentrations libres plasmatiques et les concentrations totales dans le LCS étaient semblables(100). Ainsi, une mesure de la concentration libre plasmatique serait un bon reflet de l'exposition dans le LCS, dont l'accès est plus difficile. Toutefois, les échantillons ont été prélevés peu de temps après la prise et la valeur des concentrations 24 heures après la dernière prise n'est donc pas connue. Le ratio des concentrations totales LCS/plasmatiques montre une diffusion tissulaire médiocre (proche 0,5%), comparé au raltegravir (6%)(101). Ce résultat est probablement la conséquence de la forte liaison du DTG aux protéines plasmatiques, comparé au raltegravir (lié aux protéines plasmatiques à 83%(102)). Cependant, en dépit d'une diffusion médiocre, le quotient inhibiteur du DTG est bien supérieur à celui du raltegravir dans ce compartiment (quotient inhibiteur de 4,5 pour le raltegravir, 66 à 90 pour le DTG)(100). La décroissance virale était importante et rapide aussi bien dans le sang que dans le LCS dans cette étude chez le patient naïf. L'efficacité virologique considérable retrouvée dans ce compartiment était probablement aussi liée à la bonne diffusion des deux inhibiteurs nucléosidiques habituellement associés au DTG, à savoir l'abacavir et la lamivudine.

L'exposition du DTG a également été explorée dans deux autres compartiments, le tissu génital et le tissu digestif.

La comparaison des concentrations totales de DTG entre les plasmas sanguins et séminaux a révélé une faible diffusion du DTG dans le tissu génital masculin(103). En effet le ratio des concentrations

totales dans le plasma séminal sur le plasma sanguin moyen était proche de 7%. De plus, les concentrations totales du plasma séminal étaient inférieures à la concentration inhibitrice 90 (IC_{90}) ajustée à la liaison protéique. Les mesures de concentrations libres n'ayant pas été réalisées, aucune comparaison à l'IC_{90} non ajustée à la liaison protéique n'a pu être réalisée. Les résultats de l'étude, et leurs implications sur l'interprétation pharmacologique, ont poussé les auteurs à conduire un autre essai incluant la détermination des concentrations libres dans le plasma séminal. Des travaux ont donc été menés chez des patients naïfs, avec des mesures de concentrations libres, mais aussi de charges virales sanguines et séminales(104). Les résultats ont révélé une fraction libre (ratio de la concentration libre sur la concentration totale) proche de 50% dans le plasma séminal. La concentration libre était ainsi bien supérieure à l'IC_{90}, expliquant la décroissance importante de la charge virale observée dans ce compartiment (indétectabilité fréquemment obtenue en 4 semaines).

Une étude a également combiné les mesures de DTG dans le tissu rectal (biopsie) chez des patients VIH(103). Les résultats ont révélé une diffusion rapide du DTG (dès la première heure) mais en faible proportion par rapport à la concentration plasmatique (17% du DTG plasmatique retrouvé dans les biopsies). La concentration en DTG demeurait cependant supérieure à l'IC_{90} ajustée à la liaison protéique pendant l'intégralité de l'inter-dose.

La diffusion du DTG dans le liquide cervico-vaginal (LCV) a été analysée chez des sujets sains, à partir des mesures des concentrations totales plasmatiques et de prélèvements de LCV associés à des biopsies tissulaires cervicales et vaginales (105). Les concentrations dans le LCV représentaient 10% de la concentration plasmatique, avec une majorité des individus ayant des concentrations supérieures à l'IC_{90} ajustée à la liaison protéique. Ces valeurs étaient associées à une importante variabilité inter-individuelle (coefficient de variation de 72%). Le DTG diffusait rapidement dans les tissus (dès T3h, T_{max}=6h) et persistait longtemps après l'arrêt (jusqu'à 72 heures).

Une étude récente a également exploré la diffusion du DTG dans des ganglions. Les auteurs ont observé de faible quantité de DTG dans des biopsies de ganglions inguinaux, comparé aux autres substances de la même classe (raltegravir, elvitegravir)(45).

En résumé, les études ont révélé une hétérogénéité du profil de diffusion du DTG dans les différents tissus, avec l'existence de sanctuaires où le DTG est présent à de faibles concentrations. Si la diffusion paraît être importante dans le LCS, comparé au seuil de l'IC_{50}, et le tissu génital masculin, elle se montre plus modeste dans les tissus digestifs, les sécrétions génitales féminines ou les

ganglions. L'étude combinant les mesures de concentrations libres dans le LCS et le plasma ont montré que la forme libre est un meilleur reflet que la concentration totale pour évaluer la diffusion du DTG dans ce tissu.

6. Pharmacocinétique du DTG dans les populations particulières

La pharmacocinétique du DTG a été explorée dans des sous-populations de PVVIH particulières, comme des patients insuffisants hépatiques ou rénaux mais aussi chez les femmes enceintes. Des mesures de concentrations libres ont été réalisées chez ces patients, les conditions physio/pathologiques étant susceptibles de conduire à une variation des concentrations libres et totales.

Une étude a été réalisée chez des patients non VIH présentant une insuffisance hépatique modérée (score Child-Pugh 7-9). La pharmacocinétique du DTG chez ces individus a été comparée à un deuxième bras composé de sujets sains à fonction hépatique non altérée (106). Les paramètres pharmacocinétiques de concentration totale (C_{max}, C_{min}, ASC) étaient similaires entre les deux bras (ratio moyen ≤ 5%). L'intérêt de l'étude résidait surtout dans la mesure des concentrations libres plasmatiques. En effet, les résultats révélaient un écart majeur entre les deux groupes, avec des concentrations libres beaucoup plus élevées chez les insuffisants hépatiques. Un paramètre pharmacocinétique, probablement la clairance intrinsèque si l'on considère les patients étudiés, a donc été perturbé par l'insuffisance hépatique. Cependant, cette modification pharmacocinétique ne s'est pas répercutée sur les valeurs de concentrations totales.

Une étude a exploré la pharmacocinétique du DTG chez des patient non VIH avec une clairance à la créatinine inférieure à 30 mL/min(107). Les résultats de concentrations libres (C_{min}, C_{max}) et totales (C_{max}, ASC) ont été comparés à un groupe de sujets sains à fonction rénale conservée. Après une seule administration, les deux formes, libres et totales, étaient plus basses dans le groupe de patients à fonction rénale altérée. Les auteurs ont conclu (i) à une réduction de la clairance apparente d'élimination pour expliquer ces résultats, (ii) tout en indiquant que la diminution des concentrations totales était à l'origine de la baisse des concentrations libres.

Les mesures de concentrations totales chez les femmes enceintes révèlent une diminution des paramètres d'exposition (ASC, C_{max}, C_{min}) à partir du second semestre(108,109). Puis en *post partum*, les concentrations redeviennent équivalentes à celles de la population générale. Une étude récente a mesuré les concentrations libres en DTG pendant la grossesse(110). Les résultats ont montré que

l'exposition de la forme libre ne varie pas au cours de la grossesse. Ainsi, la pharmacocinétique de la forme libre du DTG, et la clairance d'élimination en particulier, n'est pas ou peu modifiée pendant la grossesse. La réduction des concentrations totales est donc secondaire à la modification d'un paramètre de liaison du DTG à l'albumine. La concentration de l'albumine diminue pendant la grossesse à partir du second semestre(111,112). C'est donc ce paramètre qui explique la divergence observée entre les formes libres et totales. Le DTG est une substance récente et, à ce jour, peu d'essais ont étudié l'innocuité du DTG pendant la grossesse. Le DTG n'est donc pas proposé en première intention à l'initiation de la grossesse. Cette décision a été renforcée suite à une alerte survenue au printemps 2018. Elle rapportait l'augmentation de la fréquence des anomalies de fermeture du tube neural chez les fœtus nés suite à une exposition au DTG pendant la grossesse(113).

L'influence d'IMC extrêmes sur la pharmacocinétique du DTG n'a pas été étudiée.

Dans le cadre de nos travaux, les résultats de l'étude conduite chez les patients insuffisants hépatiques sont importants(106). L'étude démontre que des concentrations totales peuvent être similaires entre plusieurs individus sans pour autant refléter la variabilité inter-individuelle des concentrations libres. Il est donc possible d'observer des désynchronisation entre les formes libres et totales du DTG. Par ailleurs, l'interprétation dans l'étude de cette discordance entre les formes libres et totales est étonnante. En effet, les auteurs ont utilisé les mesures de concentrations totales pour discuter de l'effet de l'insuffisance hépatique sur la clairance apparente. L'interprétation des rapports entre concentrations libres et totales était également erronée dans une étude menée par les auteurs de l'étude explorant la pharmacocinétique du DTG chez l'insuffisant rénal(107). Les premières données d'exploration chez la femme enceinte montrent également une divergence de variation entre les concentrations libres et totales. Le mécanisme de cette divergence est bien connu et ne devrait plus entraîner aujourd'hui d'adaptation de posologie erronée. Ces cas de figures soulignent l'intérêt de la forme libre, par rapport à un suivi des concentrations totales, dans l'exploration de la pharmacocinétique du DTG.

7. Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques

Dans le cadre du STP appliqué chez les PVVIH, il est recommandé de suivre la concentration totale minimale (ou résiduelle)(3). La valeur du seuil d'efficacité est issue d'études chez les patients naïfs de

traitement, période où la charge virale est importante. Dans cette population de patient, une C_{min} supérieure à 1 mg/L a été associée à une meilleure efficacité virologique du DTG(3,6,81).

Les auteurs des études VIKING ont proposé une posologie de 50 mg en deux prises par jour(83). Dans ces essais, l'objectif de l'augmentation de la posologie était de maintenir un quotient inhibiteur élevé contre des virus avec des mutations de résistance sur l'intégrase. Cependant, ces études n'ont pas été assorties de mesures de concentrations. Il n'y a donc pas eu de recherche de relation pharmacocinétique-pharmacodynamique.

De même, aucun seuil n'a été proposé dans les stratégies d'allègement thérapeutique. Une étude de DTG en monothérapie a constaté des échecs virologiques associés à des concentrations totales minimales supérieures à 1 mg/L(5). Chez certains patients, des virus avec mutations de résistance ont été isolés. Toutefois, ces échecs virologiques ne sont pas observés si le DTG est associé à une autre substance présentant un profil de diffusion important dans différents tissus, comme la lamivudine(88,90). Cette différence d'efficacité soulève l'hypothèse d'une quantité insuffisante de DTG dans certains compartiments, non expliquée par les concentrations totales. Ainsi, dans les situations d'échec en monothérapie, la concentration totale pourrait ne pas être un bon témoin des valeurs de concentrations libres. L'efficacité de l'association DTG/lamivudine, renforce l'hypothèse d'une quantité de DTG insuffisante dans certains tissus(114).

Le DTG est une substance avec un profil de sécurité d'utilisation favorable. Cependant, des études ont révélé de fréquents de troubles neurocognitifs (entre 5 et 10% selon les études)(115,116). Ces effets se déclarent dès l'initiation du traitement, associant vertiges, maux de tête, insomnies, agitation, dépression, pensées suicidaires et anxiété. La question de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique n'est à ce jour pas tout à fait résolue. Une étude récente a établi un lien entre la concentration totale maximale, avec une exposition élevée, et la survenue d'effets neurocognitifs(117).

Le suivi de la concentration totale paraît suffisant pour s'assurer de l'efficacité des substances pendant une trithérapie. Cependant, ces concentrations totales n'expliquaient pas des échecs dans certaines stratégies d'allègement ou en cas de neurotoxicité. Ces données montrent ainsi les limites d'un STP basé sur la concentration totale. L'intérêt de la forme libre comme marqueur complémentaire dans le STP du DTG doit être évalué. En particulier lorsque l'on prend en compte les

éléments sur la diffusion dans les tissus ou sur l'exploration de la forme libre, abordés précédemment.

8. Interactions médicamenteuses

Dans une étude conduite en vie réelle, Cattaneo *et al.* ont montré que la C_{min} du DTG est augmentée avec l'ATV (ASC multipliée d'un facteur 2), et inversement, diminuée avec le DRV *boosté* (98). L'association DTG/DRV/r ne paraît donc pas être une association intéressante sur le plan pharmacocinétique. L'association du DTG avec l'efavirenz et l'etravirine entraîne également une diminution de l'exposition de 57 et 71% respectivement (118). L'ajout de ritonavir à l'association DTG-etravirine compense cependant la diminution de concentrations décrite avec l'etravirine(119). Mais le mécanisme de cette double interaction, théoriquement inductrice, n'est pas expliqué.

Le DTG ne doit pas être administré concomitamment à des cations divalents, ces derniers étant à l'origine d'une importante diminution de la biodisponibilité du DTG (de 40 à 75%). Le magnésium, l'aluminium, le calcium et le fer ferreux doivent être administrés 6h avant ou 2h après la prise de DTG (118,120). Cette interaction est liée au mécanisme d'action antirétroviral du DTG, qui chélate le magnésium utilisé par l'intégrase virale comme co-facteur enzymatique(76).

Les inducteurs enzymatiques puissants du CYPA3A4 et de l'UGT1A1 entrainent une diminution de l'exposition en DTG. Ainsi la carbamazepine, tout comme la rifampicine, conduit à une diminution de 50% de l'ASC du DTG (118,121).

Le DTG de son côté provoque l'accumulation de metformine par inhibition du transporteur rénal OCT-2 (122). L'association doit donc être maniée avec prudence, celle-ci pouvant conduire à un risque d'acidose lactique, mortelle dans 50% des cas. Les doses maximales (1000 mg x 3 / j) de metformine sont donc déconseillées.

B. Inhibiteurs de protéase

1. Place dans la classe thérapeutique et la stratégie actuelle

Les dernières substances commercialisées et encore régulièrement employées sont l'ATV et le DRV. Le DRVest considéré comme étant un IP de deuxième génération. En effet, ce dernier reste efficace face à des mutations de résistance impactant les autres IP. Les inhibiteurs de protéases (IP) doivent être associés à un potentialisateur pharmacocinétique dans la majorité des stratégies. Ces

substances améliorent l'absorption et réduisent le métabolisme de cette classe d'antirétroviraux. Cet effet est obtenu par inhibition des enzymes du métabolisme (CYP3A4/5) et des protéines d'efflux (P-gp notamment)(72). Ces potentialisateurs sont le ritonavir, développé initialement pour une activité antirétrovirale(123), et le cobicistat, commercialisé depuis 2013.

2. Mécanisme d'action

Les IP agissent très en aval du cycle viral(124). Ce sont de petites substances (les poids moléculaires du DRV et de l'ATV sont de 547,665 g/mol(125) et 704.855 g/mol(126), respectivement), qui se lient à la protéase virale. Les IP inhibent cette enzyme essentielle pour le clivage de pré-proprotéines nécessaires à la formation de virions infectieux. L'action des IP conduit donc à la production par les cellules hôtes de particules virales immatures incapables d'infecter d'autres cellules.

3. Darunavir

a) Evaluation de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation lors des essais cliniques

Plusieurs essais cliniques ont évalué l'efficacité du DRV en trithérapie dans différentes conditions. Son efficacité et son profil de sécurité d'utilisation ont été explorés chez des patients naïfs de traitements, pré-traités en succès virologique et en échec virologiques. Dans les différentes études, le DRV a montré sa non-infériorité ou sa supériorité sur le plan virologique (face au lopinavir par exemple). Les principaux résultats obtenus pour les essais de trithérapies mais aussi d'allègement thérapeutique sont résumés dans le tableau 13 de l'annexe 1-1 (127–142). Dans les essais de bithérapie, la stratégie DRV/ritonavir/lamivudine était non inférieure à la trithérapie (essai DUAL)(134) et conduisait à moins d'échec virologique, en comparaison avec la monothérapie (essai MOBIDIP)(135) . Dans les essais de monothérapie, les résultats divergeaient selon les études. L'étude MONOI(136,137) montrait la non infériorité de la monothérapie face à la trithérapie. Dans l'essai MONET(138–140), la monothérapie était non inférieure à la trithérapie à S48, mais un plus grand nombre d'échecs virologiques était ensuite observé à S144 dans le bras monothérapie. Ces échecs virologiques n'étaient pas expliqués par les mesures de concentrations totales plasmatiques. Enfin, dans l'étude PROTEA(141), la monothérapie de DRV était inférieure à la trithérapie en termes d'efficacité virologique du traitement.

b) Pharmacocinétique

Le DRV doit obligatoirement être associé à un potentialisateur pharmacocinétique pour assurer une biodisponibilité orale optimale. En l'absence de ritonavir, le DRV est métabolisé rapidement par les CYP3A4/5 entérocytaires puis hépatiques. Aux doses actuelles (800 mg x 1 ou 600 mg x 2 par jour), les concentrations efficaces ne sont pas atteintes sans ritonavir. Le DRV est également substrat de la P-gp intestinale, qui limite son absorption en l'absence de ritonavir, inhibiteur efficace de ce transporteur d'efflux. L'ajout de 100 mg de ritonavir assure une absorption rapide et importante avec un T_{max} compris entre 2,5 et 4 heures(125,143).

Pour favoriser la solubilisation du DRV dans le tractus gastro-intestinal, le DRV doit être associé à une prise alimentaire, quelle que soit sa composition(144). La prise du DRV/ritonavir pendant un repas augmente l'ASC et la C_{max} d'environ 40%, par rapport à une administration à jeun. Cet effet de l'alimentation est spécifique au DRV, l'exposition du ritonavir étant identique avec ou sans prise alimentaire (144). Le bol alimentaire favoriserait la solubilisation du DRV dans la lumière intestinale.

L'effet du ritonavir sur la pharmacocinétique du DRV est considérable. Ainsi, la biodisponibilité orale passe de 37% à 82% avec l'association du ritonavir au DRV(145). L'ASC et la C_{max} augmentent respectivement de 1316% et de 191% et les variabilités inter-individuelles de l'ASC et de la C_{max} passent respectivement de 63% à 22% et de 42% à 22%. Ces données sont issues de mesures effectuées sur un faible effectif de sujets sains (145). 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(146). Les protéines d'efflux sont inhibées par le ritonavir, qui améliore ainsi l'absorption mais aussi la diffusion du DRV dans les tissus.

Le volume de distribution du DRV est majoré par la co-administration de ritonavir (V_d=130,8L contre 88,1L avec ou sans ritonavir, calculé après administration intraveineuse (IV) de DRV) (145). Le DRV est fortement lié aux protéines plasmatiques (environ 95%). L'alpha-1 glycoprotéine acide (AAG) est la protéine de transport plasmatique principale du DRV. L'albumine serait également impliquée, dans une moindre mesure, dans le transport plasmatique du DRV (absence de données détaillées) (145). L'exploration de la liaison du DRV reste cependant parcellaire. En effet, aucune étude ne décrit à ce jour l'affinité des liaisons ou le nombre de sites de liaison sur les protéines plasmatiques.

Le DRV est principalement métabolisé par le CYP3A4 hépatique(125,143). Trois métabolites conservent une faible activité (<10% par rapport au DRV) sur le VIH(147). La clairance d'élimination après administration d'une dose IV de DRV/ritonavir a été estimée à 5,9 L/h. La demi-vie d'élimination est proche des 15 heures (145,147).

L'IMC, l'origine ethnique, l'âge et le sexe n'expliquent pas la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du DRV(148). Néanmoins, les IMC étudiés n'incluaient pas des valeurs extrêmes (<18 et >30kg/m²).

Plusieurs modèles de pharmacocinétique de population sont décrits dans la littérature(14,149,150). Deux des trois études ont proposé un modèle mono-compartimental pour décrire la pharmacocinétique du DRV(149,150). L'originalité de deux études a été d'intégrer la concentration d'AAG dans le modèle de covariables (14,150). Molto *et al*(14) ont utilisé ces concentrations pour expliquer la variabilité du volume de distribution du compartiment périphérique. Une augmentation de la concentration d'AAG, d'après les résultats de l'étude, conduit à une diminution du volume de distribution. Les auteurs expliquaient ce lien par l'influence du taux d'AAG sur la fraction libre du DRV et *in fine* sur sa capacité à diffuser dans les tissus. Cette interprétation du rôle de la covariable n'est néanmoins pas conforme aux propriétés de la forme libre. En effet, seule la forme libre diffuse dans les compartiments. Or la concentration libre, et donc la capacité de la substance à diffuser, ne peut pas dépendre des concentrations des protéines de liaison plasmatiques. Brochot *et al*(150) ont exploité les taux d'AAG pour expliquer la variabilité de la clairance d'élimination dans leur modèle de covariable. La concentration d'AAG était intégrée dans le modèle avec la constante de dissociation (fixée) pour estimer la fraction libre (f_u), dont le produit ($1/f_u$) avec la clairance intrinsèque permettait d'estimer la clairance totale. Les auteurs n'expliquaient donc pas des variations de clairance intrinsèque mais des variations de clairance d'élimination totale (et donc indirectement des variations du nombre de sites de liaison).

c) Diffusion du DRV dans les tissus

Le DRV se révèle avoir un profil de diffusion modeste dans le LCS. Deux études(151,152) ont exploré les concentrations libres du DRV dans le LCS et dans le plasma. La protéinorachie est faible, comparée à la protéinémie (0,15 – 0,40 g/L dans le LCS, 64-83 g/L dans le plasma sanguin)(153). Ainsi, même si la concentration en protéine est faible, le DRV dans le LCS existe sous une forme libre et liée. Ainsi, Croteau *et al* retrouvent une fraction libre de 93,5%, comparé à une fraction liée de

97,2% dans le plasma(152). Les auteurs ont rapporté des ratios de concentrations libres LCS/plasma moyens compris entre 4 et 8%. Par ailleurs, ces valeurs de ratio variaient considérablement entre les individus(151,152). Le quotient inhibiteur, en utilisant la concentration libre, était en moyenne de 8 et 28,1 dans les études de Delille *et al* (151) et Croteau *et al*(152), respectivement. Par ailleurs, il existait une corrélation entre les concentrations libres plasmatiques et du LCS (coefficient de corrélation de Spearman de 0,77 et 0,66 pour les études de Delille *et al* (151) et Croteau *et al*(152), respectivement). Par ailleurs, les concentrations libres plasmatiques étaient mieux corrélées que les concentrations totales plasmatiques aux concentrations rachidiennes (151,152).

Le DRV est retrouvé à un niveau de concentration important dans le liquide cervico-vaginal(154). En effet, les concentrations mesurées dans cette étude sont proches voire supérieures à celles du plasma sanguin.

Le DRV diffuse également bien dans le tissu génital masculin. Une étude(155) a mesuré les concentrations libres et totales dans le plasma séminal, sans donner les rapports des concentrations libres entre les plasma séminaux et sanguins. La concentration totale dans le sperme est bien inférieure à la concentration totale plasmatique (ratio plasma séminal/sanguin d'environ 10-20%)(155). Cependant, la liaison de DRV aux protéines est beaucoup plus faible dans le sperme comparé au sang. La fraction libre calculée était proche de 86% (contre 6% dans le sang). Les mesures de concentration libre étaient supérieures à l'IC_{50} dans ce compartiment. Cette même étude a mesuré les concentrations de DRV dans des biopsies rectales. Les mesures rapportées indiquaient des concentrations en DRV plus élevées que celles mesurées dans le plasma. Cependant, les concentrations n'étant pas homogènes dans les différents segments du tube digestif, il est difficile de les interpréter. Fletcher *et al* ont ainsi démontré que les concentrations en DRV étaient plus élevées dans l'iléon que dans le rectum(43).

Cette même étude de Fletcher *et al* a montré que les concentrations en DRV dans les ganglions étaient bien plus faibles que les concentrations plasmatiques(43). Pour les auteurs, cette faible diffusion dans ce compartiment pourrait expliquer des échecs virologiques.

En résumé, le DRV présente un profil de diffusion hétérogène dans les différents compartiments. Le DRV est retrouvé à des concentrations efficaces dans les tissus génitaux et probablement une partie du tissu lymphoïde du tube digestif. En revanche, sa diffusion paraît être plus limitée dans le LCS et les ganglions, qui peuvent ainsi constituer des sanctuaires pour le virus. Des individus présentant une

exposition insuffisante dans ces compartiments seraient susceptibles de déclarer un échec virologique.

d) Pharmacocinétique du DRV dans les populations particulières

Des études(156,157) ont exploré l'exposition de la forme totale du DRV chez des patients insuffisants hépatiques. Les deux études conduisent à des données contradictoires. Curran *et al* (156)ont combiné l'étude des formes totales et libres sur deux groupes de PVVIH, avec ou sans insuffisance hépatique (cirrhose chez patients co-infectés VIH-VHC). Les ASC et C_{min} libres et totales avaient tendance (absence de significativité) à être plus élevées chez les patients cirrhotiques, comparées aux patients sans atteinte de la fonction hépatique. Ces différences s'expliqueraient par une clairance d'élimination plus basse chez les patients cirrhotiques. Cependant, les clairances n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes de patients. En revanche, le ritonavir, substance fortement lié aux protéines plasmatiques (liaison proche de 99%, sur l'AAG et l'albumine(72)), présentait des divergences de variations entre les formes libres et totales. Les marqueurs d'expositions de la forme libre (ASC, C_{max}, C_{min}) étaient plus élevés chez les patients cirrhotiques. En revanche, aucune différence dans les concentrations totales n'était observée entre les deux groupes de patients. Sekar *et al* (157)n'ont pas observé de différence d'expositions de concentration totales (ASC, C_{max}, C_{min}) entre les sujets sains et les patients avec une insuffisance hépatique légère et modérée. Aucune mesure de forme libre n'a été réalisée dans cette étude.

A ce jour, il n'existe pas de données décrivant la pharmacocinétique du DRV chez le patient insuffisant rénal.

Comme pour le DTG mais aussi l'ATV, les concentrations totales de DRV diminuent à partir du second trimestre de grossesse. De nombreuses études pharmacocinétiques ont mesuré les concentrations libres dans ce contexte, sans observer de modifications significatives de l'exposition (158–160). La baisse des concentrations totales observées est une conséquence d'une réduction du taux l'alpha 1 glycoprotéine acide (AAG)(161).

En résumé, en dehors de la grossesse, aucune donnée de forme libre n'a montré de divergence de variation entre les formes libres et totales du DRV. Cependant, peu d'études, avec de faibles effectifs, se sont intéressées à la forme libre chez les sous-populations de PVVIH. Seul le ritonavir, dont le comportement de liaison est probablement proche de celui du DRV, a montré une « désynchronisation » entre les formes libres et totales chez les patients insuffisants hépatiques. Il

existe donc un intérêt de rechercher cette divergence de variation pour le DRV dans d'autres sous-populations de patients.

e) Relation pharmacocinétiques-pharmacodynamiques

Aucune étude de PK/PD n'a été conduite pour le DRV. Les concentrations cibles correspondent aux concentrations habituellement observées aux doses usuelles, issues des essais cliniques. Une valeur de référence de C_{min} est proposée chez le patient prétraité en échec virologique (>2 mg/L). Une valeur de concentration efficace 50, ajustée à la liaison protéique (EC_{50} *protein-adjusted*), est également proposée (0,5 mg/L).

Les études explorant l'efficacité du DRV en monothérapie ont révélé des échecs virologiques plus fréquents, comparés aux stratégies de trithérapie, avec deux inhibiteurs nucléosidiques. Les mesures de C_{min} ne permettaient cependant pas de distinguer les patients en succès ou en échec virologique(7).

Le DRV est une substance avec un profil de sécurité d'utilisation favorable. Il n'a pas été décrit de toxicité spécifique liée au DRV. Les effets indésirables sont habituellement secondaires à l'utilisation du ritonavir. Ainsi, aucun seuil de concentration toxique n'a été établi pour le DRV à ce jour.

4. Atazanavir

L'ATV n'est plus recommandé en première intention chez le patient naïf, mais il fait encore partie de la thérapeutique antirétrovirale chez de nombreux patients. Par ailleurs, cet antirétroviral conserve une place dans les stratégies d'allègement(2), justifiant l'exploration de la forme libre.

a) Evaluation de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation lors des essais cliniques

Lors des essais cliniques (décrits dans le tableau 14 d'annexe 1-1), l'ATV a montré sa non infériorité en termes d'efficacité par rapport au lopinavir, aussi bien chez les patients naïfs que pré-traités(162,163). Deux stratégies d'allègement thérapeutique ont été principalement étudiées avec l'ATV. La première combine l'ATV/r à la lamivudine et a montré son intérêt sur le maintien de l'efficacité à long terme(164,165). La seconde consiste en une monothérapie d'ATV/r. En raison d'une proportion importante d'échecs virologiques, cette stratégie n'est pas recommandée(2,166,167). L'arrêt de l'association du ritonavir est également considéré comme une stratégie d'allègement,

même si elle nécessite le maintien d'une trithérapie. Cette stratégie a montré son efficacité (essais ARIES et ASSURE) tout en améliorant le bilan lipidique des patients(168,169).

b) Pharmacocinétique

L'ATV, à la dose de 300 mg, est associé à 100 mg de ritonavir pour améliorer son absorption(170,171). En effet, l'ATV subit un efflux, notamment via la P-gp, au niveau de la barrière entérocytaire. Il est également substrat du CYP3A4, présent dans les entérocytes et les hépatocytes(170,171). Ces différents systèmes protéiques, limitant l'exposition de l'ATV, sont inhibés par le ritonavir. Le ritonavir favorise également la diffusion de l'ATV dans différents tissus en inhibant les pompes d'efflux comme la P-gp(170,171), qui est largement distribué dans l'organisme(42). L'exposition est améliorée par la prise de nourriture (+70% ASC et +57% C_{max} lors d'une administration avec un repas léger, en comparaison à une prise à jeun). La pharmacocinétique de l'ATV est non linéaire sur l'intervalle de dose 200 - 800 mg, avec une absence de proportionnalité entre l'ASC, la C_{max} et la modification de la dose(170,171). Pour une absorption optimale, le pH gastrique doit être acide. Cette caractéristique explique l'interaction avec les inhibiteurs de la pompe à proton, et dans une moindre mesure, avec les anti-H2(11,172).

L'ATV est métabolisé dans les hépatocytes par les CYP3A4/5, en deux métabolites pharmacologiquement inactifs(170,171). La majorité de la substance est éliminée via la bile puis les fèces (79%, dont 20% sous forme inchangée) et en partie par l'urine (13% dont 7% sous forme inchangée). Le ritonavir inhibe le métabolisme de l'ATV, expliquant les différences de demi-vies d'élimination ($T_{1/2}$ d'environ 8 heures ou 6,5 heures, avec ou sans ritonavir, respectivement) (170,171).

L'ATV se lie fortement aux protéines plasmatiques (86%), majoritairement à l'alpha-1-glycoprotéine acide (AAG) (11,170,171). Barrail Tran *et al* (173)ont étudié *in vitro* et chez des patients VIH la liaison de l'ATV aux protéines plasmatiques. Dans les essais *in vitro*, les auteurs ont observé une liaison importante, spécifique et saturable, à des concentrations supra-thérapeutiques, à l'AAG. Les essais sur l'albumine révélaient une liaison de faible affinité et non saturable. Cette étude a permis d'établir des valeurs de constante d'affinité et un nombre de sites de liaison. Ces résultats ont été obtenus par ultrafiltration (2000 g, 30°C, 120 minutes). Mais aucun détail n'est donné sur la méthode utilisée pour calculer les paramètres de liaison (la méthode Scatchard avait été utilisée dans un article similaire de la même équipe explorant la liaison du raltegravir(174)).

Plusieurs modèles ont été construits pour décrire et prédire la pharmacocinétique de l'ATV(175–178). Les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques individuels estimés étaient relativement similaires entre les études. Dans les quatre études, basées sur des données de patients et/ou de sujets sains, les auteurs ont développé des modèles monocompartimental, avec un *lag-time* sur la phase d'absorption. Le niveau d'exposition au ritonavir était une covariable commune dans les trois études. L'étude de Schipani *et al*(177) s'est intéressée au polymorphisme de *PXR*, protéine conditionnant la transcription de gènes comme le *CYP3A*. Les patients avec un polymorphisme associé à une activation plus importante de PXR présentaient une clairance d'élimination plus importante de l'ATV. Cette différence de clairance d'élimination s'expliquerait par un métabolisme plus élevé chez les patients porteurs de ce polymorphisme. Par ailleurs, une prise vespérale conduisait à une absorption plus importante de l'ATV, comparé à une prise matinale. Les auteurs n'ont pas proposé de mécanisme pour expliquer ces aspects chronopharmacologiques.

c) Diffusion de l'ATV dans les tissus

L'ATV ne présente pas un profil de diffusion favorable dans le LCS. Le rapport des concentrations totales entre le LCS et le plasma est proche de 1%(179). Une autre étude a comparé les concentrations libres plasmatiques et dans le LCS(151). Les auteurs ont observé un rapport des concentrations libres LCS/plasma de 8%, supérieur à celui décrit pour le DRV dans la même étude. Cependant, les concentrations libres d'ATV étaient majoritairement inférieures à l'IC_{50} d'un virus sauvage ($C_{u,ATV}$=0,6 ng/ml ; IC_{50}= 1,7 ng/ml). Le quotient inhibiteur de l'ATV dans ce compartiment est donc faible (0,4 en moyenne).

La distribution de l'ATV dans les tissus génitaux est plus importante, d'après les résultats d'une étude se basant sur les mesures de concentrations totales. Les concentrations dans le plasma séminal et les sécrétions vaginales correspondaient à 10 et 18% de la concentration plasmatique sanguine, respectivement(180). Cependant, aucune mesure de concentration libre n'a été réalisée pour l'ATV dans ces matrices biologiques.

Dans l'étude de Fletcher *et al* (43)les concentrations d'ATV dans les ganglions étaient relativement faibles, comparés aux concentrations plasmatiques sanguines. Par ailleurs, les concentrations mesurées lors de cette même étude dans l'iléon et le rectum traduisaient également des expositions relativement faibles dans ces tissus.

En résumé, l'ATV présente un profil de diffusion limité dans la plupart des compartiments, en dehors des tissus génitaux. Ces résultats pourraient expliquer (i) les échecs virologiques observés lors de monothérapies par ATV et (ii) le risque d'émergence de réplication dans le SNC lors de l'arrêt du ritonavir.

d) Pharmacocinétique de l'ATV dans les populations particulières

L'insuffisance hépatique altère considérablement la pharmacocinétique de l'ATV. Ainsi, chez des patients présentant une insuffisance hépatique modérée à sévère, l'ASC augmentait en moyenne de 42%. Une étude testant une dose de 400 mg d'ATV sans ritonavir a été réalisée chez des patients VIH avec une insuffisance hépatique modérée ou sévère. Les concentrations minimales obtenues étaient comprises dans l'intervalle thérapeutique. Cependant l'étude a été effectuée sur un faible effectif, avec une variabilité inter-individuelle importante (coefficient de variation=76% ; valeurs des ASC). Les auteurs recommandaient donc un STP pour individualiser la posologie (171,181).

Peu de données décrivent la pharmacocinétique de l'ATV chez les patients avec une maladie rénale chronique, avec ou sans hémodialyse. Une étude comparant la pharmacocinétique de l'ATV entre des sujets sains et des patients hémodialysés a observé une réduction de la concentration totale chez les hémodialysés. Aucun mécanisme n'a été proposé pour expliquer ce résultat. Chez le patient dialysé, un STP est donc recommandé pour individualiser la dose(11,182,183).

Comme pour le DTG et le DRV, la forte liaison aux protéines plasmatiques et l'hémodilution de la grossesse expliquent la baisse des concentrations totales de l'ATV à partir du second trimestre. Cependant, la concentration libre demeure inchangée. Il n'est ainsi pas nécessaire d'adapter la posologie chez la femme enceinte.

Les données de la forme libre dans les sous-populations de PVVIH sont inexistantes, en dehors des études menées lors de la grossesse. Seul ce cas particulier révèle une divergence des variations des concentrations libres et totales, pouvant conduire à une interprétation erronée de la forme totale d'une part et à une adaptation de dose injustifiée d'autre part.

e) Toxicité associée à une stratégie basée sur l'ATV

Inhibiteur compétitif de l'UGT1A1, l'ATV peut entraîner une hyperbilirubinémie (HB) à bilirubine libre. La survenue d'une HB dépend de la concentration d'ATV. Plus la concentration d'ATV est élevée, plus la bilirubine libre est augmentée. Ainsi, à partir d'un seuil de 0,8 mg/L, la probabilité

d'HB est augmentée d'un facteur trois. L'association au ritonavir augmentant l'exposition de l'ATV, la probabilité d'une HB sous ATV/ritonavir est plus importante, comparée aux patients prenant de l'ATV seul (184,185). Cependant, des résultats ont montré que des concentrations totales inférieures au seuil de toxicité pouvaient quand même être associées à une HB(186). La forme libre de l'ATV, capable de diffuser dans les hépatocytes, est susceptible d'expliquer les HB survenant à des concentrations totales inférieures au seuil de toxicité.

L'utilisation combinée d'ATV et de ritonavir a un effet péjoratif sur le bilan lipidique, en particulier sur le taux de triglycérides. Ce trouble lipidique a initialement été associé à une sur-exposition à l'ATV, sans explorer l'effet du ritonavir. Lors des essais évaluant l'arrêt du ritonavir, les bilans lipidiques se sont normalisés, imputant l'effet dyslipidémiant au ritonavir. Néanmoins, les patients conservant une exposition importante d'ATV sans ritonavir présentaient plus de perturbations lipidiques. Ainsi, l'ATV présente également un effet dyslipidémiant concentration dépendant(184,185).

f) Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique

Un intervalle thérapeutique, basé sur une mesure de la concentration minimale, est proposé pour l'ATV(3). Celui-ci est compris entre 0,2 et 0,8 mg/L. Le seuil d'efficacité a été défini à partir de l'IC_{50} ajustée aux protéines (environ 10 fois l'IC_{50} *protein-adjusted* à 14 ng/ml)(187). La concentration toxique a été définie par la probabilité de survenue d'une hyperbilirubinémie à bilirubine libre (HB). Ainsi, une C_{min} supérieure à 0,8 mg/L augmente d'un facteur trois la probabilité de survenue d'une HB(71).

5. Interactions associées aux inhibiteurs de protéase

L'ATV et le DRV sont deux substrats des CYP3A4/5 et de pompes d'efflux, comme la P-gp(125,143,170,171). En inhibant les CYP et les transporteurs d'efflux, le ritonavir assure une exposition optimale des deux antirétroviraux pour une prise quotidienne. Toute substance inhibant l'activité de ces protéines s'associera à l'effet du ritonavir, avec un risque majoré d'effet indésirable, notamment pour l'ATV. En revanche, la présence du ritonavir peut maintenir une exposition efficace lors d'une co-prescription avec un inducteur enzymatique, comme l'etravirine ou la rifampicine.

Le ritonavir n'est pas uniquement un inhibiteur des CYP3A. Il exerce également une inhibition enzymatique sur les systèmes CYP 2B6, 2C8 et 2D6(72). Par ailleurs, via une liaison au récepteur

pregnan X receptor (PXR), le ritonavir est un inducteur enzymatique pour les protéines CYP 1A2, 2C9, 2C19 mais aussi UGT1A1(188). L'étendue de l'action du ritonavir explique son implication dans de nombreuses interactions médicamenteuses, reportées dans le tableau 15 de l'annexe 1-1.

L'ATV possède un effet inhibiteur propre du CYP3A4/5 et de la P-gp qui pourra conduire à des interactions, même lors d'une utilisation sans ritonavir(11).

IV. Forme libre et forme totale

A. Notions de fraction libre

Dans le compartiment vasculaire, les substances peuvent être liées aux protéines plasmatiques. Il existe une grande variabilité dans l'importance de la liaison aux protéines plasmatiques entre les substances. Certains médicaments sont faiblement liés aux protéines plasmatiques (0-10%). D'autres, comme les trois antirétroviraux étudiés, sont fortement fixés aux protéines plasmatiques (liaison aux protéines >85%). Les liaisons sont majoritairement réversibles et constituées de liaison dites faibles (hydrophobes, hydrogène par exemple)(8). Il existe donc un équilibre constant entre la forme liée et la forme libre, faisant intervenir une constante d'affinité (K_a) (unité mol/L) et la concentration molaires en protéine de liaison. Dans la suite de ce chapitre, toutes les concentrations sont exprimées en molaires.

Deux équations mettent en relation les concentrations libres et liées :

$$C_t = C_u + C_b \qquad \textbf{Eq.V-1}$$

Avec C_t, la concentration totale ; C_u, la concentration libre ; C_b, la concentration liée aux protéines plasmatiques.

Et l'équation calculant la fraction libre (f_u) :

$$f_u = \frac{C_u}{C_t} \qquad \textbf{Eq.V-2}$$

Avec f_u, la fraction libre (un scalaire); C_u, la concentration libre ; C_t, la concentration totale libre et liée.

Si l'on considère la relation entre la substance et les protéines liaison, avec la formation d'un complexe substance-protéine de liaison, on retrouve la relation suivante :

$$C_u \leftrightarrow C_b - protéine \qquad \textbf{Eq.V-3}$$

Qui peut se réécrire, s'il n'existe qu'un seul site de liaison:

$$C_b + PL = B_{max} \qquad \textbf{Eq.V-4}$$

Avec C_b, concentration liée ; PL, concentration protéine libre ; B_{max}, concentration totale en protéine

Il est possible de définir dans les conditions d'équilibre la notion de constante d'affinité (K_a) avec l'équation suivante :

$$K_a = \frac{C_b}{C_u \times PL} \qquad \textbf{Eq.V-5}$$

Et en intégrant B_{max} de l'équation 4 on obtient :

$$C_b = K_a(B_{max} - C_b) \times C_u \qquad \textbf{Eq.V-6}$$

On en déduit donc l'équation suivante :

$$C_b = \frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} \qquad \textbf{Eq.V-7}$$

Avec K_d, constante de dissociation (inverse de la constante d'association avec une dimension de mol/L) ;

On peut exprimer la concentration totale est donc donnée par :

$$C_t = \frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} + C_u \qquad \textbf{Eq.V-8}$$

Et en associant les équations 2 et 8, on obtient une équation générale donnant la fraction libre en termes d'affinité, de concentration en protéine et de concentration libre :

$$f_u = \frac{C_u}{\frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} + C_u} \qquad \textbf{Eq.V-9}$$

Dans les situations où la concentration libre est très inférieure au K_d, l'équation 9 peut être simplifiée tel que :

$$f_u = \frac{K_d}{B_{max} + K_d} \qquad \textbf{Eq.V-10A}$$

Qui peut être reformulée selon l'équation suivante

$$C_t = C_u \times (1 + \frac{B_{max}}{K_d}) \qquad \textbf{Eq.V-10B}$$

Et finalement

$$C_t = C_u \times (\frac{K_d + B_{max}}{K_d}) \qquad \textbf{Eq.V-10C}$$

En inversant l'équation **Eq.V-10A** ($1/f_u$).

L'inspection de l'équation 10 indique que f_u va dépendre pour une majorité de médicaments de deux facteurs: (i) la concentration molaire de la protéine de transport qui est une donnée physiologique propre à chaque patient et qui peut varier avec des évènements physiologiques (grossesse, âge…) ou physiopathologiques (inflammation, insuffisance hépatique, …) et (ii) la valeur de la constante de dissociation à l'équilibre qui elle aussi peut se trouver modifiée par des altérations de la protéine, ou des compétitions entre médicaments par exemple.

Ainsi, on constate que seule la forme totale, et non la libre, dépend de la constante de dissociation et de la concentration en protéine de liaison. Le K_d et le B_{max} sont deux paramètres susceptibles d'être des sources de variabilité inter-individuelles des profils pharmacocinétiques de la forme totale. La variabilité inter-individuelle des concentrations totales faisant suite à des modifications de ces paramètres est désormais bien illustréchez les femmes enceintes. Elle peut également être suspectée avec le DTG et le ritonavir chez les individus insuffisants hépatiques(106,156). Le B_{max} et le K_d peuvent donc expliquer des divergences de variations entre les formes libres et totales. Ces divergences conduisent donc à des difficultés dans l'interprétation des concentrations totales et justifie la mesure des concentrations libres. Cependant, cette source de variabilité est mal décrite à ce jour, peu d'études ayant exploré la variabilité inter-individuelle du B_{max} et du K_d. Néanmoins, une variabilité inter-individuelle importante de la fraction libre peut être un témoin indirect de la variation de ces paramètres.

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'étude de ces paramètres pour comprendre des divergences de variations entre les concentrations libres et totales.

B. Intérêts pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

La forme libre est capable de diffuser dans les tissus et rentrer dans les cellules(8). C'est en se basant sur cette propriété que l'on considère que les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques reposent sur la concentration libre.

Les antirétroviraux étudiés subissent un métabolisme hépatique important(76,92,125,143,170,171). On peut ainsi écrire :

$$CL_t \sim CL_h = Q_h \times E_h \qquad \textbf{Eq.V-11}$$

Avec CL_t, clairance totale ; CL_h, clairance hépatique ; Q_h, débit sanguin hépatique ; E_h, coefficient d'extraction hépatique.

Le coefficient d'extraction hépatique (E_h) correspond à la concentration de substance retrouvée dans le sang, après un seul passage par la circulation hépatique(8). Selon le principe de Fick(189), ce coefficient peut s'exprimer selon l'équation suivante:

$$E_h = \frac{C_a - C_v}{C_a} \qquad \textbf{Eq.V-12}$$

Avec E_h, coefficient d'extraction hépatique ; C_a, concentration totale en médicament dans le sang artériel (en amont du foie) ; C_v, concentration totale veineuse (en aval du foie).

Cette équation aide à comprendre le rôle d'extraction au niveau hépatique. Le foie va ainsi extraire le médicament de la circulation pour le métaboliser. On considère les concentrations totales pour calculer E_h, qui s'écrit aussi selon la relation suivante :

$$E_h = \frac{f_u \times CL_{int}}{Q_h + f_u \times CL_{int}} \qquad \textbf{Eq.V-13}$$

Or les trois antirétroviraux ont un coefficient d'extraction hépatique considéré comme faible (E_h<0,3 ; la clairance totale apparente des trois substances est nettement inférieure au débit sanguin hépatique, 1,5 L/min). Le terme de clairance intrinsèque apparaît (CL_{int}). La clairance intrinsèque correspond à à l'activité hépatocellulaire (ne prenant donc pas en compte la liaison des substances aux protéines plasmatiques ou le débit sanguin). Si les substances sont substrats d'enzymes ou de protéines de transports, la CL_{int} reflète l'activité de ces protéines(8). On en déduit que le produit f_u x CL_{int} est très inférieur au débit sanguin hépatique.

L'équation 11 peut ainsi être simplifiée, en intégrant f_u x $CL_{int} << Q_h$:

$$CL_h = Q_h \times \frac{f_u \times CL_{int}}{Q_h + f_u \times CL_{int}} \qquad \textbf{Eq.V-14}$$

$$CL_h = f_u \times CL_{int} \qquad \textbf{Eq.V-15}$$

Par ailleurs, lorsque les concentrations ont atteint l'état d'équilibre, elles peuvent être exprimées selon l'équation suivante:

$$C_{u,eq} = \frac{VE}{VS} = \frac{VE}{CL_u} \qquad \textbf{Eq.V-16}$$

Avec $C_{u,eq}$, la concentration libre à l'équilibre ; VE, la vitesse d'entrée ; VS, la vitesse de sortie de la substance de l'organisme ; CL_u, la clairance d'élimination de la forme libre, correspondant à la clairance intrinsèque (CL_{int}).

De même pour la concentration totale, on note :

$$C_{t,eq} = \frac{VE}{VS} = \frac{VE}{CL_t} \qquad \textbf{Eq.V-17}$$

Avec $C_{t,eq}$, la concentration totale à l'équilibre ; VE, la vitesse d'entrée ; VS, la vitesse de sortie de la substance de l'organisme ; CL_t, la clairance de la forme totale.

Or la clairance totale correspond à la clairance hépatique pour les trois antirétroviraux d'intérêt et peut être exprimée selon l'équation suivante:

$$CL_h = CL_t = f_u \times CL_{int} \qquad \textbf{Eq.V-18}$$

Ainsi, à l'équilibre, si l'on considère les équations calculant les clairances des formes libres (**Eq.V-16**) et totales (**Eq.V-17**), on constate que les variations de :

- la concentration libre (C_u), ne dépendent que de la CL_{int} et de la dose absorbée
- la concentration totale (C_t), dépendent de la CL_{int} et de la dose absorbée mais aussi de la fraction libre (f_u).

Or l'équation 10 nous rappelle que la f_u dépend de la C_u et de deux paramètres, le K_d et le B_{max}. Il existe donc deux facteurs supplémentaires pouvant expliquer une variation de C_t entre les individus. Cette variation peut intervenir sans que la C_u ne soit modifiée. Pour évaluer la clairance, il paraît donc préférable de suivre la concentration libre plutôt que la concentration totale. Ce cas de figure a bien été illustrée (mais mal interprété) dans l'étude de la pharmacocinétique du DTG chez le patient insuffisant hépatique(106). Elle a également été observée avec le ritonavir, dans l'étude de l'effet d'un défaut de la fonction hépatique sur les pharmacocinétiques du DRV et du ritonavir(156).

