



HAL
open science

Étude des interactions entre toxines urémiques et les médicaments inhibiteurs de la calcineurine dans une cohorte de patients transplantés rénaux

Camille André

► To cite this version:

Camille André. Étude des interactions entre toxines urémiques et les médicaments inhibiteurs de la calcineurine dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Sciences pharmaceutiques. 2022. <dumas-03983307>

HAL Id: dumas-03983307

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03983307v1>

Submitted on 9 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License



UFR de Pharmacie

Année 2021/2022

N°

**THÈSE D'EXERCICE
POUR LE
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 7 avril 2022

Par Camille André

**Étude des interactions entre les toxines urémiques et
les médicaments inhibiteurs de la calcineurine dans
une cohorte de patients transplantés rénaux**

JURY

Président du Jury : Saïd KAMEL, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Directeurs de thèse : Sophie LIABEUF, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Sandra BODEAU, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Membres du jury : Pauline CAILLARD, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Thomas DUFLOT, Assistant-Hospitalo-Universitaire, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen



UFR de Pharmacie

Année 2021/2022

N°

**THÈSE D'EXERCICE
POUR LE
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 7 avril 2022

Par Camille André

**Étude des interactions entre les toxines urémiques et
les médicaments inhibiteurs de la calcineurine dans
une cohorte de patients transplantés rénaux**

JURY

Président du Jury : Saïd KAMEL, Professeur des Universités -
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Directeur de thèse : Sophie LIABEUF, Professeur des
Université - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier
Universitaire d'Amiens

Sandra BODEAU, Maître de Conférences
des Universités - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier
Universitaire d'Amiens

Membres du jury : Pauline CAILLARD, Praticien Hospitalier,
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Thomas DUFLOT, Assistant-Hospitalo-
Universitaire, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Saïd Kamel, pour m'avoir accueillie au laboratoire MP3CV et qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Un grand merci également au Professeur Sophie Liabeuf et au Docteur Sandra Bodeau qui m'accompagnent depuis maintenant près de 4 ans, qui ont encadré ce travail et tant d'autres ! Merci pour tous vos conseils, votre patience, votre bienveillance et votre disponibilité ! Je n'aurais pas pu découvrir le monde de la recherche d'une meilleure façon qu'avec vous !

Je tiens à remercier ensuite les Docteurs Pauline Caillard et Thomas Duflot, qui me font l'honneur de participer à ce jury.

Une pensée toute particulière pour mes acolytes picards, qui m'ont accueillie chaleureusement dans leur belle région : Lucie, Loïc, Cédric, Linda, Olivier et Benjamin. Merci pour les séances d'intenses réflexions, de rire, les restaurants, les soirées, les maux de crânes, les dégustations de bières, de vin et de pâté !

Aux membres du laboratoire MP3CV et à mes co-thésards, je les remercie de m'accompagner et de partager les interrogations, les discussions et les rires de tous les jours : Carine, Cathy, Gaëlle, Chantal, Amamyelle, Maria, Maxime, Isabelle, Romuald, Sabrina, Marlène, Kawthar, Nadia, Michael.

Un grand merci également à l'ensemble de l'équipe du service de Pharmacologie Clinique et plus particulièrement aux biologistes du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Anne-Sophie, Charlotte et Youssef pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leurs précieux conseils !

Je souhaite remercier également tout particulièrement Claudie et Ludo, qui m'ont accompagnée dans le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie à mes tous débuts, et avec qui j'ai commencé à apprendre les secrets de la spectrométrie de masse !

Merci à Touria, ma co-interne depuis 3 ans, qui me subit tous les jours dans mes doutes, mes réflexions et mes blagues douteuses ...

Je tiens également à remercier les super tech' du labo de Pharmacologie-Toxicologie : Delphine, Béné, Chloé, Dub, Marc, Charlotte, Philippe, vous qui égayez mes journées de validation !

À l'équipe de la PUI du GHPSO de Creil-Senlis, avec qui j'ai commencé mon internat : Lucie, Laurie, Anaïs, Margaux, Ferdinand, M. Tran, Bénédikte, Samira, Pauline, Mélodie, Lise, ... Merci pour ces deux semestres riches en apprentissage, en stress et en rires !

Un grand merci à Lina et Nathalie, avec qui j'ai commencé cette grande aventure des études supérieures, il y a 12 ans. Vous étiez là dès le début, vous êtes toujours là à la fin ...

Aux membres de la Communauté de la Piche Parfaite, merci à tous pour toutes les soirées caennaises et non caennaises, les week-ends aux quatre coins de la France, les festivals, les vacances, qu'on vit

ensemble depuis toutes ces années, qui m'ont aidés à supporter ces études longues et difficiles ! Gros boujou à Lise, Théo, Yoann, Nico, Héloïse, Luiz, Énora, Laura, Baptise, Caro, Édouard, Camille, Alexis, Quentin, Nikita, Anne, ... et tous les autres picheurs !