Dans nos travaux, nous avons donc utilisé la concentration libre pour évaluer la clairance d'élimination des trois antirétroviraux.

C. Méthodes de mesure de la concentration

Afin d'évaluer la forme libre des antirétroviraux, il est nécessaire de développer :

- Une méthode analytique capable de mesurer les concentrations libres et totales dans l'intervalle des valeurs théoriques de la forme libre. Le plus souvent, elle repose sur une technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse(190). La mise en place et la validation analytique de ce dosage est normée par des recommandations internationales(191,192).
- Une méthode isolant la forme libre de la forme totale ou liée. Deux techniques sont fréquemment utilisées, la dialyse à l'équilibre et l'ultrafiltration(13). Chacune d'entre elle présente ses propres avantages et inconvénients. A l'inverse des méthodes chromatographiques, aucun consensus ne détaille les étapes à suivre pour le développement d'une technique isolant la forme libre.

1. Méthode de mesure des concentrations libres et totales

La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse assure une mesure sensible et spécifique des substances, comme les antirétroviraux, en réduisant la durée et le nombre d'étapes avant le dosage(190). Par ailleurs avec cette méthode, il est possible de mesurer avec une même technique les concentrations libres et totales, dans une matrice biologique ou dans un tampon.

Pour s'assurer de l'exactitude de la mesure de concentrations, des référentiels (FDA, EMA) proposent une procédure pour la validation de la méthode de dosage. Il est ainsi nécessaire de vérifier plusieurs caractéristiques, comme la reproductibilité et la répétabilité de la méthode (qui permettent de déterminer l'exactitude et la précision) ou la stabilité de la substance mesurée.

Lors de nos travaux, dans l'objectif d'évaluer les performances de nos méthodes de dosage, nous avons suivi les recommandations de la FDA et de l'EMA pour la mesure des concentrations libres et totales du DTG, du DRV et de l'ATV. Cependant, ces deux organismes ne proposent pas de référentiel pour évaluer les performances des méthodes isolant la forme libre de la forme liée.

2. Dialyse à l'équilibre(13)

Le mode de fonctionnement de la dialyse à l'équilibre (DE) est le suivant. Une cellule de dialyse est composée de deux réservoirs séparés par une membrane semi-perméable. En effet, cette membrane est perméable aux substances libres et imperméable aux substances liées aux protéines. Le seuil du filtre est habituellement de 30 kDa. Il est recommandé de procéder à un pré-traitement de la membrane de dialyse, en l'imprégnant de tampon Sorensen (tampon phosphate à pH=7,4) avant

l'essai. L'échantillon de plasma à analyser et le tampon sont placés dans leurs réservoirs respectifs, de part et d'autre de la membrane semi-perméable.

L'objectif d'une étude de la liaison par DE est de s'approcher des conditions physiologiques pour obtenir un équilibre de liaison proche de celui retrouvé chez un individu. Ainsi, le tampon utilisé a une concentration en ions et un pH (pH=7,4) qui sont proches des valeurs retrouvées dans le plasma. Par ailleurs, le système de dialyse peut être placé à température physiologique (37°C). En effet, le pH et la température sont des conditions expérimentales influençant l'équilibre de liaison(13). Il est donc essentiel de maîtriser ces paramètres pour l'analyse de la forme libre. Par ailleurs, le système est maintenu en rotation continue pendant toute la durée de la dialyse afin d'arriver plus rapidement à l'équilibre de liaison.

Après avoir atteint l'équilibre de liaison, les liquides de chaque réservoir sont récupérés et les concentrations de la substance d'intérêt sont mesurées. A la fin de la dialyse, la concentration de la substance explorée dans le réservoir « tampon » est en équilibre avec la concentration libre dans le réservoir « plasma ». Ainsi, la concentration dans le réservoir « plasma » représente la concentration totale. La fraction libre (f_u) est alors calculée selon le rapport suivant :

$$f_u = \frac{C_u}{C_t} \qquad \textbf{Eq. V-19}$$

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est une étape limitante dans l'analyse par DE. Pour une interprétation exacte des résultats, la concentration libre dans le réservoir « tampon » doit être mesurée à l'équilibre de liaison. Ainsi, la première étape d'une validation de méthode par DE consiste à définir le temps de dialyse nécessaire pour atteindre cet équilibre. Ce dernier est considéré atteint lorsque la f_u ne varie plus au cours du temps.

Des phénomènes d'adsorption au dispositif, appelés liaisons non-spécifiques (LNS), peuvent survenir avec la membrane semi-perméable et/ou les cellules de dialyse. Même si ce phénomène est peu important, il doit obligatoirement être évalué avant de poursuivre l'analyse.

Le principe de la dialyse à l'équilibre est représenté dans la figure 3.

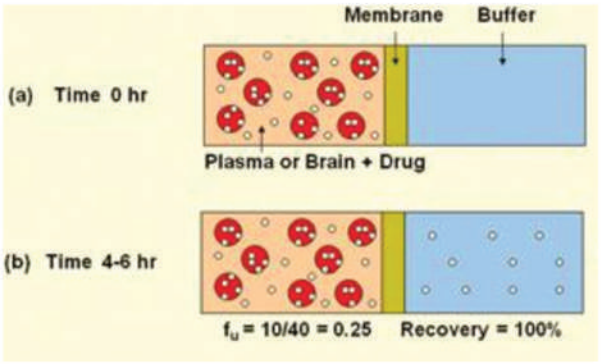


Figure 3: Représentation de la méthode de la dialyse à l'équilibre(193)

3. Ultrafiltration(13)

L'ultrafiltration (UF) est la technique la plus utilisée dans les études explorant la forme libre des médicaments. En effet, cette méthode est beaucoup plus rapide que la dialyse à l'équilibre et ne requiert qu'un faible volume de plasma (100 µL minimum contre 1 mL pour la DE). Cependant une validation de méthode rigoureuse est nécessaire avant son utilisation.

La figure 4 représente le dispositif et l'étape d'ultrafiltration.

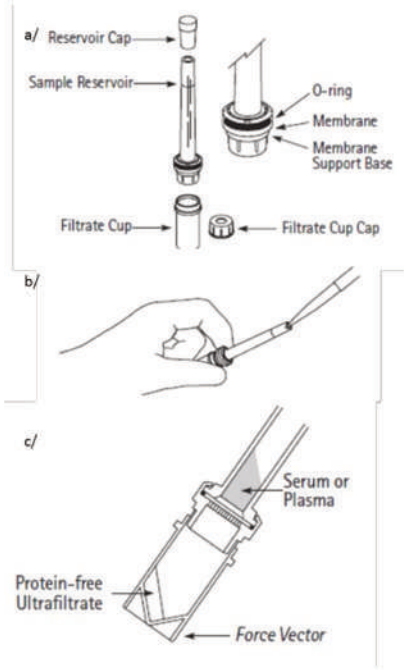


Figure 4Principes du phénomène d'ultrafiltration. Figures issues de la notice du fournisseur. a/ : éléments constituant la cheminée d'UF ; b/ : dépôt du plasma à analyser dans la tête de la cheminée ; c/ : ultrafiltration pendant la centrifugation.

Le mode opératoire (détails dans la figure 4) de l'UF est le suivant. L'échantillon de plasma est déposé dans un compartiment, la cheminée, séparé du réceptacle de l'ultrafiltrat par un filtre. Lors

de l'étape de centrifugation qui suit, le filtre laisse passer l'eau et les substances de taille inférieure au tamisage (30kDa habituellement). Les substances présentant un poids moléculaire plus élevé, comme les protéines plasmatiques, ne franchissent pas le filtre pendant la centrifugation. La concentration mesurée dans le réceptacle inférieur correspond à la C_u, la concentration totale devant être mesurée dans le plasma avant la centrifugation. De la même manière qu'avec la DE, la f_u est alors calculée selon le rapport suivant :

$$f_u = \frac{C_u}{C_t} \qquad \textbf{Eq. V-19}$$

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

L'UF présente l'avantage d'être rapide et facile d'utilisation. Elle ne nécessite pas de tampon et peut être utilisée pour étudier la fraction libre de différents liquides biologiques.

Cependant, il existe trois inconvénients majeurs à l'UF :

- L'étude de la forme libre n'est pas effectuée à l'équilibre de liaison. Au cours de l'UF, la concentration de l'échantillon dans la cheminée peut être modifiée (augmentée) et conduire à un déséquilibre de liaison. La conséquence pourrait être une libération de substance initialement liée. Pour éviter ce phénomène, le volume d'ultrafiltrat ne doit pas dépasser 10 à 15% du volume de plasma initiallement déposé dans la cheminée(13).
- Des phénomènes de LNS avec le filtre et/ou le dispositif d'UF sont décrits pour plusieurs substances(13). Les LNS seraient beaucoup plus importants avec l'UF, comparée à la DE. Il est donc primordial de quantifier les LNS pour une méthode d'UF.
- La température est un paramètre susceptible d'influencer l'UF. En effet, des travaux comparant l'étude de la forme libre par DE et UF ont relevé des différences de fraction libre avec l'UF, non observé avec la DE (Tableau 3). Le mécanisme de l'interférence n'est pas connu.

Substances	Techniques	Températures		Références
		24°C	37°C	
Thiopental	Ultrafiltration (f_u,%)	14,2	26,3	Jung *et al*(194)
	Dialyse à l'équilibre (f_u,%)	15,9	14	
Théophylline	Ultrafiltration (f_u,%)	40.9	45.0	Brors *et al*(195)
	Dialyse à l'équilibre (f_u,%)	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.

D'autres paramètres comme la durée et la force de centrifugation interviendraient sur la valeur la de fraction libre après UF.

La DE est une méthode inadaptée à une activité hospitalière, si de multiples échantillons doivent être analysés sur un intervalle de temps très court (<24 heures). Et il n'est pas possible d'utiliser l'UF sans maîtriser des facteurs de variabilité tels que la vitesse et la durée de centrifugation, la température appliquée. Il est donc préférable de valider les conditions expérimentales d'UF par rapport à la méthode référence, la DE. Ceci permet de retrouver des valeurs de faction libre identiques quelle que soit la technique employée.

Dans nos travaux, nous avons utilisé ces deux méthodes pour explorer la forme libre du DTG, du DRV et de l'ATV. La DE a également servi de référence pour étudier la fraction libre de ces trois antirétroviraux d'une part et établir les différentes conditions expérimentales appliquées à l'UF conduisant à des valeurs de fraction libre identiques à celles obtenues avec la DE d'autre part.

D. Protéines de transport plasmatique

Deux protéines sont impliquées dans le transport des antirétroviraux dans le plasma : l'albumine, sur laquelle se lie le DTG(10), et l'alpha-1-glycoprotéines acide (AAG), liant le DRV et de l'ATV(11,12). Ces deux protéines ont en commun une synthèse hépatocytaire(161,196). Ainsi, une insuffisance hépatique ou une dénutrition sont susceptibles de conduire à une réduction de leur production et donc de leur concentration plasmatique(161,196). Par ailleurs, les phénomènes d'hémodilution,

comme dans la grossesse, diminuent aussi leur concentration plasmatique(161,196), et donc le B_{max}. A l'inverse, pour l'AAG, le B_{max} peut augmenter, par exemple lors d'une inflammation(161). Dans ces conditions, il existe un intérêt à mesurer la concentration en protéine de liaison.

Les deux protéines ont aussi une fonction de transport des substances endogènes(161,196). Ces ligands sont donc susceptibles d'entrer en compétition sur les sites de liaison et réduire la proportion de substances liées, par réduction de l'affinité de la liaison(161,196). Ce phénomène de compétition peut également survenir avec des co-médications(161,196). Par ailleurs, pour les deux protéines, il existe un polymorphisme génétique mais aussi des modifications post-traductionnelles susceptibles de changer l'affinité de liaison.

1. Albumine

L'albumine est une protéine de masse molaire de 65 kDa (65000 g/mol)(196). Les valeurs de référence chez l'adulte sont de 35-52 g/L (540 – 800 µM)(196). En dehors des conditions discutées précédemment, il est rare d'observer d'importantes variations de l'albumine.

L'albumine fixe de nombreux ligands endogènes comme les acides gras, les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, l'urée ou la bilirubine(196). Certains de ces composés, comme les triglycérides, l'urée ou la bilirubine peuvent s'accumuler dans certaines pathologies (dyslipidémie, maladie rénale chronique, syndrome de Gilbert)(153). L'albumine transporte également de nombreux xénobiotiques, en particulier les médicaments. Les médicaments des classes suivantes sont décrits pour être fortement liées à l'albumine (>85%) : antihypertenseurs, antidiabétiques oraux (famille des sulfonylurées), hypolipémiants, benzodiazépines, anti-vitamines K, anti-inflammatoires non stéroïdiens(197–201).

Par ailleurs, de nombreux phénotypes d'albumine ont été répertoriés(202,203). Certaines des mutations observées étaient associées à des modifications de l'affinité de liaison, comme avec la warfarine. Cependant, l'influence de ces variants sur les liaisons protéiques est encore méconnue.

Plusieurs facteurs de modifications post-traductionnelles de l'albumine (204), généralement des phénomènes de glycation, sont observés(196). Le mécanisme le plus fréquent fait suite à des glycémies élevées sur le long terme, comme chez les patients avec un IMC élevé (>25-30 kg/m²)(70). Des liaisons covalentes s'établissent avec plusieurs sites de l'albumine. Les conséquences de ces réactions de glycation sur l'affinité de liaison sont peu étudiées. Néanmoins, il a été observé pour

certains ligands, comme la warfarine, la phenylbutazone ou le tryptophane, une augmentation de l'affinité (donc une diminution du K_d) suite à des phénomènes de glycation(205,206).

2. Alpha-1-glycoprotéine acide

L'alpha-1-glycoprotéine acide (AAG) est une protéine avec une masse molaire proche 40 kDa (40000 g/mol)(161). Cette masse molaire varie et dépend de la quantité d'acide sialique présent sur l'AAG(161). Les valeurs de référence chez l'adulte sont de 0,5-1,2 g/L (12,5 – 30µM)(207). Outre les variations communes à l'albumine, le syndrome inflammatoire est associé à une augmentation rapide et importante de la concentration en AAG(161). La cinétique de décroissance du taux d'AAG est analogue à celle de la réduction du syndrome inflammatoire(208). Les étiologies fréquemment rencontrées associées à une augmentation importante de l'AAG sont les épisodes infectieux, les traumatismes, la chirurgie ou les néoplasies(161). L'âge, le sexe, l'IMC et certaines co-médications sont également susceptibles d'entraîner des variations de l'AAG, mais ces dernières restent modestes, comparées aux autres étiologies(161). Chez les PVVIH, l'entrée dans un stade SIDA, fréquemment associé à un syndrome inflammatoire important, conduit à une augmentation importante de la concentration en AAG(161). Néanmoins, en 2018, il est désormais rare d'observer des PVVIH entrant en stade SIDA sous traitement antirétroviral efficace, la grande majorité des PVVIH étant viro-contrôlés(69).

L'AAG est une protéine de transport pour de nombreuses substances endogènes (stéroïdes, catécholamines, protéines de l'inflammation) mais aussi pour des xénobiotiques (classe thérapeutiques comprenant des médicaments se liant fortement (>85%) à l'AAG : anti-hypertenseurs, antidépresseurs, neuroleptiques, benzodiazépines, anticancéreux, anti-infectieux, méthadone(161,209–218). Les substances concernées sont en majorité plutôt anciennes et ne sont donc pas fréquemment rencontrées dans les co-médications chez les PVVIH.

Le polymorphisme sur les gènes (*ORM1* et *ORM2 ;* avec deux autres gènes *AGP1* et *AGP2*) codant l'AAG entraîne la synthèse de différents phénotypes. Les phénotypes décrits conduiraient à des modifications d'affinité avec les médicaments se liant à l'AAG(219,220).

Des mécanismes de modifications post-traductionnelles, telle que la glycation non-enzymatique, peuvent se manifester, comme pour l'albumine. Ces réactions surviennent lors de pathologies chroniques comme le diabète ou lors d'un syndrome métabolique chez les patients à IMC élevé(221).

Le rôle de la glycation de l'AAG sur l'affinité de liaison des médicaments à cette protéine n'est pas encore bien exploré.

En résumé, aussi bien pour l'albumine que l'AAG, il est plus probable d'observer des variations de K_d que de B_{max}. Ces variations de K_d sont susceptibles d'intervenir lors de compétitions avec des composés endogènes ou exogènes. Les modifications post-traductionnelles des deux protéines peuvent également intervenir dans la variabilité inter-individuelle de l'affinité, même si à ce jour, peu d'études ont exploré leur impact sur les concentrations totales des médicaments. Dans nos travaux, nous avons eu la possibilité de colliger les valeurs mesurées de certains composés endogènes (triglycérides, bilirubine, urée) et les co-médications susceptibles de se lier à l'albumine ou l'AAG. Les modifications post-traductionnelles n'ont pas pu être évaluées dans notre étude. En revanche, il a été possible de recueillir les pathologies (ou les thérapeutiques traitant ces pathologies) associées à une modification post-traductionnelle comme la glycation.

V. Pharmacocinétique de Population

A. Introduction à la pharmacocinétique de population

Lorsqu'une substance est administrée à une même dose à un ensemble d'individus, les profils de concentrations mesurées vont différer entre les sujets. Cette variabilité a principalement deux origines:

(i) la variation, d'un individu à l'autre, des paramètres pharmacocinétiques (PK) individuels, comme la clairance (Cl) ou le volume de distribution (V),

(ii) une erreur liée à la mesure des concentrations. Cette part analytique est systématique, les appareils n'étant pas capables de mesurer des concentrations « exactes ». L'erreur peut également venir de la dose ou des horaires de prise et de prélèvement, si elles sont mal renseignées.

L'objectif de la modélisation en pharmacocinétique de population (PKPOP) est de décrire et expliquer la variabilité entre les individus. Elle permet ensuite de prédire des profils de concentrations chez de nouveaux individus.

Pour atteindre cet objectif, les paramètres PK de population doivent être estimés au sein de l'échantillon d'individus. Cette estimation est possible en associant trois modèles :

(i) le modèle structurel. Il correspond à une équation décrivant un profil de concentrations au cours du temps chez un sujet particulier. Ce modèle contient les paramètres PK individuels.

(ii) le modèle statistique. Il décrit l'écart existant entre la concentration mesurée et celle prédite par le modèle.

(iii) le modèle de covariables. Il décrit la distribution des paramètres PK individuels dans la population. Ce modèle permet de décrire et expliquer la variabilité existant entre les paramètres PK individuels, à partir de données démographiques et/ou clinico-biologiques.

La modélisation en PKPOP suit plusieurs étapes : le recueil des données, le développement et l'association des trois modèles puis la validation du modèle final. Si celui-ci décrit fidèlement les données, il est possible d'exploiter le modèle dans des prédictions de profils de concentrations. Les différentes étapes sont décrites dans les chapitres suivants.

B. Le recueil des données

La modélisation en PKPOP repose sur un recueil de données chez un nombre suffisamment important de sujets (au moins plusieurs dizaines). Deux catégories d'informations sont recueillies.

Il faut tout d'abord collecter les données liées au profil PK de la substance et utilisées dans le modèle structurel. On retrouve ainsi les observations (c'est-à-dire les concentrations mesurées chez l'individu), la dose administrée et les intervalles de temps entre la prise et les différents prélèvements. Ces informations PK peuvent être riches ou éparses. Les données riches, donc comprenant de nombreuses mesures de concentrations, sont généralement retrouvées dans les études de phase I. Ces études sont habituellement effectuées chez des sujets sains et l'on cherche, sur un plan PK, à explorer le profil des concentrations chez ces individus. De nombreux prélèvements sont donc programmés chez un faible nombre d'individus (20-30 sujets), chaque individu décrit un profil de concentrations complet. Les données éparses sont recueillies chez des patients dans les essais de phase II/III ou dans la pratique clinique lors d'un Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP). L'objectif n'est plus de décrire en détail le profil PK de la substance. De fait, seul un faible nombre de prélèvement(s) (1 à 3) est/sont réalisé(s) par patient. Les échantillons sont prélevés à n'importe quel moment dans l'intervalle de temps entre la prise et le prélèvement. Dans les bases de données éparses, c'est l'intégralité des prélèvements effectués pour l'ensemble des individus qui va décrire le profil PK complet.

D'autres informations peuvent être recueillies chez les individus pour construire le modèle de covariables. Ces données sont caractéristiques à chaque individu. Elles regroupent des informations démographiques (âge, genre, poids, taille entre autre), biologiques (marqueurs de la fonction rénale, hépatique, protéinémie), cliniques (pathologie associée) et thérapeutiques (substances co-administrées).

Dans le cadre de notre étude, seuls des échantillons issus du STP étaient accessibles. Nous avons donc effectué les mesures et le recueil de données sur le plus grand nombre d'échantillons possibles pour décrire le profil PK du DRV. Dans la majorité des cas, un seul échantillon a été prélevé chez chaque patient. Les données obtenues comprenaient des mesures de concentrations libres et totales. Les données susceptibles de faire varier la PK des formes libres et totales, mais aussi les paramètres de liaison, ont été colligées.

C. Les modèles

Trois modèles (structurel, statistique et de covariables) doivent être construits puis associés pour former le modèle final. C'est ce modèle global qui assure la prédiction des paramètres PK individuels.

1. Le modèle structurel

Le modèle structurel repose sur une équation mathématique décrivant l'évolution des concentrations au cours du temps. Dans l'exemple suivant, le profil des concentrations suit une équation mono-compartimentale, après une administration en intraveineuse bolus :

$$Y(t) = \frac{Dose}{V} \times e^{-\frac{Cl}{V} \times t} \qquad \textbf{Eq.VI-1}$$

Où Y, la concentration mesurée à un temps t; Dose, la dose administrée ; V, le volume de distribution ; Cl, la clairance totale ; t, l'intervalle de temps entre l'administration et le prélèvement.

La modélisation en PKPOP cherche à prédire le profil des concentrations chez plusieurs sujets et pas pour une moyenne d'individus. Pour analyser plusieurs individus et la variabilité existant entre les individus, on utilise ainsi l'équation suivante:

$$Y_{ij} = f(\theta, X_i, t_{ij}) + \varepsilon_{\mathrm{i}} \qquad \textbf{Eq.VI-2}$$

Où Y_{ij}, la concentration de la substance pour le ieme individu au temps j; θ, le vecteur regroupant les paramètres PK (CL et V, si l'on reprend l'administration IV bolus dans un modèle mono-compartimental); X_i, la dose X pour l'individu i ; t_{ij}, l'intervalle de temps j pour le i^{eme} individu ; ε_i l'erreur résiduelle entre les observations chez l'individu et les prédictions du modèle pour le i^{eme} individu.

2. Le modèle statistique

Le rôle du modèle statistique est de détailler la variabilité existant autour du modèle structurel. Le programme utilisé dans nos travaux (logiciel Pmetrics®) propose une erreur multiplicative pour le modèle statistique. Il est courant d'utiliser cette catégorie d'erreur en analyse de pharmacocinétique de population. Nous avons donc choisi de maintenir l'erreur multiplicative dans notre modèle statistique pour expliquer l'erreur résiduelle.

3. Le modèle de covariables

Un écart important entre les paramètres PK individuels et les paramètres PK moyens de la population peut exister. En intégrant des données démographiques, pathologiques ou thérapeutiques, il est possible d'expliquer cette variabilité inter-individuelle. Mais aussi d'améliorer la capacité de prédiction des concentrations chez les individus.

Dans nos travaux, les covariables étaient susceptibles d'expliquer deux catégories de variabilité : (i) celles modifiant la clairance ou le volume de distribution, impactant les expositions de concentrations libres et totales et (ii) les covariables pouvant expliquer les variations des paramètres de liaison, influençant les concentrations totales uniquement. Ce sont ces dernières qui pourraient expliquer des divergences de variations entre les concentrations libres et totales.

D. L'évaluation des modèles

Au cours de la construction du modèle de PKPOP, la capacité du modèle à bien estimer les paramètres PK, et donc à bien prédire les profils de concentrations, doit être évaluée. La méthode graphique, par évaluation visuelle, apporte le plus d'informations sur les caractéristiques du modèle. Elle permet ainsi de distinguer des défauts sur le modèle structurel ou statistique. L'approche statistique juge globalement la pertinence du modèle final.

Lors de notre étude, nous avons basé nos évaluations sur les prédictions au modèle : (i) prédictions de population (PRED) en fonction des mesures observées ou contre les résidus et (ii) les prédictions individuelles (IPRED) en fonction des concentrations observées.

En plus de ces méthodes graphiques, nous avons comparé les modèles en suivant le score de l'Akaike Information Criterion (AIC) et calculé le biais moyen existant entre les concentrations observées et prédites.

Après les différentes étapes d'évaluation, le modèle finalisé doit être validé. Cette analyse se fait par validation externe et/ou interne. La validation externe nécessite un jeu de données n'ayant pas été utilisé lors du développement. La validation interne est fréquemment conduite par la méthode du *visual predictive check* (VPC), qui permet d'évaluer et valider graphiquement le modèle final. A partir du modèle et des différents temps de prélèvement, un nombre important (plusieurs milliers) de simulations de Monte Carlo sont effectuées. Ces simulations permettent de déterminer un intervalle

de prédiction à 90%, avec les 5eme et 95eme percentiles. Les concentrations simulées, en fonction du temps, sont représentées graphiquement et forment un profil pharmacocinétique moyen (avec des bornes aux 5eme et 95eme percentiles). On reporte ensuite sur ce graphique les concentrations observées. Pour que le modèle soit considéré valide, les concentrations observées doivent être réparties de manière homogène autour du profil pharmacocinétique moyen, tout au long de l'interdose.

Lors de nos travaux, nous n'avions pas accès à un jeu de données riches et la validation externe n'était donc pas envisageable. Nous avons eu recours à une méthode de validation interne et en particulier au VPC pour évaluer les performances des modèles développés.

E. Utilisation d'un modèle de PKPOP

Lorsque le modèle final est validé, celui-ci peut être utilisé pour prédire des profils de concentrations. On parle de profils PK simulés ou des simulations de profils PK. Des conditions sont fixées par l'opérateur, comme la posologie, différentes valeurs de covariables, et des cibles d'exposition à atteindre. Les conditions d'intérêt à explorer sont rassemblées sous la forme d'un « scenario ». A partir du « scenario » et du modèle final (distribution des paramètres PK moyens), des profils de concentrations vont être simulés. L'intérêt des simulations réside dans la possibilité d'explorer des situations PK singulières, difficiles à renseigner lors d'une étude chez des patients (pédiatrie, dysfonction d'organe comme le rein ou le foie).

Dans notre étude, les simulations ont été utilisées pour explorer la diffusion du DRV dans un compartiment dont l'accès par des prélèvements est difficile. Le but était de rechercher des facteurs capables d'expliquer des échecs à partir d'un compartiment où l'exposition est considérée insuffisante.

F. Les approches paramétriques et non paramétriques

Deux approches existent pour analyser un jeu de données par une modélisation en PKPOP. La première, l'approche paramétrique, est actuellement la plus utilisée dans les logiciels de PKPOP. Elle repose sur l'hypothèse d'une distribution Normale ou log-Normale des paramètres PK de population. Ces paramètres PK estimés sont donc décrits avec une moyenne, une varianceet avec une possible relation (nommée covariance) entre certains paramètres. La seconde méthode correspond à

l'approche non paramétrique. A l'inverse de l'approche paramétrique, aucune hypothèse sur la distribution des paramètres PK de population n'est formulée.

La différence entre les deux approches repose donc sur l'hypothèse de distribution des paramètres PK de population. La méthode paramétrique peut sembler contraignante en imposant une distribution Normale ou log-Normale sans que celle-ci ne soit vérifiée au préalable. Dans le cas d'une distribution bi- ou trimodale de la clairance (par exemple lorsqu'il existe des profils de métabolisme lent/intermédiaire/rapide), l'hypothèse d'une distribution Normale est difficilement envisageable. L'approche non-paramétrique s'avère être dans cette situation une alternative intéressante. Toutefois, la méthode non-paramétrique nécessite un échantillon d'individus important pour repérer efficacement des sous-populations d'intérêts.

Nous avons fait le choix dans notre étude de suivre une approche non-paramétrique. Avec cette méthode, nous avons pris la décision de favoriser la recherche d'une sous-population de patients. L'objectif est d'identifier des catégories de patients à risque de développer un échec virologique suite à une exposition insuffisante dans un compartiment.

Objectifs de l'étude

Pour les trois antirétroviraux étudiés, des échecs virologiques sont observés, sans être expliqués par les valeurs de concentrations totales. Ainsi, dans certaines situations, la concentration totale n'apporterait pas d'information pour évaluer l'efficacité de ces trois substances.

L'efficacité des antirétroviraux dépend de la concentration dans les compartiments. La forme libre représente la partie pharmacologiquement active des substances dans le sang, capable de diffuser dans des tissus comme les compartiments. Elle est généralement extrapolée à partir des concentrations totales. Cependant, pour ces substances fortement liées aux protéines plasmatiques, il existe des situations de désynchronisation dans la variation des concentrations libres et totales. Cette désynchronisation, dont les origines ne sont pas bien identifiées, ne permet pas de prédire avec exactitude la valeur de la forme libre à partir de la concentration totale. Dans ce cas de figure, la mesure de la concentration libre devient nécessaire. Pour isoler puis mesurer la forme libre, il est indispensable de suivre une validation de méthode rigoureuse. Dans le cas contraire, il existe un risque d'erreur important dans la mesure et donc dans l'interprétation des concentrations libres. Pour explorer la forme libre du DTG, du DRV et de l'ATV, nous avons donc articulés nos travaux autour de trois axes :

(i) valider les méthodes des dosages des concentrations libres et totales mais aussi des méthodes de dialyse à l'équilibre et d'ultrafiltration isolant la forme libre de la forme liée

(ii) étudier les caractéristiques des liaisons entre les antirétroviraux et les protéines plasmatiques,

(iii) décrire et expliquer les relations entre les concentrations libres et totales du DRV chez les patients VIH par une méthode de pharmacocinétique de population. Le modèle développé est ensuite utilisé prédire des profils de concentrations et ainsi proposer un mécanisme pharmacologique aux échecs observés avec le DRV.

Résultats expérimentaux

Première partie : étude de la forme libre par dialyse à l'équilibre, associée à une méthode de chromatographie liquide couplée à spectromètre de masse.

Introduction.

Quelques études ont exploré la forme libre des trois antirétroviraux en utilisant deux méthodes, l'ultrafiltration et la dialyse à l'équilibre. Cette dernière est considérée comme la méthode de référence pour étudier la forme libre d'une substance. **L'objectif** de cette partie est (i) de mettre au point une méthode pour déterminer la fraction libre (ratio des concentrations libres et totales) par dialyse à l'équilibre, (ii) d'étudier les paramètres pré-analytiques qui influencent les valeurs de fraction libre et (iii) d'évaluer la variabilité inter-individuelle de la fraction libre des trois antirétroviraux.

Matériel et méthodes

Pour les trois antirétroviraux, les mesures de concentrations libre et totale ont été effectuées par une méthode de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Les critères de validation analytique mentionnés dans les référentiels publiés par la FDA et l'EMA ont été utilisés.

La forme libre des trois antirétroviraux a été isolée par une méthode de dialyse à l'équilibre. Avant de pouvoir déterminer la fraction libre de chaque antirétroviral, il a fallu atteindre l'équilibre de liaison entre l'antirétroviral et les protéines plasmatiques. L'équilibre était considéré atteint lorsque les résultats de fraction libre ne variaient plus lors de l'augmentation de la durée des essais. Par ailleurs, nous avons évalué les liaisons non spécifiques, la stabilité de la liaison aux différentes conditions de stockages (+4°C, -20°C, cycles de congélation/décongélation), l'influence de l'hémolyse et de l'anticoagulant sur les résultats de fraction libre.

Les concentrations libres et totales ont ensuite été mesurées sur des échantillons de patients VIH et la fraction libre a été calculée.

Résultats

Les performances des méthodes de mesures des trois antirétroviraux, pour les concentrations libres et totales, sont conformes aux attentes des référentiels FDA et EMA. Les résultats sont résumés pour les trois substances dans les tableaux 4 à 6. Les résultats des mesures de concentrations libres et totales et de fraction libres sont résumés dans le tableau 7.

	Dolutegravir	Darunavir	Atazanavir
Gamme de concentrations (libre/total)	0,5 – 100 ng/ml 0,05 – 10,00 µg/l	1 – 1000 ng/ml 0,018- 5,54 µg/l	0,5 – 500 ng/ml 0,022 – 3,08 µg/ml
Reproductibilité (libre /total ; CV%)	<15%	<15%	<15%
Répétabilité (libre /total ; CV%)	<15%	<15%	<15%
Effet matrice (libre /total ; CV%)	Libre : 58 et 49% pour DTG et DTGd4 ; Total : 96 et 101% pour DTG et DTGd4	Libre : 65 et 59% pour DRV et DRVd5 ; Total : 110 et 107% pour DRV et DRVd5	Libre : non effectué Total : 91 et 165%.
Carry over; contribution isotopique (libre/total; CV%)	<20%	<20%	<20%
Dilution (libre/total ; CV%)	<15% au 1/5eme et 1/10eme		

Tableau 4résultats de la validation analytique. CV : coefficient de variation.

	Dolutegravir	Darunavir	Atazanavir
Stabilité C_t	<15%	<15%	<15%
Influence anticoagulant	<15%	<15%	<15%

Tableau 5 : Résultats complémentaires sur la validation analytique de la concentration totale. La stabilité et l'influence de l'anticoagulant (EDTA) sur le résultat étaient évaluées par le coefficient de variation. C_t : concentration totale.

	Dolutegravir	Darunavir	Atazanavir
Stabilité tampon	<15%	4h	<15%
Temps équilibre	<15%	4h	<15%
Liaison non spécifique	<15%	4h	<15%
Stabilité liaison	24h; 2cycles congélation /décongélation		
Anticoagulant	Augmentation de la fraction libre (+72%)	Absence d'effet statistiquement significatif	
Hémolyse	Augmentation de la fraction libre (+77%)		

Tableau 6 : Etude de la liaison aux protéines plasmatiques pour les trois antirétroviraux. Les anticoagulants testés sont l'héparine de lithium et le citrate.

Patients	Dolutegravir (n=121)	Darunavir (n=135)	Atazanavir (n=39)
C_u	16,00µg/L IQR[8,41; 24,35]	128,5µg/L IQR [67,3; 211,3]	53,7µg/L IQR [29,8; 105,0]
C_t	2610µg/L IQR[1668; 4150]	2675µg/L IQR [1578;3675]	796,0µg/L IQR [392,0;1350,0]
f_u	0,52% IQR [0,44 ; 0,67]	4,65% IQR [3,65; 6,24]	7,22 % IQR [5,34; 8,36]

Tableau 7: Résultats des concentrations libres, totales et de fraction libre. C_u : concentration libre ; C_t : concentration totale ; f_u : fraction libre ; IQR : interquartile range ; n : nombre d'échantillons sur lesquels les concentrations libres et totales ont été mesurées.

Conclusion :

Les méthodes pré-analytique (ici la dialyse à l'équilibre) et analytique (LC-MS) permettant de déterminer les concentrations libres et totales du DTG, du DRV et de l'ATV sont robustes.

Concernant la méthode de dialyse, l'équilibre de liaison est obtenu après quatre heures de dialyse et la liaison non-spécifique est faible (inférieure ou égale à 10%).

Les trois antirétroviraux et leur liaison aux protéines plasmatiques sont stables dans le temps et ne sont pas impactées par les cycles de congélation/décongélation. En revanche, la liaison du DTG est modifiée par l'hémolyse *in vitro* et par la nature de l'anticoagulant. Il paraît donc nécessaire d'explorer ces facteurs lors de la validation d'une méthode isolant la forme libre d'une substance.

Valorisation des travaux

Les détails du matériel et méthodes et des résultats sont reportés pour les trois substances dans trois articles. Un premier article sur l'étude de la fraction libre par dialyse à l'équilibre du DTG a été publié dans *Clinica Chimica Acta* (Annexe 2-1). Les travaux sur le DRV et l'ATV sont en fin de rédaction et sont présentés sous forme de résumé dans les annexes (Annexe 2-2 et 2-3).

Les données de la validation des méthodes de dosages par LC-MS et de dialyse à l'équilibre ont été présentées lors de deux congrès :

- 17eme International Workshop on Clinical Pharmacology of Antiviral Therapy, Chicago 2017
- 22eme Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Toulouse 2018

Deuxième partie : étude visant à déterminer les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats de fraction libre similaires à ceux de la méthode de référence, la dialyse à l'équilibre à 37°C.

Introduction

La rapidité et la facilité d'utilisation de l'ultrafiltration justifient la popularité de cette technique dans les études de la forme libre des antirétroviraux. Cependant, l'ultrafiltration est très sensible à de nombreux facteurs de variabilité, comme la température ou les conditions de centrifugations. **L'objectif** de cette partie a été d'établir, pour les trois antirétroviraux, les conditions d'ultrafiltration pour lesquelles il est possible d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus avec la dialyse à l'équilibre à 37°C.

Matériel et méthodes

La méthode pour isoler la forme libre par dialyse à l'équilibre est la même que celle précédemment décrite. Pour la validation de méthode de l'ultrafiltration, un plan expérimental factoriel complet a été construit. Pour ce plan complet, trois facteurs ont été explorés, à deux niveaux pour chacun : la température (25°C et 37°C), la durée (10 et 20 minutes) et la force relative (1000 et 2000 g) de centrifugation. Ce mode opératoire permet d'identifier les facteurs modifiant les valeurs de fraction libre lors de l'ultrafiltration. Ces facteurs peuvent être (i) **indépendants**, (le changement de niveau suffit à lui seul pour modifier la valeur de fraction libre) ou (ii) **croisés**, (il nécessaire de combiner deux facteurs à deux niveaux spécifiques pour modifier la valeur de fraction libre). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la dialyse à l'équilibre à 37°C. Pour explorer l'effet de la température sur la liaison, des essais de dialyse à l'équilibre à 25°C ont également été réalisés. Les volumes d'ultrafiltrat ont également été mesurés.

Pour valider les conditions d'ultrafiltrations établies, des échantillons de patients ont été analysés à la fois par dialyse à l'équilibre et ultrafiltration.

Résultats

Les résultats de l'évaluation de l'ultrafiltration sont reportés dans le tableau 8.

	Différence de f_u par DE 25/37°C	Facteurs influençant valeurs f_u par UF	Conditions UF équivalent à DE 37°C
DTG	Oui (f_u augmentée à 25°C)	**Indépendant :** Température (f_u augmentée à 25°C) **Croisé :** Durée (20 minutes) + force (2000 g) centrifugation (f_u augmentée dans ces conditions)	37°C 1000 g 20 minutes

DRV	Non	**Indépendant :** duréede centrifugation (f_u augmentée à 20 minutes)	
ATV	Oui (f_u augmentée à 25°C)	**Indépendant :** Durée (f_u augmentée à 2000 g) Force (f_u augmentée à 10 minutes)	Aucune condition

Tableau 8 : Influence de la température sur la f_u déterminée par DE et comparaison de l'UF à la DE. Lorsqu'un facteur ou une association de facteurs influencent les valeurs de f_u par UF, les résultats sont comparés à toutes les autres conditions. DTG : Dolutegravir ; DRV : Darunavir ; ATV : Atazanavir ; f_u : fraction libre ; DE : dialyse à l'équilibre ; UF : ultrafiltration.

Par ailleurs, avec le DTG, seule la combinaison d'une force et d'une durée de centrifugation élevées (20 minutes à 2000 g) ont conduit à une augmentation des volumes d'ultrafiltrat.

Pour les échantillons issus de patient sous DTG ou DRV, les résultats de f_u n'ont pas varié entre la dialyse à 37°C et l'ultrafiltration aux conditions établies pendant les essais (37°C, 1000 g, 20 minutes).

Conclusion

Quelle que soit la substance étudiée, les résultats d'ultrafiltration sont fortement liés aux conditions d'ultrafiltration. Nos résultats confirment donc la nécessité de valider une méthode d'ultrafiltration par rapport à la dialyse à l'équilibre pour une interprétation optimale des résultats de forme libre.

Valorisation des travaux

Le développement de la méthode d'ultrafiltration pour isoler la forme libre du DTG a été soumis dans la revue *Scientific Reports* (Annexe 2-4 ; révisions mineures).

Deux autres articles détaillant les résultats pour le DRV et l'ATV sont en cours de rédaction (Annexes 2-5 et 2-6).

Les données de l'évaluation de l'ultrafiltration par rapport à la dialyse à l'équilibre, pour les trois antirétroviraux, ont été présentées lors de deux congrès :

- 17eme International Workshop on Clinical Pharmacology of Antiviral Therapy, Chicago 2017
- 22 ^{eme} Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Toulouse 2018

Troisième partie : Détermination *in vitro* des paramètres de liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques.

Introduction

La liaison des substances aux protéines plasmatiques dépend de deux paramètres, l'affinité de liaison (K_d) et le nombre de sites de liaison (B_{max}). Une variabilité de ces paramètres de liaison est susceptible de conduire à une désynchronisation entre les concentrations libres et totales. Par ailleurs, ces deux paramètres de liaison ne sont pas à ce jour pas décrits dans la littérature. **L'objectif** a donc été (i) d'explorer le comportement de la liaison des trois antirétroviraux en présence d'antirétroviraux se liant également fortement aux protéines plasmatiques et (ii) d'estimer des valeurs moyennes de K_d et B_{max} pour le DTG et le DRV.

Matériel et méthodes

L'étude de la forme libre a été faite par dialyse à l'équilibre, selon la méthode précédemment décrite. Les antirétroviraux ont été sélectionnés selon deux critères : (i) l'antirétroviral à tester est associé aux antirétroviraux d'intérêt dans les stratégies actuelles d'allègement ou de renforcement thérapeutique et (ii) est susceptible d'entrer en compétition sur les sites de liaison aux protéines plasmatiques des trois antirétroviraux d'intérêt. Ainsi, pour le DTG, quatre antirétroviraux ont été sélectionnés : la rilpivirine (albumine), l'ATV (alpha-1-glycoprotéine acide (AAG)), le DRV (AAG) et l'etravirine (AAG, albumine). Pour les deux inhibiteurs de protéase, le raltegravir (albumine), le DTG (albumine, AAG) et l'etravirine (AAG, albumine) ont été choisis. Une interaction portant sur le site de liaison aux protéines plasmatiques a été définie par un changement statistiquement significatif ($p<0,05$) de la valeur de fraction libre, par rapport à la valeur obtenue avec un échantillon plasmatique (groupe contrôle) sans antirétroviral associé.

Par ailleurs, les paramètres d'affinité (K_d) et de sites de liaison (B_{max}) ont été estimés selon une approche de pharmacocinétique de population pour le DTG et le DRV. Les modèles utilisés étaient comparés entre eux par calcul de l'AIC et par évaluation graphique (analyse des résidus, IPRED et PRED en fonction des valeurs observées). La prédiction des paramètres de liaison, faites pour le DTG et le DRV, a été réalisée à partir d'un plasma de sujet sain. Le plasma a été surchargé en DTG ou en DRV pour dix valeurs de concentrations totales en antirétroviral allant de 0,25 à 50 mg/L (concentrations exprimées en µM dans le modèle). Pour évaluer l'absence de variabilité entre les expérimentations liées à la méthode de dialyse à l'équilibre, chaque niveau de concentration a été passé quatre fois (essai de répétabilité).

Résultats

L'influence des des associations d'antirétroviraux sur les valeurs de fraction libre sont résumées dans le tableau 9.

	f_u du DTG (%)	f_u du DRV (%)	f_u de l'ATV (%)
Antirétroviral seul	0,81	9,6	9,98
RPV	0,95	X	X
ATV	1,11	X	X
DRV	1,12	X	X
DRV/ETV	1,15	X	X
ETV	X	10,17	12,50
DTG	X	10,55	12,16
DTG/ETV	X	10,09	X
RAL	X	9,92	10,16
RAL/ETV	X	10,09	X

Tableau 9 : Fractions libres moyennes du DTG, du DRV et de l'ATV lors des études d'interaction avec d'autres antirétroviraux. DTG : dolutegravir ; DRV : darunavir ; ATV : atazanavir ; RPV : rilpivirine ; ETV : etravirine ; RAL : raltegravir ; f_u : fraction libre.

Le DTG était systématiquement déplacé de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques, quel que soit l'antirétroviral ajouté ($p<10^{-3}$). A l'inverse, pour les deux inhibiteurs de protéase, aucun des antirétroviraux ajouté *in vitro* n'a conduit à une compétition sur la liaison ($p>0,05$). Il existe une tendance au déplacement de l'ATV de sa liaison lorsqu'il est associé à l'ETV ($p=0,05$).

Les essais de répétabilité ont révélé une faible variabilité des résultats de f_u par DE. Ainsi, les coefficients de variation de la fraction libre étaient compris entre 2 et 20% pour le DRV et 2 et 18% pour le DTG aux différents niveaux de concentration. Nous avons observé une saturation de la liaison aux protéines plasmatiques à partir d'une concentration totale de 10 mg/L pour le DRV et 20 mg/L pour le DTG.

Pour le DTG, le modèle le plus approprié suivait l'équation suivante :

$$C_t = \frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} + C_u \qquad \textbf{Eq. R-3-1}$$

En revanche, le modèle décrivant le mieux les données pour le DRV faisait apparaître la notion de site de liaison non spécifique :

$$C_t = \frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} + C_u \times N_s + C_u \qquad \textbf{Eq. R-3-2}$$

Avec, C_t concentration totale; B_{max}: nombre de sites de liaison; C_u: concentration libre; K_d: constante de dissociation; N_s: nombre de site de liaison non spécifique. Les unités des concentrations et des paramètres pharmacocinétiques de liaison sont exprimés en molaire.

Les paramètres de liaison aux protéines plasmatiques prédits sont résumés dans le tableau 10.

	K_d (µM)	B_{max} (µM)	Ns (nombre sans unité)
Dolutegravir	1,27	163	X
Darunavir	6,58	32,41	1,72

Tableau 10: Valeur issues des estimations des paramètres de liaison. K_d : constante de dissociation ; B_{max} : nombre de sites de liaison ; Ns : nombre de sites de liaisons non spécifiques

Conclusion

Dans l'étude de l'exploration des interactions sur les sites de liaison, nous avons montré qu'il existe de nombreuses interactions sur les sites de liaison du DTG.

Par ailleurs, nous avons pu déterminer, par une approche de pharmacocinétique de population, les paramètres de liaison aux protéines plasmatiques (K_d et B_{max}) pour le DTG et le DRV.

Valorisation des travaux

Les articles détaillant l'exploration de la liaison des trois substances aux protéines plasmatiques lors des études portant sur les interactions avec d'autres antirétroviraux sont en cours de rédaction (Annexe 2-7, 2-8 et 2-9).

Les données sur la variabilité de la liaison entre les protéines plasmatiques et les antirétroviraux, ont été présentées lors de deux congrès :

- 17eme International Workshop on Clinical Pharmacology of Antiviral Therapy, Chicago 2017
- 22 ^{eme} Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Toulouse 2018

Quatrième partie : intérêts de la forme libre dans le suivi thérapeutique pharmacologique des antirétroviraux chez des patients VIH

Résumé 1 : forme libre et grossesse

De nombreux auteurs ont proposé, pour les inhibiteurs de protéase, une augmentation de posologie systématique pendant le second et le troisième trimestre de la grossesse. Ces propositions d'adaptation faisaient suite à des observations répétées d'une baisse des concentrations totales lors de cette période de la grossesse. Or, physiologiquement, les deuxième et troisième trimestres sont également associés à une diminution des concentrations en protéines plasmatiques.

L'objectif de notre travail a été d'illustrer la divergence de profil cinétique entre les concentrations libres et totales lors de la grossesse. Ce travail a permis de souligner les conséquences d'une modification du B_{max} sur la concentration totale et de proposer des recommandations de posologie pendant la grossesse.

Pour cette étude, nous nous sommes appuyés sur des données de la littérature rapportant des mesures de concentrations libres et totales pendant la grossesse.

Valorisation des travaux :

Ce travail sur la forme libre et le STP des inhibiteurs de protéase lors de la grossesse a été publié dans le *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Annexe 2-10).

Résumé 2 : exploration de la forme libre de l'atazanavir et son intérêt dans le suivi thérapeutique pharmacologique.

Cette étude présentait deux **objectifs** : (i) expliquer la variabilité de la fraction libre de l'ATV chez des patients VIH et (ii) rechercher des relations entre les concentrations libres/totales, et les marqueurs d'efficacité (charge virale) et de toxicité (bilirubine libre et totale).

Les mesures de concentrations libres et totales ont été réalisées selon une méthode chromatographique LC-UV et la forme libre a été isolée par une méthode d'ultrafiltration. Les facteurs de variabilité tel que la concentration en AAG, le sexe, la prise de ritonavir ou de tenofovir ont été documentés. Pour évaluer l'efficacité et la toxicité, les données de charge virale et les bilirubinémies (libre et totale) ont été colligées.

Aucun facteur (sexe, ritonavir, tenofovir, concentration en AAG), n'a pu expliquer la variabilité de la fraction libre (p=0,28 ;0,14 ;0,67 ;0,67 respectivement). Une relation proportionnelle a été observée entre la concentration totale et la f_u. Cependant, elle est difficilement explicable, les concentrations mesurées étant loin des concentrations de saturation de la liaison aux protéines plasmatiques. Les hyperbilirubinémies étaient toutes des hyperbilirubinémies à bilirubine libre, témoignant du mécanisme de toxicité de l'ATV. Toutefois, les mesures de concentration libre n'expliquaient pas les hyperbilirubinémies (p=0,17) alors qu'elles étaient en partie expliquées par les concentrations totales (rho= 0,22 ; p= 0,045). Aucune relation entre les concentrations libres/totales et la charge virale n'a pu être établie (p=0,21 et 0,19, respectivement).

Deux points étaient à retenir dans cette étude : (i) la fraction libre présentait une importante variabilité inter-individuelle (f_u médian 3,8% IQR[2,8 ;4,5] et (ii) les valeurs de fraction libre étaient très différentes de celles rapportées dans la littérature.

Valorisation des travaux :

Cette étude a fait l'objet d'un article accepté dans *Fundamental and Clinical Pharmacolgy* (Annexe 2-11).

Par ailleurs, les résultats partiels de fraction libre obtenus par ultrafiltration ont été présentés lors de quatre congrès :

- 33 ^{eme} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 2013

- 18 ^{eme} Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Poitiers 2014

- 14eme International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Rotterdam 2015

- 15eme International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and Hepatitis Therapy, Washington 2015

Cinquième partie : Etude (i) des relations entre les concentrations libres et totales de DRV chez des patients VIH par une approche de pharmacocinétique de population et (ii) de l'exposition du DRV dans le compartiment liquide cérébro-spinal par des simulations de Monte-Carlo.

Introduction

L'objectif de notre étude a été de (i) développer un modèle de pharmacocinétique de population intégrant l'analyse combinée des concentrations libres et totales, (ii) d'identifier des covariables expliquant la variabilité inter-individuelle des formes libres et totales et (iii) de prédire par des simulations de Monte-Carlo la concentration libre rachidienne de DRV pour évaluer son efficacité théorique.

Résumé du matériel et méthodes

Un modèle de pharmacocinétique de population a été développé en s'appuyant sur une approche non paramétrique à partir du logiciel Pmetrics®. La construction du modèle s'est basée sur des mesures de concentrations libres et totales de DRV chez des patients VIH. La relation entre les concentrations libres et totales était régie à partir des équations suivantes:

$$\frac{dA_u}{dt} = -CL_{int} \times C_u \qquad \textbf{Eq. R-5-1}$$

$$\frac{dA_{tot}}{dt} = -CL_{int} \times \frac{K_d}{K_d + AAG} \times C_{tot} \qquad \textbf{Eq. R-5-2}$$

où

$$C_u = A/(V \times F) \qquad \textbf{Eq. R-5-3}$$

et

$$C_{tot} = A/(V \times F) \qquad \textbf{Eq. R-5-4}$$

Par ailleurs

$$C_t = C_u + C_B \qquad \textbf{Eq. R-5-5}$$

$$C_t = C_u + \frac{B_{max} \times C_u}{K_d + C_u} \qquad \textbf{Eq. R-5-6}$$

$$C_t = C_u \times (1 + \frac{B_{max}}{K_d + C_u}) \qquad \textbf{Eq. R-5-7}$$

En postulant $K_d >> C_u$ (d'après les données *in vitro* de surcharge et les concentrations libres mesurées)

$$C_t = C_u \times (1 + \frac{B_{max}}{K_d}) \qquad \textbf{Eq. R-5-8}$$

Ainsi

$$C_t = C_u \times (\frac{K_d + B_{max}}{K_d}) \qquad \textbf{Eq. R-5-9}$$

$$C_t = \frac{C_u \times (AAG + K_d)}{K_d} \qquad \textbf{Eq. R-5-10}$$

Avec C_u: concentration libre; Dose: dose administrée; V: volume de distribution; AAG: concentration en AAG mesurée, se substituant au B_{max}; K_d: constante de dissociation. A : quantité de DRV. Les unités des concentrations et des paramètres ont été exprimées en micromolaire (µM). Pour utiliser l'équation Eq. R-5-10 comme modèle structurel, deux approximations ont été faites. Tout d'abord, nous avons considéré qu'il existait un seul site de fixation du DRV aux protéines plasmatiques (AAG). Cette hypothèse reposait sur les données décrites pour l'ATV, d'après les travaux de Barrail-Tran *et al*. Dans leur étude, ils ont observé que l'ATV se liait avec une forte affinité à l'AAG. Cette liaison était saturable à des concentrations suprathérapeutiques uniquement. D'après la même étude de Barrail-Tran *et al,* la constante de dissociation était supérieure aux concentrations libres en ATV. En nous basant sur ces résultats et les données de notre étude (Partie 3), nous avons supposé que la valeur de la constante de dissociation était supérieure à celle de la concentration libre en DRV mais aussi que la liaison du DRV à l'AAG était non saturable aux concentrations thérapeutiques. De plus, nous avons considéré, toujours sur les résultats de l'étude de Barrail-Tran *et al* l'existence d'un seul site de fixation sur l'AAG pour utiliser l'équation R-5-10.

Des données démographiques, biologiques et thérapeutiques ont été recueillies en vue de les utiliser dans un modèle de covariables. Le modèle final a été évalué par analyse graphique.

Des simulations de Monte-Carlo ont été effectuées à partir du modèle final dans l'objectif de prédire les concentrations libres en DRV dans le liquide cérébro-spinal (LCS). Des ratios moyens de concentrations libres LCS/plasma, décrits dans deux études, ont été utilisés pour prédire la concentration libre dans le LCS. Dans l'objectif d'évaluer l'efficience du DRV, les concentrations libres prédites dans le LCS ont été comparées aux concentrations inhibitrices 50 et 90 ($IC_{50/90}$) rapportées dans la littérature. Dans la *Probability of Target Attainment,* le DRV était considéré efficace si la concentration libre dans le LCS était supérieure aux $IC_{50/90}$ pendant toute la durée de l'interdose (12 à 24h selon la posologie).

Résumé des résultats

Un modèle mono-compartimental, avec une élimination de premier ordre, décrit le mieux les relations entre les concentrations libres et totales. L'intégration de l'indice de masse corporelle (IMC) dans le modèle de covariable améliore le modèle final. Dans notre étude, l'IMC influence deux paramètres : la clairance intrinsèque apparente et la constante de dissociation. Un IMC élevé est associé à une clairance intrinsèque plus importante, et donc à une baisse des concentrations libres et totales. Par ailleurs, un IMC élevé peut aussi être associé à une augmentation de l'affinité de la liaison du DRV aux protéines plasmatiques (p=0,049 ; à un seuil d'IMC de 28 kg/m², valeur pour lequel le risque d'hyperglycémie chronique est élevé). Cet effet contrebalance l'augmentation de la clairance intrinsèque apparente et conduit à des valeurs de concentrations totales identiques entre les patients avec des IMC différents (p=0,95 ; à un seuil d'IMC de 28 kg/m²).

La diminution de la concentration libre chez les patients à IMC élevé est associée à des concentrations libres basses dans le LCS. Ainsi, à partir des simulations, nous observons que les concentrations libres dans le LCS ne sont pas supérieures aux concentrations inhibitrices pendant 100% de l'interdose chez les patients présentant un IMC élevé. Ces résultats sont résumés dans les figures 5a et b, et détaillés dans le tableau 12. Les IMC choisis pour les simulations correspondent à l'IMC médian et aux IMC extrêmes de l'échantillon de patients de notre étude. Nos résultats suggèrent ainsi que les patients à IMC élevé ont une probabilité plus importante d'avoir des concentrations libres dans le LCS inférieures aux $IC_{50/90}$.

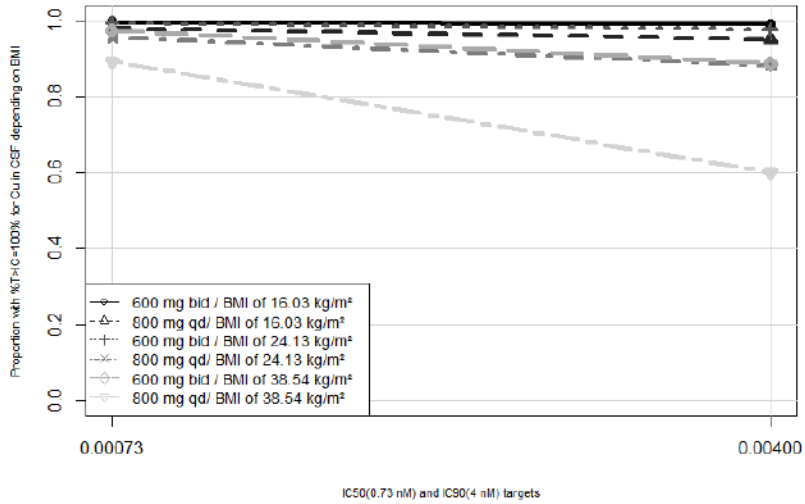


Figure 5a

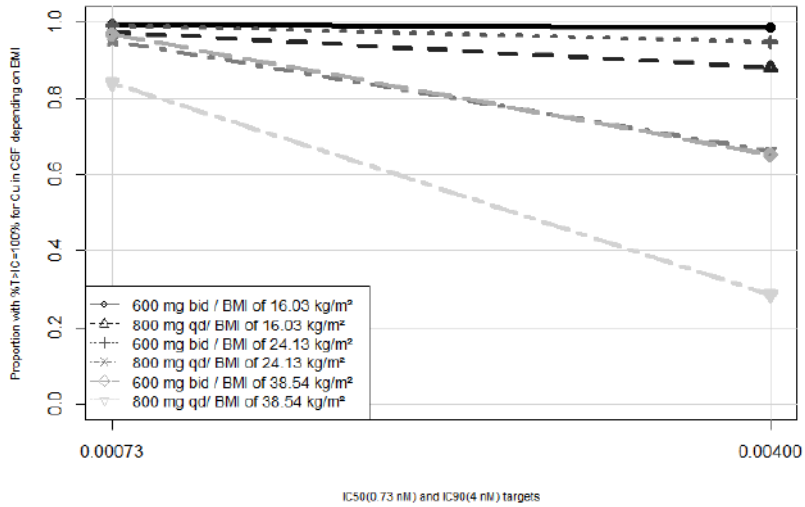


Figure 5b Simulation des concentrations libres dans le LCS avec un ratio LCS/plasma de 8,5% (a) et de 4% (b). La figure représente la proportion de patients avec une concentration libre dans le LCS supérieure à l'$IC_{50/90}$ pendant toute la durée de l'interdose. Les patients sont catégorisés en six groupes en fonction de la posologie en DRV (600 mg en deux prises par jour ou 800 mg en une prise par jour) et de leur IMC. IC : concentration inhibitrice ; BMI : indice de masse corporelle ; bid : deux fois par jour ; qd : une fois par jour ; CSF : cerebrospinal fluid (liquide cérébro-spinal).

Posologie	Concentration libre cible	IMC (kg/m²)	Pourcentage de succès pour un ratio ($C_{u,csf}/C_{u,pl}$) de 4%	Proportion de succès pour un ratio ($C_{u,csf}/C_{u,pl}$) de 8,5%
600mg *bid*	IC_{50}= 0,7 nM	16,0	99.4	99.7
		24,1	99.1	99.4
		38,5	96.9	97.3
	IC_{90}= 4 nM	16,0	98.5	99.1
		24,1	94.7	97.8
		38,5	65.3	88.6
800 mg *qd*	IC_{50}= 0,7 nM	16,0	97.4	98.0
		24,1	95.0	95.7
		38,5	84.0	89.2
	IC_{90}= 4 nM	16,0	88.1	95.0
		24,1	66.1	88.2
		38,5	28.5	60.0

Tableau 11 Pourcentage de patients atteignant des concentrations libres dans le LCS supérieures aux $IC_{50/90}$ pendant toute la durée de l'interdose. IC : concentration inhibitrice ; IMC : indice de masse corporelle ; bid : deux fois par jour ; qd : une fois par jour.

Conclusion

En associant les mesures de concentrations libres et totales de DRV, nous avons montré que l'IMC est une covariable d'intérêt pour expliquer une désynchronisation entre les concentrations libres et totales. Par ailleurs, les simulations de profils pharmacocinétiques d'exposition de la forme libre dans le LCS effectuées à partir de notre modèle ont montré que les concentrations cibles ($IC_{50/90}$) n'étaient pas atteintes chez tous les patients présentant un IMC élevé (38,5 kg/m²).

Valorisation des travaux :

Ce travail a fait l'objet d'un article qui sera soumis dans le *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Annexe 2-12).

Les données sur le développement du modèle de pharmacocinétique de population et de simulations pour le DRV, ont été présentées lors de deux congrès :

- 18eme International Workshop on Clinical Pharmacology of Antiviral Therapy, Baltimore 2018
- 22eme Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Toulouse 2018

Discussion

Les résultats de nos travaux sur les plans analytiques, d'étude de la liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques et de pharmacocinétique de population pourraient contribuer à une meilleure interprétation des résultats de forme libre des trois antirétroviraux. Ainsi, d'un point de vue analytique, nous avons observé des variations dans les résultats de fraction libre qui dépendaient des conditions expérimentales. La méthode utilisée pour évaluer la forme libre peut donc compromettre l'interprétation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) des concentrations libres. Par ailleurs, les études de liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques ont montré l'existence d'interaction conduisant à un déplacement de l'antirétroviral depuis son site de liaison. Ces interactions pourraient conduire à une désynchronisation entre les concentrations libres et totales, et expliquer l'absence de relation PK-PD entre les concentrations totales et certains échecs virologiques. Enfin, en construisant un modèle de pharmacocinétique de population combinant les mesures de concentrations libres et totales de DRV, nous avons effectué des simulations de profils pharmacocinétiques de forme libre dans le LCS. Les données obtenues indiquent que les patients avec des valeurs d'IMC élevées avaient des expositions insuffisantes de forme libre dans le liquide cérébro-spinal.

I. Validation des méthodes analytiques

A. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Lors de nos travaux, nous avons validé une méthode analytique robuste pour déterminer les concentrations libres et totales du DTG, du DRV et de l'ATV. Plusieurs travaux décrivent des méthodes pour quantifier les concentrations totales et libres des antirétroviraux (100,104,107,151,152,156,158–160,222–230). Toutefois, peu d'entre elles, et aucune à ce jour pour les concentrations libres, ont détaillé point par point leur processus de validation de méthode en suivant les référentiels de la FDA et de l'EMA(191,192).

Parmi les étapes analytiques critiques, nous avons documenté l'existence d'un effet matrice susceptible de mener à une suppression ou à un gain d'ionisation. Cet effet matrice a été exploré dans le plasma et le dialysat de DE, ce dernier contenant une forte proportion d'ions phosphates. Or les ions phosphates sont connus pour leur effet de suppression d'ionisation dans la source du

détecteur spectromètre de masse(231). Dans nos essais, nous avons retrouvé un effet matrice important (environ 50% de perte de signal pour le DTG et le DRV), lié à la présence du tampon phosphate dans le dialysat. L'utilisation d'un isotope stable (aussi appelé « deutéré ») comme étalon interne, subissant la perte d'ionisation comme la substance dosée, écarte toute interférence pour la mesure des concentrations libres. Ainsi, sur la base de nos résultats, il paraît primordial de rechercher un effet matrice et d'utiliser des étalons internes « deutérés » lorsque (i) la méthode de détermination de la forme libre repose sur la DE et (ii) que la quantification de l'analyte est effectuée par un détecteur spectromètre de masse. Une étude (151) sur la forme libre du DRV et de l'ATV a été effectuée sans étalon interne « deutéré » mais en utilisant un détecteur spectromètre de masse. Pour autant, leurs résultats de forme libre sont proches de ceux que nous avons observé (*e.g.* fraction libre de 3,5% pour le DRV).

A contrario, nous n'avons pas exploré l'existence d'un effet matrice avec l'ultrafiltrat et à ce jour, aucune étude n'a recherché l'existence d'un effet matrice pour cette matrice. Néanmoins, cette dernière, dérivant du plasma, ne contient que peu de phosphate(153). L'existence d'un effet matrice aussi important que celui observé avec le dialysat paraît peu probable.

B. Dialyse à l'équilibre

Les travaux de validation pré-analytique (*e.g.* la stabilité de la liaison, l'effet de l'hémolyse) ou analytique ont été conduit avec la technique de DE, qui est la méthode de référence pour l'étude de la forme libre(13).

En l'absence du matériel nécessaire dans notre laboratoire, certains facteurs de variabilité comme le pH, le taux de CO_2 et la différence de pression oncotique entre les deux compartiments de la dialyse, n'ont pas été exploré lors de nos travaux.

Le pH est un facteur susceptible d'influencer la liaison des substances aux protéines plasmatiques(13,174). Le pH du tampon utilisé dans nos travaux correspondait au pH physiologique (pH=7,4)(153). Cependant, nous n'étions pas en mesure de contrôler ses variations, et donc son effet sur l'équilibre de liaison pendant la durée de l'expérimentation. Dans sa revue de littérature, Nilsson (13) a suggéré qu'un essai de DE sur une période inférieure à six heures n'entraînait pas de modification suffisante du pH pour perturber l'équilibre de liaison. Nous en avons donc déduit que le

pH n'avait pas influencé nos résultats ; la durée de la dialyse ayant été de quatre heures pour les trois substances.

Le taux de CO_2 pendant l'analyse n'a pas pu être contrôlé. Le CO_2 présent dans le plasma fait partie du tampon physiologique CO_2/HCO_3^-(153). Lors d'un prélèvement sanguin et à l'ouverture du tube de prélèvement, le $C0_2$ présent dans le plasma s'échappe en partie par échange gazeux avec l'air. Cette perte de $C0_2$ déstabilise le tampon CO_2/HCO_3^- et modifie le pH du plasma (13). Néanmoins, l'utilisation d'un tampon phosphate lors de des expérimentations de DE compenserait la modification de pH associée à la perte du $C0_2$ (13).

L'effet de la pression oncotique, lié aux protéines du compartiment plasmatique de la DE, n'a pas été contrôlé pendant les travaux. L'absence de substance osmotiquement active dans le dialysat conduit à cette différence de pression oncotique. En conséquence, le compartiment plasmatique attire une partie de l'eau présente dans le dialysat. Afin de limiter ce transfert aqueux, des macromolécules pourraient être ajoutées dans le compartiment contenant le dialysat, l'objectif étant d'augmenter la pression oncotique dans ce compartiment(13). Cependant, si des substances sont ajoutées dans ce compartiment, il est nécessaire de vérifier que la substance étudiée ne se lie pas à cet adjuvant. En effet, une liaison non spécifique importante pourrait induire un changement de l'équilibre de liaison.

Ces limites sont importantes à considérer si l'on souhaite se rapprocher de la « vraie » forme libre chez le patient. En effet, des résultats de concentrations libres considérés comme proches de celles pouvant être rencontrées *in vivo* assurent une comparaison fiable à des marqueurs d'efficacité virologiques comme les $IC_{50/90}$.

La durée de dialyse pour atteindre l'équilibre était similaire à celles observées dans d'autres études ayant utilisé la DE (4 à 5h, 8h dans l'étude sur l'ATV de Xu *et al* (226)), et ce pour les trois antirétroviraux (104,107,151,225,226,229). Cependant, avec cette durée d'expérimentation, il n'est pas envisageable d'intégrer la détermination de la forme libre dans une activité de laboratoire hospitalier ou pour une étude portant sur un grand nombre d'échantillons. Il est donc fréquent de recourir à une autre méthode plus rapide, telle que l'UF(13).

C. Validation des conditions d'ultrafiltration

La majorité des études ayant exploré la forme libre des antirétroviraux d'intérêt ont utilisé l'UF. Cependant, peu d'entre elles ont détaillé leur processus de validation de méthode (100,152,156,158–

160,222–224,227,228), alors que la procédure d'UF est connue pour ses nombreuses interférences durant l'expérimentation (13). Lors de nos travaux, il s'est avéré que les résultats de fraction libre obtenus par UF variaient en fonction des conditions opératoires. Les divergences de valeurs de fraction libre rapportées dans la littérature pourraient ainsi avoir une origine analytique. Nous avons donc entrepris une validation de méthode permettant (i) d'identifier les facteurs de variabilité et (ii) d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec la méthode de référence (DE à 37°C).

Comme pour la DE, nous n'étions pas en mesure d'évaluer l'influence du pH et de la pression partielle en CO_2 sur les résultats d'UF. A notre connaissance, ces aspects n'ont jamais été documentés dans l'exploration de la forme libre des trois antirétroviraux (100,152,156,158–160,222–224,227,228).

Lors de notre étude, nous avons exploré l'influence de la température et de la centrifugation (force relative et durée) sur les résultats d'UF. La plupart des travaux ayant exploré la forme libre de ces substances ont étudié l'influence des paramètres (température, durée et force relative de centrifugation) indépendamment les uns des autres(232–239). Or, cette méthodologie ne permet pas d'explorer l'interaction de plusieurs paramètres. Dans nos travaux, nous avons donc recherché par la méthode du plan expérimental factoriel complet les conditions d'UF influençant les résultats de fraction libre. Les données obtenues étaient comparées aux résultats de la DE à 37°C. Cette méthodologie diffère des études précédemment publiées, qui ne s'appuient pas sur des données de DE lors de la validation des conditions d'UF. En effet, à notre connaissance, ce processus n'a jamais été utilisé pour valider les conditions d'UF (232–239).

L'utilisation d'un plan expérimental complet nécessite un nombre important d'échantillons. Deux niveaux étant explorés, 2^n analyses étaient à prévoir, n correspondant aux nombre de paramètres étudiés (température, force relative et durée de centrifugation). Avec cinq échantillons par condition explorée, nous avons analysé 120 échantillons pour l'ensemble des antirétroviraux. Cette méthodologie pourrait être améliorée en vue de réduire le nombre d'échantillons. Deux approches sont possibles. Le plan expérimental factoriel fractionnaire réduit le nombre de conditions explorées. Toutefois, avec cette approche, une interaction (exemple : durée et force relative de centrifugation pour le DTG) peut ne pas être identifiée. Il existe une seconde approche en deux temps, associant un plan fractionnaire, pour une première exploration des conditions, suivi d'un plan complet. Le plan fractionnaire permet de rechercher les interactions pouvant survenir entre différents facteurs. Si des

interactions sont identifiées, le plan complet est ensuite appliqué pour identifier les conditions conduisant à des interactions entre plusieurs facteurs (240).

Lors de notre étude, les conditions de températures (DTG, ATV) et de centrifugation (durée pour le DRV et force relative pour l'ATV) se sont révélés être des facteurs indépendants dans l'influence des résultats de f_u. Des résultats similaires avaient été observés pour d'autres substances(232,234,238,239). Ainsi, Li *et al*(232) ont observé qu'en augmentant la durée de centrifugation (10 à 50 minutes) ou la force relative de centrifugation (1000 à 10000 g), les résultats de fraction libre de vancomycine étaient modifiés (augmentation de la fraction libre avec l'augmentation de la force de centrifugation). Ces modifications des résultats de fraction libre étaient associées à des variations du volume d'ultrafiltrat récupéré. Comme dans notre étude (DTG), plus la durée de centrifugation était longue, plus le volume d'ultrafiltrat était important. Les auteurs attribuaient ces résultats à une rupture de l'équilibre de liaison dans le plasma situé dans la cheminée d'UF lorsque les conditions de centrifugation étaient extrêmes (condition de force relative ou de durée de centrifugation élevée). Du *et al* (234)ont observé un effet de la température et de la force relative de centrifugation sur les résultats de fraction libre du docetaxel. Ainsi, plus la température (4°C, 25°C et 37°C) augmentait, plus les valeurs de fraction libre étaient élevées. A l'inverse, en augmentant la force de centrifugation (2000, 6000 et 10000 g), les valeurs de fraction libre diminuaient. Deux autres études portant sur la fraction libre de l'ertapenem(238) et de la vancomycine(239) ont fait des observations similaires liées à la force relative de centrifugation et à la température. Les auteurs de ces différentes études ont tous constaté l'importante variabilité dans les résultats de fraction libre liés aux conditions d'UF. Néanmoins, aucun d'entre eux n'a discuté l'intérêt de se comparer à des résultats de DE pour déterminer les conditions optimales d'UF. Comme pour les antirétroviraux, il serait préférable de s'assurer de la méthode de détermination de la forme libre des antibiotiques. En effet, les valeurs de concentrations libres des antibiotiques, sont, comme avec les antirétroviraux, comparés à des données de concentrations inhibitrices théoriques (concentrations minimales inhibitrices pour les antibiotiques)(241).

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'UF du DTG confirment l'intérêt d'une exploration des conditions d'UF par un plan complet pour rechercher une interaction croisée (force relative et durée de centrifugation). Pris indépendamment, ces deux paramètres, quelle que soit la condition, ne modifiaient pas les résultats de fraction libre du DTG. En revanche, avec le plan complet, nous avons

mis en évidence une interaction conduisant à des résultats différents des autres conditions et notamment ceux obtenus avec la méthode de référence (DE à 37°C).

Dans nos travaux portant sur le DTG, nous avons observé des volumes d'ultrafiltrats plus importants dans les conditions extrêmes d'UF (UF à 2000g pendant 20 minutes). Notre hypothèse repose un phénomène de concentration en amont du filtre, avec une réduction du plasma en tête de cheminée. En conséquence, l'équilibre de liaison DTG-albumine serait rompu et le plasma filtré entraînerait avec lui des molécules de DTG. Cette hypothèse est également proposée dans d'autres travaux(232,234,239).

Pour les trois antirétroviraux, une même condition d'UF a été fixée (37°C ; 1000g ; 20 minutes). Cette condition assure des résultats identiques à ceux obtenus avec la DE à 37°C, hormis pour l'ATV. Pour cette substance, aucune condition ne permet d'obtenir des résultats similaires à ceux de la méthode de référence.

La disparité des résultats de fraction libre (f_u) par UF et DE dans nos travaux est retrouvée dans la littérature, notamment pour le DTG et l'ATV. Ainsi, nos résultats de f_u par DE sont proches de ceux publiés chez le patient VIH et obtenus par DE (0,45%)(104). A l'inverse, les résultats de f_u par UF publiés sont différents de nos résultats de DE, et sont proches de résultats obtenus dans certaines conditions d'UF (0,7%)(100). Des écarts similaires sont retrouvés pour l'ATV, avec des données en DE proches de nos résultats (3% et 5,4% estimé contre 7% dans notre étude)(151,225). En revanche, les études documentant la forme libre par UF ont observé des valeurs de f_u beaucoup plus élevées (proches de 15%)(173). Les différences de valeurs entre les études publiées pourraient provenir d'un manque de robustesse lors de l'étape de l'expérimentation isolant la forme libre.

L'absence de validation du processus d'UF est d'autant plus regrettable que plusieurs études se basent sur leurs résultats de forme libre, en les comparant à des $IC_{50/90}$, pour émettre des recommandations de stratégies thérapeutiques(100,152,156,159,174,174,223,224,228,242,243,243–247). Ce biais est d'autant plus dommageable que les résultats d'UF non validés conduisent le plus souvent à des valeurs de concentrations libres plus élevées que la DE(100,104,151,152,222,224,228,230). Il est donc possible de conclure, à tort, à des hypothèses rassurantes quant à l'efficacité des antirétroviraux à partir des résults obtenus par UF.

La lourdeur de la validation et l'absence de recommandations pour la validation des méthodes sont des freins probables à l'utilisation de la forme libre dans le suivi thérapeutique pharmacologique des

substances fortement liées aux protéines plasmatiques. Il serait intéressant que des lignes directrices soient proposées par les autorités de référence (FDA, EMA) pour la validation de méthode de l'UF dans l'objectif d'améliorer l'interprétation des résultats de forme libre.

II. Etude de la liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques

La deuxième étape de nos travaux consistait à l'étude de la liaison des trois substances aux protéines plasmatiques (albumine et alpha-1-glycoprotéine acide (AAG)). Deux paramètres sont susceptibles de conduire à une variabilité de liaison aux protéines plasmatiques: le nombre de sites de liaison (B_{max}) et l'affinité (formulée sous la forme d'une constante de dissociation, K_d) de l'antirétroviral pour la protéine plasmatique. Lors de nos travaux d'étude de la liaison, les essais étaient conduits sur le plasma issu d'un même individu pour chaque antirétroviral. Le B_{max} pouvait donc être considéré constant (absence de variation de la concentration en protéine de liaison). Le K_d était donc à l'origine des variations de résultats de fraction libre observées lors des expérimentations. L'exploration des caractéristiques de liaison des antirétroviraux s'est faite en deux parties. La première a étudié la phase pré-analytique et des interactions avec d'autres antirétroviraux, la seconde s'est intéressée aux calculs de K_d et B_{max}. C'est avec l'étude de la liaison du DTG aux protéines que nous avons observé le plus grand nombre d'interférences et d'interactions sur la liaison.

A. Facteurs de variabilité à la liaison *in vitro*

A notre connaissance, aucune étude n'a exploré l'influence des différentes phases pré-analytiques et des interférences *in vitro* sur la liaison aux protéines plasmatiques pour les trois antirétroviraux étudiés. Néanmoins, les résultats de nos travaux indiquent que cette étape est primordiale pour évaluer avec exactitude la forme libre d'une substance.

Pour les deux inhibiteurs de protéase (IP), l'équilibre de liaison n'a pas été modifié par les différentes conditions pré-analytiques ou par la présence d'autres antirétroviraux (DTG, etravirine, raltegravir). Ces résultats nous ont conduits à formuler deux hypothèses : (i) les IP n'ont pas de sites de liaison communs avec les composés intra-érythrocytaires, les anticoagulants et les antirétroviraux étudiés, et/ou (ii) l'affinité de liaison aux protéines plasmatiques est suffisamment importante pour que les IP ne soient pas déplacés par d'autres substances. Ces résultats complètent les données éparses

disponibles sur la liaison aux protéines plasmatiques des deux IP(173). A l'inverse des IP, l'équilibre de liaison du DTG a été modifié par de nombreux facteurs, non explorés à ce jour dans la littérature.

L'influence de l'hémolyse survenant *in vitro* n'est pas inclue dans de précédentes études de la forme libre de substances fortement liées aux protéines plasmatiques. Elle conduit néanmoins à la libération de produits endogènes entrant en compétition avec le site de liaison du DTG aux protéines plasmatiques. En déplaçant le DTG du site de liaison, ces substances endogènes ont augmenté la concentration libre mesurée. Si aucune donnée ne décrit à ce jour cette interaction avec des médicaments, ce mécanisme est néanmoins bien décrit en analytique(248). Des travaux ont montré que l'hémolyse est associée à une diminution de la liaison entre des anticorps et leurs épitopes, expliquant les résultats observés avec le DTG. Il est donc important, lors de la validation d'une méthode d'UF, de vérifier l'effet de l'hémolyse sur la fraction libre. Une hémolyse à 0,2 g/dL d'hémoglobine conduisant à une coloration rosée du plasma, il est possible d'écarter les échantillons par analyse macroscopique du plasma(248–250). En effet, pour des valeurs inférieures à 0,25 g/L d'hémoglobine dans le plasma, les résultats de f_u n'étaient pas statistiquement différent d'un plasma sans hémolyse, quelle que soit la concentration totale en DTG. Comme l'hémolyse, l'utilisation d'un tube de prélèvement contenant du citrate réduisait l'affinité de la liaison du DTG aux protéines plasmatiques. Néanmoins, aucune étude n'a décrit cette interaction, que ce soit pour des substances endogènes ou pour des xénobiotiques.

Le DTG était également déplacé de la liaison protéique par l'ajout *in vitro* d'autres antirétroviraux. Peu d'études ont exploré la variabilité des concentrations totales de DTG suite à une association avec d'autres antirétroviraux. Il est ainsi difficile de savoir si les interactions observées *in vitro* ont bien un retentissement sur les concentrations totales mesurées chez les patients (*in vivo*). Il est important de noter que les conséquences d'une compétition sur la liaison ne doivent pas être interprétées de la même manière lors d'une expérimentation *in vitro* ou *in vivo* (*e.g.* chez les patients). La différence d'interprétation entre un déplacement de la liaison *in vitro* et *in vivo* est illustrée dans la Figure 6 (251). Lors d'une compétition à la liaison *in vitro*, la forme liée déplacée rejoint la forme libre. On assiste donc à une augmentation de la concentration libre, sans modification de la concentration totale (qui correspond à la somme des concentrations libres et liées). Lors d'une compétition *in vivo*, la forme liée se décroche également, ce qui entraîne une augmentation ponctuelle de la concentration libre. Néanmoins, *in vivo* et à l'état d'équilibre pharmacocinétique, pour les substances à faible coefficient d'extraction hépatique comme les antirétroviraux, la clairance

intrinsèque gouverne l'élimination de la concentration libre. Comme décrit dans les équations de la Figure 6, la clairance intrinsèque est constante au cours du temps (en l'absence d'inhibition sur le métabolisme). La concentration déliée est ainsi éliminée, la concentration libre reprend la valeur précédant l'interaction et la concentration totale diminue. En résumé, lors d'une interaction sur le site de liaison, la substance (comme le DTG) victime de l'interaction va être déplacée. *In vitro*, l'interaction se manifeste par une augmentation de la fraction libre par augmentation de la concentration libre. *In vivo*, l'interaction se traduit par une augmentation de la fraction libre par diminution de la concentration totale (conséquence d'une baisse de la forme liée), la concentration libre restant inchangée. Nous avons utilisé ces relations entre formes libres et liées pour extrapoler les résultats observés dans notre étude *in vitro* avec le DTG pour prédire l'évolution des concentrations chez les patients.

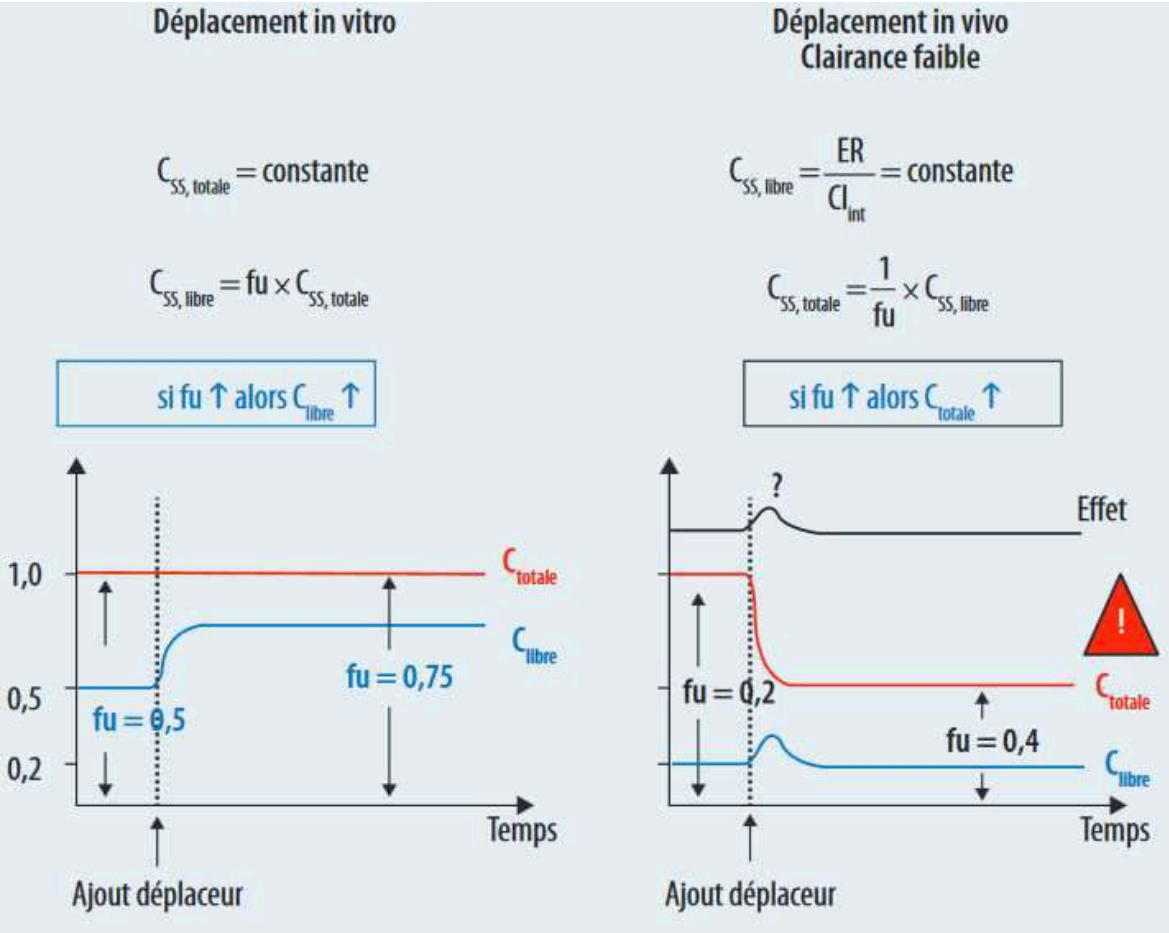


Figure 6 : conséquences d'une interaction sur un site de liaison, associé à un déplacement de la substance, sur les valeurs de fraction libre et de concentrations libres et totales. In vitro (partie gauche de la figure), après l'interaction, la concentration libre (en bleu) augmente, la concentration totale (en rouge) demeure inchangée. Dans la partie droite de la figure, correspondant à une situation in vivo, l'interaction conduit également à un déplacement de la substance liée. Elle se

retrouve pendant un court associée à la concentration libre, qui augmente. Néanmoins, la clairance intrinsèque existant in vivo (et absente in vitro) va conduire à un retour à une concentration libre à l'équilibre identique à celle précédant l'interaction.

L'association DTG/DRV est celle qui a été le plus étudié d'un point de vue pharmacocinétique. Plusieurs travaux ont décrit une réduction des concentrations totales du DTG chez les patients lors d'une association avec le DRV/ritonavir(252–254). Toutefois, un effet inducteur du ritonavir sur le métabolisme du DTG (augmentation de la clairance intrinsèque), réduisant les concentrations totales, a été suspecté dans les différents travaux. Le mécanisme d'induction a été confirmé par Gervasconi *et al*(254), qui ont étudié l'évolution des concentrations totales de DTG en passant d'une association avec le DRV/ritonavir au DRV/cobicistat. Le changement du ritonavir pour le cobicistat, qui ne présente pas d'effet inducteur sur le métabolisme du DTG, était associé à une augmentation des concentrations totales de DTG. L'effet de l'interaction du DRV sur le site de liaison du DTG paraît donc modeste, comparé à l'effet inducteur du ritonavir(10).

Lors de l'association DTG/ATV(255), une augmentation des concentrations totales de DTG a été décrite, en comparaison des concentrations totales de DTG sans ATV. Cette co-prescription, observée dans des stratégies de renforcement thérapeutiques, a conduit à des augmentations considérables des concentrations totales, par inhibition de l'UGT1A1 par l'ATV (10). Ainsi, si l'ATV interagit avec le DTG sur la liaison à l'albumine, l'effet de l'interaction sur le site de liaison est masqué *in vivo* par l'importante réduction de la clairance intrinsèque du DTG.

A ce jour, la variation des concentrations totales de DTG suite à l'association de la rilpivirine n'a pas été étudiée. Si une baisse des concentrations totales de DTG venait à être observée, elle ne serait pas associée à une baisse d'efficacité, comme en attestent les résultats des essais SWORD I et II(87). En effet, l'interaction se manifesterait uniquement par une baisse des concentrations liées (et donc totales), la rilpivirine étant dénuée de tout effet inducteur des systèmes enzymatiques impliqués dans l'élimination du DTG(256).

Une seule étude a exploré les variations des concentrations totales de DTG sous etravirine et DRV/ritonavir(119). Les concentrations totales de DTG ne variaient pas significativement, avec ou sans cette association de trois antirétroviraux. Ce résultat est inattendu, le ritonavir et l'etravirine étant des inducteurs connus du métabolisme du DTG(10,72,257). Il est donc difficile d'utiliser nos résultats *in vitro* pour expliquer les résultats des concentrations totales dans cette étude.

Dans les quatre situations évoquées, seules des mesures combinées des concentrations libres et totales chez les patients permettraient de confirmer une interaction sur le site de liaison. Si une étude venait à conduire cette exploration, et si notre hypothèse émise à partir de nos résultats *in vitro* se confirmait *in vivo*, une désynchronisation de la variation des concentrations libres et totales serait observée.

B. Etude de la liaison des antirétroviraux aux protéines plasmatiques

Pour chacune des trois substances, nous avons observé chez les patients une importante variabilité inter-individuelle de la f_u lors des essais par DE. En revanche, les variabilités inter-individuelles des concentrations d'albumine et d'AAG, étaient relativement faibles (inférieures ou proches de 30%).

Dans la seule étude explorant la liaison de l'ATV aux protéines plasmatiques (AAG et albumine) (173), les auteurs ont rapporté une saturation des sites de liaison aux protéines plasmatiques à des concentrations suprathérapeutiques. Lors de notre exploration des paramètres de liaison, la saturation de la liaison survenait également pour des concentrations totales supérieures à 10 mg/L, considérées comme suprathérapeutiques, pour les trois antirétroviraux. La saturation de liaison aux protéines plasmatiques n'intervenant qu'à des concentrations suprathérapeutiques, on peut en déduire que la variabilité de la f_u n'est pas expliquée par les valeurs de concentrations totales. Il est donc probable que la variabilité de f_u observée dans notre étude ait pour origine une variabilité du K_d, comme nous l'avons observé lors des études d'interaction sur la liaison avec le DTG.

Lors des expérimentations sur les interactions à la liaison aux protéines plasmatiques, nous avons observé que (i) le DTG était fréquemment déplacé de sa liaison aux protéines plasmatiques et (ii) à l'inverse, aucune interaction à la liaison n'était observée avec le DRV. En théorie, nous pouvions donc nous attendre à une valeur de K_d plus basse (donc une affinité plus importante) pour le DRV, comparé au DTG. Curieusement, les résultats des K_d calculés pour le DTG et le DRV sont contradictoires avec l'hypothèse formulée (le K_d du DTG était plus faible que celui du DRV). Lors de nos travaux, nous avons travaillé sur du plasma de sujets sains. Cela peut être considéré comme une limite dans notre exploration. En effet, dans notre étude, les résultats de K_d et B_{max} correspondent à des paramètres de liaison pour les protéines plasmatiques dans leur ensemble et pas spécifiquement à l'albumine ou à l'AAG. Pour déterminer les valeurs de K_d et B_{max},il aurait été préférable de travailler sur des solutions surchargées en albumine et ou AAG, comme dans les travaux de Barrail-Tran *et*

al(173). Dans leur travaux, les auteurs ont été capable de différencier les liaisons de l'ATV à l'AAG (forte affinité de liaison et saturable) et à l'albumine (faible affinité de liaison, non saturable).

Par ailleurs, nos travaux étaient une première étape pour évaluer les sources de variabilité inter-individuelle du K_d. Une importante variabilité pourrait être à l'origine d'une discordance dans la variation des formes totales et libres, comme celle observée chez les patients insuffisants hépatiques avec le DTG(106). Cette désynchronisation entre les formes libres et totales expliquerait des différences d'efficacité entre les individus, non expliquées par la concentration totale (*e.g.* le DRV en monothérapie(7)).

III. Exploration de la forme libre du DRV chez les patients VIH : apports du modèle de pharmacocinétique de population.

Dans les essais MONET(138–140) et PROTEA(141), la monothérapie de DRV ne conduisait pas à la même efficacité virologique qu'une trithérapie, voire une bithérapie (essai MOBIDIP(135)). Ces échecs n'étaient pas expliqués par les mesures de concentrations totales(7). Nous avons cherché à savoir si ces échecs virologiques pouvaient être expliqués par des sous-expositions en concentration libre, que l'on peut prédire par un modèle de pharmacocinétique de population (PKPOP). Nous avons donc (i) développé un modèle de PKPOP pour approfondir l'exploration de la pharmacocinétique du DRV, et (ii) recherché le rôle éventuel du K_d pour expliquer des désynchronisations dans les variations des concentrations libres et totales. En réalisant des simulations à partir du modèle développé, nous avons pu proposer une hypothèse pharmacologique aux échecs virologiques observés lors des monothérapies de DRV.

A. Construction du modèle de pharmacocinétique de population et apport de la combinaison des formes libres et totales dans la mise au point

Le modèle que nous avons construit à partir des mesures de concentrations libres et totales de DRV peut se rapprocher de certains modèles publiés dans la littérature pour des antirétroviraux (DRV, ATV, lopinavir) (150,225,258,259). Néanmoins, nous avons émis deux hypothèses, sur la base de nos travaux et de données de la littérature, distinguant l'équation de notre modèle structurel (Eq.3) des modèles publiés précédemment. Le premier postulat porte sur le nombre de sites de liaisons. Barrail-Tran *et al*(173) on étudié la liaison de l'ATV aux protéines plasmatiques *in vitro*. Ils ont observé un seul site de liaison de l'ATV sur l'AAG, saturable à des concentrations suprathérapeutiques (>15

mg/L). Nous avons ainsi supposé que la liaison du DRV aux protéines plasmatiques était similaire à celle de l'ATV, avec l'existence d'un seul site de liaison et l'absence de saturation de la liaison aux concentrations thérapeutiques. Brochot *et al*(150) avait également proposé cette approximation dans leur modèle. En nous reposant sur cette hypothèse, nous avons remplacé le B_{max} par la concentration en AAG mesurée chez les patients (Eq.2,3). Cependant, la liaison étant considérée comme non saturable dans notre hypothèse, le K_d n'est en réalité pas une constante de dissociation. En effet, le K_d correspond à la valeur de concentration libre lorsque la moitié des sites de liaison aux protéines plasmatiques sont occupés. Or nous considérons ici la liaison non saturable. On pourrait donc ici parler plutôt d'une pseudo-constante de dissociation ou d'une constante de fixation. Le second postulat porte sur la différence des valeurs de concentrations libres chez les patients et de K_d du DRV pour la liaison à l'AAG. En nous basant sur nos résultats de l'étude de la liaison du DRV (K_d estimé à 6 µM) et les valeurs des concentrations libres mesurées (moyenne à 0,2 µM), nous avons considéré que le K_d était plus élevé aux concentrations libres. Nous avons donc pu simplifier l'équation 2 pour obtenir l'équation 3, qui une équation de notre modèle structurel.

$$C_t = C_u \times (1 + \frac{B_{max}}{K_d + C_u}) \qquad \text{Eq.1}$$

$$C_t = C_u \times (\frac{K_d + B_{max}}{K_d}) \qquad \text{Eq.2}$$

$$C_t = \frac{C_u \times (AAG + K_d)}{K_d} \qquad \text{Eq.3}$$

Les échantillons disponibles pour construire le modèle ne permettaient pas une bonne description de la phase d'absorption du DRV. En effet, la majorité des échantillons étaient prélevés après le milieu de l'interdose. Nous avons donc décidé de ne pas inclure une constante d'absorption dans notre modèle structurel.

Le *Laboratory of Applied Pharmacokinetics* (LAPK)(260) est à l'origine du développement du logiciel Pmetrics®(261). Une bibliothèque de modèle structurel est mise à disposition sur le site du LAPK. Comme le propose Robert Jelliffe (262), membre du LAPK, la phase d'élimination est décrite par la micro-constante k_e, selon l'équation suivante :

$$\mathrm{k}_e = \frac{\mathrm{CL}}{\mathrm{V}}$$

avec k_e : constante d'élimination, CL : clairance totale ; V : volume de distribution, en suggérant une relation d'interdépendance entre chacun des trois membres de l'équation(262). Or, la clairance et le volume de distribution (V, correspondant au volume de distribution à l'équilibre V_{ss}) sont deux mécanismes distincts, chacun d'eux pouvant évoluer indépendamment l'un de l'autre(8). La proposition d'une interdépendance entre les trois paramètres k_e, CL et V n'est donc pas valide.

Les valeurs de CL et V prédites dans notre modèle étaient très différentes de celles décrites dans les précédent modèles publiés, qui ont développé leur modèle avec des concentrations totales (14,149,150). Cependant, on ne peut pas pas comparer directement les valeurs obtenues dans nos travaux à ceux décrits dans la littérature. En effet, en travaillant à partir des concentrations libres, nous avons prédit des valeurs de clairance intrinsèque apparente (ou clairance libre) et de volume de distribution libre apparent. Les modèles publiés ont prédit des valeurs de clairance d'élimination totale apparente et de volume apparent. Néanmoins, en multipliant les valeurs des paramètres pharmacocinétiques individuels (clairance intrinsèque et volume de distribution libre) par la f_u moyenne calculée dans notre étude (3%)(251), nous retrouvons des valeurs proches de celles publiées dans les précédents travaux(14,149,150).