Merci aux meusiens, vosgiens et autres normands, qui nous ont accueillis, nous, les bas-normands arrivés dans ch'Nord, merci pour toutes les sorties qui font oublier les semaines difficiles : Mathilde, Antoine, Solène, Yann, Claire, Guillaume, Alexandre, ...

Merci à tous les copains et les collègues que j'ai oubliés !

Une pensée toute particulière à Paul, qui m'a suivie dans le Nord, et qui m'épaule depuis tant d'années, merci pour ton soutien indéfectible.

Enfin, à ma famille, sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui, je n'ai pas de mots suffisamment forts pour vous remercier ...

Ce travail de thèse d'exercice a fait l'objet d'un article original publié dans *Nephrology Dialysis Transplantation* en juin 2021 (Annexe I) ainsi que d'un poster au 58^{ème} congrès de l'*European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association* ayant eu lieu du 5 au 8 juin 2021 à Berlin. Celui-ci a reçu un prix en tant que meilleur résumé présenté par des jeunes auteurs (Annexe II).

Table des matières	
Liste des figures	3
Liste des tableaux	4
Liste des abréviations	5
Introduction	7
1. La maladie rénale chronique.....	7
1.1. Généralités et description de la maladie rénale chronique	7
a) Définition et physiopathologie	7
b) Épidémiologie et facteurs de risque.....	8
c) Complications de la maladie rénale chronique.....	8
1.2. La prise en charge du stade terminal de la maladie rénale chronique	10
a) Les traitements de suppléance.....	10
b) La dialyse	10
c) La transplantation rénale.....	10
1.3. Les inhibiteurs de la calcineurine dans la prise en charge de la maladie rénale chronique.....	11
a) Pharmacodynamique des inhibiteurs de la calcineurine	11
b) Pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine	12
c) Effets indésirables des inhibiteurs de la calcineurine	13
d) Suivi thérapeutique et pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine.....	13
2. Les toxines urémiques	14
2.1. Définition et classification.....	14
2.2. Toxicocinétique.....	15
2.3. Toxicité des toxines urémiques.....	16
a) Cardiotoxicité	16
b) Neurotoxicité.....	17
c) Maladie osseuse rénale	17
2.4. Pistes de traitements pour limiter l'accumulation des toxines urémiques.....	18
3. Rôle des toxines urémiques dans l'altération de la pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine chez les patients transplantés rénaux	19
3.1. Problématique de l'altération de la pharmacocinétique dans l'insuffisance rénale chronique. 19	
3.2. État des lieux des connaissances sur l'implication des toxines urémiques dans la modification des paramètres pharmacocinétiques des médicaments.....	20
a) Absorption	20
b) Distribution.....	20
c) Métabolisme.....	21
d) Élimination	22
3.3. Cas des inhibiteurs de calcineurine.....	22
4. Hypothèse et objectifs	24
Matériels et méthodes	25
1. L'étude DRUGTOX.....	25
1.1. Conception de l'étude	25
1.2. Inclusion des patients	26
1.3. Recueil des données	26

2. Détermination des concentrations en inhibiteurs de la calcineurine et en toxines urémiques.....	27
2.1. Dosage sanguin des inhibiteurs de la calcineurine	27
2.2. Dosage plasmatique des toxines urémiques.....	28
3. Analyses statistiques	29
Résultats	31
1. Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte DRUGTOX	31
2. Dosage des concentrations plasmatiques en toxines urémiques	33
3. Dosage des concentrations résiduelles sanguines en inhibiteurs de la calcineurine	33
4. Facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus et de ciclosporine	34
4.1. Tacrolimus	34
a) Caractéristiques des patients selon l'exposition en tacrolimus évaluée par le ratio C_{min}/D	34
b) Analyse de l'association entre les concentrations en toxines urémiques et l'exposition en tacrolimus évaluée par le ratio C_{min}/D	36
4.2. Ciclosporine	38
a) Caractéristiques des patients selon l'exposition en ciclosporine évaluée par le ratio C_{min}/D ..	38
b) Analyse de l'association entre les concentrations en toxines urémiques et l'exposition en ciclosporine évaluée par le ratio C_{min}/D	40
Discussion	42
Conclusion et perspectives	46
Références bibliographiques	47
Annexes	56
Annexe I : Article original publié dans <i>Nephrology Dialysis Transplantation</i>	56
Annexe II : résumé soumis au 58 ^{ème} congrès de l' <i>European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association</i>	66
Annexe III : traitements pris de manière concomitante au tacrolimus et susceptibles d'interagir avec ses paramètres pharmacocinétiques (n = 155).....	68
Annexe IV : traitements pris de manière concomitante avec la ciclosporine et susceptibles d'interagir avec ses paramètres pharmacocinétique (n = 155)	69
Serment de Galien	70