A partir du logiciel Pmetrics®, nous avons appliqué une approche non paramétrique pour développer le modèle, ce qui nous distingue des études précédentes utilisant plutôt des approches paramétriques(14,149,150). L'intérêt principal de cette approche est de ne pas se contraindre à l'hypothèse d'une distribution normale des paramètres pharmacocinétique. L'approche non paramétrique est donc intéressante pour identifier des sous-populations de patients, ces derniers étant potentiellement ignorés par une approche paramétrique. Néanmoins, les données de nos travaux étaient limitées pour une utilisation optimale de cette approche. En effet, l'effectif de la population était probablement insuffisant pour identifier une sous-population de patients avec un profil pharmacocinétique inhabituel.

Les études ayant exploré l'effet d'un IMC élevé (>25-30 kg/m²) sur la clairance d'élimination se sont basées sur des mesures de concentrations totales(263). Les substances étudiées étaient très majoritairement des médicaments fortement liées aux protéines plasmatiques. Or, les différents travaux publiés ont montré des résultats divergents. Selon les études, les individus avec un IMC élevé présentaient soit une augmentation soit une absence de modification de la clairance d'élimination. En associant les concentrations libres et totales, ainsi que les concentrations en AAG, dans notre

modèle, nous avons été en mesure de distinguer l'effet de l'IMC sur la clairance intrinsèque (réduction des concentrations libres et totales) d'une part et sur la constante de dissociation (augmentation de la concentration liée) d'autre part. Il n'est pas possible de distinguer ces deux effets en étudiant uniquement les concentrations totales, comme cela a été rapporté (263). On explique ainsi les divergences observées dans ces études, en fonction de l'effet de l'IMC sur la liaison des substances étudiées aux protéines plasmatiques.

Dans nos travaux, un IMC élevé était associé à une clairance intrinsèque apparente (Cl_{int}/F) élevée, ce qui conduisait à une diminution des concentrations, libres et totales. Par ailleurs, nous avons observé qu'un IMC élevé pouvait être relié à une diminution du K_d (augmentation de l'affinité). Ce changement de K_d pourrait s'expliquer par des mécanismes de glycation des protéines plasmatiques. Ce phénomène de glycation est rapporté chez les patients diabétiques ou présentant un syndrome métabolique observé chez les patients avec un IMC élevé(264–266). Ainsi, une glycation de l'AAG serait susceptible de modifier le K_d du DRV, comme cela a été rapporté pour la liaison de la warfarine à l'albumine(204,205,267). D'après les données publiées, la glycation de l'albumine était associée à une augmentation de l'affinité de certaines substances, comme la warfarine la phenylbutazone ou le tryptophane, à l'albumine. Dans nos travaux, l'augmentation de la Cl_{int}/F était contrebalancée par la baisse du K_d, masquant ainsi l'effet de l'IMC sur la Cl_{int}/F sur les concentrations totales. En effet, une diminution du K_d est associée à une diminution de la fraction libre par augmentation de la forme liée. Des données de désynchronisation entre les concentrations libres et totales en ATV ont été également observées sur des rats obèses(268).

B. Application pratique à partir de simulations dans un *what if scenario*

A partir de nos travaux de modélisation et de simulations, nous proposons une hypothèse pharmacologique aux échecs virologiques observés en dépit de concentrations totales optimales au cours d'une monothérapie de DRV.

Le profil de diffusion du DRV dans le liquide cérébro-spinal (LCS) est médiocre(151,152) et des rebonds virologiques ayant pour origine ce compartiment(48,269–271) ont été décrits. Ces échecs virologiques étaient caractérisés par des virus ne présentant pas de mutation de résistance, et une indétectabilité virologique récupérée par un retour à une trithérapie. Lorenzo-Rodendo *et al*(34) ont montré que pour une faible concentration d'antirétroviral dans un compartiment, la pression de sélection était trop faible pour favoriser l'apparition de mutants résistants. De faibles concentrations

libres de DRV dans le SNC, comme celles observées dans nos simulations de profils cinétiques dans le LCS, conduiraient à une faible pression de sélection. Nos résultats pourraient donc expliquer des échecs virologiques, sans mutations de résistance, observés sous monothérapie de DRV.

Peu d'études ont intégré l'IMC, en incluant des valeurs élevées, dans leur analyse des échecs virologiques lors des monothérapies. Notre hypothèse doit donc être confirmée sur une population plus importante de patients, en incluant des patients avec un IMC élevé (>25-30 kg/m²). Nos résultats pourraient avoir un intérêt particulier dans la population nord-américaine, où des IMC très élevés sont fréquemment retrouvés (272).

Si nos résultats venaient à être confirmés, la monothérapie de DRV ne devrait pas être recommandée chez les patients présentant un IMC élevé. Par ailleurs, une augmentation de posologie de 800 mg *qd* à 600 mg *bid* ne serait pas systématiquement suffisante pour atteindre une concentration libre efficace dans le LCS. En revanche, une association du DRV à la lamivudine, comme dans l'étude MOBIDIP(135), pourrait être intéressante dans cette sous-population de patients. Dans l'étude MOBIDIP, l'efficacité était conservée même en présence de mutation de résistance archivée (comme la M184)(135). La lamivudine, mais aussi l'emtricitabine, sont des inhibiteurs nucléosidiques avec un bon profil de diffusion dans le LCS (rapport des concentrations LCS/plasma = 0,7 pour l'emtricitabine)(273,274). Ces substances seraient intéressantes pour envisager une stratégie d'allègement en bithérapie avec du DRV chez des patients à IMC élevé.

La diffusion du DRV a été étudiée dans d'autres compartiments comme le tissu génital ou rectal. Cependant, ces études se sont limitées à la mesure des concentrations totales dans ces tissus. Or il a été montré avec le DTG (104,230), l'existence d'une forme liée en proportion non négligeable dans le tissu génital masculin (f_u=13%). Pour éviter toute erreur d'interprétation dans les résultats, en l'absence de ratio des concentrations libres compartiment/plasma, nous avons préféré écarter l'exploration de l'exposition par des simulations de profils cinétiques du DRV libre dans ces compartiments.

Notre scénario de simulations repose sur deux études ayant exploré les ratios de concentrations libres LCS/plasma (4% et 8,5%) (151,152). Cependant, il existe un écart important entre les ratios de concentrations libres LCS/plasma entre les deux études, ce qui constitue une limite dans l'interprétation des résultats. Cette différence trouve très probablement son origine dans les procédures analytiques mesurant la concentration libre. En effet, une étude s'est basée sur la

DE(151), l'autre sur l'UF(152). En se basant sur les exigences pré-analytiques et analytiques que nous nous sommes imposés, seuls les résultats de l'étude de Delille *et al* (151) sont utilisables dans le cadre de cette discussion. En effet, les auteurs ont obtenus un ratio de 4.0% en utilisant une technique de DE (151).

L'utilisation de ratios fixes des concentrations libres lors de nos simulations était une autre limite dans l'interprétation de nos résultats. En effet, dans les deux études, les ratios observés sont associés à une importante variabilité inter-individuelle (8.5% IQR[6.2-12.7] pour l'étude de Croteau *et al* et 4.0% IQR[3.0-6.0] pour l'étude de Delille *et al*(151)). Nous avons donc exclu toute variabilité liée à la diffusion, pouvant être apportée par exemple par le transport d'influx (OATP1B1) ou d'efflux (P-gp) à travers la barrière hémato-méningée. Cependant, aucune étude n'a détaillé à ce jour les facteurs de variabilité de la diffusion du DRV dans le LCS. Le polymorphisme génétique des deux transporteurs et la présence du ritonavir dans le sang (inhibiteur de la P-gp) pourrait être deux facteurs à explorer pour expliquer une variabilité dans le profil de diffusion(36).

Les seuils d'efficacité utilisés dans notre étude constituent également une limite à notre étude. En effet, nous avons considéré efficace une concentration libre supérieure à des $IC_{50/90}$ pendant 100% du temps entre deux prises (interdose). Cependant, aucun modèle pharmacodynamique n'a validé cet objectif d'exposition. Ainsi, une aire sous courbe, un ratio de concentration maximale ou minimale sur une $IC_{50/90}$ pourraient également être des critères pharmacocinétiques-pharmacodynamiques à explorer. Notre choix de cible (C_{min}> $IC_{50/90}$ pendant toute l'interdose) reposait donc uniquement sur un souci d'homogénéité de présentation des résultats, par rapport à d'autres études explorant l'efficacité des antirétroviraux. Il est en effet fréquent de voir les concentrations minimales comparées à une cible comme $IC_{50/90}$, plus ou moins ajustée à la liaison protéique (qui correspond à l'évaluation de la concentration inhibitrice dans un milieu de culture contenant du sérum humain pour s'approcher des conditions de liaisons aux protéines sériques) (100,152,156,159,174,174,223,224,228,242,243,243–247).

IV. Conclusions et perspectives

Une validation de méthode approfondie est nécessaire avant d'entreprendre l'étude et l'interprétation de la forme libre des substances fortement liées aux protéines plasmatiques. Lors de nos travaux, nous avons montré l'existence de plusieurs sources de variabilité des résultats de fraction libre liés à des expérimentations par UF. Cette variabilité a facilement été observée, en explorant uniquement trois facteurs (température, durée et force de centrifugation), sur des valeurs des niveaux de facteurs proches (*e.g.* 1000/2000g). Seule une harmonisation des pratiques dans l'évaluation de la forme libre permettrait de comparer les résultats de forme libre entre les différentes études. Cette harmonisation paraît d'autant plus importante que les résultats de concentrations libres sont souvent directement comparés à des concentrations inhibitrices de la réplication virale. La comparaison des deux concentrations libres et inhibitrices est ensuite utilisée pour conclure sur l'efficacité de l'antirétroviral.

En nous basant sur une méthode de DE, nous avons montré l'existence d'une importante variabilité des résultats de fraction libre, pouvant être liée à des interactions sur la liaison aux protéines plasmatiques. Cette variabilité pourrait principalement être expliquée par une modification de la constante de dissociation des antirétroviraux pour les protéines plasmatiques. Ainsi de nombreux facteurs comme les co-prescriptions ou les composés endogènes sont susceptibles d'entrer en compétition avec les antirétroviraux. Lors de nos travaux, ce mécanisme de compétition a été notamment observé avec le DTG. Cette interaction sur le site de liaison a pour conséquence une modification de la constante de dissociation (K_d). Nous avons par ailleurs proposé des valeurs de K_d et de B_{max} à partir du plasma d'un seul sujet. Néanmoins, il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces paramètres de liaison par des travaux à partir d'échantillons de plusieurs individus. Une telle étude permettrait de rechercher l'existence d'une variabilité inter-individuelle des paramètres de liaison K_d et de B_{max}.

Au cours de nos travaux, nous avons développé un modèle de pharmacocinétique de population assurant une description fidèle des données de concentrations libres et totales. Nos travaux se sont basés sur une approche non paramétrique. Cependant, nous n'avons peut-être pas été en capacité d'exploiter pleinement l'approche non paramétrique. Il aurait été intéressant de comparer les approches paramétriques/non paramétriques et de rechercher d'éventuelles divergences entre les

deux démarches. En se basant sur la concentration libre, nous avons mis en évidence une sous-population de patients présentant une clairance intrinsèque (ou clairance libre) augmentée. La variabilité de l'affinité de liaison dans cette population de patients rendait difficile cette interprétation par la seule mesure des concentrations totales. Néanmoins, nos résultats se doivent d'être confirmés par des calculs de K_d *in vitro*. Pour ce faire, des surcharges de DRV pourraient être réalisées sur des échantillons de plasma provenant de différents sujets, catégorisés selon leur IMC (normal 18-25 kg/m², ou élevé >25 kg/m² et >30kg/m²). Les calculs de K_d sur ces échantillons pourraient confirmer notre hypothèse.

Les résultats de nos travaux sont une première étape dans l'objectif d'un suivi thérapeutique pharmacologique reposant sur les concentrations libres à la place des concentrations totales pour le DRV. Elles justifient d'étendre ces travaux sur la forme libre à d'autres substances fortement liées aux protéines plasmatiques, comme certains antibiotiques (*e.g.* la cefazoline chez les patients présentant une maladie rénale chronique, accumulant des produits du catabolisme se liant à l'albumine, comme l'urée).

Les simulations des profils pharmacocinétiques à partir du modèle construit dans notre étude ont montré que l'exposition du DRV libre dans le LCS était insuffisante. Ce résultat serait en mesure d'expliquer les échecs virologiques lors des monothérapies de DRV et contribuerait à l'individualisation des stratégies d'allègement. L'individualisation pourrait passer par la proposition d'une bithérapie à la place d'une monothérapie pour certaines sous-populations de patients. Néanmoins, les hypothèses formulées à partir des simulations nécessitent d'être approfondies sur une population plus importante de patients.

V. Références bibliographiques

1. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Initiation d'un premier traitement antirétroviral (version avril 2018) [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_initiation.pdf

2. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Optimisation d'un traitement antirétroviral en situation de succès virologique (version juillet 2017) [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/01/experts-vih_optimisation.pdf

3. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Pharmacologie (version mars 2018) [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2018/03/experts-vih_pharmacologie.pdf

4. Pellegrin I, Wittkop L, Joubert LM, Neau D, Bollens D, Bonarek M, et al. Virological response to darunavir/ritonavir-based regimens in antiretroviral-experienced patients (PREDIZISTA study). Antivir Ther. 2008;13(2):271-9.

5. Katlama C, Soulié C, Caby F, Denis A, Blanc C, Schneider L, et al. Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia. J Antimicrob Chemother. 2016;71(9):2646-50.

6. Pharmacokinetics (PK) and PK-Pharmacodynamic (PD) Relationship of Dolutegravir (DTG) in Integrase Inhibitor (INI)-Naive Subjects [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: http://www.natap.org/2013/ICAAC/ICAAC_44.htm

7. Kakuda TN, Brochot A, Tomaka FL, Vangeneugden T, Van De Casteele T, Hoetelmans RMW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of boosted once-daily darunavir. J Antimicrob Chemother. oct 2014;69(10):2591-605.

8. Rowland M, Tozer TN. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. Rowland, M., Tozer, T. (Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, 2011). Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins; 2011. 839 p.

9. Svicher V, Ceccherini-Silberstein F, Antinori A, Aquaro S, Perno CF. Understanding HIV compartments and reservoirs. Curr HIV/AIDS Rep. juin 2014;11(2):186-94.

10. European Medicines Agency. Tivicay: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002753/WC500160680.pdf

11. European Medicines Agency. Reyataz: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000494/WC500056380.pdf

12. European Medicines Agency. Prezista: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000707/WC500041756.pdf

13. Nilsson LB. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. Bioanalysis. déc 2013;5(24):3033-50.

14. Moltó J, Xinarianos G, Miranda C, Pushpakom S, Cedeño S, Clotet B, et al. Simultaneous pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of darunavir and ritonavir in HIV-infected patients. Clin Pharmacokinet. juill 2013;52(7):543-53.

15. Illamola SM, Hirt D, Tréluyer JM, Urien S, Benaboud S. Challenges regarding analysis of unbound fraction of highly bound protein antiretroviral drugs in several biological matrices: lack of harmonisation and guidelines. Drug Discov Today. avr 2015;20(4):466-74.

16. Rolan PE. Plasma protein binding displacement interactions--why are they still regarded as clinically important? Br J Clin Pharmacol. févr 1994;37(2):125-8.

17. Toutain PL, Bousquet-Melou A. Free drug fraction vs free drug concentration: a matter of frequent confusion. J Vet Pharmacol Ther. déc 2002;25(6):460-3.

18. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. Immunity. 21 sept 2012;37(3):377-88.

19. Hoefnagel JGM, Koopmans PP, Burger DM, Schuurman R, Galama JMD. Role of the inhibitory quotient in HIV therapy. Antivir Ther. 2005;10(8):879-92.

20. Gupta K, Klasse PJ. How do viral and host factors modulate the sexual transmission of HIV? Can transmission be blocked? PLoS Med. févr 2006;3(2):e79.

21. Shaw GM, Hunter E. HIV Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. nov 2012 [cité 20 sept 2018];2(11). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543106/

22. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature. 20 janv 1984;312(5996):763-7.

23. Eckstein DA, Penn ML, Korin YD, Scripture-Adams DD, Zack JA, Kreisberg JF, et al. HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. Immunity. oct 2001;15(4):671-82.

24. Février M, Dorgham K, Rebollo A. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. Viruses. 2011;3(5):586-612.

25. Rowland-Jones S. HIV infection: where have all the T cells gone? Lancet Lond Engl. 3 juill 1999;354(9172):5-7.

26. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. Nature. 19 avr 2001;410(6831):974-9.

27. Hu W-S, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 oct 2012;2(10).

28. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. Annu Rev Med. 2002;53:557-93.

29. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. nov 2008;73(11):975-83.

30. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. Science. 14 nov 1997;278(5341):1291-5.

31. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 nov 1997;94(24):13193-7.

32. Darcis G, Coombs RW, Van Lint C. Exploring the anatomical HIV reservoirs: role of the testicular tissue. AIDS Lond Engl. 28 2016;30(18):2891-3.

33. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. PLoS Pathog. 22 juill 2010;6(7):e1001005.

34. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim E-Y, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. Nature. 4 févr 2016;530(7588):51-6.

35. Thompson CG, Gay CL, Kashuba ADM. HIV Persistence in Gut-Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities. AIDS Res Hum Retroviruses. 2017;33(6):513-23.

36. Calcagno A, Cusato J, D'Avolio A, Bonora S. Genetic Polymorphisms Affecting the Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs. Clin Pharmacokinet. avr 2017;56(4):355-69.

37. Wook JK, Yukl SA. Tissue reservoirs of HIV. Curr Opin HIV AIDS. 2016 Jul; 11(4):362-70.

38. Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. juill 1999;27(7):804-9.

39. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 « pie ». Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. mai 2006;34(5):880-6.

40. Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci. nov 2006;29(3-4):269-77.

41. Tucker TGHA, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MWH. Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. Biochem Pharmacol. 15 janv 2012;83(2):279-85.

42. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. Essays Biochem. 7 sept 2011;50(1):161-78.

43. Fletcher CV, Staskus K, Wietgrefe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 11 févr 2014;111(6):2307-12.

44. Agosto LM, Uchil PD, Mothes W. HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. Trends Microbiol. mai 2015;23(5):289-95.

45. Integrase Inhibitor Penetration Generally Worse in Lymphoid Tissue Than Blood Cells [Internet]. [cité 28 sept 2018]. Disponible sur: http://www.natap.org/2018/CROI/croi_24.htm

46. Cory TJ, Schacker TW, Stevenson M, Fletcher CV. Overcoming pharmacologic sanctuaries. Curr Opin HIV AIDS. mai 2013;8(3):190-5.

47. Gavegnano C, Schinazi RF. Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication. Antivir Chem Chemother. 19 oct 2009;20(2):63-78.

48. Donath M, Wolf T, Stürmer M, Herrmann E, Bickel M, Khaykin P, et al. HIV-1 replication in central nervous system increases over time on only protease inhibitor therapy. Med Microbiol Immunol (Berl). déc 2016;205(6):575-83.

49. Else LJ, Taylor S, Back DJ, Khoo SH. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract. Antivir Ther. 2011;16(8):1149-67.

50. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. Clin Microbiol Rev. oct 2010;23(4):858-83.

51. Morris ME, Rodriguez-Cruz V, Felmlee MA. SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. AAPS J. 2017;19(5):1317-31.

52. Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A, Moreau M, Satie A-P, Mahé D, et al. Detection of Simian Immunodeficiency Virus in Semen, Urethra, and Male Reproductive Organs during Efficient Highly Active Antiretroviral Therapy. J Virol. juin 2015;89(11):5772-87.

53. Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. AIDS Lond Engl. 17 juill 2009;23(11):1397-404.

54. Cu-Uvin S, DeLong AK, Venkatesh KK, Hogan JW, Ingersoll J, Kurpewski J, et al. Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. AIDS Lond Engl. 23 oct 2010;24(16):2489-97.

55. Hu M, Patel SK, Zhou T, Rohan LC. Drug transporters in tissues and cells relevant to sexual transmission of HIV: Implications for drug delivery. J Control Release Off J Control Release Soc. 10 déc 2015;219:681-96.

56. Mruk DD, Su L, Cheng CY. Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. Trends Pharmacol Sci. févr 2011;32(2):99-106.

57. Huang Y, Hoque MT, Jenabian M-A, Vyboh K, Whyte S-K, Sheehan NL, et al. Antiretroviral drug transporters and metabolic enzymes in human testicular tissue: potential contribution to HIV-1 sanctuary site. J Antimicrob Chemother. 2016;71(7):1954-65.

58. Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol. 1 mai 2005;204(3):216-37.

59. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH (version avril 2018) [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2018/05/experts-vih_suivi.pdf

60. Bates M, Wrin T, Huang W, Petropoulos C, Hellmann N. Practical applications of viral fitness in clinical practice. Curr Opin Infect Dis. févr 2003;16(1):11-8.

61. Boffito M, Back DJ, Blaschke TF, Rowland M, Bertz RJ, Gerber JG, et al. Protein binding in antiretroviral therapies. AIDS Res Hum Retroviruses. sept 2003;19(9):825-35.

62. Hickman D, Vasavanonda S, Nequist G, Colletti L, Kati WM, Bertz R, et al. Estimation of serum-free 50-percent inhibitory concentrations for human immunodeficiency virus protease inhibitors lopinavir and ritonavir. Antimicrob Agents Chemother. août 2004;48(8):2911-7.

63. Delaugerre C. Barrière génétique à la résistance des antirétroviraux: Le point sur le raltégravir, premier inhibiteur d'intégrase. Médecine Mal Infect. 1 sept 2010;40:S1-10.

64. HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithm (version avril 2018) [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: http://www.hivfrenchresistance.org/2018/Algo2018-HIV1.pdf

65. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2016;46:292-307.

66. Bressy J. Prise en charge du VIH - Recommandations du groupe d'experts [Internet]. Conseil national du sida et des hépatites virales. 2018 [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/actualites/prise-en-charge-du-vih-recommandations-du-groupe-dexperts/

67. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. N Engl J Med. 27 août 2015;373(9):795-807.

68. A Trial of Early Antiretrovirals and Isoniazid Preventive Therapy in Africa. N Engl J Med. 27 août 2015;373(9):808-22.

69. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Epidémiologie (version juillet 2017) [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/10/experts-vih_epidemio.pdf

70. Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Obesity, cardiometabolic syndrome, and chronic kidney disease: the weight of the evidence. Adv Chronic Kidney Dis. oct 2006;13(4):365-73.

71. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Recommandations du groupe d'experts. Rapport 2013. [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf

72. European Medicines Agency. Norvir: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000127/WC500028728.pdf

73. European Medicines Agency. Ziagen: EPAR-Product Information, 2018. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170309137266/anx_137266_fr.pdf [Internet]. [cité 20 sept 2018]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170309137266/anx_137266_fr.pdf

74. Dolutegravir [Internet]. [cité 21 sept 2018]. Disponible sur: https://www.drugbank.ca/drugs/DB08930

75. Prise en charge du VIH – Recommandations du groupe d'experts; Résistance du VIH-1 aux antirétroviraux. (version octobre 2016) [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/02/experts-vih_resistance.pdf

76. Cottrell ML, Hadzic T, Kashuba ADM. Clinical Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Drug-Interaction Profile of the Integrase Inhibitor Dolutegravir. Clin Pharmacokinet. nov 2013;52(11):981-94.

77. Min S, Sloan L, DeJesus E, Hawkins T, McCurdy L, Song I, et al. Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of dolutegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults. AIDS Lond Engl. 10 sept 2011;25(14):1737-45.

78. van Lunzen J, Maggiolo F, Arribas JR, Rakhmanova A, Yeni P, Young B, et al. Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naive adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. Lancet Infect Dis. févr 2012;12(2):111-8.

79. Raffi F, Rachlis A, Stellbrink H-J, Hardy WD, Torti C, Orkin C, et al. Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. Lancet Lond Engl. 2 mars 2013;381(9868):735-43.

80. Walmsley SL, Antela A, Clumeck N, Duiculescu D, Eberhard A, Gutiérrez F, et al. Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. N Engl J Med. 7 nov 2013;369(19):1807-18.

81. Clotet B, Feinberg J, van Lunzen J, Khuong-Josses MA, Antinori A, Dumitru I, et al. Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 48 week results from the randomised open-label phase 3b study. Lancet. 2014 Jun 28;383(9936):2222-31. [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=Once-

daily+dolutegravir+versus+darunavir+plus+ritonavir+in+antiretroviral-naive+adults+with+HIV-1+infection+(FLAMINGO)+48+week

82. Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, Shuldyakov A, Brites C, Andrade-Villanueva JF, et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. Lancet. 2013 Aug 24;382(9893):700-8. [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=Dolutegravir+versus+raltegravir+in+antiretroviral-experienced%2C+integrase-inhibitor-naive+adults+with+HIV+week+48+results+from+the+randomised%2C+double-blind%2C+non-inferiority+SAILING

83. Eron JJ, Clotet B, Durant J, Katlama C, Kumar P, Lazzarin A, et al. Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. J Infect Dis. 1 mars 2013;207(5):740-8.

84. Castagna A, Maggiolo F, Penco G, Wright D, Mills A, Grossberg R, et al. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. J Infect Dis. 1 août 2014;210(3):354-62.

85. Akil B, Blick G, Hagins DP, Ramgopal MN, Richmond GJ, Samuel RM, et al. Dolutegravir versus placebo in subjects harbouring HIV-1 with integrase inhibitor resistance associated substitutions: 48-week results from VIKING-4, a randomized study. Antivir Ther. 2015;20(3):343-8.

86. Viani RM, Alvero C, Fenton T, Acosta EP, Hazra R, Townley E, et al. Safety, Pharmacokinetics and Efficacy of Dolutegravir in Treatment-experienced HIV-1 Infected Adolescents: Forty-eight-week Results from IMPAACT P1093. Pediatr Infect Dis J. nov 2015;34(11):1207-13.

87. Llibre JM, Hung C-C, Brinson C, Castelli F, Girard P-M, Kahl LP, et al. Efficacy, safety, and tolerability of dolutegravir-rilpivirine for the maintenance of virological suppression in adults with HIV-1: phase 3, randomised, non-inferiority SWORD-1 and SWORD-2 studies. Lancet Lond Engl. 03 2018;391(10123):839-49.

88. Taiwo BO, Zheng L, Stefanescu A, Nyaku A, Bezins B, Wallis CL, et al. ACTG A5353: A Pilot Study of Dolutegravir Plus Lamivudine for Initial Treatment of Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)-infected Participants With HIV-1 RNA <500000 Copies/mL. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 17 mai 2018;66(11):1689-97.

89. Wijting I, Rokx C, Boucher C, van Kampen J, Pas S, de Vries-Sluijs T, et al. Dolutegravir as maintenance monotherapy for HIV (DOMONO): a phase 2, randomised non-inferiority trial. Lancet HIV. 2017;4(12):e547-54.

90. Promising Results of Lamivudine + Dolutegravir Maintenance Therapy in ANRS 167 Lamidol Trial [Internet]. [cité 21 sept 2018]. Disponible sur: http://www.natap.org/2017/CROI/croi_83.htm

91. Min S, Song I, Borland J, Chen S, Lou Y, Fujiwara T, et al. Pharmacokinetics and safety of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor, in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. janv 2010;54(1):254-8.

92. McCormack PL. Dolutegravir: a review of its use in the management of HIV-1 infection in adolescents and adults. Drugs. juill 2014;74(11):1241-52.

93. Song I, Borland J, Chen S, Patel P, Wajima T, Peppercorn A, et al. Effect of food on the pharmacokinetics of the integrase inhibitor dolutegravir. Antimicrob Agents Chemother. mars 2012;56(3):1627-9.

94. Reese MJ, Savina PM, Generaux GT, Tracey H, Humphreys JE, Kanaoka E, et al. In vitro investigations into the roles of drug transporters and metabolizing enzymes in the disposition and drug interactions of dolutegravir, a HIV integrase inhibitor. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. févr 2013;41(2):353-61.

95. Chen S, St Jean P, Borland J, Song I, Yeo AJ, Piscitelli S, et al. Evaluation of the effect of UGT1A1 polymorphisms on dolutegravir pharmacokinetics. Pharmacogenomics. janv 2014;15(1):9-16.

96. Gammal RS, Court MH, Haidar CE, Iwuchukwu OF, Gaur AH, Alvarellos M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing. Clin Pharmacol Ther. avr 2016;99(4):363-9.

97. Castellino S, Moss L, Wagner D, Borland J, Song I, Chen S, et al. Metabolism, excretion, and mass balance of the HIV-1 integrase inhibitor dolutegravir in humans. Antimicrob Agents Chemother. août 2013;57(8):3536-46.

98. Cattaneo D, Minisci D, Cozzi V, Riva A, Meraviglia P, Clementi E, et al. Dolutegravir plasma concentrations according to companion antiretroviral drug: unwanted drug interaction or desirable boosting effect? Antivir Ther. 23 déc 2016;

99. Zhang J, Hayes S, Sadler BM, Minto I, Brandt J, Piscitelli S, et al. Population pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-infected treatment-naive patients. Br J Clin Pharmacol. 2015 Sep;80(3):502-14. [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1111%2Fbcp.12639

100. Letendre SL, Mills AM, Tashima KT, Thomas DA, Min SS, Chen S, et al. ING116070: a study of the pharmacokinetics and antiviral activity of dolutegravir in cerebrospinal fluid in HIV-1-infected, antiretroviral therapy-naive subjects. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. oct 2014;59(7):1032-7.

101. Croteau D, Letendre S, Best BM, Ellis RJ, Breidinger S, Clifford D, et al. Total raltegravir concentrations in cerebrospinal fluid exceed the 50-percent inhibitory concentration for wild-type HIV-1. Antimicrob Agents Chemother. déc 2010;54(12):5156-60.

102. European Medicines Agency. Isentress: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 12 déc 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000860/WC500037405.pdf

103. Greener BN, Patterson KB, Prince HMA, Sykes CS, Adams JL, Dumond JB, et al. Dolutegravir pharmacokinetics in the genital tract and colorectum of HIV-negative men after single and multiple dosing. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 1 sept 2013;64(1):39-44.

104. Imaz A, Martinez-Picado J, Niubó J, Kashuba ADM, Ferrer E, Ouchi D, et al. HIV-1-RNA Decay and Dolutegravir Concentrations in Semen of Patients Starting a First Antiretroviral Regimen. J Infect Dis. 15 nov 2016;214(10):1512-9.

105. Adams JL, Patterson KB, Prince HMA, Sykes C, Greener BN, Dumond JB, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of dolutegravir in the genital tract of HIV-negative women. Antivir Ther. 2013;18(8):1005-13.

106. Song IH, Borland J, Savina PM, Chen S, Patel P, Wajima T, et al. Pharmacokinetics of Single-Dose Dolutegravir in HIV-Seronegative Subjects With Moderate Hepatic Impairment Compared to Healthy Matched Controls. Clin Pharmacol Drug Dev. oct 2013;2(4):342-8.

107. Weller S, Borland J, Chen S, Johnson M, Savina P, Wynne B, et al. Pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-seronegative subjects with severe renal impairment. Eur J Clin Pharmacol. janv 2014;70(1):29-35.

108. Mulligan N, Best BM, Wang J, Capparelli EV, Stek A, Barr E, et al. Dolutegravir pharmacokinetics in pregnant and postpartum women living with HIV. AIDS Lond Engl. 27 mars 2018;32(6):729-37.

109. Schalkwijk S, Feiterna-Sperling C, Weizsäcker K, Colbers A, Bührer C, Greupink R, et al. Substantially lowered dolutegravir exposure in a treatment-experienced perinatally HIV-1-infected pregnant woman. AIDS Lond Engl. 31 juill 2016;30(12):1999-2001.

110. First report of dolutegravir un bound plasma concentrations during pregnancy in HIV - positive women IWCPAT 2018 [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: http://regist2.virology-education.com/presentations/2018/Antiviralpk/24_bollen.pdf

111. Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. Clin Pharmacokinet. 2005;44(10):989-1008.

112. Abduljalil K, Furness P, Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Soltani H. Anatomical, physiological and metabolic changes with gestational age during normal pregnancy: a database for parameters required in physiologically based pharmacokinetic modelling. Clin Pharmacokinet. 1 juin 2012;51(6):365-96.

113. New study suggests risk of birth defects in babie s born to women on HIV medicine dolutegravir. EMA 2018, may [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2018/05/WC500249225.pdf

114. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness Rank for Quantifying Antiretroviral Penetration Into the Central Nervous System. Arch Neurol. janv 2008;65(1):65-70.

115. de Boer MG, van den Berk GE, van Holten N, Oryszcyn JE, Dorama W, Moha DA, et al. Intolerance of dolutegravir-containing combination antiretroviral therapy regimens in real-life clinical practice. AIDS. 2016 Nov 28;30(18):2831-2834. [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible

sur: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=10.1097%2FQAD.0000000000001279

116. Hoffmann C, Welz T, Sabranski M, Kolb M, Wolf E, Stellbrink H-J, et al. Higher rates of neuropsychiatric adverse events leading to dolutegravir discontinuation in women and older patients. HIV Med. 2017;18(1):56-63.

117. Elliot ER, Wang X, Singh S, Simmons B, Vera JH, Miller RF, et al. Increased dolutegravir peak concentrations in people living with HIV aged 60 and over and analysis of sleep quality and cognition. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 16 mai 2018;

118. Tivicay, INN-dolutegravir - WC500160680 [Internet]. EMA; Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002753/WC500160680.pdf?wb48617274=36DAFC90

119. Song I, Borland J, Min S, Lou Y, Chen S, Patel P, et al. Effects of etravirine alone and with ritonavir-boosted protease inhibitors on the pharmacokinetics of dolutegravir. Antimicrob Agents Chemother. juill 2011;55(7):3517-21.

120. Song I, Borland J, Arya N, Wynne B, Piscitelli S. Pharmacokinetics of dolutegravir when administered with mineral supplements in healthy adult subjects. J Clin Pharmacol. mai 2015;55(5):490-6.

121. Song I, Weller S, Patel J, Borland J, Wynne B, Choukour M, et al. Effect of carbamazepine on dolutegravir pharmacokinetics and dosing recommendation. Eur J Clin Pharmacol. juin 2016;72(6):665-70.

122. Zong J, Borland J, Jerva F, Wynne B, Choukour M, Song I. The effect of dolutegravir on the pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. J Int AIDS Soc. 2014;17(4 Suppl 3):19584.

123. Merry C, Barry MG, Mulcahy F, Ryan M, Heavey J, Tjia JF, et al. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients. AIDS Lond Engl. 15 mars 1997;11(4):F29-33.

124. Imamichi T. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. Curr Pharm Des. 2004;10(32):4039-53.

125. K. Rittweger M. and Arasteh. K. Rittweger M. and Arasteh. Clinical pharmacokinetics of darunavir. Clin Pharmacokinet. 2007;46(9):739-56. [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Clinical+Pharmacokinetics+of+Darunavir+rittweger

126. Atazanavir [Internet]. [cité 18 nov 2018]. Disponible sur: https://www.drugbank.ca/drugs/DB01072

127. Ortiz R, Dejesus E, Khanlou H, Voronin E, van Lunzen J, Andrade-Villanueva J, et al. Efficacy and safety of once-daily darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in treatment-naive HIV-1-infected patients at week 48. AIDS Lond Engl. 31 juill 2008;22(12):1389-97.

128. Madruga JV, Berger D, McMurchie M, Suter F, Banhegyi D, Ruxrungtham K, et al. Efficacy and safety of darunavir-ritonavir compared with that of lopinavir-ritonavir at 48 weeks in treatment-experienced, HIV-infected patients in TITAN: a randomised controlled phase III trial. Lancet Lond Engl. 7 juill 2007;370(9581):49-58.

129. Cahn P, Fourie J, Grinsztejn B, Hodder S, Molina J-M, Ruxrungtham K, et al. Week 48 analysis of once-daily vs. twice-daily darunavir/ritonavir in treatment-experienced HIV-1-infected patients. AIDS Lond Engl. 24 avr 2011;25(7):929-39.

130. Clotet B, Bellos N, Molina J-M, Cooper D, Goffard J-C, Lazzarin A, et al. Efficacy and safety of darunavir-ritonavir at week 48 in treatment-experienced patients with HIV-1 infection in POWER 1 and 2: a pooled subgroup analysis of data from two randomised trials. Lancet Lond Engl. 7 avr 2007;369(9568):1169-78.

131. Flynn P, Komar S, Blanche S, Giaquinto C, Noguera-Julian A, Welch S, et al. Efficacy and safety of darunavir/ritonavir at 48 weeks in treatment-naïve, HIV-1-infected adolescents: results from a phase 2 open-label trial (DIONE). Pediatr Infect Dis J. sept 2014;33(9):940-5.

132. McKeage K, Scott LJ. Darunavir: in treatment-experienced pediatric patients with HIV-1 infection. Paediatr Drugs. 1 avr 2010;12(2):123-31.

133. Violari A, Bologna R, Kumarasamy N, Pilotto JH, Hendrickx A, Kakuda TN, et al. Safety and efficacy of darunavir/ritonavir in treatment-experienced pediatric patients: week 48 results of the ARIEL trial. Pediatr Infect Dis J. mai 2015;34(5):e132-137.

134. Pulido F, Ribera E, Lagarde M, Pérez-Valero I, Palacios R, Iribarren JA, et al. Dual Therapy With Darunavir and Ritonavir Plus Lamivudine vs Triple Therapy With Darunavir and Ritonavir Plus Tenofovir Disoproxil Fumarate and Emtricitabine or Abacavir and Lamivudine for Maintenance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Suppression: Randomized, Open-Label, Noninferiority DUAL-GESIDA 8014-RIS-EST45 Trial. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 29 nov 2017;65(12):2112-8.

135. Ciaffi L, Koulla-Shiro S, Sawadogo AB, Ndour CT, Eymard-Duvernay S, Mbouyap PR, et al. Boosted protease inhibitor monotherapy versus boosted protease inhibitor plus lamivudine dual therapy as second-line maintenance treatment for HIV-1-infected patients in sub-Saharan Africa (ANRS12 286/MOBIDIP): a multicentre, randomised, parallel, open-label, superiority trial. Lancet HIV. 2017;4(9):e384-92.

136. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, Duvivier C, Lambert-Niclot S, Girard PM, et al. Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. AIDS Lond Engl. 24 sept 2010;24(15):2365-74.

137. Valantin MA, Lambert-Niclot S, Flandre P, Morand-Joubert L, Cabiè A, Meynard JL, et al. Long-term efficacy of darunavir/ritonavir monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: week 96 results from the MONOI ANRS 136 study. J Antimicrob Chemother. mars 2012;67(3):691-5.

138. Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Fätkenheuer G, Nelson M, Clumeck N, et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. AIDS Lond Engl. 16 janv 2010;24(2):223-30.

139. Clumeck N, Rieger A, Banhegyi D, Schmidt W, Hill A, Van Delft Y, et al. 96 week results from the MONET trial: a randomized comparison of darunavir/ritonavir with versus without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA <50 copies/mL at baseline. J Antimicrob Chemother. août 2011;66(8):1878-85.

140. Arribas JR, Clumeck N, Nelson M, Hill A, van Delft Y, Moecklinghoff C. The MONET trial: week 144 analysis of the efficacy of darunavir/ritonavir (DRV/r) monotherapy versus DRV/r plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors, for patients with viral load < 50 HIV-1 RNA copies/mL at baseline. HIV Med. août 2012;13(7):398-405.

141. Antinori A, Arribas J, Fehr J, Girard P-M, Horban A, Hill A, et al. The PROTEA trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV-1 RNA below 50 copies/mL. J Int AIDS Soc. 2014;17(4 Suppl 3):19525.

142. Girard PM, Antinori A, Arribas JR, Ripamonti D, Bicer C, Netzle-Sveine B, et al. Week 96 efficacy and safety of darunavir/ritonavir monotherapy vs. darunavir/ritonavir with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in the PROTEA trial. HIV Med. 2017;18(1):5-12.

143. Deeks ED. Darunavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. Drugs. janv 2014;74(1):99-125.

144. Sekar V, Kestens D, Spinosa-Guzman S, Pauw MD, Paepe ED, Vangeneugden T, et al. The Effect of Different Meal Types on the Pharmacokinetics of Darunavir (TMC114)/Ritonavir in HIV-Negative Healthy Volunteers. J Clin Pharmacol. 1 avr 2007;47(4):479-84.

145. Clinical pharmacology of TMC114 - a new HIV protease inhibitor [Internet]. [cité 25 sept 2018]. Disponible sur: http://www.natap.org/2006/IAS/IAS_76.htm

146. Hartkoorn RC, San Kwan W, Shallcross V, Chaikan A, Liptrott N, Egan D, et al. HIV protease inhibitors are substrates for OATP1A2, OATP1B1 and OATP1B3 and lopinavir plasma concentrations are influenced by SLCO1B1 polymorphisms. Pharmacogenet Genomics. févr 2010;20(2):112-20.

147. Vermeir M, Lachau-Durand S, Mannens G, Cuyckens F, Hoof B van, Raoof A. Absorption, Metabolism, and Excretion of Darunavir, a New Protease Inhibitor, Administered Alone and with Low-Dose Ritonavir in Healthy Subjects. Drug Metab Dispos. 1 avr 2009;37(4):809-20.

148. Garvey L, Latch N, Erlwein OW, Mackie NE, Walsh J, Scullard G, et al. The effects of a nucleoside-sparing antiretroviral regimen on the pharmacokinetics of ritonavir-boosted darunavir in HIV type-1-infected patients. Antivir Ther. 2010;15(2):213-8.

149. Arab-Alameddine M, Lubomirov R, Fayet-Mello A, Aouri M, Rotger M, Buclin T, et al. Population pharmacokinetic modelling and evaluation of different dosage regimens for darunavir and ritonavir in HIV-infected individuals. J Antimicrob Chemother. sept 2014;69(9):2489-98.

150. Brochot A, Kakuda TN, Van De Casteele T, Opsomer M, Tomaka FL, Vermeulen A, et al. Model-Based Once-Daily Darunavir/Ritonavir Dosing Recommendations in Pediatric HIV-1-Infected Patients Aged ≥3 to <12 Years. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol. juill 2015;4(7):406-14.

151. Delille CA, Pruett ST, Marconi VC, Lennox JL, Armstrong WS, Arrendale RF, et al. Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations. J Clin Pharmacol. sept 2014;54(9):1063-71.

152. Croteau D, Rossi SS, Best BM, Capparelli E, Ellis RJ, Clifford DB, 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. mars 2013;68(3):684-9.

153. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 6th Edition [Internet]. [cité 16 janv 2018]. Disponible sur: https://www.elsevier.com/books/tietz-textbook-of-clinical-chemistry-and-molecular-diagnostics/rifai/978-0-323-35921-4

154. Patterson K, Jennings S, Falcon R, Mrus J, Kashuba A. Darunavir, Ritonavir, and Etravirine Pharmacokinetics in the Cervicovaginal Fluid and Blood Plasma of HIV-Infected Women. Antimicrob Agents Chemother. mars 2011;55(3):1120-2.

155. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of darunavir plus ritonavir and etravirine in semen and rectal tissue of HIV-negative men. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 28 sept 2018]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22614898

156. Curran A, Martí R, López RM, Pérez M, Crespo M, Melià MJ, et al. Darunavir and ritonavir total and unbound plasmatic concentrations in HIV-HCV-coinfected patients with hepatic cirrhosis compared to those in HIV-monoinfected patients. Antimicrob Agents Chemother. nov 2015;59(11):6782-90.

157. Sekar V, Spinosa-Guzman S, De Paepe E, Stevens T, Tomaka F, De Pauw M, et al. Pharmacokinetics of multiple-dose darunavir in combination with low-dose ritonavir in individuals with mild-to-moderate hepatic impairment. Clin Pharmacokinet. mai 2010;49(5):343-50.

158. Zorrilla CD, Wright R, Osiyemi OO, Yasin S, Baugh B, Brown K, et al. Total and unbound darunavir pharmacokinetics in pregnant women infected with HIV-1: results of a study of darunavir/ritonavir 600/100 mg administered twice daily. HIV Med. janv 2014;15(1):50-6.

159. Colbers A, Moltó J, Ivanovic J, Kabeya K, Hawkins D, Gingelmaier A, et al. Pharmacokinetics of total and unbound darunavir in HIV-1-infected pregnant women. J Antimicrob Chemother. févr 2015;70(2):534-42.

160. Crauwels HM, Kakuda TN, Ryan B, Zorrilla C, Osiyemi OO, Yasin S, et al. Pharmacokinetics of once-daily darunavir/ritonavir in HIV-1-infected pregnant women. HIV Med. 2016;17(9):643-52.

161. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metab Rev. mai 2001;33(2):161-235.

162. Johnson M, Grinsztejn B, Rodriguez C, Coco J, DeJesus E, Lazzarin A, et al. 96-week comparison of once-daily atazanavir/ritonavir and twice-daily lopinavir/ritonavir in patients with multiple virologic failures. AIDS Lond Engl. 21 mars 2006;20(5):711-8.

163. Molina J-M, Andrade-Villanueva J, Echevarria J, Chetchotisakd P, Corral J, David N, et al. Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naive HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study. Lancet Lond Engl. 23 août 2008;372(9639):646-55.

164. Perez-Molina JA, Rubio R, Rivero A, Pasquau J, Suárez-Lozano I, Riera M, et al. Dual treatment with atazanavir-ritonavir plus lamivudine versus triple treatment with atazanavir-ritonavir plus two nucleos(t)ides in virologically stable patients with HIV-1 (SALT): 48 week results from a randomised, open-label, non-inferiority trial. Lancet Infect Dis. juill 2015;15(7):775-84.

165. Perez-Molina JA, Rubio R, Rivero A, Pasquau J, Suárez-Lozano I, Riera M, et al. Simplification to dual therapy (atazanavir/ritonavir + lamivudine) versus standard triple therapy [atazanavir/ritonavir + two nucleos(t)ides] in virologically stable patients on antiretroviral therapy: 96 week results from an open-label, non-inferiority, randomized clinical trial (SALT study). J Antimicrob Chemother. 2017;72(1):246-53.

166. Castagna A, Spagnuolo V, Galli L, Vinci C, Nozza S, Carini E, et al. Simplification to atazanavir/ritonavir monotherapy for HIV-1 treated individuals on virological suppression: 48-week efficacy and safety results. AIDS Lond Engl. 24 sept 2014;28(15):2269-79.

167. Galli L, Spagnuolo V, Bigoloni A, D'Arminio Monforte A, Montella F, Antinori A, et al. Atazanavir/ritonavir monotherapy: 96 week efficacy, safety and bone mineral density from the MODAt randomized trial. J Antimicrob Chemother. 2016;71(6):1637-42.

168. Squires KE, Young B, DeJesus E, Bellos N, Murphy D, Ward D, et al. ARIES 144 week results: durable virologic suppression in HIV-infected patients simplified to unboosted atazanavir/abacavir/lamivudine. HIV Clin Trials. oct 2012;13(5):233-44.

169. Wohl DA, Bhatti L, Small CB, Edelstein H, Zhao HH, Margolis DA, et al. Simplification to abacavir/lamivudine + atazanavir maintains viral suppression and improves bone and renal biomarkers in ASSURE, a randomized, open label, non-inferiority trial. PloS One. 2014;9(5):e96187.

170. Le Tiec C, Barrail A, Goujard C, Taburet A-M. Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. Clin Pharmacokinet. 2005;44(10):1035-50.

171. Croom KF, Dhillon S, Keam SJ. Atazanavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. Drugs. 29 mai 2009;69(8):1107-40.

172. Zhu L, Persson A, Mahnke L, Eley T, Li T, Xu X, et al. Effect of low-dose omeprazole (20 mg daily) on the pharmacokinetics of multiple-dose atazanavir with ritonavir in healthy subjects. J Clin Pharmacol. mars 2011;51(3):368-77.

173. Barrail-Tran A, Mentré F, Cosson C, Piketty C, Chazallon C, Gérard L, 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. févr 2010;54(2):614-9.

174. Barau C, Furlan V, Yazdanpanah Y, Fagard C, Molina J-M, Taburet A-M, et al. Characterization of binding of raltegravir to plasma proteins. Antimicrob Agents Chemother. oct 2013;57(10):5147-50.

175. Colombo S, Buclin T, Cavassini M, Décosterd LA, Telenti A, Biollaz J, et al. Population pharmacokinetics of atazanavir in patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrob Agents Chemother. nov 2006;50(11):3801-8.

176. Dickinson L, Boffito M, Back D, Waters L, Else L, Davies G, et al. Population pharmacokinetics of ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients and healthy volunteers. J Antimicrob Chemother. juin 2009;63(6):1233-43.

177. Schipani A, Siccardi M, D'Avolio A, Baietto L, Simiele M, Bonora S, et al. Population pharmacokinetic modeling of the association between 63396C->T pregnane X receptor polymorphism and unboosted atazanavir clearance. Antimicrob Agents Chemother. déc 2010;54(12):5242-50.

178. Kile DA, MaWhinney S, Aquilante CL, Rower JE, Castillo-Mancilla JR, Anderson PL. A population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis of atazanavir. AIDS Res Hum Retroviruses. oct 2012;28(10):1227-34.

179. Best BM, Letendre SL, Brigid E, Clifford DB, Collier AC, Gelman BB, et al. Low atazanavir concentrations in cerebrospinal fluid. AIDS Lond Engl. 2 janv 2009;23(1):83-7.

180. 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. janv 2007;51(1):335-7.

181. Guaraldi G, Cocchi S, Motta A, Ciaffi S, Codeluppi M, Bonora S, et al. A pilot study on the efficacy, pharmacokinetics and safety of atazanavir in patients with end-stage liver disease. J Antimicrob Chemother. déc 2008;62(6):1356-64.

182. Cure S, Bianic F, Espinas C, Hardy H, Rosenblatt L, Juday T. Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Renal Function in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients Treated with Atazanavir (ATV)-Based Regimens. PloS One. 2015;10(5):e0124666.

183. Izzedine H, Lescure FX, Bonnet F. HIV medication-based urolithiasis. Clin Kidney J. avr 2014;7(2):121-6.

184. Baril J, Conway B, Giguère P, Ferko N, Hollmann S, Angel JB. A meta-analysis of the efficacy and safety of unboosted atazanavir compared with ritonavir-boosted protease inhibitor

maintenance therapy in HIV-infected adults with established virological suppression after induction. HIV Med. mai 2014;15(5):301-10.

185. Metabolic and kidney disorders correlate with high atazanavir concentrations in HIV-infected patients: is it time to revise atazanavir dosages? - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=Metabolic+and+kidney+disorders+correlate+with+high+atazanavir+concentrations+in+HIV-infected+patients%3A+is+it+time

186. Nso Roca AP, Nso AP, Larru B, Bellón JM, Mellado MJ, Ramos JT, et al. HIV-infected adolescents: relationship between atazanavir plasma levels and bilirubin concentrations. J Adolesc Health Off Publ Soc Adolesc Med. janv 2011;48(1):100-2.

187. Boffito M, Jackson A, Amara A, Back D, Khoo S, Higgs C, et al. Pharmacokinetics of once-daily darunavir-ritonavir and atazanavir-ritonavir over 72 hours following drug cessation. Antimicrob Agents Chemother. sept 2011;55(9):4218-23.

188. Foisy MM, Yakiwchuk EM, Hughes CA. Induction effects of ritonavir: implications for drug interactions. Ann Pharmacother. juill 2008;42(7):1048-59.

189. Mager DE, Kimko HHC. Systems Pharmacology and Pharmacodynamics. Springer; 2016. 512 p.

190. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev. févr 2009;30(1):19-34.

191. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 2018;44.

192. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf [Internet]. [cité 7 oct 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

193. Di L, Umland JP, Trapa PE, Maurer TS. Impact of recovery on fraction unbound using equilibrium dialysis. J Pharm Sci. mars 2012;101(3):1327-35.

194. 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(1):166–168.

195. 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(4):393–397.

196. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. Mol Aspects Med. juin 2012;33(3):209-90.

197. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharmacol. 1 nov 2002;64(9):1355-74.

198. Monographie de produit - Glimeperide. :52.

199. European Medicines Agency. Rosuvastatin: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 7 nov 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/referral/crestor-5-mg-article-29-referral-annex-i-ii-iii_en.pdf

200. European Medicines Agency. Glibenclamide: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 7 nov 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/amglidia-epar-product-information_fr.pdf

201. European Medicines Agency. Atorvastatin: EPAR-Product Information, 2018. https://www.ema.europa.eu/documents/referral/sortis-article-6-12-referral-annex-i-ii-iii_fr.pdf [Internet]. [cité 7 nov 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/referral/sortis-article-6-12-referral-annex-i-ii-iii_fr.pdf

202. Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Park DS, Bhagavan NV. Familial dysalbuminemic byperthyroxinemia may result in altered warfarin pharmacokinetics. Chem Biol Interact. 1 févr 2000;124(3):161-72.

203. Minchiotti L, Galliano M, Kragh-Hansen U, Peters T. Mutations and polymorphisms of the gene of the major human blood protein, serum albumin. Hum Mutat. 1 août 2008;29(8):1007-16.

204. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. Br J Pharmacol. 1 juill 2007;151(5):580-90.

205. Szkudlarek A, Sułkowska A, Maciążek-Jurczyk M, Chudzik M, Równicka-Zubik J. Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 5 janv 2016;152:645-53.

206. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Hoy KS, Wa C, DeBolt E, et al. Review: Glycation of human serum albumin. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 21 oct 2013;425:64-76.

207. Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, 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 the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc. juin 1996;34(6):517-20.

208. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su D-F. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. J Physiol Biochem. juin 2015;71(2):329-40.

209. Hill MD, Briscoe PR, Abramson FP. Comparison of propranolol-binding plasma proteins in sheep with those in humans, dogs and rats. Biochem Pharmacol. 1 déc 1989;38(23):4199-205.

210. McGowan FX, Reiter MJ, Pritchett EL, Shand DG. Verapamil plasma binding: relationship to alpha 1-acid glycoprotein and drug efficacy. Clin Pharmacol Ther. avr 1983;33(4):485-90.

211. Kornguth ML, Hutchins LG, Eichelman BS. Binding of psychotropic drugs to isolated alpha-acid glycoprotein. Biochem Pharmacol. 1 sept 1981;30(17):2435-41.

212. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. Clin Pharmacokinet. sept 1999;37(3):177-93.

213. Telford JE, Bones J, McManus C, Saldova R, Manning G, Doherty M, et al. Antipsychotic Treatment of Acute Paranoid Schizophrenia Patients with Olanzapine Results in Altered Glycosylation of Serum Glycoproteins. J Proteome Res. 6 juill 2012;11(7):3743-52.

214. Bi C, Matsuda R, Zhang C, Isingizwe Z, Clarke W, Hage DS. Studies of drug interactions with alpha1-acid glycoprotein by using on-line immunoextraction and high-performance affinity chromatography. J Chromatogr A. 13 oct 2017;1519:64-73.

215. Steele WH, Haughton DJ, Barber HE. Binding of vinblastine to recrystallized human alpha 1-acid glycoprotein. Cancer Chemother Pharmacol. déc 1982;10(1):40-2.

216. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. févr 2003;9(2):625-32.

217. Mihaly GW, Ching MS, Klejn MB, Paull J, Smallwood RA. Differences in the binding of quinine and quinidine to plasma proteins. Br J Clin Pharmacol. déc 1987;24(6):769-74.

218. Romach MK, Piafsky KM, Abel JG, Khouw V, Sellers EM. Methadone binding to orosomucoid (alpha 1-acid glycoprotein): determinant of free fraction in plasma. Clin Pharmacol Ther. févr 1981;29(2):211-7.

219. Li JH, Xu JQ, Cao XM, Ni L, Li Y, Zhuang YY, et al. Influence of the ORM1 phenotypes on serum unbound concentration and protein binding of quinidine. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. mars 2002;317(1-2):85-92.

220. Wang LS, Shang JJ, Shi SY, Zhang YQ, Lin J, Guo ZH, et al. Influence of ORM1 polymorphisms on the maintenance stable warfarin dosage. Eur J Clin Pharmacol. mai 2013;69(5):1113-20.

221. Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. Amino Acids. avr 2012;42(4):1193-204.

222. Fayet A, Béguin A, de Tejada BM, Colombo S, Cavassini M, Gerber S, et al. Determination of unbound antiretroviral drug concentrations by a modified ultrafiltration method reveals high variability in the free fraction. Ther Drug Monit. août 2008;30(4):511-22.

223. Curran A, Guiu JM, Ribera E, Crespo M. Darunavir and telaprevir drug interaction: total and unbound plasma concentrations in HIV/HCV-coinfected patients with cirrhosis. J Antimicrob Chemother. mai 2014;69(5):1434-6.

224. Lambert-Niclot S, Peytavin G, Duvivier C, Poirot C, Algarte-Genin M, Pakianather S, 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. nov 2010;54(11):4910-3.

225. Dumond JB, Chen J, Cottrell M, Trezza CR, Prince H, Sykes C, et al. Population Pharmacokinetics Modeling of Unbound Efavirenz, Atazanavir, and Ritonavir in HIV-Infected Subjects With Aging Biomarkers. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol. 2017;6(2):128-35.

226. Xu XS, Rose A, Demers R, Eley T, Ryan J, Stouffer B, et al. Quantitative determination of free/bound atazanavir via high-throughput equilibrium dialysis and LC-MS/MS, and the application in ex vivo samples. Bioanalysis. 2014;6(23):3169-82.

227. Colombo S, Buclin T, Franc C, Guignard N, Khonkarly M, Tarr PE, et al. Ritonavir-boosted atazanavir-lopinavir combination: a pharmacokinetic interaction study of total, unbound plasma and cellular exposures. Antivir Ther. 2006;11(1):53-62.

228. Ghosn J, Slama L, Chermak A, Houssaini A, Lambert-Niclot S, Schneider L, et al. Switching to darunavir/ritonavir 800/100 mg once-daily containing regimen maintains virological control in fully suppressed pre-treated patients infected with HIV-1. J Med Virol. janv 2013;85(1):8-15.

229. Nicolaï J, De Bruyn T, Thevelin L, Augustijns P, Annaert P. Transport-Metabolism Interplay of Atazanavir in Rat Hepatocytes. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. mars 2016;44(3):389-97.

230. Brown KC, Patterson KB, Jennings SH, Malone SA, Shaheen NJ, Asher Prince HM, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of darunavir plus ritonavir and etravirine in semen and rectal tissue of HIV-negative men. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 1 oct 2012;61(2):138-44.

231. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem. 1 juill 2003;75(13):3019-30.

232. Li X, Wang F, Xu B, Yu X, Yang Y, Zhang L, et al. Determination of the free and total concentrations of vancomycin by two-dimensional liquid chromatography and its application in elderly patients. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 15 oct 2014;969:181-9.

233. Li W, Lin H, Smith HT, Tse FLS. Developing a robust ultrafiltration-LC-MS/MS method for quantitative analysis of unbound vadimezan (ASA404) in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1 juill 2011;879(21):1927-33.

234. Du P, Han X, Li N, Wang H, Yang S, Song Y, et al. Development and validation of an ultrafiltration-UPLC-MS/MS method for rapid quantification of unbound docetaxel in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 15 sept 2014;967:28-35.

235. Pretorius CJ, Galligan JP, McWhinney BC, Briscoe SE, Ungerer JPJ. Free cortisol method comparison: ultrafiltation, equilibrium dialysis, tracer dilution, tandem mass spectrometry and calculated free cortisol. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 12 mai 2011;412(11-12):1043-7.

236. Stove V, Coene L, Carlier M, De Waele JJ, Fiers T, Verstraete AG. Measuring unbound versus total vancomycin concentrations in serum and plasma: methodological issues and relevance. Ther Drug Monit. avr 2015;37(2):180-7.

237. Larsen HS, Chin PK, Begg EJ, Jensen BP. Quantification of total and unbound concentrations of lorazepam, oxazepam and temazepam in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS. Bioanalysis. avr 2011;3(8):843-52.

238. Liebchen U, Kratzer A, Wicha SG, Kees F, Kloft C, Kees MG. Unbound fraction of ertapenem in intensive care unit patients. J Antimicrob Chemother. nov 2014;69(11):3108-11.

239. Kees MG, Wicha SG, Seefeld A, Kees F, Kloft C. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. J Clin Pharmacol. 1 mars 2014;54(3):318-23.

240. Les plans d'Expériences. Jacques GOUPY. La revue MODULAD, numéro 34, Juillet 2006 [Internet]. [cité 19 déc 2018]. Disponible sur: https://www.rocq.inria.fr/axis/modulad/archives/numero-34/Goupy-34/34_res_goupy.htm

241. Sime FB, Hahn U, Warner MS, Tiong IS, Roberts MS, Lipman J, et al. Using Population Pharmacokinetic Modeling and Monte Carlo Simulations To Determine whether Standard Doses of Piperacillin in Piperacillin-Tazobactam Regimens Are Adequate for the Management of Febrile Neutropenia. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(11).

242. Brown KC, Patterson KB, Malone SA, Shaheen NJ, Prince HMA, Dumond JB, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of maraviroc in saliva, semen, and rectal tissue of healthy HIV-negative men. J Infect Dis. 15 mai 2011;203(10):1484-90.

243. Yilmaz A, Ståhle L, Hagberg L, Svennerholm B, Fuchs D, Gisslén M. Cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA levels and lopinavir concentrations following lopinavir/ritonavir regimen. Scand J Infect Dis. 2004;36(11-12):823-8.

244. Fayet-Mello A, Buclin T, Guignard N, Cruchon S, Cavassini M, Grawe C, et al. Free and total plasma levels of lopinavir during pregnancy, at delivery and postpartum: implications for dosage adjustments in pregnant women. Antivir Ther. 2013;18(2):171-82.

245. Taburet A-M, Raguin G, Le Tiec C, Droz C, Barrail A, Vincent I, et al. Interactions between amprenavir and the lopinavir-ritonavir combination in heavily pretreated patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Pharmacol Ther. avr 2004;75(4):310-23.

246. Almond LM, Hoggard PG, Edirisinghe D, Khoo SH, Back DJ. Intracellular and plasma pharmacokinetics of efavirenz in HIV-infected individuals. J Antimicrob Chemother. oct 2005;56(4):738-44.

247. Almond LM, Boffito M, Hoggard PG, Bonora S, Raiteri R, Reynolds HE, et al. The relationship between nevirapine plasma concentrations and abnormal liver function tests. AIDS Res Hum Retroviruses. juill 2004;20(7):716-22.

248. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. J Clin Chem Clin Biochem Z Klin Chem Klin Biochem. févr 1986;24(2):127-39.

249. Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. Transfus Med Rev. janv 2002;16(1):46-60.

250. Grant MS. The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. J Emerg Nurs JEN Off Publ Emerg Dep Nurses Assoc. avr 2003;29(2):116-21.

251. Bousquet-Mélou A, Toutain PL. Les interactions impliquant les protéines plasmatiques ne sont plus ce qu'elles étaient. :7.

252. Elliot ER, Cerrone M, Else L, Amara A, Bisdomini E, Khoo S, et al. Pharmacokinetics of dolutegravir with and without darunavir/cobicistat in healthy volunteers. J Antimicrob Chemother. 1 janv 2019;74(1):149-56.

253. Spinner CD, Kümmerle T, Krznaric I, Degen O, Schwerdtfeger C, Zink A, et al. Pharmacokinetics of once-daily dolutegravir and ritonavir-boosted darunavir in HIV patients: the DUALIS study. J Antimicrob Chemother. 01 2017;72(9):2679-81.

254. Gervasoni C, Riva A, Cozzi V, Capetti A, Rizzardini G, Clementi E, et al. Effects of ritonavir and cobicistat on dolutegravir exposure: when the booster can make the difference. J Antimicrob Chemother. 01 2017;72(6):1842-4.

255. Cattaneo D, Minisci D, Cozzi V, Riva A, Meraviglia P, Clementi E, et al. Dolutegravir plasma concentrations according to companion antiretroviral drug: unwanted drug interaction or desirable boosting effect? Antivir Ther. 2017;22(4):353-6.

256. European Medicines Agency. Edurant: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 20 nov 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/edurant-epar-product-information_en.pdf

257. European Medicines Agency. Intelence: EPAR-Product Information, 2018. [Internet]. [cité 20 nov 2018]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/intelence-epar-product-information_en.pdf

258. Chen J, Malone S, Prince HMA, Patterson KB, Dumond JB. Model-Based Analysis of Unbound Lopinavir Pharmacokinetics in HIV-Infected Pregnant Women Supports Standard Dosing in the Third Trimester. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol. mars 2016;5(3):147-57.

259. Fauchet F, Treluyer J-M, Illamola SM, Pressiat C, Lui G, Valade E, et al. Population approach to analyze the pharmacokinetics of free and total lopinavir in HIV-infected pregnant women and consequences for dose adjustment. Antimicrob Agents Chemother. sept 2015;59(9):5727-35.

260. Laboratory of Applied Pharmacokinetics [Internet]. [cité 19 déc 2018]. Disponible sur: http://www.lapk.org/

261. 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. août 2012;34(4):467-76.

262. Jelliffe R. Challenges in Individualizing Drug Dosage for Intensive Care Unit Patients: Is Augmented Renal Clearance What We Really Want to Know? Some Suggested Management Approaches and Clinical Software Tools. Clin Pharmacokinet. 2016;55(8):897-905.

263. Hanley MJ, Abernethy DR, Greenblatt DJ. Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans. Clin Pharmacokinet. 2010;49(2):71-87.

264. Higai K, Azuma Y, Aoki Y, Matsumoto K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. mars 2003;329(1-2):117-25.

265. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet Lond Engl. 16 avr 2005;365(9468):1415-28.

266. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, American Heart Association, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation. 27 janv 2004;109(3):433-8.

267. Nakajou K, Watanabe H, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. Biochim Biophys Acta. 13 oct 2003;1623(2-3):88-97.

268. Kobuchi S, Fukushima K, Aoyama H, Ito Y, Sugioka N, Takada K. Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of atazanavir in rats. Drug Metab Lett. mars 2013;7(1):39-46.

269. Antinori A, Clarke A, Svedhem-Johansson V, Arribas JR, Arenas-Pinto A, Fehr J, et al. Week 48 efficacy and central nervous system analysis of darunavir/ritonavir monotherapy versus darunavir/ritonavir with two nucleoside analogues. AIDS Lond Engl. 10 sept 2015;29(14):1811-20.

270. Gisslén M, Fuchs D, Hagberg L, Svennerholm B, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid viral breakthrough in two HIV-infected subjects on darunavir/ritonavir monotherapy. Scand J Infect Dis. déc 2012;44(12):997-1000.

271. Di Yacovo MS, Moltó J, Ferrer E, Curran A, Else L, Gisslén M, et al. Antiviral activity and CSF concentrations of 600/100 mg of darunavir/ritonavir once daily in HIV-1 patients with plasma viral suppression. J Antimicrob Chemother. mai 2015;70(5):1513-6.

272. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. The Lancet. 12 févr 2011;377(9765):557-67.

273. Lahiri CD, Reed-Walker K, Sheth AN, Acosta EP, Vunnava A, Ofotokun I. Cerebrospinal fluid concentrations of tenofovir and emtricitabine in the setting of HIV-1 protease inhibitor-based regimens. J Clin Pharmacol. avr 2016;56(4):492-6.

274. Van den Hof M, Blokhuis C, Cohen S, Scherpbier HJ, Wit FWNM, Pistorius MCM, et al. CNS penetration of ART in HIV-infected children. J Antimicrob Chemother. 01 2018;73(2):484-9.

VI. Annexes

A. Partie bibliographique

Tableau des principaux essais cliniques évaluant l'efficacité du DTG.

Etude	Type d'étude et de population	Schéma thérapeutique	Evaluation
Patients naïfs de traitement			
Essais de phase IIa	Efficacité de différentes doses Patient naïf	placebo, 2,10 et 50 mg par jour en monothérapie chez 35 patients naïfs	CV à 10 jours **Décroissance plus importante** pour une dose de **50 mg** 50 mg : seul bras sans augmentation de la CV à l'arrêt (reprise réplication à J4)
SPRING Essai de phase IIb	DTG 3 doses contre EFV Suivi CV à S48	10, 25 et 50 mg DTG 600 mg EFV	**Efficacité plus rapide** avec le bras **DTG**, quelle que soit la dose
SPRING-2 Essai de phase III	Non infériorité DTG face RAL, suivi CV S48 et S96	50 mg DTG 400 mg x 2/j RAL	**Non infériorité** du DTG contre le RAL **Plus d'échecs dans le bras RAL**
SINGLE Essai de phase III	Comparaison deux stratégies à 1 comprimé DTG/ABC/3TC contre EFV/TDF/FTC Suivi CV, LTCD4, S48,96,144,	50/600/300 mg pour DTG/ABC/3TC et 600/245/200 mg pour EFV/TDF/FTC	**Supériorité efficacité** du bras DTG et dans la proportion patients avec CV<seuil 50 c/mL; **rapidité indétectabilité** ; augmentation LTCD4 ; arrêts pour effets indésirables
FLAMINGO Essai de phase III	Comparaison DTG au DRV Suivi CV S48, 96	DTG 50 mg DRV 800 mg	**Supériorité DTG efficacité virologique** : plus grande proportion CV<50 c/ml ; **meilleur profil lipidique** et moins d'arrêts dans bras DTG
Patients pré-traités			
SALING Essai de phase III	DTG contre RAL patients en échec avec mutations résistance Suivi CV à S48	DTG 50 mg RAL 400 mg x 2 / j	**Supériorité du DTG** : plus grande proportion CV<50 c/mL
VIKING Essai de phase III	DTG *qd* ou *bid* Patients en échec virus avec mutations sur intégrase + une autre classe	DTG 50 mg *qd* ou *bid* Ajouté à une stratégie inefficace	Résultats plus intéressants sur un plan virologique à J11 et S24 pour 50 mg x 2 / jour.
VIKING-3	DTG sur stratégie en échec	DTG 50 mg *bid* pendant 8 jours	CV<50 c/mL obtenue chez 63% des patients à S24

	Patients avec mutations sur intégrase + deux autres classes	puis optimisation stratégie thérapeutique	
VIKING-4	Même étude que VIKING-3 mais avec bras placebo	DTG 50 mg *bid* contre placebo	Confirmation résultats études VIKING-3
Pédiatrie			
IMPAACT Etude de phase I/II	- 12/18 ans - 6/12 ans - 2/6 ans	1 mg/kg, avec un maximum à 50 mg par jour	- 12/18 ans : infériorité comparé à SAILING à S48. Imputée à l'observance - 6/12 ans : non-infériorité comparé à SAILING à S48 - 2/6 ans : S4 résultats intéressant. Evaluation en cours
Stratégies d'allègement thérapeutique – Bithérapie			
SWORD 1 et 2	CV<50 c/mL pendant 12 mois, sans échec virologique dans l'histoire de la maladie	Bras bithérapie **DTG/RPV** (50/25mg) contre trithérapie	- **Non infériorité** sur un plan virologique à S48 - plus d'arrêts liés à des effets indésirables dans le bras bithérapie
LAMIDOL	CV<50 c/mL pendant 24 mois Bithérapie DTG/3TC Etude à un bras	**DTG** 50 mg **3TC** 300 mg	A S40, 97% patients conservaient une CV<50 c/mL
ACTG A5353	Simple bras DTG/3TC chez patients naïfs avec CV<10^5 c/mL	**DTG** 50 mg **3TC** 300 mg	A S24, résultats comparables aux essais de trithérapie (90% CV<50 c/mL)
Stratégies d'allègement thérapeutique – Monothérapie			
DOMONO	DTG monothérapie contre trithérapie	**DTG 50 mg**	A S24, **infériorité** par rapport à la trithérapie Stratégie non recommandée

Tableau 12 Annexe 1-1 : principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur le Dolutegravir. CV : charge virale ; DTG : Dolutegravir ; EFV : Efavirenz ; S24,48,96 : semaines 24,48,96 ; RAL : Raltegravir ; TDF : Tenofovir disoproxyl fumarate ; FTC : Emtricitabine ; LTCD4 : lymphocytes T CD4 ; ABC : Abacavir ; 3TC : Lamivudine ; DRV : Darunavir ; qd *: une fois par jour ;* bid *: deux fois par jour ; RPV : Rilpivirine.*

Tableau des principaux essais cliniques évaluant l'efficacité du DRV.

Etude	Type d'étude et de population	Schéma thérapeutique	Evaluation
Patients naïfs de traitement			
ARTEMIS Essais phase III	Patients naïfs en trithérapie, DRV/r contre LPV/r	DRV/r 800/100 mg LPV/r 800/200 mg (en deux prises)	S48, 96, 192 : **non infériorité** du DRV sur un objectif à CV<50 c/mL
Patients pré-traités			
TITAN Essais de phase III	Patients prétraités en trithérapie, DRV/r contre LPV/r	DRV/r 1200/200 mg LPV/r 800/200 mg (en deux prises)	S48, 96: **non infériorité** du DRV sur un objectif à CV<50 c/mL
ODIN Essais de phase III	Patients prétraités en trithérapie, DRV 800 contre 1200 mg	800/100 mg 1200/200 mg (en deux prises)	S48 : **non infériorité** du DRV/r 800 mg
POWER	Patients pré-traités, histoire avec échec IP. DRV ajouté à la stratégie en cours	DRV/r 1200/200 mg en deux prises	S48, 96 : bénéfice de l'ajout du DRV sur le bilan virologique et immunologique
Pédiatrie			
DIONE	Enfants 12-18 ans, >40 kg	DRV/r 800/100 mg	Environ 80% des enfants avaient une CV<50 c/mL à S48
DELPHI Essais phase II	Enfants 6-18 ans, >20kg	Posologie adaptée aux poids	Environ 50% des enfants avaient une CV<50 c/mL à S48
ARIEL Essais phase II	Enfants 3-6 ans, 10-20 kg	Posologie adaptée aux poids	Environ 80% des enfants avaient une CV<50 c/mL à S48
Stratégies d'allègement thérapeutique – Bithérapie			
DUAL	DRV/r + 3TC contre trithérapie avec DRV+3TC	DRV/ritonavir 800/100 mg 3TC 300 mg	**Non infériorité** en termes d'efficacité virologique
MOBIDIP	DRV/r + 3TC contre monothérapie DRV/r	DRV/ritonavir 800/100 mg 3TC 300 mg	**Plus grand nombre d'échecs virologiques** dans le bras **monothérapie** (24,8%) contre bras bithérapie (3%), même en présence d'une mutation M184
Stratégies d'allègement thérapeutique – Monothérapie			
MONOI	DRV/r contre trithérapie, viro-contrôlés, sans histoire d'échec virologique	DRV/r 800/100 mg (après S48) Trithérapie : DRV+ INTI au choix	S96 : **non infériorité** bras monothérapie. Pas de suivi des concentrations entre les échecs
MONET Essais phase III		DRV/r 800/100 mg Trithérapie : DRV+ INTI au choix	S48 : **non infériorité** mais absence de différence dans les concentrations totales entre les

			échecs virologiques S144 : **plus d'échecs virologiques** dans le bras **monothérapie**, non expliqués par la concentration totale
PROTEA Essais phase III		DRV/r 800/100 mg Trithérapie : DRV+ INTI au choix	S96 : **infériorité** bras monothérapie par rapport trithérapie

Tableau 13 Annexe 1-1 : principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur le Darunavir. CV : charge virale ; DRV/r : Darunavir/ritonavir ; S24, 48, 96 : semaines 24,48,96 ; 3TC : Lamivudine ; INTI : inhibiteur nucléos(t)dique de la transcriptase inverse.

Tableau des principaux essais cliniques évaluant l'efficacité de l'ATV.

Etude	Type d'étude et de population	Schéma thérapeutique	Evaluation
Patients naïfs de traitement			
Etude 138	Patients naïfs en trithérapie, ATV/r contre LPV/r	ATV/r 300/100 mg LPV/r 800/200 mg (en deux prises)	**Non infériorité** de l'ATV à S48, 96
Etude 136 (INDUMA)	ATV sans RTV pendant 48 semaines après une période de 26-30 semaines avec ATV/r	ATV/r 300/100 mg Suivi d'ATV 400 mg dans un bras, poursuite RTV dans l'autre bras	**Non infériorité** virologique à S48. Moins d'arrêts pour effets indésirables (ictère surtout) dans le bras sans RTV.
Patients pré-traités			
Etude 045	Patients pré-traités en trithérapie, ATV/r contre LPV/r	ATV/r 300/100 mg LPV/r 800/200 mg (en deux prises)	**Non infériorité** de l'ATV à S48, 96
Pédiatrie			
Etude AI424-020	Enfants 3 mois – 21 ans ; naïfs ou prétraités	ATV/r 300/100 mg A partir de 6 ans	Données d'efficacité proches des résultats dans les essais chez les adultes (81% CV<50 copies/mL naïfs). Indication possible uniquement pour un âge>6 ans
Stratégies d'allègement thérapeutique – Bithérapie			
AtLaS Etude pilote	ATV/r + 3TC contre trithérapie avec ATV+3TC	ATV/ritonavir 300/100 mg 3TC 300 mg	**Non infériorité efficacité** Améliorations bilans biologiques (bilirubine libre, lipides) mais augmentation du nombre de lithiases
SALT Essais randomisé	ATV/r + 3TC contre trithérapie avec ATV	ATV/ritonavir 300/100 mg 3TC 300 mg	**Non infériorité efficacité**
Stratégies d'allègement thérapeutique – Monothérapie			
MODAt	ATV/r contre trithérapie avec ATV	ATV/ritonavir 300/100 mg	Taux élevé d'échec virologique

Tableau 14Annexe 1-1: principaux résultats des essais cliniques évaluant l'efficacité immuno-virologique et l'innocuité des stratégies thérapeutiques reposant sur l'Atazanavir. CV : charge virale ; ATV/r : Atazanavir/ritonavir ; S24, 48, 96 : semaines 24, 48, 96 ; LPV : Lopinavir ; 3TC : Lamivudine ; INTI : inhibiteur nucléos(t)dique de la transcriptase inverse.

Tableau des principales interactions liées à l'utilisation des inhibiteurs de protéase.

Substances associées	Modification de l'ATV	Modification du DRV	Modification de la substance associée
Tenofovir	Diminué (pas adaptation)		Augmenté
Autres inhibiteurs nucléosidiques	Inchangé		Inchangé
Nevirapine	Diminué (obligation RTV)	Inchangé	Augmenté
Efavirenz	Diminué	Diminué	Augmenté
Etravirine	Diminué (obligation RTV)	Diminué (obligation RTV)	Augmenté
Rilpivirine	Inchangé		Augmenté
Raltegravir	Inchangé	Diminué	ATV : augmenté ; DRV : inchangé
Elvitegravir (avec cobicistat)	Augmenté		Augmenté si utilisation avec RTV (CI).
Dolutegravir	Inchangé		ATV : augmenté; DRV : diminué
Maraviroc	Inchangé		Augmenté
Daclatasvir	Inchangé		Augmenté
Sofosbuvir/Ledipasvir	Augmenté	Inchangé	LDV augmenté, SOF inchangé
Paritaprevir/Ombitasvir Dasunaprevir	Inchangé	Diminué	Ne pas combiner deux fois le RTV Augmenté
Grazoprevir/Elbasvir	Inchangé	Inchangé	Augmenté (CI)
Velpatasvir	Augmenté	Inchangé	ATV : augmenté ; DRV : diminué
Rifampicine	Diminué (CI relative)		Inchangé
Rifabutine	Inchangé	Augmenté	Augmenté : Rifabutine, Moxifloxacine avec Atazanavir
Voriconazole	Augmenté	Diminué ?	ATV : variable (fonction statut 2C19) DRV : Diminué
Posaconazole	Augmente	Augmenté	Inchangé
Itraconazole	Inchangé ?		Augmenté ?
Fluconazole	Inchangé		Inchangé
Echinocandines	Inchangé ?	Inchangé ?	Inchangé ? Caspofungine : augmenté ?
Macrolides	Inchangé Clari : Augmenté	Inchangé	Augmenté
Antiacides	Diminué (CI relative IPP)	Inchangé	Inchangé
Antidiabétiques	Inchangé		Diminiution Sulfonylurée (sauf Glibenclamide augmentation)
Hypolipémiants	Inchangé		Statines augmentées (CI :

		Simvastatine, Lovastatine) inchangées Fluvastatine, Pravastatine sauf avec DRV où augmenté)
Antihypertenseurs	Inchangé	Augmentés : inhibiteurs calciques (CI Lecardipine)
Anticoagulants	Inchangé	Augmentation –Xaban (CI) Diminution effet AVK
Antiagrégants	Inchangé	Augmentation Ticagrelor (CI) Diminution : Clopidogrel, Dipyridamole
Immunosuppresseurs	Inchangé	
Corticoïdes (même inhalés)	Inchangé	Augmentés (CI : Inhalés sauf Béclométasone, Triamcinolone)
Opioïdes	Inchangé	Augmentation
Antidépresseurs	Inchangé (sauf Millepertuis: diminution; (CI))	Augmentation
Neuroleptiques	Inchangé	Augmentation (CI: Quétiapine; Pimozide) Diminution Olanzapine, Asénapine
Anxiolytiques	Inchangé	Augmenté
Anticancéreux	Inchangé	Augmentés : ITK, dérivés alcaloïdes.
Contraceptifs oraux	Inchangé	Augmenté (sauf estrogènes et Noréthindrone diminués)
Stupéfiants	Inchangé	Augmentés

Tableau 15Annexe 1-1 : tableau des interactions impliquant les inhibiteurs de protéase. Les variations d'expositions sont celles de concentrations totales. CI : contre-indiqué ; ATV : atazanavir ; RTV : ritonavir ; DRV : darunavir ; ITK : inhibiteurs de tyrosine kinase : AVK : antivitamines K ; Caspo : caspofungine ; 2C19 : CYP450 2C19 ; LDV : ledipasvir ; SOF : sofosbuvir.

B. Articles et résumés

1. Première partie : étude de la forme libre par dialyse à l'équilibre, associée à une méthode de chromatographie liquide couplée à spectromètre de masse.

Annexe 2 – 1: Article, accepté dans *Clinica Chimica Acta,* de l'étude visant à déterminer la forme libre du DTG par une méthode combinant la dialyse à l'équilibre et de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse.

Clinica Chimica Acta - Original article

Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods.

David Metsu [a,b]; Thomas Lanot [a]; François Fraissinet [a]; Mélanie Picot [a]; Didier Concordet [c]; Marion Cabrol [a]; Frédérique Dubois-Galopin [d]; Etienne Chatelut [b,e]; Pierre Delobel [f,g,]; Peggy Gandia [*a,c]

a. Department of Pharmacokinetic and Toxicology, Toulouse University Hospital, France

b. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

c. INRA, Toxalim, INP-ENVT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

d. Laboratory of Hematology, Toulouse University Hospital, France

e. Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

f. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

g. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

Clinica Chimica Acta 479 (2018) 56–65

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods

David Metsu[a,b], Thomas Lanot[a], François Fraissinet[a], Mélanie Picot[a], Didier Concordet[c], Marion Cabrol[a], Frédérique Dubois-Galopin[d], Etienne Chatelut[b,e], Pierre Delobel[f,g], Peggy Gandia[a,c,*]

[a] Department of Pharmacokinetic and Toxicology, Toulouse University Hospital, France
[b] INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France
[c] INRA, Toxalim, INP-ENVT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France
[d] Laboratory of Hematology, Toulouse University Hospital, France
[e] Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France
[f] INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France
[g] Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Dolutegravir
Unbound fraction
Equilibrium dialysis

ABSTRACT

Assessment of the unbound pharmacologically active fraction (fu; as the ratio of unbound to total concentration) of dolutegravir could improve therapeutic drug monitoring (TDM) in patients that experience virological failure or toxicity, despite receiving adequate total concentrations. This study evaluated (i) dolutegravir's fu through equilibrium dialysis (ED), (ii) the pre-analytical parameters that influence fu, and (iii) fu's inter-individual variability in HIV patients. Validation of the LC-MS/MS method followed FDA guidelines. The results, based on coefficients of variation (results from nominal concentrations < 15%), allowed accurate measurement of unbound and total dolutegravir concentrations. Equilibrium during ED was obtained in 4 h. Sparse non-specific binding (9%) was observed, allowing results interpretation without interference. Steps before analysis (e.g., conservation at + 4 °C, freeze/thaw cycles) did not influence fu, allowing easy integration of fu analysis within laboratory routines. Anticoagulants from samples (citrated versus heparinized; $p < 0.001$) and hemolysis ($p = 0.007$) influenced fu and could lead to misinterpretation. Developed was then performed to the HIV-patients' plasma ($n = 54$). Results, expressed as median InterQuartile Range [25%;75%] were 0.45% IQR [0.38; 0.55] for fu, 9.26 µg/L IQR [4.62; 15.14] for unbound, and 2035 µg/L IQR [878.5; 2640] for total concentration. The high inter-individual variability observed in the unbound form from HIV patients was a first step towards integrating dolutegravir TDM.

1. Introduction

Dolutegravir (DTG) is an HIV integrase strand-transfer inhibitor that is usually associated with abacavir and lamivudine in combined antiretroviral therapy. Clinical trials show that the efficacy of DTG depends on plasmatic concentration [1,2]. Although efficacy thresholds have been proposed [3,4], some virological failures have been observed despite total concentrations considered to be effective and similar to patients without virological failure [3–5]. Moreover, many "real-life" studies indicate there can often be neuro-psychic effects [6,7] although, to date, without an association with higher total concentration (area under the curve, maximal or trough concentration) in the overall population that receive DTG.

The unbound concentration is considered to be the pharmacologically active form that can diffuse into tissues and across membrane cells to exert its pharmacological activity (therapeutic or toxic) [8]. To date, this property has been used to explore DTG diffusion and concentration in tissues, especially those identified as anatomical HIV reservoirs for replication, such as the central nervous system or testicular tissue [9,10]. Dolutegravir is highly bound (> 99%) to plasma proteins,

Abbreviations: TDM, therapeutic drug monitoring; ED, equilibrium dialysis; HIV, human virus of immunodeficience; FDA, Food and Drug Administration; LC-MS/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; IQR, InterQuartile Range; DTG, dolutegravir; AAG, alpha-1-acid glycoprotein; HPLC, high performance liquid chromatography; QC, quality-control; CV, coefficient of variation; SD, standard of deviation; ANOVA, analysis of variance

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, Centre Hospitalo-Universitaire Purpan, 330 avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse, France.
E-mail address: gandia.p@chu-toulouse.fr (P. Gandia).

https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.12.034
Received 10 October 2017; Received in revised form 20 December 2017; Accepted 21 December 2017
Available online 22 December 2017
0009-8981/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

Table 1
Multiple-reaction mode (MRM) transitions used to detect analytes, DP, EP, CEP, CE, and CXP for API 4500, and retention times for the biphenyl HPLC column. DP: de-clustering potential, EP: entrance potential, CEP: cell-entrance potential, CE: collision energy, CXP: and cell-exit potential.

	MRM transition (m/z) Precursor ion product ion	Retention time (min)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Dolutegravir	420.2–277.0	0.75	61	10	10	37	10
Dolutegravir-d4	424.2–279.0	0.73					

especially albumin, and to a lesser extent to the alpha-1-acid glycoprotein (AAG) [11]. Then, only a small amount of unbound DTG is available to exert its pharmacological activity. Thus, it can be hypothesized that any variation of the unbound form, which may not be perceived at total concentration, could result in considerable variability in pharmacodynamic effect. Therefore, differences in efficacy (virological failure) or toxicity (neuro-psychic side effects) between patients at similar total concentrations could be explained by the inter-individual variability within unbound concentrations.

Only sparse data are available on the unbound form of DTG. Two studies [9,12] have explored the unbound form of DTG using a quick and convenient method, namely ultrafiltration. Nevertheless, ultrafiltration is known to suffer from many analytical interference factors, leading to wide variability in the results [13,14]. On the other hand, equilibrium dialysis (ED) is considered the gold-standard technique to evaluate the unbound form of DTG, particularly because of the low number of interference factors related to this technique [13,14]. However, several pre-analytical parameters, such as sample preservation and freeze–thaw cycles, may influence the results independently of the device used to evaluate unbound forms [13,14]. Thus, the aim of our study was to evaluate the unbound form of DTG, especially under pre-analytical conditions, using a method with the lowest analytical interference and evaluating protein binding at equilibrium. Consequently, our study was based on developing an analytical assay that measured unbound (through equilibrium dialysis and measured by LC-MS/MS) and total plasma concentrations (measured by LC-MS/MS). The validated method was then applied to samples from HIV patients to explore the inter-individual variability of DTG in its unbound form.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Acetic acid and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Dolutegravir (DTG) (LGC Standards) was measured with a deuterated internal standard: dolutegravir-d4 (LGC Standards, Molsheim, France). LC-MS-grade acetonitrile and methanol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Water-gradient of HPLC grade was obtained from an Elga Option 4 water purifier (Scharlau, Barcelona, Spain). Sörensen buffer solution was prepared with sodium phosphate dibasic purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and potassium phosphate monobasic was purchased from VWR international (Fontenay sous Bois, France), sodium hydroxide 32% from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and ultrapure water form Merck Millipore (Fontenay-sous-Bois, France) to adjust the pH to 7.4. Drug-free plasma from healthy donors was supplied by the French Blood Bank ("Etablissement Français du Sang", EFS, Toulouse, France).

2.2. Instruments and conditions

The LC-MS/MS system in the laboratory consisted of a Shimadzu LC system with a Shimadzu LC-20AD$_{XR}$ binary pump, a Shimadzu SIL-20A$_{XR}$ auto-sampler, a Shimadzu CBM-20A controller, and a Shimadzu CTO-20AC column oven, coupled with an ABSciex API-4500 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA) triple quadripole tandem mass-spectrometer.

2.3. Chromatographic conditions

The column was a Kinetex Biphenyl (50 × 2.1 mm, 5 μm) from Phenomenex™ (Aschaffenburg, Germany), maintained at 40 °C. The two mobile phases were 2 mM ammonium acetate and 0.2% acetic acid in water (mobile phase A), and 2 mM ammonium acetate and 0.2% acetic acid in methanol (mobile phase B). Chromatographic separation was achieved using an isocratic program at a flow rate of 800 μL/min with 30% of mobile phase A and 70% of mobile phase B. The total run time was 2 min. The needle was washed twice with 3 mL of acetonitrile/isopropanol (50:50, v/v) between injections.

2.4. Tandem mass-spectrometry analysis

The mass spectrometer was set to electrospray ionization in positive-ion mode for DTG and DTG-d4. The TurboIonspray interface settings and collision gas pressure were optimized (ion spray voltage: 5500 V, temperature: 500 °C, collision gas: 8.0 psi, curtain gas: 15.0 psi). Nitrogen was used both as a nebulizing (40 psi) and a drying gas (40 psi). Tandem mass-spectrometry was performed in multiple-reaction mode (MRM) mode with nitrogen as the collision gas. All MRM transitions are listed in Table 1, including de-clustering potential (DP), entrance potential (EP), cell-entrance potential (CEP), collision energy (CE), and cell-exit potential (CXP). Analyst 1.6.2 and Cliquid 3.0 software were used to control the equipment, collect data, and for the analyses (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA).

2.5. Preparation of standard solutions, internal standards, and quality controls

The following stock solutions were prepared at a concentration of 1000 mg/L: DTG, DTG-d4. All primary stock solutions were prepared in methanol and stored at −20 °C. Working solutions were diluted in methanol for total DTG and water for unbound DTG.

A six-point calibration curve was prepared for each analyte by diluting known volumes of the working solution in plasma for total DTG and in Sörensen buffer for unbound DTG. Calibrators concentrations were 0, 50, 125, 500, 2000, 4000, and 10,000 ng/mL for DTG, and 0.5, 1, 5, 10, 50, and 100 ng/mL for unbound DTG. Range calibration curves were established according to available data in the literature for both total [5] and unbound concentrations [9,10] in HIV patients. Through the proposed ranges, we aimed to avoid any dilution or measurement under the lowest limit of quantification (LLOQ) to fully interpret the unbound-form result.

Quality-control (QC) samples were prepared in the same way, using an independently prepared stock solution at a final concentration of 150 ng/mL (low QC [LQC]), 1500 ng/mL (medium QC [MQC]), and 7500 ng/mL (high QC [HQC]) for total DTG, and 1.5 ng/mL (LQC), 15 ng/mL (MQC), and 75 ng/mL (HQC) for unbound DTG. For both unbound and total concentrations, low level QC corresponded to three times the value of the lower limit of quantification. Medium QC level lay in the middle range of calibration, whereas high QC level corresponded to the third quarter of the higher limit of quantification, in accordance to FDA recommendations [15].

Calibration curves and quality controls were prepared just before use during assay validation.

2.6. Sample processing

For total DTG determination in plasma, in Eppendorf tubes, 50 µL of plasma were extracted with 200 µL of precipitation reagent containing 100 ng/mL of DTG-d4 in methanol. Samples were immediately vigorously shaken for 30 s and centrifuged at 10,000g for 10 min. Fifty microliters of the supernatant were diluted with 200 µL of distilled water and then 150 µL were transferred into a 200-µL sample vial (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Five microliters were injected in the LC-MS/MS system.

For unbound DTG determination, in Eppendorf tubes, 50 µL of dialysate was extracted with 200 µL of precipitant reagent containing 1 ng/mL of DTG-d4 in a solution of 40% of mobile phase A and 60% of mobile phase B. Fifty microliters were injected in the LC-MS/MS system.

2.7. Method validation

In our study, method validation for unbound and total DTG concentrations were performed according to the recommendations of both the International Organization for Standardization (ISO) 15189 standard for medical laboratories and the Food and Drug Administration (FDA) [15].

The validation method was divided into three successive parts

(i) The first part describes the different stages of accuracy and precision, selectivity, matrix effects and recovery, carry-over, dilution, and isotopic contribution for both the unbound and total concentrations.
(ii) The second part describes the total concentration stability at different storage conditions and the impact of plasma anticoagulants on the results.
(iii) The third part describes the unbound form and the procedure used for equilibrium dialysis, stability of the unbound DTG in Sörensen's buffer and of the DTG-protein binding, and finally the effects of plasma anticoagulant and hemolysis on the unbound fraction.

2.7.1. Accuracy and precision

Accuracy and precision were evaluated on intra- and inter-days using calibration at each level. For intra-day validation, five samples from each level quality control were analyzed on the same day. For inter-day validation, two samples from each quality control (three levels: LQC, MQC, HQC) were determined on 5 separate days. Accuracy was defined as the percentage deviation from the nominal level, and precision as the coefficient of variation (calculated by the following equation: $CV = (SD / m) * 100$; where, CV = coefficient of variation, SD = standard of deviation, m = mean), which should not exceed 15% [15].

For the calibration curve, there were three acceptance criteria: (i) a correlation coefficient between the measurements and the theoretical concentration > 0.99, (ii) the deviation from the calculated concentration with the range within ± 15% of the theoretical concentration, except for the LLOQ, where a deviation of ± 20% was accepted, and (iii) a follow-up of the slope reproducibility of the method validations: its relative standard deviation should not exceed ± 15%.

Our laboratory included total concentration DTG analysis according to external and international quality control (Asqualab®).

2.7.2. Selectivity

Selectivity was assessed using blank plasma samples from six different sources of plasma for total DTG and with dialysate or Sörensen's buffer for unbound DTG. An absence of interfering components was accepted when the response (area) was < 20% of the lower limit of quantification for the analyte.

2.7.3. Matrix effects and recovery

Matrix effects and extraction recovery were evaluated following Matuszewski et al.'s [16] methodology.

To evaluate the matrix effect and extraction recovery for total DTG, blank plasma samples from different donors were extracted, as described above. Extracts were spiked with the working solution of total DTG, with spiking levels corresponding to QC levels after extraction (assuming an extraction recovery of 100%). The matrix effect for each level was assessed by calculating the ratio of peak area between these spiked blank extracts and the corresponding solutions of DTG and DTG-d4, in mobile phase. Extraction recovery was assessed by calculating the ratio of area peak between the extracted QCs (LQC, MQC, and HQC) and the corresponding spiked blank extracts. Each sample was made in triplicate and the main criteria for validating extraction recovery was precision: calculated CV should not exceed 20%.

To evaluate the matrix effect for unbound DTG, Sörensen's buffer was diluted then directly spiked with the working solution of unbound DTG with spiking levels corresponding to QC levels after dilution. The matrix effect for each level was assessed by calculating the ratio of peak area between these spiked blanks and the corresponding solutions of DTG and DTG-d4, in mobile phase.

2.7.4. Carry-over effects

Carry-over effects were assessed by testing three blanks successively following the highest calibration standard for both total and unbound DTG. Carry-over in the blank sample should not exceed 20% of the LLQ concentration [17].

2.7.5. Dilution integrity

Accuracy of diluted samples was investigated to ensure that the samples could be diluted with a blank matrix without affecting the final concentration. Spiked human-plasma samples were prepared at concentrations of 15,000 ng/mL for total DTG and 200 ng/mL for unbound DTG, respectively. These solutions were further diluted ten and five-fold with blank plasma in six replicates, and then analyzed. The six replicates should demonstrate precisions of ≤ 15% and accuracies between ± 15% [17].

2.7.6. Isotopic contribution

Hypothetical isotopic contributions between analyte and its deuterated internal standard were assessed to ensure spiked samples with DTG-d4 do not impact on DTG concentrations and vice versa. Contribution of DTG to DTG-d4 response was evaluated by comparing the DTG-d4 signals of a blank spiked with DTG at the upper limit of quantification versus a blank spiked with DTG-d4 at working concentrations. Contribution of DTG-d4 on DTG response was evaluated by comparing the DTG signals of a blank spiked with DTG-d4 at a working concentration versus a blank spiked with DTG at the LLOQ. In both cases, the former signal should not exceed 20% of the latter [17].

2.7.7. Stability of DTG for total concentration

The stability of DTG in plasma under different storage and processing conditions was investigated. The stability of analytes in the injection solvent was estimated by injecting replicate preparations of processed samples at up to 24 h (in an auto-sampler at room temperature) after the initial injection, in order to simulate an over-night instrumental failure. The peak-areas of the analytes and internal standards obtained from the initial cycle were used as a reference to determine relative stability of the analytes at subsequent points.

Stability of analytes in plasma after 3 and 6 h, at room temperature (bench top), was determined at two concentrations (LQC and HQC) in three replicates. Stability at + 4 °C was assessed in plasma for the total concentration stored at + 4 °C for 3 days (at 24, 48, and 72 h). Stability of analytes in the plasma following three repeated freeze–thaw cycles (stored at − 20 °C) were assessed using QC samples spiked with analytes in the same conditions as described above. Stability of binding

protein was also studied at 4 °C and after one or two repeat unbound freeze–thaw cycles. Stability at − 20 °C was investigated for long-term stability. Duplicates of each QC level were thawed after 10 months of freezing and compared to the target.

The mean target concentration at each level was aimed to be within ± 15% of the nominal concentration.

2.7.8. Anticoagulant effect

Citrated plasma samples (BD, Oxford, UK) were used to validate total concentrations method whereas lithium heparin (BD, Oxford, UK) plasma samples were used in the HIV-patient study. Citrated and heparinized plasma samples were obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang). Three citrated and heparinized plasma samples were spiked at 1 mg/L of DTG total concentration, whereas three other plasma from each anticoagulant were spiked at 4 mg/L in order to obtain concentrations close to those observed at trough and maximum concentrations in HIV patients [5].

Spiked samples were then extracted as described for the DTG total-concentration samples. The chromatographic area of DTG, DTG-d4, and concentrations of DTG were compared between the anticoagulants to assess any anticoagulant effects.

2.7.9. Determination of unbound DTG in plasma

2.7.9.1. Dolutegravir stability in Sörensen buffer. The stability of DTG in Sörensen's buffer under different storage and processing conditions was investigated.

The stability of analytes in the injection solvent was estimated by injecting replicate preparations of processed samples for up to 24 h (in an auto-sampler at room temperature) after the initial injection in order to simulate an over-night instrumental failure. The peak-areas of the analytes and internal standards obtained from the initial cycle were used as references to determine relative stability of the analytes at subsequent points.

Stability of analytes in Sörensen's buffer after 3 and 6 h, at room temperature (bench top), was determined at two concentrations (LQC and HQC) in three replicates. Stability at + 4 °C was assessed in plasma for unbound concentrations stored at + 4 °C (at 24 and 168 h). Stability of analytes in the buffer following three repeated freeze–thaw cycles (stored at − 20 °C) were assessed using QC samples spiked with analytes under the same conditions as described above. The mean target concentration at each level was aimed to be within ± 15% of the nominal concentration [15].

2.7.9.2. Plasma samples. In order to evaluate the time needed to reach binding equilibrium during dialysis-binding stability and the influence of the anticoagulant and hemolysis on DTG-protein binding, plasma from healthy donors were spiked with DTG. Dolutegravir was added to the plasma in solution that included < 5% methanol, to avoid altering protein binding.

2.7.9.3. Equilibrium dialysis. Equilibrium dialysis (ED) was performed in cells made from Teflon using a Dianorm apparatus (Diachema AG, Zurich, Switzerland) in 1-mL capacity cells, and equilibrium was reached through Visking Dialysis Tubing membranes (molecular mass cut-off: 12,000–14,000 Da, Medicell Membranes Ltd., London, UK). A 1-mL aliquot of plasma samples was dialyzed against 1-mL Sörensen's phosphate buffer solution at pH 7.4 in a temperature-controlled heater at a nominal temperature of 37 °C in a thermostatic enclosure that was rotated at 12 rpm for 4 h. After dialysis was complete, the resulting plasma and buffer dialysates were promptly recovered from the Teflon cells and analyzed by LC-MS/MS. Fifty microliters of dialysate were diluted with 450 µL of mobile phase (40% of A and 60% of B) containing DTG-d4 at 1 ng/mL. Fifty microliters was injected into the LC-MS/MS system. After dialysis, the remaining plasma was extracted as described above.

2.7.9.4. Calculation of the unbound fraction. The unbound fraction was calculated using the follow equation: fu = Cu / Ct, Cu as buffer DTG concentration, which was considered as unbound, Ct as total concentration in plasma after ED, fu corresponded to the unbound fraction.

2.7.9.5. Time to equilibrium. The time necessary to achieve equilibrium of DTG-binding to plasma proteins was determined with five samples during 3, 4, and 5 h, at 12 rpm and in a thermostatically controlled oven at 37 °C. The samples were then spiked to obtain total DTG concentrations of 1 mg/L, corresponding to the usual trough concentration [5].

2.7.9.6. Non-specific binding. To evaluate the non-specific binding study, plasma samples were spiked to achieve 1 mg/L total concentration of DTG. Non-specific binding was calculated with five samples using the following formula: [(initial quantity) / (plasma quantity + dialysate quantity)]. The target of non-specific binding was defined as being < 10% [18].

2.7.9.7. Binding stability. Protein-binding stability was studied at + 4 °C for 24, 48, 96, and 120 h, and after two and three freeze–thaw cycles in spiked plasma at 1 mg/L, stored at − 20 °C.

2.7.9.8. Influence of hemolysis. In order to explore the effect of hemolysis on the unbound fraction as a pre-analytical interference, whole blood from healthy donor without DTG was diluted by 50% in distilled water to generate hemolysis through hypo-osmolar bursting. The target value of hemoglobin was 0.5 g/dL [19] and was checked by spectrophotometry (XN3000, Sysmex®). The sample was then diluted to obtain hemoglobin values of 0.25 and 0.1 mg/L. The samples were then spiked to obtain total DTG concentrations of 1 and 4 mg/L, corresponding to the usual trough and maximum concentration, respectively, observed in HIV patients [5]. Donor plasma samples, spiked at the same trough and maximal concentrations, without hemolysis, were also prepared in parallel to compare the results obtained with a control without hemolysis. Total and unbound concentrations, using the ED procedure, were measured and fu was calculated.

2.7.9.9. Influence of anticoagulant. Citrated plasma samples (BD, Oxford, UK) were used to validate our method and the binding studies, whereas plasma samples with lithium heparin (BD, Oxford, UK) were used in the HIV-patients' study. The influence of two anticoagulants on the DTG unbound fraction was also investigated. Six paired samples of citrated and heparinized plasma, each pair from the same patient, were spiked to obtain total DTG concentrations of 1 and 4 mg/L, corresponding to the usual trough and maximum concentrations, respectively, in HIV patients [5]. Three pairs were spiked at 1 mg/L and three others pairs were spiked at 4 mg/L of total DTG. Unlike for total DTG concentration, each pair of citrated and heparinized plasma sample was from the same patient to avoid any inter-individual variability of fu from the plasma donors. Total and unbound concentrations, using the ED procedure, were measured and fu calculated.

2.8. Samples from patient

Total and unbound DTG were quantified in plasma samples from 54 patients. Samples were stored at − 20 °C before analysis, after first centrifuging at 2000 g, at + 20 °C for 15 min, immediately after arrival at the laboratory. The plasma was separated from the sample and stored at − 20 °C until analysis. On the day of analysis, the thawed plasma samples were first heated at 37 °C within a Bain Marie heater prior to processing (total concentration measurement or equilibrium dialysis).

Dolutegravir therapeutic drug monitoring and data collection were

part of routine patient care, without any additional procedures. Therefore, no institutional review board or ethics-committee approval was required, in accordance with the French regulations on biomedical research [20,21].

2.9. Statistical analyses

Analysis of variance (ANOVA) was performed with R software (3.3.2) [22]. The significance level was set at $p < 0.05$. If the ANOVA was statistically significant, Dunnett's test was performed to determinate any potential interactions. Results of paired Student's *t*-tests are shown as their means and standard deviations. The alpha value was set at 5%. Results from the HIV-patients' samples are expressed as their medians and InterQuartile Ranges IQR [25%; 75%]. As recommended by FDA guidelines for analytical procedures, stability results were analyzed using the coefficient of variation (calculated as: CV = (SD / m) * 100; where, CV = coefficient of variation, SD = standard of deviation, m = mean).

3. Results

3.1. Chromatography and extraction

Multiple-reaction mode (MRM) transitions and mass-spectrometer parameters were optimized using direct infusion of DTG and DTG-d4 in a standard solution. Positive-ionization mode was used. The MRM transition for DTG (*m/z* 420.2–277.0) was selected due to its intensity and lack of chromatographic interference during selectivity tests. The selected MRM transition for DTG-d4 corresponded to the same fragmentation mechanism as the DTG transition to ensure optimal standardization. Optimal separation of the analytes was achieved using ammonium buffer in water and methanol as the mobile phase. These chromatographic conditions have been also used for other antiretroviral drugs. Separation and detection of DTG and an internal standard were accomplished within 2 min. The retention time of the analyte was 0.76 min for DTG and 0.74 min for DTG-d4, respectively (Fig. 1).

3.2. Method validation

This section on Method Validation follows the same pattern used in the Materials and Methods section, i.e.: the first part is on unbound and total concentrations, the second part addresses total concentrations, and the third part focuses on exploration of unbound DTG and DTG-binding.

3.2.1. Calibration curves

The calibration curves were satisfactorily fitted by linear regression (1/x weighting) for total and unbound DTG over the concentration ranges of 50–10,000 ng/mL for total concentration DTG, and 0.5–100 ng/mL for the unbound DTG. For both total and unbound DTG, the methods showed large linearities (50–10,000 ng/mL and 0.5–100 ng/mL, for total and unbound concentrations, respectively). The quality of the calibration curves was evaluated by the correlation coefficient, the deviation of calculated concentrations from nominal values, and the reproducibility of the slope and intercept. The observed mean calculated concentrations, with their precisions and accuracies, are listed in Table 2.

During the experiment, the area of the internal standard (IS) did not decrease with the increase in the concentration of the calibrated curve.

3.2.2. Accuracy and precision

The data for intra- and inter-day precision and accuracy of all the analytes from the quality control samples are shown in Table 3 for total and unbound DTG. Intra- and inter-day precisions were < 3.05% and 4.72%, whereas intra- and inter-day accuracies ranged from 5.33–10.51% and 1.20–10.60%, respectively.

We also used an external quality-control system to further evaluate accuracy and to follow the performances of the method through time. Accuracy of the samples from the year 2016 was 3.85%.

3.2.3. Limit to quantitation

The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest standard concentration of the calibration curve whose precision and accuracy were evaluated during intra-day and inter-day assays. Moreover, the LLOQ signal was ten times greater than the signal from the blank, indicating adequate sensibility.

In accordance with laboratory practice, the limit of detection was not studied and was, by default, considered equal to the LLOQ. This was considered satisfactory as concentrations below the lowest point of the calibration curve were regarded as clinically irrelevant.

3.2.4. Selectivity

As shown in Fig. 1, no interference from endogenous substances was observed at any of the retention times for DTG (total or unbound) in the tested blanks.

3.2.5. Matrix effects and recovery

For total DTG, the mean extraction recoveries from all the analytes with sample precipitation were 98 ± 3% for total DTG, 95 ± 3% for

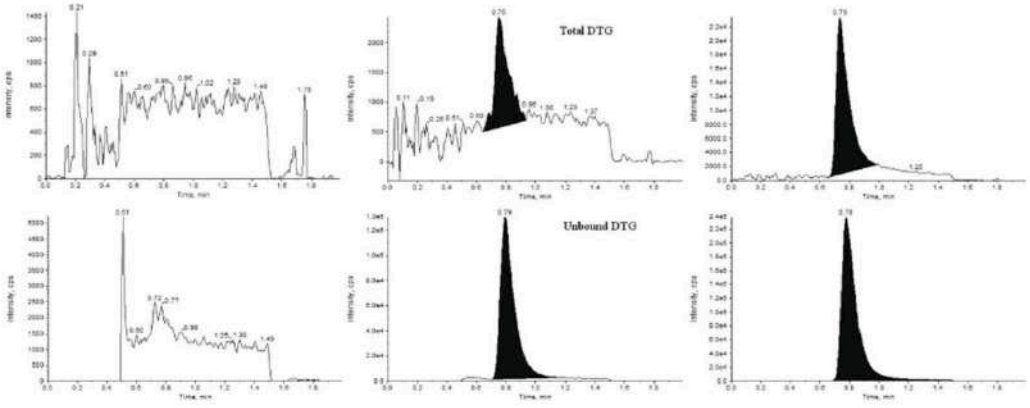


Fig. 1. Representative chromatograms of total and unbound dolutegravir (DTG) in blank plasma (left/a), extracted lower limit of quantification (center/b), internal standard (right/c).

Table 2
Summary of calibration-curve standards. CV: coefficient of variation; r^2: coefficient of determination.

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Mean calculated concentration (ng/mL)	% CV	% accuracy	Slope	Intercept	r
Total dolutegravir	50	41	14.61	−18.36	1.7240 ± 0.08	0.0733 ± 0.02	0.9988
	125	133	2.76	6.4			
	500	541	2.47	8.16			
	2000	2068	7.74	3.4			
	4000	4064	4.67	1.6			
	10,000	9834	3.42	−1.66			
Unbound dolutegravir	0.5	0.56	7.32	11.68	0.0715 ± 0.05	0.1140 ± 0.01	0.9981
	1	1.07	5.12	7.32			
	5	4.44	3.87	−11.28			
	10	9.11	4.73	−8.86			
	50	49.98	7.96	−0.04			
	100	101.44	4.25	1.44			

Table 3
Precision and accuracy of method used to measure total and unbound dolutegravir.

	Nominal concentration (ng/mL)	Intra-day		Inter-day	
		Precision[a] (% CV)	Accuracy[b] (% bias)	Precision[a] (% CV)	Accuracy[b] (% bias)
Total DTG	150	1.73	0.40	5.77	−2.00
	1500	1.52	13.87	6.93	10.60
	7500	1.28	12.88	6.23	8.23
Unbound DTG	1.5	3.05	6.00	7.09	10.20
	15	4.72	5.33	4.38	1.20
	75	3.86	10.51	6.37	10.60

[a] Expressed as the coefficient of variance for the peak area ratios of the analyte/internal standard.
[b] Calculated as [(mean calculated concentration − nominal concentration) / nominal concentration] × 100.

DTG-d4, and the matrix effects were 96 ± 5% for DTG and 101 ± 5% for DTG-d4. No critical matrix effects were observed; overall CVs were not > 15%.

For unbound-DTG, the mean extraction recoveries from all the analytes with sample precipitation were 108 ± 8% for DTG, 91 ± 4% for DTG-d4, and the matrix effects were 58 ± 8% for DTG and 49 ± 4% for DTG-d4; overall CVs were not > 15%.

3.2.6. Carry-over

No carry-over effect was observed because no peak was observed on the blank plasma after analyzing the highest concentration of the calibration standards.

3.2.7. Dilution integrity

For total and unbound DTG, dilution integrity was performed to extend the upper concentration limit by testing two dilutions (at 1/5 and 1/10): this had acceptable precision and accuracy (< 10%; Table 4).

3.2.8. Isotopic contribution

Examination of the single, blank, plasma samples containing DTG-d4, but no DTG, revealed no significant interferences from DTG (< 20% of the LLOQ peak area). Conversely, analysis of the highest standard in the calibration curve without DTG-d4 showed that DTG did not significantly interfere with the DTG-d4 signal.

Table 4
Dilution accuracy. DTG: dolutegravir; SD: standard deviation.

	Dilution 1/5		Dilution 1/10	
	Total DTG	Unbound DTG	Total DTG	Unbound DTG
Theoretical concentration (ng/mL)	20,000	200	20,000	200
Mean	19,367	196.10	19,383	188.20
SD	52.7	3.01	54.6	4.66
Precision (CV)	2.72	1.53	2.81	2.48
Accuracy %	96.83	98.05	96.92	94.1

3.2.9. Stability of the total concentration

Stability of total DTG was checked in plasma samples (LQC and HQC) stored at an ambient temperature, at 4 °C, after three freeze–thaw cycles, and after long-term conservation at − 20 °C (10 months). The results are shown in Table 5. Stability accuracies (CV%) after 10 months at − 20 °C for the total concentrations were 2.50% (5.79%) and 7.55% (6.98%).

3.2.10. Anticoagulant effect for the total concentration

No difference between heparinized or citrated plasma was observed for DTG and DTG-d4 areas ($p = 0.72$ and $p = 0.22$ Student's t-paired test for DTG, and DTG-d4 area, respectively), or DTG concentration calculated by the DTG and DTG-d4 area ratios ($p = 0.23$, paired Student's t-test).

3.2.11. Determination of the unbound fraction

3.2.11.1. Dolutegravir's stability in Sörensen buffer. Dolutegravir's stability in Sörensen buffer at + 4 °C for 168 h showed accuracies of − 4.66% and − 2.18%, with precisions of + 3.22% and + 1.73%, for LQC and HQC, respectively.

Stability of total and unbound DTG was checked for in the plasma samples (LGC and HQC) stored at ambient temperature, at 4 °C, and after three freeze–thaw cycles. The results are shown in Table 5. For LQC and HQC, accuracy for 3 and 6 h at ambient temperature was within ± 15%.

3.2.11.2. Time needed for equilibrium. We determined the time needed to achieve equilibrium in five samples (Table S1). There were significant differences between all the groups ($p = 0.0036$, ANOVA), but not between the equilibrium delay of 4 h and 5 h ($p = 0.98$, Dunnett's test). Thus, a period of 4 h of equilibrium was chosen, as

Table 5
Unbound and total dolutegravir stability over time. QC: quality control; CV: coefficient of variation.

Analyte	Experiment	Low QC (150 ng/mL)		High QC (7500 ng/mL)	
		% accuracy	% CV	% accuracy	% CV
Total dolutegravir	Matrix stability				
	Bench-top, 3 h	− 8.89	4.23	− 4.92	1.18
	Bench-top, 6 h	− 8.00	4.37	− 16.08	4.84
	Freeze–thaw (n = 3 cycles)	− 6.13	6.46	5.52	5.38
	72 h, + 4 °C	3.03	3.03	1.39	3.14
	Extracted stability				
	Autosampler, 4 °C	3.00	2.77	11.24	1.28

Analyte	Experiment	Low QC (1.50 pg/mL)		High QC (75 pg/mL)	
		% accuracy	% CV	% accuracy	% CV
Unbound dolutegravir	Matrix stability				
	Bench-top, 3 h	0.00	0.61	− 12.62	2.51
	Bench-top, 6 h	− 0.67	1.15	− 14.09	2.74
	Freeze–thaw (n = 3 cycles)	6.89	1.30	− 13.47	1.26
	168 h, + 4 °C	14.22	2.08	10.18	1.03
	Extracted stability				
	Autosampler, 4 °C	0.00	1.63	10.80	2.69

occurs for other antiretrovirals drugs co-administered with DTG.

3.2.11.3. Non-specific binding. Non-specific binding was evaluated in five samples spiked with DTG at 1 mg/L. Mean non-specific binding was 9%. The ratio was < 10%. Non-specific binding in a dialysis system (dialysis membrane, plastic recipients) was negligible.

3.2.11.4. Binding stability. Binding stability was studied at 4 °C for 24, 48, 96, and 120 h, and after two and three freeze–thaw cycles. The unbound fractions did not differ between the groups (p = 0.648, ANOVA; Table S2).

Binding of DTG remained stable over time and after freeze–thaw cycles.

3.2.11.5. Influence of anticoagulant. The unbound fraction was higher on samples that contained citrate anticoagulant compared to heparinized samples. The difference was statistically significant at higher concentrations (mean ± SD fu were 1.22 ± 0.09 and 0.77 ± 0.08, respectively, p < 0.001, paired Student's t-test for citrated and heparinized samples at initial total concentrations of 4 mg/L), and there was a trend towards significance at low concentrations of DTG (mean ± SD fu were 0.92 ± 0.26 and 0.71 ± 0.2, respectively, p = 0.135, paired Student's t-test for citrated and heparinized sample at an initial total concentration of 1 mg/L) (Table S3).

3.2.11.6. Influence of hemolysis. The unbound fraction increased with hemoglobin concentration increasing, especially at concentrations of 4 mg/L of DTG (p = 0.007, ANOVA). Dolutegravir's fu was also statistically higher (p = 0.024, ANOVA) at low concentration (1 mg/L), but only at high concentrations of hemoglobin (p = 0.03, Dunnett's test) (Table S4, Fig. S1). At high concentrations and for high levels of DTG, hemolysis increased the unbound fraction. Hemolysis at 0.5 g/dL systematically and significantly increased the unbound fraction for both low and high concentration of DTG (1 and 4 mg/L).

3.3. Evaluation of unbound forms in plasma samples from HIV patients

Results from HIV patients enabled us to explore the inter-individual variability of the total and unbound form of DTG: this had a median IQR [25, 75%] and coefficient of variation (CV) of 0.45% IQR [0.38, 0.55]; CV = 61.77% for unbound fraction, 9.26 µg/L IQR [4.62, 15.14]; CV = 70.03% for unbound concentration and 2035 µg/L IQR [878.5; 2640]; CV = 66.72% for total concentration. Distribution of sampling times has been reported on supplemental data (Fig. S2).

4. Discussion

Two techniques were developed in our study to evaluate the unbound form of DTG and to explore the pre-analytical parameters that could alter interpretation of the results. These techniques were then used to evaluate the unbound form of DTG in HIV patients.

The chromatographic technique allowed us to measure concentrations of DTG, both in a plasma matrix and in phosphate buffer. The accuracy, precision, carry-over, dilution, stability, and isotopic contribution complied with the FDA's recommended guidelines. This method provided accurate and precise measurement of total and unbound concentrations of DTG.

The following transitions (DTG m/z 420.2–277.0) were the most intense during infusion and in the mobile phase conditions. The results were consistent with transitions reported in previous [23–25]. These mobile-phase conditions were already being used in our laboratory to measure other antiretrovirals in human plasma. Even if three other studies have used C18 [24–26] or another phenyl hexyl [23] stationary phase, we have chosen a stationary biphenyl phase because of its ability to develop π–π interactions with aromatic structures. This allows it to retain both hydrophilic and hydrophobic compounds, like other antiretrovirals, as measured in our laboratory.

Our mobile-phase conditions were both similar [24] and quite different [23,25,26] than other described methods. We preferred methanol to acetonitrile as the organic solvent, as the latter impedes the π–π interactions between the biphenyl stationary phase and the analytes, which results in decreased aromatic retention.

Extraction recoveries were equivalent to those observed with the protein-precipitation method [23,26]. Two others methods of DTG quantification in plasma have low extraction recoveries but these methods used liquid–liquid extraction [24] or on-line solid-phase extraction [23]. Regarding the unbound concentration method, as the dialysate contains phosphate buffer, which is a non-volatile salt and provides ion suppression [16], a matrix effect for unbound-DTG was observed. However, this matrix effect had no impact on DTG quantification as (i) we used a deuterated internal standard that became ionized

in the same way, and (ii) our calibration curve was linear and reproducible. This result stresses the significance of using a stable isotope-labeled internal standard to avoid an undesired matrix effect.

No desynchronization between DTG and DTG-d4 areas was observed for unbound or total concentrations while increasing the DTG calibration concentration, excluding the possible competition between DTG and DTG-d4 during the ionization step, as observed by Aouri et al. [27] with rilpivirine, another antiretroviral. The internal-standard area did not increase with DTG concentration increased in our study, but this has not been reported in studies on DTG measurement using LC-MS/MS [23–26].

In our study, low variability in the calibration slope allowed us to run plasma samples without systematic calibration, as samples series being framed by quality control.

Precision of the three levels of quality control were similar, both within and between days, for both unbound and total concentrations, and were close to those reported in other studies [23–26], showing the ruggedness of this method over the calibration range.

The results on stability have not been described in other studies [25,26], or have not been fully detailed to follow FDA guidelines [23,24]. No decomposition of DTG was expected as the results of stability were lower than 15%. Thus, it can be concluded that DTG is not degraded at room temperature, at + 4 °C, at − 20 °C, or after three freeze–thaw cycles, and that plasma samples containing DTG can be stored under these conditions.

Results from the dilution experiment demonstrated the ability to accurately quantify DTG in both unbound and total concentrations, regardless of whether the concentrations were diluted. However, few of the plasma samples from HIV patients needed dilution as most of the data were within the calibration ranges for both unbound and total concentrations.

The major DTG metabolism pathway includes UGT1A1, to produce a glucuronide metabolite, which represents 18.9% of total DTG in human plasma [28], and thus has a low probability of analytical interference. This was confirmed in a study by Grégoire et al. [23], who reported no interference by glucuronide on DTG measurements, with or without using glucuronidase.

The chromatographic method developed in our study is suitable for routine hospital use for DTG therapeutic-drug monitoring. Indeed, plasmatic or dialysate, as well as chromatographic tests, are quicker than the LC method using an UV detector [29,30]. Moreover, the use of a deuterated internal standard allowed us to avoid any possible matrix effects, such as those observed with phosphate buffer and the unbound concentration. Finally, the low Cu value for DTG requires the use of an MS detector to achieve the required sensitivity level, which is difficult to achieve using a UV detector [29,30].

The first step to validate the unbound fraction through ED is to establish the time needed to reach binding equilibrium. Using our method, it was obtained after 4 h of dialysis. To date, no study has described the ED procedure to evaluate the unbound fraction of integrase strand transfer inhibitors. Nevertheless, for the protease inhibitors lopinavir and nelfinavir [31,32], assessment of the unbound fraction by ED showed that the time needed to reach binding equilibrium was close to that observed with DTG in our study. Two studies [25,33] have explored the unbound fraction of DTG in HIV-seronegative subjects using high-throughput equilibrium dialysis. Even though this procedure is dissimilar to ours, the time to reach equilibrium was adjusted at 5 h, which was a similar timespan to ours. In our study, the short time needed to reach equilibrium allowed us to avoid a dilution effect that could be caused during longer term ED [13]. Non-specific binding during dialysis (dialysis membrane, plastic recipients) is thus negligible [18].

The composition of the ED device, in particular the Teflon cells, allowed us to avoid major non-specific binding. The lack of non-specific binding was one of the factors that made ED the reference method to evaluate the unbound form of a drug.

Dolutegravir remained stable in the various pre-analytical short and longer term thermal conditions, even at low concentrations (i.e., LCQ of the unbound form). In our study, evaluation of stability of DTG binding was also performed: binding remained unchanged for five days at + 4 °C and after three freeze–thaw cycles. This makes it easier to include the analysis for both total and unbound DTG concentrations in routine hospital laboratory practice.

From this stability study, we deduce that DTG binding to plasmatic protein was not sensitive to changes in pH, even though it has been suggested that pH may increase after freezing and thawing [34]. Because some molecules may be sensitive to pH fluctuations, even on a small scale [35], it was necessary to assess this pre-analytical parameter during bioanalysis validation, in particularly the binding stability at different storage temperatures. Moreover pH fluctuations were not an issue during ED analysis, as the Sörensen buffer stabilized the physiological pH of both the plasma and buffer chambers [13].

To date, there are no data on the stability of DTG-protein binding. The only two studies [25,33] that have described this assay, did not detail binding stability. There are no data for other integrase strand transfer inhibitors. The unbound form was also studied for raltegravir [36], but the authors did not detail the stability of storage binding.

The anticoagulant used in plasma samples is rarely if ever described in studies on the unbound form of DTG [25,33]. However, an effect between citrated and heparinized plasma was observed in our study. Indeed, for high DTG concentration (4 mg/L), citrated plasma increased the fu results compared to heparinized plasma. We also found a trend with low DTG concentration (1 mg/L), with higher fu values from citrated plasma. Because citrate is not known to bind to albumin, it could be hypothesized that citrate interferes with DTG-protein binding, decreasing the affinity constant of DTG for plasmatic protein or competing with plasma proteins for DTG binding. To date, no study has yet explored the influence of anticoagulants on protein binding in DTG or any other drug. As the effect of sampled anticoagulant was consistent in the unbound form of DTG, it seems essential to include this parameter when exploring the unbound fraction. Detail on anticoagulant sampling should be described in further articles describing unbound form exploration for any drug.

Hemolysis can occur during sampling, for example when the tourniquet is too tight or when the sample is poorly preserved prior to centrifugation [37–39]. This parameter is known to interfere with the biochemical analyses, either by inhibiting an enzymatic reaction or by interfering with the absorbance readings [40]. In our study, hemolysis did not appear to influence our analytical method, as no variability in total concentrations was observed at the same concentration level (1 or 4 mg/L). Thus, it could be deduced that hemolysis influenced DTG-plasmatic protein binding.

Schuhmacher et al. [41,42] conducted a study on highly lipidic bound drugs and their repartition between plasmatic water, plasmatic proteins, and erythrocytes. These researchers recommended avoiding hemolysis when exploring unbound form exploration to avoid erroneous results. They hypothesized that drug binding was redistributed on the released hemoglobin and intra-erythrocyte components exposed by hemolysis, thus resulting in an increase in the bound drug and a decrease in the unbound form. In contrast, we observed an increase in the unbound concentration, and thus an increase in the unbound fraction. Nevertheless, the impact of the release of intra-erythrocyte compounds on protein binding could be questioned as, besides hemoglobin, erythrocytes contain several structural proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates [43] which could interfere with DTG protein binding. Indeed, several studies have described a decrease in drug-binding secondary to an increase in some physiologically active molecules, such as uremia compounds or fatty acids [44,45]. Moreover, Snyder et al. [46] reported that hemolysis could inhibit antibody/substrate binding in some clinical biochemistry assays, as drug–protein binding.

Thus, two kinds of binding inhibition could occur during hemolysis: (i) competitive inhibition between the release of intra-erythrocyte

compounds and DTG on the plasmatic protein-binding site, or (ii) non-competitive inhibition where intra-erythrocyte compounds decrease the binding affinity between DTG and plasmatic proteins. Spectrophotometric analysis of hemolysis could be too restrictive to easily analyze the unbound form of DTG. As hemolysis can be detected in 0.2 g/dL of hemoglobin, the samples have to be rejected if pink coloration is observed. Nevertheless, assessing hemolysis needs to be included during bioanalytical validation of unbound form.

Equilibrium dialysis has some disadvantages compared to other methods, such as ultrafiltration. Firstly, this method is time consuming, both in assay preparation and time of dialysis, which here was still short. Secondly, it is necessary to use a large amount of plasma (1 mL in our study). In contrast, ultrafiltration is a convenient and quick method that requires only a small amount of plasma (250 or 500 μL). Thus, it is preferable to use ultrafiltration if the unbound form is going to be explored during routine therapeutic drug monitoring. However, the existence of interference from ultrafiltration devices requires a first step of bioanalysis validation, based on equilibrium dialysis, which is the gold-standard method for drug-binding studies, especially when exploring the pre-analytical conditions that may interfere with unbound fractions.

Huge inter-individual variability has been described for both total and unbound DTG concentrations in samples from HIV patients' plasma. The high inter-individual variability of the unbound concentration is one of the first steps seen when including DTG in therapeutic drug monitoring [47]. Indeed, it could explain the toxicity or efficacy discrepancies when compared to total concentrations, as observed with protease inhibitors during pregnancy [48].

The unbound concentration of DTG varies with dosing interval (maximum to minimal concentrations). Therefore, it is hazardous to compare unbound concentrations between studies. However, the fu does not vary with dosing interval [9] and could be used to compare results between studies. Imaz et al. [10] evaluated DTG fu using a technique similar to ED, known as high-throughput dialysis equilibrium, and found similar results to ours (our fu was 0.46%, Imaz et al.'s was 0.42%). Unfortunately, we were not able to compare our results with other studies that used ED-like procedures [25,33] as these (i) evaluated DTG fu on healthy subjects and (ii) the HIV-seronegative subjects present different DTG pharmacokinetic profile compared to HIV patients [49].

5. Conclusion

Developed method allowed accurate measurement of unbound and total dolutegravir concentrations. Nor non-specific binding or conservation steps did influence fu results. On the contrary, anticoagulants from samples and hemolysis influenced fu results and could lead to a misinterpretation. The high inter-individual variability observed in the unbound form from HIV patients was a first step towards integrating dolutegravir TDM.

Conflict of interest

M.D. received from Bristol-Myers Squibb, Janssen-Cilag, Gilead Sciences, and ViiV Healthcare travel grants and fees for public speaking. The other authors have no financial interests to declare.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.12.034.

References

[1] S. Min, L. Sloan, E. DeJesus, T. Hawkins, L. McCurdy, I. Song, R. Stroder, S. Chen, M. Underwood, T. Fujiwara, S. Piscitelli, J. Lalezari, Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of dolutegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults, AIDS 25 (2011) 1737–1745.
[2] I. Song, K. Adkison, M. Lovern, J. Chiu, J. Huang, C. Vavro, M. Ait-Khaled, B. Wynne, S. Min. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling & simulation of the virologic response of dolutegravir in HIV-infected patients with integrase inhibitor resistant virus. 16th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and Hepatitis Therapy 2015; Washington, DC. Abstract #14.
[3] C. Katlama, C. Soulié, F. Caby, A. Denis, C. Blanc, L. Schneider, M.A. Valantin, R. Tubiana, M. Kirstetter, E. Valdenassi, T. Nguyen, G. Peytavin, V. Calvez, A.G. Marcelin, Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia, J. Antimicrob. Chemother. 71 (2016) 2646–2650.
[4] I.H. Song, S. Chen, S. Piscitelli, S. Min Pharmacokinetics (PK) and PK-pharmacodynamic (PD) relationship of dolutegravir (DTG) in int grase inhibitor (INI)-naïve subjects, abstr A-1573. 53rd ICAAC, 10 to 13 September 2013, Denver, CO.
[5] J. Zhang, S. Hayes, B.M. Sadler, I. Minto, J. Brandt, S. Piscitelli, S. Min, I.H. Song, Population pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-infected treatment-naive patients, Br. J. Clin. Pharmacol. 80 (2015) 502–514.
[6] M.G. de Boer, G.E. van den Berk, N. van Holten, J.E. Oryszcyn, W. Dorama, D.A. Moha, K. Brinkman, Intolerance of dolutegravir-containing combination antiretroviral therapy regimens in real-life clinical practice, AIDS 30 (2016) 2831–2834.
[7] A. Menard, C. Montagnac, C. Solas, L. Meddeb, C. Dhiver, C. Tomei, I. Ravaux, H. Tissot-Dupont, S. Mokhtari, P. Colson, A. Stein, Neuropsychiatric adverse effects on dolutegravir: an emerging concern in Europe, AIDS 31 (2017) 1201–1203.
[8] M. Rowland, T.N. Tozer, Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995.
[9] S.L. Letendre, A.M. Mills, K.T. Tashima, D.A. Thomas, S.S. Min, S. Chen, I.H. Song, S.C. Piscitelli, Extended ING116070 Study Team, ING116070: a study of the pharmacokinetics and antiviral activity of dolutegravir in cerebrospinal fluid in HIV-1-infected, antiretroviral therapy-naive subjects, Clin. Infect. Dis. 59 (2014) 1032–1037.
[10] A. Imaz, J. Martinez-Picado, J. Niubó, A.D. Kashuba, E. Ferrer, D. Ouchi, C. Sykes, N. Rozas, L. Acerete, J. Curto, A. Vila, D. Podzamczer, HIV-1-RNA decay and dolutegravir concentrations in semen of patients starting a first antiretroviral regimen, J. Infect. Dis. 214 (2016) 1512–1519.
[11] M.L. Cottrell, T. Hadzic, A.D. Kashuba, Clinical pharmacokinetic, pharmacodynamic and drug-interaction profile of the integrase inhibitor dolutegravir, Clin. Pharmacokinet. 52 (2013) 981–994.
[12] J.B. Pain, M.P. Lê, M. Caseris, C. Amiel, L. Lassel, C. Charpentier, A. Desnoyer, C. Farnoux, G. Pialoux, D. Descamps, G. Peytavin, Pharmacokinetics of dolutegravir in a premature neonate after HIV treatment intensification during pregnancy, Antimicrob. Agents Chemother. 59 (2015) 3660–3662.
[13] L.B. Nilsson, The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs, Bioanalysis 5 (2013) 3033–3050.
[14] S.M. Illamola, D. Hirt, J.M. Tréluyer, S. Urien, S. Benaboud, Challenges regarding analysis of unbound fraction of highly bound protein antiretroviral drugs in several biological matrices: lack of harmonisation and guidelines, Drug Discov. Today 20 (2015) 466–474.
[15] FDA, Homepage, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf, (2017) (accessed 19.08.17).
[16] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, Anal. Chem. 75 (2003) 3019–3030.
[17] SWGTOX Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology Laboratories, available at: http://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf, 2017 (accessed 19.08.17).
[18] C. Arellano, P. Gandia, T. Lafont, R. Jongejan, E. Chatelut, Determination of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib, validation of an UPLC-MS/MS assay and ultrafiltration method, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 907 (2012) 94–100.
[19] G. Lippi, D. Giavarina, M. Gelati, G.L. Salvagno, Reference range of hemolysis index in serum and lithium-heparin plasma measured with two analytical platforms in a population of unselected outpatients, Clin. Chim. Acta 429 (2014) 143–146.
[20] French Code of Public Health—Article L1121-1.
[21] French Code of Public Health—Article L1121-2.
[22] R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008 ISBN 3-900051-07-0 http://www.R-project.org 2017 (accessed 19.08.17).
[23] M. Grégoire, G. Deslandes, C. Renaud, R. Bouquié, C. Allavena, F. Raffi, P. Jolliet, E. Dailly, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of rilpivirine and dolutegravir in human plasma, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 971 (2014) 1–9.
[24] S.D. Penchala, S. Fawcett, L. Else, D. Egan, A. Amara, E. Elliot, E. Challenger, D. Back, M. Boffito, S. Khoo, The development and application of a novel LC-MS/MS method for the measurement of Dolutegravir, Elvitegravir and Cobicistat in human plasma, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 1027 (2016) 174–180.
[25] I.H. Song, J. Borland, P.M. Savina, S. Chen, P. Patel, T. Wajima, A.F. Peppercorn, S.C. Piscitelli, Pharmacokinetics of single-dose dolutegravir in HIV-seronegative subjects with moderate hepatic impairment compared to healthy matched controls, Clin. Pharmacol. Drug Dev. 2 (2013) 342–348.

[26] C. Bennetto-Hood, G. Tabolt, P. Savina, E.P. Acosta, A sensitive HPLC-MS/MS method for the determination of dolutegravir in human plasma, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 945–946 (2014) 225–232.
[27] M. Aouri, A. Calmy, B. Hirschel, A. Telenti, T. Buclin, M. Cavassini, A. Rauch, L.A. Decosterd, A validated assay by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous quantification of elvitegravir and rilpivirine in HIV positive patients, J. Mass Spectrom. 48 (2013) 616–625.
[28] S. Castellino, L. Moss, D. Wagner, J. Borland, I. Song, S. Chen, Y. Lou, S.S. Min, I. Goljer, A. Culp, S.C. Piscitelli, P.M. Savina, Metabolism, excretion, and mass balance of the HIV-1 integrase inhibitor dolutegravir in humans, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 3536–3546.
[29] V. Cozzi, N. Charbe, S. Baldelli, S. Castoldi, C. Atzori, D. Cattaneo, E. Clementi, Development and validation of a chromatographic ultraviolet method for the simultaneous quantification of dolutegravir and rilpivirine in human plasma, Ther. Drug Monit. 38 (2016) 407–413.
[30] X. Wang, S.D. Penchala, A. Amara, L. Else, M. McClure, M. Boffito, A validated method for quantification of dolutegravir using ultra performance liquid chromatography coupled with UV detection, Ther. Drug Monit. 38 (2016) 327–331.
[31] M. Boffito, P.G. Hoggard, W.E. Lindup, S. Bonora, A. Sinicco, S.H. Khoo, G. Di Perri, D.J. Back, Lopinavir protein binding in vivo through the 12-hour dosing interval, Ther. Drug Monit. 26 (2004) 35–39.
[32] C. Herforth, J.A. Stone, A.L. Jayewardene, T.F. Blaschke, F. Fang, T. Motoya, F.T. Aweeka, Determination of nelfinavir free drug concentrations in plasma by equilibrium dialysis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry: important factors for method optimization, Eur. J. Pharm. Sci. 15 (2002) 185–195.
[33] S. Weller, J. Borland, S. Chen, M. Johnson, P. Savina, B. Wynne, T. Wajima, A.F. Peppercorn, S.C. Piscitelli, Pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-seronegative subjects with severe renal impairment, Eur. J. Clin. Pharmacol. 70 (2014) 29–35.
[34] A. Fura, T.W. Harper, H. Zhang, L. Fung, W.C. Shyu, Shift of pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 513–522.
[35] C.J. Kilpatrick, S. Wanwimolruk, L.M. Wing, Plasma concentrations of unbound phenytoin in the management of epilepsy, Br. J. Clin. Pharmacol. 17 (1984) 539–546.
[36] C. Barnu, V. Furlan, Y. Yazdanpanah, C. Fagard, J.M. Molina, A.M. Taburet, A. Barnil-Tran, Characterization of binding of raltegravir to plasma proteins, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 5147–5150.
[37] S. Saleem, V. Mani, M.A. Chadwick, S. Creanor, R.M. Ayling, A prospective study of causes of haemolysis during venepuncture: tourniquet time should be kept to a minimum, Ann. Clin. Biochem. 46 (2009) 244–246.
[38] M.S. Grant, The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples, J. Emerg. Nurs. 29 (2003) 116–121.
[39] S.O. Sowemimo-Coker, Red blood cell hemolysis during processing, Transfus. Med. Rev. 16 (2002) 46–60.
[40] O. Sonntag, Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 24 (1986) 127–139.
[41] J. Schuhmacher, K. Bühner, A. Witt-Laido, Determination of the free fraction and relative free fraction of drugs strongly bound to plasma proteins, J. Pharm. Sci. 89 (2000) 1008–1021.
[42] J. Schuhmacher, C. Kohlsdorfer, K. Bühner, T. Brandenburger, R. Kruk, High-throughput determination of the free fraction of drugs strongly bound to plasma proteins, J. Pharm. Sci. 93 (2004) 816–830.
[43] E.M. Pasini, H.U. Lutz, M. Mann, A.W. Thomas, Red blood cell (RBC) membrane proteomics—part I: proteomics and RBC physiology, J. Proteomics 73 (2010) 403–420.
[44] C.J. Bowmer, W.E. Lindup, Decreased drug binding in uraemia: effect of indoxyl sulphate and other endogenous substances on the binding of drugs and dyes to human albumin, Biochem. Pharmacol. 31 (1982) 319–323.
[45] J.A. Anguizola, S.B. Basiaga, D.S. Hage, Effects of fatty acids and glycation on drug interactions with human serum albumin, Curr. Metabolomics 1 (2013) 239–250.
[46] J.A. Snyder, M.W. Rogersb, M.S. Kingb, J.C. Phillipsb, J.F. Chapmana, C.A. Hammett-Stablera, The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's ECi and Roche's elecsys immunoassay systems, Clin. Chim. Acta 348 (2004) 181–187.
[47] R.E. Aarnoutse, J.M. Schapiro, C.A. Boucher, Y.A. Hekster, D.M. Burger, Therapeutic drug monitoring: an aid to optimising response to antiretroviral drugs? Drugs 63 (2003) 741–753.
[48] D. Metsu, P.L. Toutain, E. Chatelut, P. Delobel, P. Gandia, Antiretroviral unbound concentration during pregnancy: piece of interest in the puzzle? J. Antimicrob. Chemother. 72 (2017) 2407–2409.
[49] P.L. McCormack, Dolutegravir: a review of its use in the management of HIV-1 infection in adolescents and adults, Drugs 74 (2014) 1241–1252.

Annexe 2 – 2: résumé de l'étude visant à déterminer la forme libre du DRV par une méthode combinant la dialyse à l'équilibre et de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. La rédaction de l'article est en cours de finalisation et sera soumis dans le journal *Translational Research.*

Translational Research

Determination of Darunavir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods

David Metsu [a,b]; Thomas Lanot [a]; François Fraissinet [a]; Mélanie Picot [a]; Didier Concordet [c]; Pierre Louis Toutain[c] ; Marion Cabrol [a]; Etienne Chatelut [b,d]; Pierre Delobel [e,f,]; Peggy Gandia [*a,c]

a. Department of Pharmacokinetic and Toxicology, Toulouse University Hospital, France

b. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

c. UMR 1436 INTHERES, INRA/ENVT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

d. Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

e. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

f. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

Résumé de l'article:

Currently, Darunavir (DRV) therapeutic drug monitoring (TDM) is based on total concentrations (C_t). However, some patients could experiment virological failure despite effective C_t, as observed during DRV monotherapy. The unbound concentration (C_u) is considered as the pharmacologically active part of the drug and could improve DRV TDM. Equilibrium dialysis (ED) is the gold standard method in order to determine the unbound form of a drug. The aim of the study was to evaluate (i) DRV unbound form by ED, (ii) the pre-analytical parameters that could influence f_u results and (iii) f_u's between subject variability in HIV patients. Validation of the LC-MS/MS method followed FDA guidelines. The results, based on coefficients of variation (results from nominal concentrations< 15%), allowed accurate determination of C_u and C_t. Equilibrium during ED was obtained within 4 h. Sparse non-specific binding (10.3%) was observed, allowing results interpretation without interference. Pre-analytical phases (*e.g.*, storage conservation, freeze/thaw cycles) did not influence f_u results. Anticoagulants from samples (citrated versus heparinized; p=0.06 for low concentrations) and hemolysis (p=0.47) did not disturb DRV binding equilibrium to plasma protein. Developed method was then performed to the HIV-patients' plasma (n =135). Results, expressed as median InterQuartile Range [25%;75%] were 4.7% IQR [3.7%, 6.2%] for f_u, 129 µg/L IQR [67; 211] for C_u, and 2675µg/L IQR [1578; 3675]for C_t. The high inter-individual variability observed in the unbound form from HIV patients was a first step in order to include DRV unbound form in TDM.

Annexe 2 – 3: résumé de l'étude visant à déterminer la forme libre de l'ATV par une méthode combinant la dialyse à l'équilibre et de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. La rédaction de l'article est en cours de finalisation et sera soumis dans le journal *Biochemia Medica.*

Biochemia Medica

Determination of Atazanavir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods.

David Metsu [a,b]; Thomas Lanot [a]; François Fraissinet [a]; Mélanie Picot [a]; Didier Concordet [c]; Marion Cabrol [a]; Frédérique Dubois-Galopin [d]; Etienne Chatelut [b,e]; Pierre Delobel [f,g,]; Peggy Gandia [*a,c]

a. Department of Pharmacokinetic and Toxicology, Toulouse University Hospital, France

b. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

c. INRA, Toxalim, INP-ENVT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

d. Laboratory of Hematology, Toulouse University Hospital, France

e. Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

f. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

g. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

Résumé de l'article:

Assessment of the unbound pharmacologically active fraction (fu; as the ratio of unbound to total concentration) of Atazanavir (ATV) could improve therapeutic drug monitoring (TDM) in patients that experience virological failure or toxicity, despite receiving adequate total concentrations. This study evaluated (i) ATV's fu through equilibrium dialysis (ED), (ii) the pre-analytical parameters that influence fu, and (iii) fu's inter-individual variability in HIV patients. Validation of the LC-MS/MS method followed FDA guidelines. The results, based on coefficients of variation (results from nominal concentrations <15%), allowed accurate measurement of unbound and total ATV concentrations. Equilibrium during ED was obtained in 4h. Sparse non-specific binding (8.2%) was observed, allowing results interpretation without interference. Steps before analysis (e.g., conservation at +4°C, freeze/thaw cycles) did not influence f_u, allowing easy integration of fu analysis within laboratory routines. Anticoagulants from samples (citrated *versus* heparinized; p=0.134) and hemolysis (*p*=0.155) influenced fu and could lead to misinterpretation. Developed was then performed to the HIV-patients' plasma (*n*=39). Results, expressed as median InterQuartileRange[25%;75%] were 7.2% IQR[5.3;8.4] for f_u, 54 µg/L IQR[30;105] for unbound, and 796 µg/L IQR[392;1350] for total concentration. The high inter-individual variability observed in the unbound form from HIV patients was a first step towards integrating ATV TDM.

2. Deuxième partie : développement de l'étude de la forme libre par ultrafiltration et de la contre-validation face à la dialyse à l'équilibre

Annexe 2 – 4: *proof* de l'article soumis dans *Scientific Reports* de l'étude visant à déterminer les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats de fraction libre du DTG similaires à ceux de la méthode de référence, la dialyse à l'équilibre à 37°C.

Scientific Reports

Dolutegravir unbound fraction exploration through ultrafiltration and equilibrium dialysis: a call to standardise unbound exploration.

David Metsu [1,2]; Thomas Lanot [1]; François Fraissinet [1]; Didier Concordet [3]; Véronique Gayrard [4]; Manon Averseng [1]; Alice Ressault [1]; Etienne Chatelut [2,5]; Pierre Delobel [6,7]; Peggy Gandia [*1,3]

1. Department of Pharmacokinetics and Toxicology, Toulouse University Hospital, France

2. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

3. INTHERES, INRA, ENVT, Toulouse University, France.

4. Toxalim, Toulouse University, INRA, ENVT, Toulouse, France.

5. Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

6. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

7. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

Scientific Reports

Dolutegravir unbound fraction exploration through ultrafiltration and equilibrium dialysis: a call to standardise unbound exploration.

David Metsu [1,2]; Thomas Lanot [1]; François Fraissinet [1]; Didier Concordet [3]; Véronique Gayrard [4]; Manon Averseng [1]; Alice Ressault [1]; Etienne Chatelut [2,5]; Pierre Delobel [6,7]; Peggy Gandia [*1,3]

1. Department of Pharmacokinetics and Toxicology, Toulouse University Hospital, France

2. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

3. INTHERES, INRA, ENVT, Toulouse University, France.

4. Toxalim, Toulouse University, INRA, ENVT, Toulouse, France.

5. Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

6. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

7. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

Corresponding author: Professor Peggy Gandia

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie (Pharmacokinetics and Toxicology Laboratory), Centre Hospitalo-Universitaire Purpan (Purpan University Medical Centre), 330 avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse, France

E-mail: gandia.p@chu-toulouse.fr; Tel.:+33(0)567690383; Fax: +33 567690384

Abstract

Dolutegravir therapeutic drug monitoring (TDM) could be improved by determining the unbound concentration, especially in patients experiencing virological failure or toxicity despite suitable total plasma concentration. Equilibrium dialysis (ED) is the gold standard method used to determine the unbound form of a drug, but the prolonged duration of the procedure precludes its use in clinical practice. On the contrary, ultrafiltration is applicable to TDM, but is sensitive to analytical conditions. In order to evaluate unbound concentration through ultrafiltration, conditions and analysis validation were compared to ED. Unbound and total concentrations were measured using a LC-MS/MS method. Three ultrafiltration factors (temperature, speed and duration of ultrafiltration) were explored and compared to ED (25/37°C), using a design of experiment strategy. Applying ANOVA and Dunnett's test, temperature influenced DTG-protein binding for both ED ($p=0.036$) and UF ($p=0.002$). Moreover, speed (2000g) and time (20 minutes) generated an interaction which influenced the results achieved with the unbound form ($p=0.006$), while individually, those factors did not influence unbound results ($p=0.88$ and $p=0.42$ for speed and time). Ultrafiltration conditions were set at 37°C, 1000g for 20 minutes. Ultrafiltration results depended greatly on analytical conditions, confirming the need to validate against ED to correctly interpret unbound dolutegravir concentrations.

Introduction

Dolutegravir (DTG) is an efficient and well-tolerated antiretroviral currently used in antiretroviral therapeutic strategies[1,2]. Clinical studies have confirmed that the efficacy of DTG depends on drug plasma exposure (concentrations)[3,4] and efficacy-related targets have been proposed[5,6]. However, virological failures have been reported despite total concentrations (Ct) deemed to be efficient and close to the values recorded in HIV patients without virological failure[5-7]. Furthermore, the neuro-psychic events described are still not explained in an overall HIV population by Ct[8]. Thus, therapeutic drug monitoring (TDM), currently based on Ct, revealed some limitations, and an alternative pharmacokinetic marker of exposure may be of interest in order to improve DTG-based strategies.

Dolutegravir is highly bound to plasma proteins (>99%), binding mainly to albumin and, to lesser extent, to the alpha-1-acid glycoprotein[9]. Thus, the amount of unbound form able to diffuse into tissues and cross cell membranes is low[10]. It can therefore be assumed that any variation in the low amount of the unbound form, not detectable with Ct, could explain the variability in pharmacodynamic effects as virological failure or neuro-psychic events. Consequently, inter-individual variability of unbound exposure (concentration) may explain differences in DTG efficacy and/or toxicity instead of total concentrations.

Before exploring the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship, it is particularly important to guarantee the strength of the method used to determine unbound exposure (concentrations). Indeed, unbound concentration is directly compared to the target virological concentration to assume DTG efficacy in the HIV compartment[11]. Equilibrium dialysis (ED) and ultrafiltration (UF) are the two main methods available for exploration of the unbound form. Because (i) non-specific binding is low and (ii) the unbound form is evaluated at binding equilibrium, ED is considered as the gold standard for evaluating the unbound form of a drug[12,13]. However, this technique is time-consuming and is not suitable for clinical trials or routine hospital laboratories[12,13]. On the contrary, UF is a rapid, convenient method, that can be used to process many samples[12,13]. Today, UF is increasingly applied to explore unbound exposure. However, despite high non-specific binding and known analytical interferences, many authors applied previously published UF technical conditions without comparing them to ED[14,15].

The aims of the study were (i) to compare the characteristics of ED and UF approaches to explore DTG unbound exposures and (ii) to determine the analytical conditions guarantying UF method comparability with ED.

Materials and methods

LC-MS/MS technique. Dolutegravir unbound and total concentrations were measured using a liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method previously described[16]. Briefly, this method includes extraction of 50 µL plasma, dialysate or ultrafiltrate using 200 µL of a precipitating reagent containing deuterated internal standard followed by LC-MS/MS analysis (ABSciex API-4500). Calibrator concentrations were 50-10000 and 0.5-100 ng/mL for total and unbound DTG. Further details on LC-MS/MS method and performance are described in a previous study[16].

Sample preparation. Quality-control (QC) samples were prepared by diluting known volumes of the working solution in plasma for total DTG and in Sorensen buffer for unbound DTG. Final concentrations were 150, 1500 and 7500 ng/mL and 1.5, 15, and 75 ng/mL for total and unbound DTG. More information on sample preparation is available in an earlier study[16].

Unbound DTG determination in plasma

Equilibrium dialysis. Equilibrium dialysis was performed in cells made from Teflon using a Dianorm apparatus (Diachema AG, Zurich, Switzerland) in 1-mL capacity cells and equilibrium was reached through Visking Dialysis Tubing membranes (molecular mass cut-off : 12000-14000Da, Medicell Membranes Ltd, London, UK). A 1 mL aliquot of plasma samples was dialysed against 1 mL Sorensen phosphate buffer solution at pH 7.4 in a temperature-controlled heater at a nominal temperature of 37°C in a thermostatic enclosure and rotated at 12 rpm for 4 h. The plasma and buffer dialysates thus obtained were then promptly recovered from the Teflon cells and analysed by LC–MS/MS. Fifty microliters of dialysate were diluted with 200µL of mobile phase containing 1ng/mL of DTG-d4. Fifty microlitres were injected into the LC-MS/MS system. Following dialysis, the remaining plasma was extracted with 200 µL of methanol containing DTG-d4 and then diluted in water (fifth dilution). Analytical validation of DTG unbound fraction (fu, calculated as the ratio of unbound substance on total concentration; fu= Cu / Ct) through ED is described in detail in a previous study[16].

Ultrafiltration. At the same time as ED (same day), unbound-DTG was determined using UF. Prior to plasma UF, filters were pre-washed at 20°C with water for 20 min at 2000 g, as recommended by the manufacturer. Five hundred microlitres of plasma (spiked or from patients) were incubated in a Centriunbound Centrifugal Filter Device (Millipore, Billerica, MA), with molecular weight cut-off of 30000 Da. The optimal UF conditions (temperature, time and speed centrifugal conditions) were determined by comparison with the reference method (ED at 37°C). After UF, DTG extraction from plasma ultrafiltrate was performed like the dialysate, as described in the ED sub-heading.

To evaluate non-specific binding (NSB), 5 blank plasma samples were spiked at 1 mg/L total concentration of DTG. Non-specific binding was calculated as follows: NSB = [(initial quantity)/(plasma quantity + ultrafiltrate quantity)]. Weight of ultrafiltrate was used to calculate ultrafiltrate volume. Ultrafiltrate density was considered by the weight of a volume of 100 µL of ultrafiltrate without DTG.

As the same extraction procedure was applied to dialysate and ultrafiltrate samples, both matrices were compared. For that purpose, blank ultrafiltrates and dialysates were spiked with 1.5 and 75 ng/mL concentrations of DTG, respectively and extracted. The final concentrations were then compared.

Equilibrium dialysis *vs.* ultrafiltration. Plasma samples used to compare both methods were spiked at 1mg/L, close to the trough total concentration usually observed (total concentration of DTG)[7]. Following plasma spiking, samples were stored at 25 or 37°C prior to analysis, depending on the temperature of the planned sample analysis (ED or UF, at 25 or 37°C). To determine the conditions for achieving similar results between ED and UF, a full design of experiment (DOE) approach was performed. This procedure can stress interferences from independent factors, such as temperature, or from the interaction of two or more factors, such as time of centrifugation versus temperature. The influence of three analytical factors on UF results was evaluated. Two levels were studied for each factor: temperature (25 and 37°C), centrifugation speed (1000 and 2000 g) and centrifugation time (10 and 20 min). Eight operating conditions were used to study the three parameters simultaneously, five times for each, as shown in Table 1. The sequence of analysis of the 8 UF conditions was randomised. In order to investigate the origin of the interferences on the unbound form values, volumes of ultrafiltrates were determined, as previously described. Ultrafiltration and ED assays were performed on the same day. Results from UF were compared to ED results at 37°C.
The choice of UF condition was primarily based on statistical analysis (no statistical difference between UF and ED at 37°C) and low dispersion of the results under the same condition (standard deviation).
Data were compared to the results obtained with ED at 37°C, which were considered as the reference values, based on previously published suggestions[12].
The d-dialysate and ultrafiltrate effects on analytical extraction were compared using spiked dialysate and ultrafiltrate at two concentration levels.

Equilibrium dialysis and ultrafiltration on HIV patient samples. Once the conditions for achieving similar results between UF and DE were identified for spiked plasma, they were applied to HIV samples collected from patients (n=16).
Moreover, since the samples (in a routine hospital laboratory) may not always contain the volume required (500 µl) to perform UF, the unbound form was also determined from duplicate HIV patient samples (n=5) on 250 and 500 µL of plasma. Both volumes were compared in parallel on the same day.

Patients' samples. Total and unbound DTG were quantified from 16 patients' samples, stored at -20°C before analysis after initial centrifugation at 2000 g, + 20°C for 15 minutes immediately after the sample had arrived at the laboratory.
This was a non-interventional study without any additional procedure. Dolutegravir TDM and data collection were part of routine patient care. For these reasons, no Institutional Review Board or Ethics Committee approval was required, in accordance with French legislation governing biomedical research[17,18].

Statistical analysis. Analysis of variance (ANOVA) and a normality test were performed. If the ANOVA test was statistically significant, Dunnett's test was performed in order to identify a potential interaction. Results were expressed as median InterQuartileRange[25%;75%]. When possible, results were associated with a paired t test and expressed as the mean and standard deviation (m±sd). The relationship between two quantitative variables was assessed using a Pearson correlation test. The level of significance was set at $p<0.05$. Statistical analyses were performed with R software (3.5.1)[19].

Results

Comparison of dialysate and ultrafiltrate matrix. Analytical extraction of DTG from the dialysate or ultrafiltrate was comparable for both low-spiked (m=1.70±0.05 ng/mL and m=1.78±0.03 ng/mL for

dialysate and ultrafiltrate; p=0.095) and high concentrations (m=80.83±1.36 ng/mL and m=81.93±2.84 ng/mL for dialysate and ultrafiltrate; p=0.578).

Non-specific binding. Mean non-specific binding was evaluated at 10.2% (sd=4.5%) by UF.

Comparison of DE/UF. The results of the full design of experiment (DOE) analysis, comparing ED and UF are presented in Table1. Similar results were obtained with an UF of 20 minutes at 1000 g and at 37°C (condition 7). In addition to the statistical outcome, this condition has also been chosen to highlight the similarity of the result with ED at 37°C and low variability in terms of result.

Temperature variations yielded statistically different unbound fraction (fu) results for both ED (m=1.56% IQR[1.48;1.57] and m=0.64% IQR[0.61;0.65], for ED at 25 and 37°C, respectively; p=0.036) and UF (m=0.88% IQR[0.77;0.91] and m=0.61% IQR[0.55;0.75], for UF at 25 and 37°C, respectively; p=0.002), regardless of centrifugation speed and duration of UF.

A comparison of UF temperatures revealed statistical differences in ultrafiltrate volumes (m=274±28.2 µL and m=298±38.8 µL for UF at 25°C and 37°C, respectively; p=0.036).

Furthermore, regardless of temperature conditions, the interaction of speed (2000 g) and duration (20 minutes) of UF resulted in statistically different fu, compared to other conditions (p=0.006 and $<10^{-4}$, at 25 and 37°C, respectively) (Table1). Ultrafiltrate volumes were higher in UF conditions set at 2000 g and 20 minutes duration, compared to the volume of other conditions (Table 2). However, if speed and duration of centrifugation were analysed independently, no significant differences were observed in either ultrafiltrate volume (p=0.588 for centrifugation time 10 *vs.* 20 minutes and p=0.882 for centrifugation speed 1000 *vs.* 2000g) and unbound fraction results (p=0.42 for centrifugation time 10 *vs.* 20 minutes and p=0.88 for centrifugation speed 1000 *vs.* 2000g). In this instance, only combined variations of speed and duration of centrifugation (2000 g for 20 minutes) influenced ultrafiltrate volume and therefore the unbound fraction result, whereas individually, those conditions had no leverage.

The patient dosage regimen was based only on 50 mg *qd.* The seventh condition (following UF conditions: 37°C with settled centrifugation at 1000 g for 20 minutes) was then applied to HIV patient samples. Unbound fraction results did not differ statistically between UF (37°C, 20 minutes and 1000 g) and ED (37°C) (m=0.44±0.06% and m=0.47±0.22% for ED and UF, respectively; p=0.685) (Figure 1). Comparison of 250 and 500 µL plasma volumes for UF did not reveal any statistically significant differences between unbound fraction results (m=0.52±0.09% and m=0.60±0.13% for 250 and 500 µL, respectively; p= 0.895, t-paired test). No relationship (p=0.661) was observed between the unbound fraction and Ct (range of Ct: 0.8 to 6 mg/L).

Condition	Temperature (°C)	Time (min)	Speed (g)	Mean unbound fraction (%)	Unbound fraction, sd (%)	ANOVA	Dunnett test (p-value)
Ultrafiltration							
1	25	10	1000	0.80	0.12		0.044
2	25	10	2000	0.93	0.05		$<10^{-4}$
3	25	20	1000	0.87	0.07		0.0262
4	25	20	2000	0.63	0.19		0.999
5	37	10	1000	0.58	0.04	$p<10^{-4}$	0.97
6	37	10	2000	0.52	0.04		0.46
7	37	20	1000	0.65	0.05		0.997
8	37	20	2000	0.85	0.05		0.007
Equilibrium dialysis							
9	25	-	-	1.56	0.08		$<10^{-4}$

10	37	-	-	0.64	0.04		Reference group

Table 1: design of experiment comparing 8 conditions of ultrafiltration and 2 conditions of equilibrium dialysis. sd: standard deviation. ANOVA: analysis of variance; min: minutes; g: gravitational constant.

Condition	Temperature	Volume (µL) Mean ± sd	ANOVA	Dunnett test (p-value)
1 (1000 g 10 minutes)	25	252 ±16	p=0.006	0.00916
2 (1000 g 20 minutes)	25	264 ±22		0.03541
3 (2000 g 10 minutes)	25	265 ±50		0.03593
4 (2000 g 20 minutes)	25	316 ±29		Reference group
5 (1000 g 10 minutes)	37	257 ±35	$p<10^{-4}$	<0.001
6 (1000 g 20 minutes)	37	289 ±36		0.0210
7 (2000 g 10 minutes)	37	296 ±16		0.0421
8 (2000 g 20 minutes)	37	351 ±26		Reference group

Table 2: results of mean ultrafiltrate volume under different temperature conditions. ANOVA: analysis of variance; g: gravitational constant; sd: standard deviation.

Discussion

In our study, the two most common techniques for studying protein-drug binding were used and compared in order to evaluate DTG in its unbound form. Equilibrium dialysis was used as the gold standard technique[12,13] to identify and set temperature, speed and duration of centrifugation during UF.

Out of the three test parameters, temperature is the parameter most likely to influence unbound fraction results through UF[12,20-28]. However, because temperature could also modify the binding equilibrium[23], UF and ED were both compared in our study at two different temperatures, namely 25 and 37°C. Since it allows approximation of the *in-vivo* condition, 37°C is therefore considered as the reference temperature[12]. Few studies have investigated duration and speed of UF centrifugation on unbound fraction, despite their potential leverage[22,24-26,28]. The influence of these paired parameters on the unbound fraction has been associated with temperature following a full DOE.
Our results showed that temperature is a limiting parameter when exploring DTG protein binding, regardless of the technique used. This has already been mentioned in earlier studies focusing on other drugs[20,22,24,26-28]. I our study, based on ED results, temperature clearly influenced the DTG-protein equilibrium. Drug-protein binding is based on weak non-covalent binding and, as suggested by Berezhkovskiy[29], temperature could change those non-covalent bonds by modifying emthropy energy. However, protein-binding equilibrium is not systematically altered by temperature conditions[21] and the interferences described may be due to analytical devices. Some studies[21,27] showed that temperature conditions affect only UF, and not ED, thereby highlighting specific temperature interference on the UF device. Even if this interference is known, the temperature mechanism in relation to the UF device has not yet been described. In our study, temperature altered the binding equilibrium. Given that the bias between the two methods under different temperature conditions was not the same, it could be deduced that temperature not only affected DTG-protein binding but also the UF device. Since a shift

in ultrafiltrate volume was observed between the two temperature conditions, temperature could be assumed to affect the UF filter. Regardless of the mechanism of the interference, ED and UF must be compared in order to determine whether or not temperature affects the drug protein binding equilibrium or the UF device.
Speed and duration of centrifugation during UF were mainly explored as independent parameters in previous studies[22,24-26,28]. In our study, only the interaction between speed and duration of centrifugation altered DTG unbound fraction results. This result would have been overlooked without a cross analysis of the two factors, which was feasible with the full DOE. Contrary to suggestions put forward by Nilsson[12], our results strongly suggested that a combination of these two UF parameters may impact unbound fraction results. Indeed, Nilsson's suggestions were based on the study carried out by McMillin *et al.*[30]. This study explored the effect of centrifugation time on the results obtained with unbound phenytoin, but without any variation in the centrifugation speed. Moreover, extrapolation of the results recorded by McMillin *et al.*[30] to all kinds of drug proteins is challenging. Dolutegravir and phenytoin could have different drug-protein binding affinities, which are constant for plasma protein, and therefore display different behaviour during UF. In the lead-up to interference mechanism, speed and duration of centrifugation also influenced ultrafiltrate volume. This questions the impact of these conditions on the filter, with ultrafiltered plasma leakage, and/or on the equilibrium of DTG-protein binding at the top of the device. However, our study was not designed to explore this interference at depth and we were unable to explain the mechanism involved. Nevertheless, regardless of the process of interference, it is essential to compare UF bioanalysis validation to ED, as the gold standard technique, in order to avoid the generation of inaccurate results.

Based on these results, UF conditions were set at 37°C, for 10 minutes at 2000 g. To complete results from spiked samples, unbound forms of HIV patient samples were determined by both ED at 37°C and UF at pre-defined conditions. Patient results confirmed determination of the unbound form of DTG by UF. Moreover, two volumes (250 and 500 µL) were evaluated and validated for a routine use on sparse volume samples.
The extraction procedure with the spiked dialysate buffer or ultrafiltrate did not reveal any interference from the solution matrices. This validation was necessary since their composition was relatively different, in particular the dialysate. Sorensen buffer mainly comprises a phosphate buffer whereas UF is a plasma ultrafiltrate, which therefore has a lower phosphate content[31]. However, this validation method is not described in the few articles comparing the two techniques[27] although phosphate buffer could be a major limitation factor for LC-MS techniques due to ion-suppression phenomena[32].
Non-specific binding of our UF method could be considered low[33] and could be attributed to the weak lipophilicity profile of DTG[9,29]. This result was close to that observed with our dialysis technique[16].

Despite promising results from our DOE analysis, there were some limitations in our study. Indeed, we did not explore the effect of higher total DTG concentrations on UF results. However, since (i) unbound fraction results did not vary with total concentrations in HIV patient samples and (ii) albumin physiological levels (close to 650 µM)[12] are more than 50 times higher than the DTG total concentration (9.58 µM for the maximal concentration generally observed, close to 4 mg/L)[7], protein-binding saturation at the standard DTG concentration is unlikely. Unfortunately, this result is not as powerful as performing a DOE evaluation and this interpretation should be taken with caution.
Another limit to our study was the exploration of only two levels for each factor (temperature, speed and duration of UF). Because it does not identify a non-linear relationship between factors (e.g. temperature) and response (unbound fraction result), studying only two levels for each factor in a DOE could not be extrapolated outside the study conditions. However, these limitations did not prevent us from achieving the objectives of our study. Indeed, we were able to describe the parameters limiting

the investigation of unbound forms by UF and highlight conditions for achieving similar results between UF and DE. A full DOE can quickly lead to a large number of assays if several conditions are to be explored. Two levels were explored for each factor, generating 2^n analyses (in our study n=3, so we carried out our analysis under 8 different conditions), whereas exploration of three levels per factor requires a far greater number of assays (3^n, hence 27 in this case). Fractional DOE is one of the alternatives to a full DOE. With fewer experiments, fractional DOE is more convenient from an experimental perspective. However, in our case, this type of DOE could not distinguish independent effects (e.g. temperature) of two-factor interactions (e.g. speed and duration of centrifugation). In light of our results, adopting this methodology would have been a major limitation in our study.

To date, few data are available on DTG unbound forms taken from HIV patients. Using an ED technique, at the same temperature level, Imaz *et al.*[34], showed median fu values similar to ours (0.46% *vs.* 0.44%). On the contrary, Letendre *et al.*[14], who did not describe any device or analytical procedure in their article, observed a higher unbound fraction compared to Imaz *et al.*[34] and our results (fu=0.70% at the sixteenth week). Higher fu values from the Letendre *et al.*[14] study were mainly driven by higher Cu values compared to our results or those from Imaz *et al.*[34], while the Ct values were close to our results. The discrepancy between the published results is similar to that observed in our study between ED and UF without set conditions. This difference raises the issue of an appropriate interpretation of the unbound form of DTG. Indeed, unbound concentrations were measured and used (i) to explain DTG diffusion in the tissues (as CSF, genital organs) and/or (ii) to evaluate drug efficacy by comparing an unbound concentration to an *in-vitro* inhibitory concentration (typically IC50)[14,34]. Then, if the unbound concentration is over-estimated, especially if a UF method is used, the truly effective concentration (unbound) in an anatomical compartment could be misinterpreted. This misreading could introduce a bias in the PK-PD analysis and therefore in the selection of dosing regimen or antiretroviral strategy.

While unbound concentrations have been deemed effective concentrations, PK/PD study is still confined to a relationship between total concentration and viral load, both in terms of kinetics of decrease[3] or rebound of viral load during virological failure[5]. This lack of interest in the unbound form mainly stems from pre-analytical and analytical constraints. Indeed, unbound concentration exploration needs a more technically intensive bioanalytical approach than total concentration measurement[12]. If unbound exploration is necessary, studies are frequently oriented towards the most convenient method, namely UF[13]. From an organisational point of view, this method is simple and quick to use. But, as stressed in our study, UF could exhibit several analytical disadvantages in the form of ultrafiltration issues involving set UF conditions or non-specific binding[12]. Thus, as recommended by several authors[12,13,35,36], it is imperative to validate UF conditions *versus* ED at 37°C for each drug. Many studies explored the unbound form of ARVs, but technical procedures used to measure unbound concentrations were not always described and only a few compared the UF and ED approaches[13]. Lack of validation of the UF procedure could pose a bias to the interpretation of results or to comparison with previous published data. Despite a call from Boffito *et al.*[37], guidelines on the bioanalytical validation of unbound measurements are still needed, as established by FDA or EMEA for total concentrations[38,39]. Recommendations should focus on deficiencies which preclude standardised evaluation of unbound forms. This could be the first step in further PK-PD studies based on the pharmacological active form of a drug.

Conclusion

Our study defines pre-analytical and analytical conditions allowing uniform results of unbound DTG concentrations of between UF and ED. Temperature, speed and duration of UF have been found to be interfering factors, thereby emphasising the interest of simultaneous validation of UF and ED for each investigational drug.

Reference

1. U.S. Department of Health and Human Services. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV*, https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf. (2018).

2. European AIDS Clinical Society. *EACS Guidelines*, http://www.eacsociety.org/files/guidelines_9.0-english.pdf. (2017).

3. Min, S. *et al.* Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of dolutegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults. *AIDS Lond Engl.* **25**,1737–45 (2011).

4. Song, I. *et al.* 16th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV and Hepatitis Therapy. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling & Simulation of the Virologic Response of Dolutegravir in HIV-Infected Patients with Integrase Inhibitor Resistant Virus*, http://www.natap.org/2015/Pharm/Pharm_11.htm (2015)

5. Katlama, C. *et al.* Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia. J. Antimicrob. Chemother. **71**, 2646–2650 (2016).

6. Song, I., Chen, S., Piscitelli, S. & Min, S. *Pharmacokinetics (PK) and PK-pharmacodynamic (PD) relationship of dolutegravir (DTG) in int grase inhibitor (INI)-naïve subjects*, http://www.natap.org/2013/ICAAC/ICAAC_77.htm (2013)

7. Zhang, J. *et al.* Population pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-infected treatment-naive patients. *Br J Clin Pharmacol.* **80**,502–14 (2015).

8. Elliot, E. R. *et al.* Increased dolutegravir peak concentrations in people living with HIV aged 60 and over and analysis of sleep quality and cognition. *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1093/cid/ciy426 (2018).

9. Cottrell, M.L., Hadzic, T. & Kashuba, A.D.M. Clinical pharmacokinetic, pharmacodynamic and drug-interaction profile of the integrase inhibitor dolutegravir. *Clin Pharmacokinet.* **52**,981–94 (2013).

10. Rowland, M., Tozer, T. & Rowland, M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. (Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, 2011).

11. Imaz, A. *et al.* HIV-1-RNA Decay and Dolutegravir Concentrations in Semen of Patients Starting a First Antiretroviral Regimen. J. Infect. Dis. **214**, 1512–1519 (2016).

12. Nilsson, L. B. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. *Bioanalysis.* **5**, 3033–3050 (2013).

13. Illamola, S.M., Hirt, D., Tréluyer, J.M., Urien, S. & Benaboud, S. Challenges regarding analysis of unbound fraction of highly bound protein antiretroviral drugs in several biological matrices: lack of harmonisation and guidelines. *Drug Discov Today.* **20**, 466–74 (2015)

14. Letendre, S.L. *et al.* ING116070: a study of the pharmacokinetics and antiviral activity of dolutegravir in cerebrospinal fluid in HIV-1-infected, antiretroviral therapy-naive subjects. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* **59**, 1032–7 (2014).

15. Pain, J.B. *et al.* Pharmacokinetics of dolutegravir in a premature neonate after HIV treatment intensification during pregnancy. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**, 3660–2 (2015).

16. Metsu, D. *et al.* Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods. *Clin. Chim. Acta.* **479**, 56–65 (2018).

17. Code de la santé publique - Article L1121-1. Code Santé Publique.

18. Code de la santé publique - Article L1121-2. Code Santé Publique.

19. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing (2015)

20. Kodama, H. *et al.* Effect of temperature on serum protein binding characteristics of phenytoin in monotherapy paediatric patients with epilepsy. J Clin Pharm Ther. **26**, 175–9 (2001).

21. 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.* **27**, 166–8 (1981).

22. Kratzer, A., Kees, F. & Dorn, C. Unbound fraction of fluconazole and linezolid in human plasma as determined by ultrafiltration: impact of membrane type. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **1039**, 74–8 (2016).

23. Lunde, P.K., Rane, A., Yaffe, S.J., Lund, L. & Sjöqvist, F. Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man; interaction with other drugs and the effect of temperature and plasma dilution. *Clin Pharmacol Ther.* **11**, 846–55 (1970).

24. Du, P. *et al.* Development and validation of an ultrafiltration-UPLC-MS/MS method for rapid quantification of unbound docetaxel in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **967**, 28–35 (2014).

25. Li, X. *et al.* Determination of the free and total concentrations of vancomycin by two-dimensional liquid chromatography and its application in elderly patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **969**, 181–9 (2014).

26. Kratzer, A., Liebchen, U., Schleibinger, M., Kees, M.G. & Kees, F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: impact of experimental conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **961**, 97–102 (2014).

27. Stove, V. *et al.* Measuring unbound versus total vancomycin concentrations in serum and plasma: methodological issues and relevance. *Ther Drug Monit.* **37**, 180–187 (2015).

28. Kees, M.G., Wicha, S.G., Seefeld, A., Kees, F. & Kloft C. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *J Clin Pharmacol.* **54**, 318–23 (2014).

29. Berezhkovskiy, L.M. On the temperature dependence of the unbound drug fraction in plasma: Ultrafiltration method may considerably underestimate the true value for highly bound drugs. *Drug Discov Ther.* **2**, 74–6 (2008).

30. McMillin, G.A., Juenke, J. & Dasgupta, A. Effect of ultrafiltrate volume on determination of free phenytoin concentration. *Ther Drug Monit.* **27**, 630–3 (2005).

31. Rifai, N. & Horvath, A. R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. (Elsevier, 2017).

32. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).

33. Arellano, C., Gandia, P., Lafont, T., Jongejan, R. & Chatelut, E. Determination of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib, validation of an UPLC-MS/MS assay and ultrafiltration method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **907**, 94–100 (2012).

34. Imaz, A. *et al.* HIV-1-RNA Decay and Dolutegravir Concentrations in Semen of Patients Starting a First Antiretroviral Regimen. J Infect Dis.;214:1512–9 (2016).

35. Zhang, F., Xue, J., Shao, J. & Jia, L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today.* **17**, 475–85 (2012).

36. Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.L., Carrupt, P.A. & Martel, S. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal Bioanal Chem.* **398**, 53–66 (2010).

37. Boffito, M. *et al.* Protein binding in antiretroviral therapies. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **19**, 825–35 (2003).

38. FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.*, https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf (2018).

39. EMA. *Guideline on bioanalytical method validation.*, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (2018).

Additional Information:

Author Contributions

D.M., D.C. and PG devised and designed the study. D.M. and M.A. performed the experiments. D.M., F.F. and A.R. drafted the initial manuscript. T.L., V.G., E.C., P.D. and P.G. reviewed and revised the final manuscript. All of the authors approved the final manuscript as submitted.

Competing interests

D.M. received travel grants and fees from Janssen-Cilag, Gilead Sciences for public speaking. The other authors have no financial or non financial interests to declare.

Annexe 2 – 5: résumé de l'étude sur le DRV visant à déterminer les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats de fraction libre similaires à ceux de la méthode de référence, la dialyse à l'équilibre à 37°C. L'article sur cette thématique doit encore être écrit.

Résumé:

Darunavir therapeutic drug monitoring (TDM) could be improved by determining the unbound concentration, especially in patients experiencing virological failure with suitable total plasma concentration. Equilibrium dialysis (ED) is the gold standard method used to determine the unbound form of a drug, but the prolonged duration of the procedure precludes its use in clinical practice. On the contrary, ultrafiltration is applicable to TDM, but is sensitive to analytical conditions. In order to evaluate unbound concentration through ultrafiltration, conditions and analysis validation were compared to ED. Unbound and total concentrations were measured using a LC-MS/MS method. Three ultrafiltration factors (temperature, speed and duration of ultrafiltration) were explored and compared to ED (25/37°C), using a design of experiment strategy. Applying ANOVA and Dunnett's test, temperature did not modify DRV binding equilibrium for both ED (p=0.116) and UF (p=0.107). However, higher centrifugation speed (2000g) disturbed independtly DRV binding equilibrium and led to higher unbound fraction results (p=0,004), compared to low speed centrifugation (1000 g). Difference in unbound fraction results, based on centrifugation speed, was not associated to significant differences in ultrafiltrate volume (p=0,074). The duration of centrifugation did not modify DRV unbound fraction (p=0,316). Based on this data, ultrafiltration conditions were set at 37°C, 1000g for 20 minutes. Ultrafiltration results depended on analytical conditions, confirming the need to validate against ED to correctly interpret unbound DRV concentrations.

Annexe 2 – 6 : résumé de l'étude sur le ATV visant à déterminer les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats de fraction libre similaires à ceux de la méthode de référence, la dialyse à l'équilibre à 37°C. L'article traitant de cette thématique doit encore être écrit.

Résumé:

Atazanavir therapeutic drug monitoring (TDM) could be improved by determining the unbound concentration, especially in patients experiencing virological failure despite suitable total plasma concentration. Equilibrium dialysis (ED) is the gold standard method used to determine the unbound form of a drug, but the prolonged duration of the procedure precludes its use in clinical practice. On the contrary, ultrafiltration is applicable to TDM, but is sensitive to analytical conditions. In order to evaluate unbound concentration through ultrafiltration, conditions and analysis validation were compared to ED. Unbound and total concentrations were measured using a LC-MS/MS method. Three ultrafiltration factors (temperature, speed and duration of ultrafiltration) were explored and compared to ED (25/37°C), using a design of experiment strategy. Applying ANOVA and Dunnett's test, temperature influenced ATV-protein binding with ED (fu results were 10.5% and 15.1% at 37°C and 25°C, respectively; $p<10^{-3}$). Moreover, none of the UF conditions provided results consistent with ED at 37°C (regardless UF conditions, fu results were all below 7%, compared to 10.5% with ED at 37°C; $p<10^{-3}$). Ultrafiltration conditions were still set at 37°C, 1000g for 20 minutes, to ensure the same UF conditions that dolutegravir and darunavir. Ultrafiltration results depended greatly on analytical conditions.

3. Troisième partie : détermination *in vitro* des interactions portant sur les sites de liaison.

Annexe 2 – 7: résumé de l'étude de la compétition portant sur les sites de liaison aux protéines plasmatiques entre le DTG et d'autres antirétrovirau fortement liés aux protéines plasmatiques. L'article traitant cette thématique doit encore être écrit.

Résumé:

The binding of substances to plasma proteins depends on two parameters, binding affinity (expressed as dissociation constant, Kd) and the number of binding sites (expressed as Bmax). Between subjects variability of these binding parameters has not yet been explored and could lead to a desynchronization between unbound and total concentrations. The purpose of the study was to investigate the binding of DTG when antiretrovirals highly bound to plasma protein-binding are added. The study was conduct using an equilibrium dialysis device. Antiretroviral to combine with DTG were selected according to two criteria: (i) the antiretroviral is currently used in therapeutic strategies in association with DTG and (ii) is expected to compete with DTG plasma protein binding sites. Four antiretrovirals were selected: rilpivirine, darunavir, atazanavir and etravirine. Regardless the antiretroviral added, DTG was systematically removed from its plasma protein binding sites ($p<10^{-3}$). It can be concluded that association with these antiretrovirals may result in desynchronization between DTG unbound and total concentrations.

Annexe 2 – 8: résumé de l'étude de la compétition portant sur les sites de liaison aux protéines plasmatiques entre le DRV et d'autres antirétrovirau fortement liés aux protéines plasmatiques. L'article traitant cette thématique doit encore être écrit.

Résumé:

The binding of substances to plasma proteins depends on two parameters, binding affinity (expressed as dissociation constant, Kd) and the number of binding sites (expressed as Bmax). Between subjects variability of these binding parameters has not yet been explored and could lead to a desynchronization between unbound and total concentrations. The purpose of the study was to investigate the binding of DRV when antiretrovirals highly bound to plasma protein-binding are added. The study was conduct using an equilibrium dialysis device. Antiretroviral to combine with DRV were selected according to two criteria: (i) the antiretroviral is currently used in therapeutic strategies in association with DRV and (ii) is expected to compete with DRV plasma protein binding sites. Three antiretrovirals were selected: etravirine, dolutegravir, raltegravir. Regardless the antiretroviral added, DRV was never removed from its plasma protein binding sites ($p>0.05$). It can be concluded that association with these antiretrovirals may not result in desynchronization between DRV unbound and total concentrations.

Annexe 2 – 9: résumé de l'étude de la compétition portant sur les sites de liaison aux protéines plasmatiques entre le ATV et d'autres antirétrovirau fortement liés aux protéines plasmatiques. L'article traitant cette thématique doit encore être écrit.

Résumé:

The binding of substances to plasma proteins depends on two parameters, binding affinity (expressed as dissociation constant, Kd) and the number of binding sites (expressed as Bmax). Between subjects variability of these binding parameters has not yet been explored and could lead to a desynchronization between unbound and total concentrations. The purpose of the study was to investigate the binding of ATV when antiretrovirals highly bound to plasma protein-binding are added. The study was conduct using an equilibrium dialysis device. Antiretroviral to combine with ATV were selected according to two criteria: (i) the antiretroviral is currently used in therapeutic strategies in association with ATV and (ii) is expected to compete with ATV plasma protein binding sites. Four antiretrovirals were selected: etravirine, dolutegravir, raltegravir. Regardless the antiretroviral added, ATV was never removed from its plasma protein binding sites ($p>0.05$). It can be concluded that association with these antiretrovirals may not result in desynchronization between ATV unbound and total concentrations.

4. Quatrième partie : intérêts de la forme libre dans le suivi thérapeutique pharmacologique des antirétroviraux chez des patients VIH

Annexe 2-10 Article accepté dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Le travail portait sur l'intérêt de l'étude de la forme libre pour l'atazanavir et le darunavir chez les patientes VIH enceinte.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy – Leading article

Antiretroviral unbound concentration during pregnancy: piece of interest in the puzzle?

Running title: Antiretroviral therapeutic drug monitoring during pregnancy

Metsu D.[1,2] ; Toutain P.L. [3] ; Chatelut E. [2,4] ; Delobel P.[5,6] ; Gandia P*[1,3].

Adresses :

1 Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, CHU Toulouse, France ; 2 CRCT, Université de Toulouse, Inserm, UPS, Toulouse, France; 3 Toxalim, Université de Toulouse, INRA, INP-ENVT, Toulouse, France, 4 Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse 5 Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Toulouse, France ; 6 INSERM, UMR1043, Toulouse, France

*Address for correspondence and reprint requests to Dr Peggy Gandia, Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, Centre Hospitalo-Universitaire Purpan, 330 avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse; E-mail: gandia.p@chu-toulouse.fr; Tel:+33(0)567690383 ; Fax : +33 567690384

J Antimicrob Chemother 2017; **72**: 2407–2409
doi:10.1093/jac/dkx176 Advance Access publication 7 June 2017

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Antiretroviral unbound concentration during pregnancy: piece of interest in the puzzle?

D. Metsu[1,2], P. L. Toutain[3], E. Chatelut[2,4], P. Delobel[5,6] and P. Gandia[1,3]*

[1]*Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, CHU Toulouse, Toulouse, France;* [2]*CRCT, Université de Toulouse, INSERM, UPS, Toulouse, France;* [3]*Toxalim, Université de Toulouse, INRA, INP-ENVT, Toulouse, France;* [4]*Institut Claudius-Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France;* [5]*Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Toulouse, Toulouse, France;* [6]*INSERM, UMR1043, Toulouse, France*

*Corresponding author. Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, Centre Hospitalo-Universitaire Purpan, 330 avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse, France. Tel: +33-567690383; Fax: +33-567690384; E-mail: gandia.p@chu-toulouse.fr

Atazanavir and darunavir total concentrations (drug bound to plasma proteins plus unbound drug) progressively decrease during pregnancy. This pharmacokinetic variation leads physicians to recommend increasing doses. Conversely, the unbound concentration (C_u), i.e. the pharmacologically active form of the drug, remains unchanged. The explanation of this desynchronization lies in the fact that the clearance of the unbound form, corresponding to the intrinsic metabolic capacity of the hepatocytes, is the only factor driving C_u, and is constant during pregnancy. The attention of HIV physicians should be attracted to this aspect of pharmacokinetics, which is often incompletely understood and could lead to inadequate dose adjustment, which could then cause overexposure of the foetus for many months, with unknown consequences.

Atazanavir and darunavir are two HIV PIs that are usually combined with ritonavir, which is administered as a pharmacokinetic booster. They are frequently prescribed during pregnancy.[1]

To date, therapeutic drug monitoring has been based on determining total trough plasma concentrations (C_t). These are usually measured just before re-administration of a drug.[2] Many authors described a decrease in C_t during the second (2T) and third trimesters (3T) of pregnancy,[3–12] whereas post-partum values for C_t are similar to those ante-partum; this suggests pregnancy has an effect on atazanavir and darunavir pharmacokinetics. These observations have led authors to propose adjusting drug dosage during pregnancy[1,3–9,11,12] in order to recover the C_t value measured ante-partum or values that are close to those recommended for C_t.

The explanation for these decreasing concentrations lies in the pharmacokinetic characteristics of atazanavir and darunavir. These two PIs are extensively bound (>85%) to plasma proteins and mostly to α-1 acid glycoprotein (AAG).[13,14] From 2T, pregnancy leads to an overall decrease in total plasma protein concentration, including AAG.[15] From a pharmacokinetic standpoint, this physiological phenomenon leads to a decrease in both the bound-drug concentration and the total concentration of bound and unbound (C_u) drugs,[16] where C_u represents the pharmacologically active form that can diffuse into tissues and cells.[17] It should be stressed that a decrease in C_t, in the absence of any alteration to C_u, nevertheless leads to an increase in the unbound fraction (f_u; the ratio of C_u to C_t). This is schematically depicted in Figure 1.

Atazanavir and darunavir are mainly eliminated (>90%) by the liver through hepatic clearance (CL_H).[13,14] They are metabolized by P4503A (CYP3A) cytochromes, which are enzymes that are mainly present in hepatocytes, and have a low hepatic extraction coefficient (EH < 0.3).[13,14] This leads to a CL_H that can be expressed as:

$$CL_H = f_u \times CL_u \quad (1)$$

C_u can be approximated (equations are detailed in the Supplementary data available at *JAC* Online) from the following equation, which describes the average concentration at steady-state:

$$C_u = \text{Dose}/(CL_u \times \tau) \quad (2)$$

where CL_u is the unbound clearance corresponding to the intrinsic metabolic capacity of the hepatocytes and Dose is the maintenance dose administered at dosage interval τ.[17] CL_u, the only factor driving C_u (Equation 2), can increase and decrease with enzyme induction and inhibition, respectively. This is generally caused by drug co-administration or physiological modification. During pregnancy, an increase in the enzymatic activity of CYP3A has been described.[18,19] However, ritonavir, a competitive inhibitor of CYP3A, is usually combined with atazanavir or darunavir: thus, CL_u can be assumed to be unchanged during pregnancy. This is supported by published data, which show no substantial alteration in darunavir C_u.[9,10,12]

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article-abstract/72/9/2407/3863005
by Centre Hospitalier Universitaire de ToulouseCentre Hospitalier Universitaire de Toulouse user
on 03 September 2018

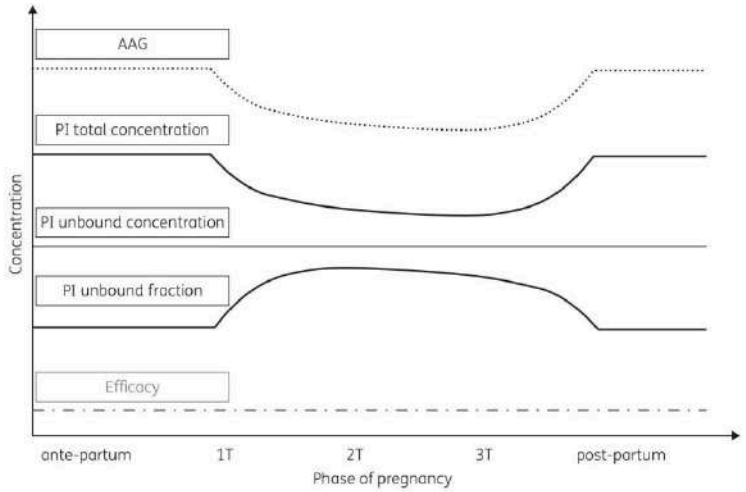


Figure 1. Schematized variations in AAG concentration, total and unbound concentrations of atazanavir and darunavir before, during and after pregnancy. 1T, first trimester of pregnancy; 2T, second trimester of pregnancy; 3T, third trimester of pregnancy.

In summary, the decrease in C_t of PIs with the parallel increase in f_u, while C_u remains unchanged or is slightly decreased, without proportionality with C_t, reflects an increase in CL_H and is directly driven by an increase in f_u (Equation 1). As unbound concentrations are always below the affinity constant for plasma proteins (K_d) at therapeutic doses, the unbound fraction is not dependent on total concentrations.[20–22] Thus, the main factors explaining an increase in f_u are drug–drug interactions (or factors affecting drug affinity for plasma proteins) and a decrease in plasma protein levels. Since CL_u does not change, it is expected that C_u at the steady-state remains unchanged. Because C_u refers to the pharmacologically active form of the drug,[17] unchanged C_u is the pharmacokinetic keystone that ensures virological success. This aspect is particularly important. Unfortunately, although unchanged C_u has been reported for darunavir many times,[9,10,12] no author has yet interpreted the pharmacokinetic processes leading to unchanged unbound exposure while total exposure is modified during pregnancy.

The 'desynchronization' between C_t and C_u in pregnancy is the reason why the pharmacokinetic (C_t)–pharmacodynamic (efficacy or toxicity) relationship is not as obvious in pregnant women, and suggests that a therapeutic range based on unbound exposure should be used. Moreover, this desynchronization between C_t and C_u is usually poorly understood by physicians and may lead to inadequate recommendations,[1,3–9,11,12] which could overexpose the foetus to these drugs for many months, with unknown consequences.

For these two PIs, it may not be necessary to adapt drug dosage in the absence of a phenomenon that alters C_u (i.e. drug metabolic interactions and/or an adherence default). However, the question remains regarding the use of antiretrovirals that have high plasma-protein binding affinities and are not associated with a pharmacokinetic booster (i.e. ritonavir or cobicistat). Indeed, for rilpivirine,[23,24] efavirenz,[25] raltegravir[26] and dolutegravir,[27] authors have recently reported a decrease in C_t, whereas information on C_u is still unavailable. In the absence of a pharmacokinetic booster, it could be hypothesized that the increase in metabolic (CL_u) activity observed during pregnancy leads to a decrease in C_u.

In conclusion, therapeutic drug monitoring of antiretrovirals could be improved during pregnancy by exploring both C_t and C_u, thus optimizing drug dosage.

Transparency declarations

D. M. received travel grants and fees for speaking from Bristol-Myers Squibb, Janssen-Cilag, Gilead Sciences and ViiV Healthcare. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Further details of equations appear as Supplementary data at *JAC* Online.

References

1 Department of Health and Human Services. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. *Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States (updated October 2016)*. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/perinatalgl.pdf.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article-abstract/72/9/2407/3863005
by Centre Hospitalier Universitaire de ToulouseCentre Hospitalier Universitaire de Toulouse user
on 03 September 2018

2 Pretorius E, Klinker H, Rosenkranz B. The role of therapeutic drug monitoring in the management of patients with human immunodeficiency virus infection. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 265–74.

3 Colbers A, Hawkins D, Hidalgo-Tenorio C *et al.* Atazanavir exposure is effective during pregnancy regardless of tenofovir use. *Antivir Ther* 2015; **20**: 57–64.

4 Else LJ, Jackson V, Brennan M *et al.* Therapeutic drug monitoring of atazanavir/ritonavir in pregnancy. *HIV Med* 2014; **15**: 604–10.

5 Kreitchmann R, Best BM, Wang J *et al.* Pharmacokinetics of an increased atazanavir dose with and without tenofovir during the third trimester of pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; **63**: 59–66.

6 Eley T, Bertz R, Hardy H *et al.* Atazanavir pharmacokinetics, efficacy and safety in pregnancy: a systematic review. *Antivir Ther* 2012; **18**: 361–75.

7 Mirochnick M, Best BM, Stek AM *et al.* Atazanavir pharmacokinetics with and without tenofovir during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **56**: 412–9.

8 Stek A, Best BM, Wang J *et al.* Pharmacokinetics of once versus twice daily darunavir in pregnant HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015; **70**: 33–41.

9 Colbers A, Moltó J, Ivanovic J *et al.* Pharmacokinetics of total and unbound darunavir in HIV-1-infected pregnant women. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 534–42.

10 Zorrilla CD, Wright R, Osiyemi OO *et al.* Total and unbound darunavir pharmacokinetics in pregnant women infected with HIV-1: results of a study of darunavir/ritonavir 600/100 mg administered twice daily. *HIV Med* 2014; **15**: 50–6.

11 Lambert J, Jackson V, Else L *et al.* Darunavir pharmacokinetics throughout pregnancy and postpartum. *J Int AIDS Soc* 2014; **17**: 19485.

12 Crauwels HM, Kakuda TN, Ryan B *et al.* Pharmacokinetics of once-daily darunavir/ritonavir in HIV-1-infected pregnant women. *HIV Med* 2016; **17**: 643–52.

13 European Medicines Agency. *Reyataz: EPAR—Product Information, 2017.* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000494/WC500056380.pdf.

14 European Medicines Agency. *Prezista: EPAR—Product Information, 2017.* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000707/WC500041754.pdf.

15 Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* 2001; **33**: 161–235.

16 Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Free drug fraction vs. free drug concentration: a matter of frequent confusion. *J Vet Pharmacol Ther* 2002; **25**: 460–3.

17 Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*, 3rd edn. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 1995; 156–83.

18 Tracy TS, Venkataramanan R, Glover DD *et al.*; National Institute for Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal-Medicine Units. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A activity) during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 633–9.

19 Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B *et al.* Interindividual variability in cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2016; **44**: 343–51.

20 Barrail-Tran A, Mentré 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* 2009; **54**: 614–9.

21 Metsu D, Seraissol P, Delobel P *et al.* Is the unbound concentration of atazanavir of interest in therapeutic drug monitoring? *Fundam Clin Pharmacol* 2017; **31**: 245–53.

22 Metsu D, Seraissol P, Delobel P *et al.* Darunavir unbound fraction association with viral load in HIV patients. In: *Abstracts of the Fourteenth International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Rotterdam, The Netherlands*, 2015. Abstract 237. International Association of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Dublin, OH, USA.

23 Mirochnick M, Best BM, Stek A *et al.* Pharmacokinetics of rilpivirine in HIV-infected women during pregnancy and postpartum. In: *Abstracts of the 22nd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Seattle, WA, USA*, 2015. Abstract #894. International Antiviral Society–USA, San Francisco, CA, USA.

24 Tran AH, Best BM, Stek A *et al.*; IMPAACT P1026s Protocol Team. Pharmacokinetics of rilpivirine in HIV-infected pregnant women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; **72**: 289–96.

25 Olagunju A, Bolaji O, Amara A *et al.* Pharmacogenetics of pregnancy-induced changes in efavirenz pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2015; **97**: 298–306.

26 Blonk M, Colbers A, Hidalgo-Tenorio C *et al.* A comparison of the pharmacokinetics of raltegravir during pregnancy and postpartum. In: *Abstracts of the 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, MA, USA, 2014*. Abstract #890. International Antiviral Society–USA, San Francisco, CA, USA.

27 Schalkwijk S, Feiterna-Sperling C, Weizsäcker K *et al.* Substantially lowered dolutegravir exposure in a treatment-experienced perinatally HIV-1-infected pregnant woman. *AIDS* 2016; **30**: 1999–2001.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article-abstract/72/9/2407/3863005
by Centre Hospitalier Universitaire de ToulouseCentre Hospitalier Universitaire de Toulouse user
on 03 September 2018

Supplementary data

$Cl_H = f_u \times Cl_u$ Eq.1

and assuming $Cl_H = Cl_{total}$ [13,14]

$AUC_{total} = Dose / f_u \times Cl_u$ Eq. 3

Where AUC_{total} is the area under the curve for total plasma concentration over the dosing interval, τ, Dose is the maintenance dosa and Cl_u is the unbound clearance corresponding to the intrinsic metabolic capacities of hepatocytes.[17] Thus the average total (measured) plasma concentration is:

$C_t = AUC_{total} / \tau$ Eq. 4

Similarly

$AUC_{unbound} = Dose / Cl_u$ Eq. 5

And, C_u, the average unbound plasma concentration, in a steady-state condition is:

$C_u = AUC_{unbound} / \tau$ Eq. 6

Where $AUC_{unbound}$ is the area under the curve for unbound plasma concentration over dosing interval, τ, where 'Dose' is the maintenance dosage.

Thus, Eq.2 is extrapolated to the unbound trough concentration to explain the absence of modification to C_u if Cl_u remains unchanged.

$C_u = Dose / Cl_u \times \tau$ Eq.2

Inspection of eqs. 5 and 6 shows that Cl_u, is the only factor that drives C_u (Eq. 2), and that Cl_u can increase or decrease with enzyme induction and inhibition.

Annexe 2-11 Article accepté dans *Fundamental and Clinical Pharmacolgy* portant sur l'étude de la fraction libre de l'atazanavir chez des patients VIH.

Title: Is the unbound concentration of Atazanavir of interest in Therapeutic Drug Monitoring?

Running title: Exploration of Atazanavir unbound concentration.

David Metsu (PharmD) [a,b], Patrick Seraissol (Biomedical Engineer) [a], Pierre Delobel (MD, PhD)[c], Christel Cinq-Frais (PharmD) [d], Lize Cuzin (MD) [e], Jacques Izopet (MD, PhD) [f], Etienne Chatelut (PharmD,PhD) [b], Peggy Gandia (PharmD, PhD) [a,b]

[a] *Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, CHU Toulouse, France*

[b] *CRCT, Université de Toulouse, Inserm, UPS, Toulouse, France*

[c] *Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Toulouse, France*

[d] *Laboratoire de Biochimie, CHU Toulouse, France*

[e] *COREVIH Midi-Pyrénées-Limousin, Toulouse, France*

[f] *Laboratoire de Virologie, CHU Toulouse, France*

Fundamental & Clinical Pharmacology

doi: 10.1111/fcp.12245

ORIGINAL ARTICLE

Is the unbound concentration of atazanavir of interest in therapeutic drug monitoring?

David Metsu[a,b], Patrick Seraissol[a], Pierre Delobel[c], Christel Cinq-Frais[d], Lise Cuzin[e], Jacques Izopet[f], Etienne Chatelut[b], Peggy Gandia[a,b]*

[a]Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, Institut Fédératif de Biologie Purpan, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France
[b]Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopole - CRCT, Université de Toulouse, Inserm, UPS, Toulouse, Midi-Pyrénées, France
[c]Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France
[d]Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie Purpan, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France
[e]COREVIH Midi-Pyrénées-Limousin, Toulouse, France
[f]Laboratoire de Virologie, Institut Fédératif de Biologie Purpan, Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France

Keywords
atazanavir,
therapeutic drug monitoring,
unbound concentration

Received 20 April 2016;
revised 23 August 2016;
accepted 15 September 2016

*Correspondence and reprints:
gandia.p@chu-toulouse.fr

ABSTRACT

To date, therapeutic drug monitoring (TDM) is carried out with antiretrovirals and is usually based on total concentrations (C_t). However, for some patients, TDM does not reflect efficacy or the avoidance of toxicity as is the case for atazanavir (ATV), a HIV protease inhibitor. As the unbound concentration (C_u) is the pharmacological active form, the aim of the study was to evaluate the value of C_u and the unbound fraction (f_u, $f_u = C_u/C_t$) for the TDM of ATV. The variability of C_u and the corresponding f_u of ATV was explored in 43 patients treated with ATV for an average of 13.5 months. C_u was determined by coupling ultrafiltration and liquid chromatography. As ATV is highly bound to alpha-1 acid glycoprotein (AAG), the correlation between f_u and AAG was also evaluated. The viral load was monitored to evaluate the patients' virologic response, while total plasma bilirubin and unconjugated plasma bilirubin were used as biomarkers of ATV toxicity. Median trough C_u and C_t were 37.9 µg/L (Interquartile range (IQR) 20.6–94.9 µg/L) and 628.6 µg/L (IQR 362.7–1078.1 µg/L), respectively. f_u, C_u and C_t showed high variability, but the f_u variability was not correlated with the AAG level. The unbound concentration and fraction were unrelated to the virologic response ($P = 0.21$ and $P = 0.65$ for C_u and f_u, respectively) nor to the unconjugated bilirubin (Pearson correlation coefficient (ρ), $\rho = 0.22$; $P = 0.17$ for C_u). Neither total nor unbound concentrations of ATV fully explained hyperbilirubinaemia or virologic failure. From this study, we conclude that unbound ATV did not appear to be more relevant than C_t.

INTRODUCTION

Atazanavir (ATV) is a human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor, currently used in combination with two nonnucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors [1]. This molecule is widely used because of its high genetic barrier to antiretroviral drug resistance and low metabolic disorders compared to older protease inhibitor [2,3]. However, ATV generates unconjugated hyperbilirubinaemia (UHB) by UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) inhibition [3,4], without hepatotoxicity, which may lower patient compliance [5].

Currently, ATV therapeutic drug monitoring (TDM) is based on total concentration to achieve activity and to avoid ATV UHB [6,7]. Therapeutic drug monitoring in ATV-treated patients is used to individually adapt the dosage in cases of inefficacy, toxicity, compliance issues or drug–drug interactions A threshold, using trough concentration, of 200 µg/L has been set and can be used for ATV with TDM for optimal effectiveness [6,7], while

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

patients with a trough total concentration exceeding 750 μg/L have a higher probability to experiment grade III/IV hyperbilirubinaemia [2,6,7]. To reach effective ATV concentrations, ritonavir can be used as a pharmacokinetic booster, promoting the oral bioavailability of ATV and reducing metabolism [2,3]. Nevertheless, for patients presenting with recommended target concentrations but unexpected therapeutic inefficacy without drug resistance, or to the contrary, toxicity, the relevance of total trough concentrations compared with other TDM parameters, especially the unbound plasma concentration (C_u) and fraction (f_u, $f_u = C_u/C_t$, where C_t is the total concentration), is questioned. Indeed, it is now accepted [8] that the unbound concentration is the pharmacologically (efficacy or toxicity) active form, based on its ability to diffuse into tissues and to pass through cell membranes. Thus, unbound ATV concentration interindividual variability could explain differences in efficacy or toxicity response, despite optimal total concentration. The hypothesis that patients with similar total concentration but with different pharmacodynamic/toxicologic responses due to different unbound concentrations was verified with other drugs [9,10].

Atazanavir is highly bound to plasma proteins, especially to alpha-1 acid glycoprotein (AAG) and to a lesser extent to albumin (plasma protein binding of 86%) [3], resulting in low C_u. AAG is a circulating glycoprotein synthesized by the liver [11]. An inflammatory state as frequently found in HIV-infected patients, as a result of the HIV infection itself or because of opportunistic infections, is known to cause a rapid and significant increase in AAG [11].

Atazanavir pharmacokinetic and total concentrations could vary due to factors such as tenofovir [12] or sex [13]. However, there are only sparse data on both unbound concentration and fraction variability. Today, only Fayet et al. [14] studied the impact of AAG level on ATV unbound fraction.

The aims of the study were to explore C_u and f_u interindividual variability and to evaluate the relevance of C_u and f_u for the TDM of ATV with plasma HIV-1 RNA load and serum bilirubin as biomarkers of efficacy and toxicity, respectively.

METHODS

Patient samples

Over 10 months, the exploration of the interindividual variability of ATV unbound concentrations and fractions was carried out on 47 samples from 43 HIV-1-infected patients, at the Purpan University Hospital of Toulouse (France). During this pilot study, these samples were also used to explore pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK-PD) relationship between the unbound concentration/fraction and the efficacy/toxicity. The study of the ATV unbound concentrations and fractions was carried out on patients treated for an average of 13.5 months (therapeutic steady state). Treatment durations were different but all patients were treated for at least 1 month and measured concentrations were at steady state. ATV, with or without ritonavir, was frequently associated with tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and emtricitabine nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors (demographic parameters, dosing and antiretroviral associations are described in Table S1).

Parameters known to influence ATV concentrations or virologic response were collected: sex [13], ritonavir dose [15] and TDF intake [12]. Because of its induction of UGT1A1, ritonavir intake was also investigated as a factor able to influence unconjugated bilirubin levels [16,17].

Data from the therapeutic drug monitoring of NRTI were collected when available.

Determination of total and unbound ATV plasma concentrations

For each sample, both total and unbound ATV plasma concentrations were measured. Total plasma concentration, as a current marker of TDM, was determined in the Laboratory of Pharmacokinetics and Toxicology (Purpan University Hospital) by a routine HPLC-UV method as part of patients' medical follow-up (no informed consent required) and was communicated to the staff of the Infectious Diseases Department for dose adjustment if necessary.

Blood samples were collected into lithium-heparinized tubes and centrifuged for 10 min at 2000 *g*. The supernatants were frozen at −20 °C until assay. Plasma was thawed at ambient temperature to determine total and unbound ATV concentrations.

Total and unbound ATV concentrations were determined applying an adapted HPLC-UV DAD method [18], with a lower limit of quantification of 10 μg/L. This lower limit has been reached using a large plasma volume for ultrafiltration (500 μL), a high injection volume (100 μL) and harnessing the molecules' maximum absorbance (254 nm) under our working conditions. The precision and accuracy, expressed as the coefficient of variation calculated by dividing the

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

standard deviation by the corresponding mean, were under 10% for each quality control concentration (concentration (precision; accuracy): 37.5 µg/L (4.5%; 106.1%), 750 µg/L (4.8%; 108.4%) and 1500 µg/L (5.4%; 107.4%) and 0.375 mg/L (3.6%; 90.7%), 7.5 mg/L (3.47%; 94.9%) and 15 mg/L (11.01%; 97.8%) for unbound and total concentration, respectively). Analytical validation followed European Medical Agency guidelines on bioanalytical method validation and met all required quality criteria [19].

Unbound concentrations were determined as follows. Briefly, 500 µL of patient's plasma was added to the Centrifree® YM-30 (Merck Millipore®, Darmstadt, Germany) sample reservoir after thawing the plasma samples at ambient temperature. Ultrafiltration devices were then centrifuged for 30 min at 2000 *g*, 20 °C. The total ultrafiltrate collected in the filtration collection cup was analysed using the same HPLC-UV method as for total ATV concentrations. Unbound fractions (f_u expressed in %) were calculated by dividing unbound concentrations by corresponding total concentrations.

As the vast majority of ATV blood samples ($n = 29$) were collected far from the trough sampling time, a POPPK approach was supplied to estimate the whole concentrations and particularly trough concentrations to explore the PK-PD relationship. Population pharmacokinetic approach was based on the combination of two validated and published population pharmacokinetic models [20,21] (for more details, see http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?rubrique41). Based on the fact that (i) ATV presents a high correlation between unbound and total concentrations for total concentrations ranging from 168 to 2940 µg/L, through the entire dosing interval, with a constant f_u [14], and (ii) all our patients had measured total concentrations included in this dosing interval, for each estimated trough total concentration, we determined the corresponding trough unbound concentration applying the formula $C_u = f_u * C_t$. Relationship between unbound fraction and sampling times was reported in Figure S1 of the supplemental data.

Determination of alpha-1 acid glycoprotein, bilirubin concentrations and viral load

Alpha-1 acid glycoprotein was determined in the same plasma samples as the unbound PI concentrations using a turbidimetric-specific reaction (BN Prospec®, Siemens HealthCare®, München, Germany). The analytical measurement range was 0.19–6 g/L, and the reference interval was 0.5–1.2 g/L [22].

Total bilirubin and conjugated bilirubin in plasma were quantified on a clinical chemistry system using a colorimetric reaction (Olympus Corporation®, Tokyo, Japan). Unconjugated bilirubin was then calculated by the following formula: unconjugated bilirubin (µM) = total bilirubin (µM) – conjugated bilirubin (µM). The lower limit of quantification for total and conjugated bilirubin was 0.68 µM and 0.24 µM, respectively. Plasma bilirubin values were also recorded before starting ATV treatment.

HIV RNA concentrations were determined on a COBAS AmpliPrep® coupled with a COBAS TaqMan HIV-1 Test® (Roche Diagnostic, Hoffman-La Roche®, Bale, Switzerland). The gag p41 gene was targeted by the primer, and the TaqMan fluorescence-tagged primers amplified HIV-1 RNA. The analytical measurement range was 1.3–7.0 log10 copies/mL. Virologic failure was defined by a positive viral load (more than 20 copies/mL). On the contrary, virologic success was defined by an undetectable viral load (<1.3 log10 copies/mL). Viral load was measured on 35 samples.

Statistics

Statistical analysis was performed using the Stata software package (version 13; StataCorp LP®, College Station, TX, USA). Median and interquartile ranges (IQR 25th–75th) were determined for total and unbound plasma concentrations, unbound plasma fractions, viral load and AAG levels. Univariate correlations were investigated using Spearman's rank correlation coefficients. Chi-square, with Yates correction if necessary, was used to compare groups, and a Wilcoxon–Mann–Whitney test was applied to compare differences between patients. All the statistical tests were two-sided and considered as significant for a *P*-value less than 0.05.

RESULTS

Pharmacokinetics and pharmacodynamics results

Median with interquartile range, TDM (f_u, C_u, C_t and AAG) and pharmacodynamic (viral load and unconjugated bilirubin) parameters are reported in *Table I*. A trend was observed between f_u and total concentrations ranging from 75.0 to 3184.5 µg/L (*Figure 1a*). The unbound fraction was independent of AAG for levels ranging from 0.30 to 1.89 g/L (*Figure 1b*). There was a good correlation between total and unbound concentrations (*Figure 1c*).

Most of the patients (77%) were on 300 mg *qd* of atazanavir, boosted with 100 mg *qd* of ritonavir, associated with a TDF 245-mg/emtricitabine 200-mg

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Table 1 Median 25th and 75th percentiles of unbound fractions, unbound concentrations, total concentrations, alpha-1 acid glycoprotein, viral load and unbound bilirubin for atazanavir.

	Total (n = 47)			Undetectable VL (n = 22)			Positive VL (n = 13)			Ranked test (P value) between
ATV	Median	IQR 25%	IQR75%	Median	IQR 25%	IQR75%	Median	IQR 25%	IQR75%	undetectable and positive groups
f_u (%)	3.8	2.8	4.5	3.4	2.8	5.0	3.8	3.4	4.4	0.65
C_u (µg/L)	37.9	20.6	94.9	51.2	22.3	113.0	36.3	23.3	57.9	0.21
C_t (µg/L)	628.6	362.7	1078.1	746.2	330.1	1648.7	541.4	275.0	804.0	0.19
AAG (g/L)	0.85	0.76	0.99	0.82	0.70	0.99	0.86	0.77	0.95	0.51
UB (µM)	30.8	16.6	46.4	30.8	16.8	54.0	36.3	23.3	43.5	Not calculated
VL (log_{10}/mL)	47 samples with measured VL			Not applicable			1.87	1.54	2.61	Not applicable

ATV, atazanavir; n, sample number; IQR, interquartile range; f_u, unbound fraction; C_u, unbound concentration; C_t, total concentration; AAG, alpha-1 acid glycoprotein; VL, viral load; UB, unbound bilirubin.

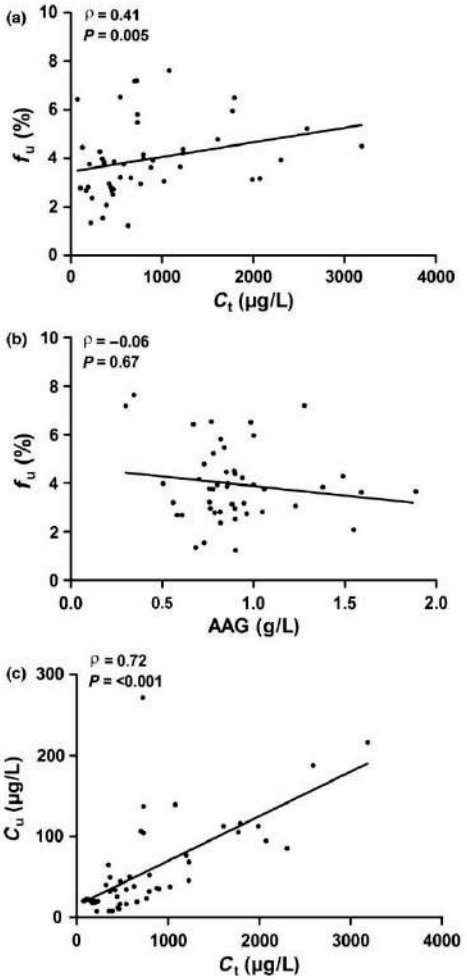


Figure 1 Exploration of the variability of the free form of atazanavir: (a) unbound fraction vs. trough concentrations; (b) alpha-1 acid glycoprotein vs. unbound fraction; (c) total vs. unbound concentrations.

combination regimen. The median age and treatment duration were 44.9 years and 13.5 months, respectively. Complete demographic data are in the supplementary data, Table SI.

The influence of sex, ritonavir and TDF intake is reported in *Table II*. Apart from ritonavir association,

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Table II Median (interquartile range 25%;75%) of total and unbound concentrations of ATV, unbound fraction, alpha-1 acid glycoprotein; viral load and unconjugated bilirubin ranking by gender, ritonavir or tenofovir disoproxil fumarate administration.

	n samples	C_t (µg/L)	C_u (µg/L)	f_u (%)	AAG (g/L)	Positive VL	UB
Gender							
Male	32	619.2 (359.7; 1065.9)	35.8 (20.5; 79.1)	3.6 (2.9; 4.3)	0.87 (0.78; 1.01)	14/32	/
Female	15	628.6 (406.6; 937.6)	40.3 (27.4; 106.2)	4.2 (3.2; 4.9)	0.78 (0.60; 0.90)	6/15	/
P-value	/	0.88	0.52	0.28	0.059	0.94	/
RTV-regimen							
yes	36	725.1 (468.2; 1115.4)	45.4 (30.2; 104.8)	3.9 (3.0; 3.9)	0.84 (0.75; 0.95)	15/36	28 (15.1; 42.2)
no	11	203.3 (147.9; 414.5)	22.32 (19.7; 29.2)	3.1 (2.8; 3.8)	0.85 (0.73; 1.01)	5/11	42.5 (27; 48.7)
P-value	/	0.0027	0.0446	0.14	0.60	0.90	0.17
TDF-regimen							
yes	34	541.4 (363.0; 894.7)	35.8 (20.2; 67.9)	3.9 (2.9; 4.4)	0.86 (0.77; 0.98)	16/34	/
no	13	698.4 (419.3; 1200.0)	38.7 (22.9; 106.9)	3.2 (3.0; 4.8)	0.79 (0.67; 0.90)	4/13	/
P-value	/	0.75	0.43	0.67	0.30	0.49	/

ATV, atazanavir; RTV, ritonavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; n, samples; IQR, interquartile range; f_u, unbound fraction; C_u, unbound concentration; C_t, total concentration; AAG, alpha-1 acid glycoprotein; VL, viral load; UB, unbound bilirubin.

neither sex nor TDF had an impact on ATV TDM parameters.

Because C_t and C_u were different between patients with or without ritonavir, these parameters were compared in a homogeneous group of patients under an ATV-boosted regimen. Total concentrations (median concentrations in groups with and without virologic failure, respectively: 578.5 vs. 793.7 µg/L; $P = 0.336$, C_u (38.7 vs. 52.7 µg/L; $P = 0.279$) and f_u (3.8 vs. 4.0%; $P = 0.395$) were, as in the overall study population, not statistically different between patients with and without virologic failure.

Alpha-1 acid glycoprotein (range; median) was measured (0.30–1.89 g/L; 0.85 g/L).

The relationship between ATV concentrations and virologic response

Table I contains patients' TDM parameters. Comparison of the TDM parameters was carried out according to the viral load (patients with vs. without virologic failure). No resistance-associated mutations were observed, according to the French National Agency for AIDS Research (ANRS) algorithm [23].

The therapeutic drug monitoring of nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors backbone has been performed for some patients (9 of 19 patients with virologic failure), without suboptimal concentration (data not shown).

Bilirubin levels in ATV-treated patients

Each case of total hyperbilirubinaemia (42 samples from 38 patients) was associated with UHB. No patients showed UHB before starting the ATV regimen. A trend was seen between trough ATV C_t and UHB levels but not for trough C_u (*Figure 2*). Relationship between both total and unbound concentration and total bilirubin was explored, and only total concentration explained total bilirubin level ($\rho = 0.13$, $P = 0.38$, and $\rho = 0.41$, $P = 0.004$, for unbound and total ATV concentration, respectively; data not shown).

DISCUSSION

To improve TDM in ATV-treated HIV-infected patients, we have explored the unbound concentration (C_u) and fraction (f_u) of a widely used PI in patients' plasma, using ultrafiltration coupled to HPLC-UV analysis.

To date, the two methods most commonly used to determine unbound plasma concentrations are equilibrium dialysis and ultrafiltration. Ultrafiltration generally has the advantage over equilibrium dialysis, being a less time-consuming process, and therefore likely to have a higher throughput in a clinical laboratory.

Based on a similar protocol, Fayet et al. [14] obtained greater values with a mean f_u of 9.6% and a corresponding CV of 25%. One factor that could explain such a difference is AAG levels. Fayet et al. [14] observed AAG levels ranging from 0.4 to 1.7 g/L, without proposing a mean or a median level to compare to our results. However, categorized AAG levels in Fayet's study showed that 91% (41/45) of patients had AAG level below 1 g/L. In the other hand, 19% (9/47) of our population presented AAG levels above 1 g/L, while being in the reference interval (i.e., 0.5–1.2 g/L) [22]. Therefore, in our study, AAG level was higher in

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

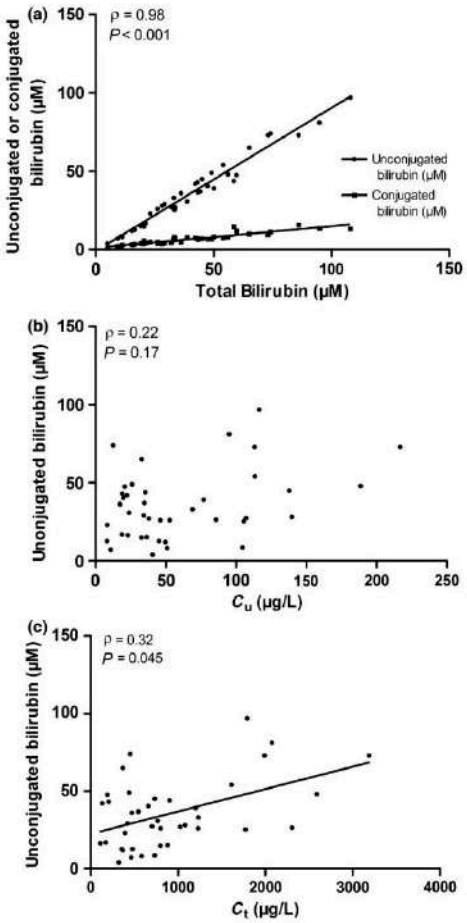


Figure 2 Hyperbilirubinaemia under atazanavir treatment: (a) unconjugated or conjugated bilirubin vs. total bilirubin, (b) unconjugated bilirubin vs. unbound concentration (C_u), (c) unconjugated bilirubin vs. total concentrations (C_t).

a significant proportion compared to Fayet's study. Nevertheless, a higher AAG level results in a higher number of protein-binding sites (B_{max}) and therefore a lower unbound fraction [24]. Thus, AAG levels and low interindividual variability observed in our study could explain (i) lower f_u values compared with Fayet's data [14] and (ii) the lack of correlation between AAG levels and f_u in our study. Nevertheless, antiretroviral strategy and demographic data were not described in Fayet's study, raising questions about the reasons for such a difference compared with our study. Venuto et al. [13] reported a significant difference for total concentrations between male and female patients with HIV infection under ATV treatment, although this was not the case in our study, either for total or unbound concentrations. Although TDF is known to decrease ATV exposure [12], both total and unbound concentrations were not statistically different between patients with and without TDF co-administration. However, ritonavir administration led to significant differences for both total and unbound concentrations compared with patients not receiving ritonavir, but without influencing f_u. Therefore, it remains difficult to justify such a difference between Fayet's [14] results and our data. More recently, Delille et al. [25], using equilibrium dialysis, reported very similar f_u values to ours (2.7 vs. 3.8% in our study) with a comparable therapeutic strategy (ATV 300 mg *qd*, ATV-boosted regimen by ritonavir and TDF intake), confirming the necessity to describe the analytical process and the population when exploring the unbound fraction.

Other factors supposed to impact on unbound fraction were antiretroviral co-administrations.

In clinical practice, ritonavir is used as a pharmacokinetic booster and is known to increase ATV total concentrations [3,26]. In our study, total as well as unbound concentrations were higher in patients with a regimen including ritonavir. However, unbound fractions of ATV were similar with or without ritonavir co-administration, pointing a lack of ritonavir effect on ATV unbound fraction.

Tenofovir interaction (as perpetrator) on ATV pharmacokinetics has not been fully demonstrated yet. Indeed, conflicting results have been published [12,27]. Based on our observed results, tenofovir did not influence unbound fraction of ATV. Thus, it is unlikely that the heterogeneity of associated treatments has led to interindividual variability of unbound fraction.

Moreover, co-administered antiretrovirals have low plasmatic protein binding (0.7 to 44% and 76% for nucleos(t)idic reverse transcriptase inhibitors and maraviroc, respectively) [28–32], excepted for raltegravir (>80%), that is mainly bound to albumin and not AAG [33]. Consequently, no binding interaction can be expected.

One of the aims of this study was to find a TDM marker, as a substitute for total concentration currently used for ATV drug monitoring. Indeed, virologic failures can be

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

observed despite 85% of the total concentrations were considered efficient while no resistance-associated mutations were observed. However, there was no significant difference between patients with and without virologic failure in the case of both f_u and C_u. Based on the values (therapeutic drug monitoring of nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors) reported for the nine patients with virologic failure, it could be expected that observed virologic failures were not related to inadequate exposure of nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors backbone. But, because ATV total concentrations only reflect compliance last days before sampling, it should take account that observed virologic failure could be a consequence of overall inobservance. Because our work was a pilot study, small sample size or missing data on co-administrated antiretroviral pharmacokinetic exposure could be a limitation to fully interpret the ATV PK-PD relationship.

Recently, D'Avolio et al. [34] explored ATV intracellular concentrations. The authors reported a trend between the ratio of intracellular to plasma total concentrations and P-glycoprotein polymorphism (i.e., *ABCB1* rs1045642 and *ABCB1* rs1128503) with an increase in the ratio when P-glycoprotein is less active. The intracellular concentration is particularly interesting as this is the concentration in direct contact with the virus. Thus, an exploration of both unbound plasma and intracellular concentrations should provide information on variability transmembrane transport of ATV and probably on ATV efficacy.

To evaluate the actual impact of the ATV concentration on hyperbilirubinaemia, the study was focused on unconjugated bilirubin, as this biological parameter is impacted by competitive ATV inhibition of UGT1A1 [4]. To discern unbound hyperbilirubinemia previous atazanavir treatment, as a Gilbert syndrome (UGT1A1*28 polymorphism), unconjugated bilirubinemia was measured before starting treatment to exclude them from the data analysis. However, none of our patients was concerned, while published data reported an incidence of 12% [35]. Thus, in our study, UHB was not explained by UGT1A1 polymorphism.

A relationship between both unconjugated and total bilirubin and C_t ($\rho = 0.32$, $P = 0.045$ and $\rho = 0.41$, $P = 0.004$; for unconjugated and total bilirubin, respectively) but not for C_u ($\rho = 0.22$, $P = 0.17$ and $\rho = 0.13$, $P = 0.38$; for unconjugated and total bilirubin, respectively) was observed. To our knowledge, this is the first time that the correlation with unconjugated bilirubin has been explored while usually studies focused on the total bilirubin. According total concentration and bilirubinaemia relationship, these results were similar to those of Gervasoni et al. [26] who studied the relationship between the ATV total concentration and total bilirubin and proposed a TDM-driven adjustment in ATV dosage.

The lack of a strong relationship between C_u, the pharmacologically active form of ATV, and bilirubin concentration could be explained by many factors besides UGT1A1 inhibition. Indeed, unbound bilirubin transport from the extracellular medium into the hepatocyte cytoplasm is based on influx transporter proteins such as OATP1B1 (also called OATP-C), which is inhibited by some protease inhibitor (ATV, lopinavir and ritonavir) [36–38]. However, this inhibition cannot single-handedly explain unconjugated hyperbilirubinaemia as lopinavir or ritonavir does not generate UHB despite similar Ki for OATP1B1 (Ki,ATV=1.5 μM, Ki, lopinavir=0.5 μM and Ki,ritonavir=1.4 μM) [36]. Our hypothesis is that simultaneous inhibition or polymorphism of OATP1B1 [39] associated with inhibition of UGT1A1 by ATV induces a significant increase in unconjugated bilirubin levels. It could also be hypothesized that this effect is amplified by intracellular accumulation of ATV. Indeed, ATV efflux is based on P-glycoprotein and multidrug resistance protein 2 (MRP2), suggesting that inhibition or polymorphism of efflux transporters could contribute to an ATV accumulation [40,41]. The pharmacogenetics must be examined on a larger population to confirm this hypothesis.

CONCLUSION

To conclude, observed interindividual variability for both unbound concentration and fraction was not explained by any explored parameter. Unbound plasmatic concentration and fraction of ATV did not improve TDM in either effectiveness or safety, probably due to an insufficient sample size and a lack of variability in AAG levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Pr. J. Woodley and to Pr. D. Concordet for help with the English language and statistics, respectively.

REFERENCES

1 EACS Executive committee. European AIDS Clinical Society guidelines for the clinical management and treatment of HIV-

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

infected adults. (2015). Available at: http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8_0-english_web.pdf. Last accessed April 2016
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** 1035–1050.
3 European Medicines Agency (2016). Reyataz: EPAR - Product Information. [Online]. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000494/WC500056380.pdf. Last accessed April 2016
4 Zhang D., Chando T.J., Everett D.W., Patten C.J., Dehal S.S., Humphreys W.G. 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** 1729–1739.
5 Smith D.E., Jeganathan S., Ray J. Atazanavir plasma concentrations vary significantly between patients and correlate with increased serum bilirubin concentrations. HIV Clin. Trials (2006) **7** 34–38.
6 Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts rapport 2013 sous la direction du Philippe Morlat et sous l'égide du CNS et de l'ANRS. http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf. Last accessed April 2016. (In French.)
7 Cleijsen R.M., van de Ende M.E., Kroon F.P. et al. Therapeutic drug monitoring of the HIV protease inhibitor atazanavir in clinical practice. J. Antimicrob. Chemother. (2007) **60** 897–900.
8 Barrail-Tran A., Mentré 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** 614–619.
9 Florent A., Gandia P., Seraissol P., Chatelut E., Houin G. Determination of plasma unbound fraction of voriconazole in patients treated with a prophylactic or a curative treatment. Ther. Drug Monit. (2014) **36** 752–758.
10 Gandia P., Arellano C., Lafont T., Huguet F., Malard L., Chatelut E. 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** 531–536.
11 Israili Z.H., Dayton P.G. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metab. Rev. (2001) **33** 161–235.
12 Taburet A.M., Piketty C., Chazallon C. et al. Interactions between atazanavir-ritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob. Agents Chemother. (2004) **48** 2091–2096
13 Venuto C.S., 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** 3300–3310.
14 Fayet A., Beguin A., de Tejada B.M. 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** 511–522.
15 Bertz R.J., Persson A., Chung E. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atazanavir-containing antiretroviral regimens, with or without ritonavir, in patients who are HIV-positive and treatment-naïve. Pharmacotherapy (2013) **33** 284–294.
16 Food and Drug Association (2016). Norvir – Product Information. [Online]. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020945s028lbl.pdf. Last accessed April 2016.
17 Smith C.M., Faucette S.R., Wang H., LeCluyse E.L. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. J. Biochem. Mol. Toxicol. (2005) **19** 96–108.
18 Remmel R.P., Kawle S.P., Weller D., Fletcher C.V. Simultaneous HPLC assay for quantification of indinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir in human plasma. Clin. Chem. (2000) **46** 73–81.
19 European Medicines agency, guideline on bioanalytical method validation, 21 July 2011
20 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** 1233–1243.
21 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. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. (2013) **62** 60–66.
22 Dati F., Schumann 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 the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1996) **34** 517–520.
23 ANRS (2014) HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms. Available at: http://www.hivfrenchresistance.org/2014/Algo2014.pdf. Last accessed April 2016.
24 Toutain P.L., Bousquet-Mélou A., Free drug fraction vs. free drug concentration: a matter of frequent confusion. J. Vet. Pharmacol. Therap (2002) **25** 460–463
25 Delille C.A., Pruett S.T., Marconi V.C. et al. Effect of protein binding on unbound atazanavir and darunavir cerebrospinal fluid concentrations. J. Clin. Pharmacol. (2014) **54** 1063–1071.
26 Gervasoni C., Meraviglia P., Minisci D. et al. Metabolic and kidney disorders correlate with high atazanavir concentrations in HIV-infected patients: is it time to revise atazanavir dosages? PLoS ONE. (2015) **10** e0123670

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

27 Fournier C., Higgins N., Thomas R. et al. Negligible effect of tenofovir on atazanavir trough concentrations and genotypic inhibitory quotients in the presence and absence of ritonavir. Ther. Drug Monit. (2013) **35** 264–269.
28 Abel S., Back D.J., Vourvahis M. Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions. Antivir. Ther. (2009) **14** 607–618.
29 European Medicines Agency (2016). Viread: EPAR - Product Information. [Online]. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000419/WC500051737.pdf. Last accessed June 2016.
30 European Medicines Agency (2016). Emtriva: EPAR - Product Information. [Online]. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000533/WC500055586.pdf. Last accessed June 2016.
31 European Medicines Agency (2016). Ziagen: EPAR - Product Information. [Online]. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000252/WC500050343.pdf. Last accessed June 2016.
32 European Medicines Agency (2016). Epivir: EPAR - Product Information. [Online]. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000107/WC500027567.pdf. Last accessed June 2016.
33 Barau C., Furlan V., Yazdanpanah Y. et al. Characterization of binding of raltegravir to plasma proteins. Antimicrob. Agents Chemother. (2013) **57** 5147–5150.
34 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** 3061–3066.
35 Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C. et al. Oude Elferink R.P., Chowdhury N.R. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N. Eng. J. Med. (1995) **333** 1171–1175.
36 Annaert P., Ye Z.W., Stieger B., Augustijns P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. Xenobiotica (2010) **40** 163–176.
37 Campbell S.D., de Morais S.M., Xu J.J. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. Chem. Biol. Interact. (2004) **150** 179–187.
38 Smith N.F., Figg W.D., Sparreboom A. Role of the liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. (2005) **1** 429–445.
39 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.
40 Bleasby K., Castle J.C., Roberts C.J. 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** 963–988.
41 Michaud V., Bar-Magen T., Turgeon J., Flockhart D., Desta Z., Wainberg M.A. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition. Pharmacol. Rev. (2012) **64** 803–833.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Figure S1 Unbound fraction through sampling interval. Full line, thin and thick scattered lines represent median unbound fraction and 25 and 75% interquartile range, respectively.

Table SI Demographic parameters and treatment characteristics in the study population. ATV: atazanavir; *qd*: once a day; *bid*: twice a day; ART: anti-retrovirals; TDF: tenofovir disproxyl fumarate; FTC: emtricitabine; ABC: abacavir; 3TC: lamivudine; RAL: raltegravir; MRV: maraviroc.

© 2016 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

5. Cinquième partie : Etude (i) des relations entre les concentrations libres et totales de DRV chez des patients VIH par une approche de pharmacocinétique de population et (ii) de l'exposition du DRV dans le compartiment liquide cérébro-spinal par des simulations de Monte-Carlo.

Annexe 2-12 Article portant sur le travail de modélisation, combinant les concentrations libres et totales, en fin de rédaction, dont la soumission est prévue dans le *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy – Original article

Darunavir unbound concentrations in plasma is the relevant concentration to predict darunavir efficacy in subject of different body mass index.

Running title:

Darunavir unbound concentration: A way to explain virological failure during monotherapy?

Metsu D[1,2], Woillard JB[3,4], Concordet D[5], Toutain PL[5,8], Seraissol P[1], Debord J[3], Marquet P[3,4], Chatelut E[2], Delobel P[6,7], Gandia P*[1,5].

1. Department of Pharmacokinetic and Toxicology, University Hospital of Toulouse, France

2. INSERM, CRCT, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

3. Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance, University Hospital of Limoges, France

4. INSERM, UMR 850, University of Limoges, France

5. INTHERES, INRA, ENVT, Université de Toulouse, France

6. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Toulouse, France

7. INSERM, UMR1043, Toulouse University, UPS, Toulouse, France

8- The Royal Veterinary College, Hawkshead Campus, Hatfield, Herts., AL9 7TA, United Kingdom

Résumé de l'article:

Background: Commonly used in combination antiretroviral therapy, darunavir (DRV) is a highly bound drug to plasma protein. The unbound DRV plasma concentration (C_u) is the driving concentration controlling pharmacological effects. We tested the hypothesis than C_u could be more relevant than the total DRV plasma concentration (C_t) to monitor DRV regimen, especially in the context of a monotherapy.

Methods: A non-parametric (Pmetrics® R-package) population pharmacokinetic model was developed to analyse simultaneously the dispostion of paired measured C_u and C_t of 67 samples from 57 HIV patients. Based on developed model and on the cerebrospinal fluid (CSF)/plasma unbound concentration published ratio, Monte Carlo simulations were performed to predict patients $C_{u,CSF}$. The targeted DRV exposures were the $C_{u,CSF}$ above the DRV IC_{50} and IC_{90}, to get 100% of the time above HIV wild type inhibitory concentration 50 (IC_{50}) of 0.7 nM or 90 (IC_{90}) of 4nM in the CSF during 12h or 24h (according to dosage regimen).

Results: A one-compartment model, with first order elimination described adequately the C_u and C_t disposition. Body-mass index (BMI) improved the likelihood through an influence on DRV intrinsic clearance and dissociation constant of DRV for plasma protein. Probability of target attainments of $C_{u,CSF}$ above selected IC_{50} or IC_{90} , respectively, ranged between 84.0-99.7% and 28.5-99.1% for DRV in CSF, depending on BMI, DRV dosing regimen and the selected $C_{u,}$ CSF/plasma ratio.

Conclusion: Our population model showed that C_u provided more information than C_t alone on DRV pharmacokinetics. Moreover, most of patients with high BMI appear to get insufficient $C_{u,CSF}$ to achieve effectiveness target (above IC_{50} or IC_{90} during the whole interdose). Undergoing DRV monotherapy, that sub-population of patients may be at risk of virological failure.

Résumé

Le suivi thérapeutique pharmacologique des antirétroviraux du VIH est actuellement basé sur le suivi des concentrations totales. Des relations entre les concentrations totales des antirétroviraux et leur efficacité ont été mises en évidence dans plusieurs études. Cependant, certains échecs virologiques ne sont pas expliqués par la concentration totale. Il existe donc un intérêt à rechercher un autre marqueur d'exposition pour expliquer ces situations d'échec virologique.

La concentration libre, non liée aux protéines plasmatiques, est considérée comme la forme pharmacologiquement active. Elle est capable de diffuser dans les tissus et de traverser les membranes des cellules pour exercer une activité pharmacologique. Le dolutegravir, le darunavir et l'atazanavir sont fortement liés (supérieur à 85%) aux protéines plasmatiques. Ainsi, seule une faible proportion de concentration libre est disponible pour exercer une activité pharmacodynamique. Il est donc possible qu'une variabilité de la concentration libre, non perçue avec la concentration totale, puisse expliquer une différence d'efficacité entre des patients présentant des concentrations totales identiques. A ce jour, peu d'études ont explorées la forme libre des antirétroviraux, aussi bien d'un point de vue technique que d'un point de vue pharmacocinétique.

Ainsi, les objectifs de l'étude de la forme libre des trois antirétroviraux ont été construits en quatre étapes successives :

(i) valider une méthode de séparation de la forme libre de la forme liée et une méthode de dosage assurant une évaluation fiable des concentrations libres et totales

(ii) comparer les techniques de dialyse à l'équilibre et d'ultrafiltration, en déterminant les conditions analytiques garantissant des résultats comparables entre les deux techniques

(iii) étudier les caractéristiques des liaisons des antirétroviraux aux protéines plasmatique

(iv) étudier les relations entre les concentrations libres et totales en DRV chez les patients VIH par une méthode de pharmacocinétique de population

Nous avons d'abord exploré les étapes pré-analytiques susceptibles d'interférer sur la liaison antirétroviral-protéine par dialyse à l'équilibre. Ainsi, nous avons démontré que les liaisons des antirétroviraux aux protéines plasmatiques n'étaient pas sensibles aux conditions pré-analytiques (*Metsu et al Clinica Chimica Acta 2018*).

Nous avons ensuite établit les conditions d'ultrafiltration assurant des résultats identiques à ceux de la dialyse à l'équilibre. Dans cette seconde partie, nous avons pu démontrer que les facteurs d'ultrafiltration peuvent considérablement modifier les résultats d'ultrafiltration (*Metsu et al soumis dans Scientific Reports*).

Nous avons également exploré les facteurs de variabilité de la liaison protéique (*Metsu et al IWCPAT 2017*). Ce travail a ainsi révélé une sensibilité du dolutegravir aux interactions de compétition sur la liaison protéique avec d'autres substances fortement liées à l'albumine. Les liaisons du darunavir et de l'atazanavir n'étaient pas impactées par les interactions. A partir de données forme libre de la littérature et de variations des concentrations en protéines plasmatiques, nous avons proposé des recommandations posologiques pour l'atazanavir et le darunavir chez les femmes enceintes (*Metsu et al Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2017*).

Des travaux de pharmacocinétique de population, combinant les mesures de concentrations libres et totales chez des patients VIH, ont ensuite été menés. Le premier modèle a été construit à partir des données du darunavir. Dans ce travail, un IMC élevé s'est révélé être une covariable explicative majeure dans la pharmacocinétique du darunavir, en expliquant une variabilité inter-individuelle de la clairance intrinsèque et de la constante de dissociation (*Metsu et al IWCPAT 2018*). A partir de ce modèle et de données de la littérature, nous avons montré, avec des simulations de Monte-Carlo que les patients à IMC élevé avaient une exposition de darunavir libre dans liquide cérébros-spinal inférieure aux autres patients.

Abstract

HIV antiretroviral therapeutic drug monitoring is currently based on total concentrations. Relationships between total concentration and efficacy have been reported in several studies. However, some virological failures are still not explained by total concentrations. Therefore, there is an interest to identify an alternative exposure marker in order to explain these virological failures.

The unbound concentration is considered as the pharmacologically active form. The unbound form is able to diffuse into tissues and cross cell membranes to exert its pharmacological activity. Dolutegravir, darunavir and atazanavir are highly bound (over 85%) to plasma proteins. Thus, only a small amount of unbound antiretroviral is available to perform the pharmacodynamic activity. Therefore, it can be assume that a slight variability in the unbound concentration, not perceived by total concentrations measurement, may explain a difference in efficacy between patients with similar total concentrations. To date, few studies have explored the unbound form of antiretrovirals, either from a technical or pharmacokinetic point of view.

Thus, the objectives of this study were designed to be achieved in four successive steps:

(i) Validate a method to isolate the unbound from the bound form and to quantify accurately unbound and total concentrations

(ii) Compare equilibrium dialysis and ultrafiltration techniques, and identify ultrafiltration conditions that ensure comparable results between the two methods,

(iii) Investigate the properties of antiretroviral binding to plasma protein,

(iv) Explore the relationships between unbound and total concentrations of DRV in HIV patients using a population pharmacokinetic method.

First, we explored the pre-analytical processes that could interfere with antiretroviral protein binding with equilibrium dialysis. As a result, we observed that antiretrovirals binding to plasma protein were globaly not sensitive to pre-analytical conditions (*Metsu et al Clinica Chimica Acta 2018*).

Then, we established the ultrafiltration conditions ensuring identical results to those achieved by equilibrium dialysis at 37°C. In this second part, we stressed that ultrafiltration conditions may considerably alter ultrafiltration results (*Metsu et al submit in Scientific Report*).

We also explored the factors of variability on antiretroviral binding to plasma protein. In this study, we established that dolutegravir binding can be affected by other substances highly bound to albumin (*Metsu et al IWCPAT 2017*). Based on results from plasma protein concentrations and unbound concentrations results from published studies, we proposed dosing recommendations for atazanavir and darunavir in pregnant women.

A population pharmacokinetic study was then conducted using paired unbound and total DRV concentrations measured in HIV patients' samples. In this study, high BMI was found to be a covariable of interest to explain unbound low exposure by increased intrinsic clearance. Moreover, lower dissociation constant results were observed from patients with high BMI (*Metsu et al IWCPAT 2018*). Then, based on Monte-Carlo simulations and data from the literature, we showed that patients with high BMI had lower unbound darunavir exposure in cerebrospinal fluid, compared to other patients.