Liste des figures

Figure 1. Pronostic de la maladie rénale chronique selon le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) et l'albuminurie d'après la classification du KDIGO (KDIGO 2012).....	7
Figure 2. Les différents stades de la maladie rénale chronique en fonction du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe).....	8
Figure 3. Cause du décès stratifiée sur le DFGe, d'après l'étude de Thompson et al. Image modifiée d'après Thompson et al., 2015 [10].	9
Figure 4. Mécanisme d'action des inhibiteurs de la calcineurine. Image modifiée d'après Fernando et al., 2014 [24].....	12
Figure 5. Constante d'affinité de la sulfadiazine aux protéines plasmatiques chez des volontaires sains avant et après carbamylation par 40mM de cyanate de potassium. Image modifiée d'après Erill et al., 2018 [111].	21
Figure 6. Chromatogrammes des toxines urémiques après acquisition en mode MRM après ionisation en mode négatif pour IxS (a), pCS (b) et en mode positif pour IAA (c) et TMAO (d).....	29
Figure 7. Réaction enzymatique permettant de doser l'urée.	29
Figure 8. Concentration plasmatique en TU par stade d'IRC (n=403) : stades 1-2 : n= 81 ; stade 3 : n=228 ; stades 4-5 : n=94).	33

Liste des tableaux

Tableau I. Paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la calcineurine.	12
Tableau II. Paramètres toxicocinétiques des toxines urémiques indoxyl sulfate, para-crésyl sulfate, acide indole-3-acétique, triméthyl-amine-N-oxyde et urée. Images modifiées d'après Nigam et al., 2019 [41].	16
Tableau III. Exemples d'études cliniques impliquant les toxines urémiques dans la morbi-mortalité cardiovasculaires des patients insuffisants rénaux chroniques.	17
Tableau IV. Régression linéaire multiple recherchant une association entre la posologie de ciclosporine et les concentrations en indoxyl sulfate. Image modifiée d'après Santana Machado et al., 2018 [121].	23
Tableau V. Liste des médicaments interagissant avec le CYP3A4, la P-gp et les protéines plasmatiques [127].	27
Tableau VI. Paramètres du spectromètre de masse pour l'identification des toxines urémiques.	28
Tableau VII. Caractéristiques clinico-biologiques des patients de la cohorte DRUGTOX (n=403).	32
Tableau VIII. Données pharmacologiques du suivi thérapeutique et pharmacologique du tacrolimus et de la ciclosporine, ainsi que des médicaments pouvant interférer sur les concentrations plasmatiques en ICN (n=403).	34
Tableau IX. Caractéristiques des patients selon leur exposition au tacrolimus (évaluée d'après le ratio de la concentration résiduelle de tacrolimus normalisée par la dose en mg/J/kg (C_{min}/D)) (n=248).	35
Tableau X. Régression logistique univariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus (n=248).	36
Tableau XI. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en indoxyl sulfate (normalisé sur la fonction ln) (n=248).	37
Tableau XII. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en urée (normalisé sur la fonction ln) (n=248).	37
Tableau XIII. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en para-crésyl sulfate (normalisé sur la fonction ln) (n=248).	38
Tableau XIV. Caractéristiques des patients selon leur exposition à la ciclosporine (évaluée d'après le ratio de la concentration résiduelle de ciclosporine normalisée par la dose en mg/J/kg (C_{min}/D)) (n=155).	39
Tableau XV. Régression logistique univariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de ciclosporine (n=155).	40
Tableau XVI. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{min}/D de ciclosporine et à la concentration plasmatique en TMAO (normalisé sur la fonction ln) (n=155).	41

Liste des abréviations

ALAT : alanine aminotransférases

ANOVA : analysis of variance

ASAT : aspartate aminotransférases

ASC : aire sous la courbe

AVC : accident vasculaire cérébral

BCRP : breast cancer resistant protein

C_{\min} : concentration résiduelle

CASI score : Cognitive Abilities Screening Instrument score

CHU : centre hospitalo-universitaire

CLHP-MS/MS : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

C_{\max} : concentration maximale

CMPF : acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-furanpropionique

CN : concentration plasmatique normale

CRP : protéine C-réactive

CU : concentration plasmatique urémique

CYP450 : cytochrome P450

D : dose journalière en mg/kg/J

Da : dalton

DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé

EI : écart interquartile

EIM : effet indésirable médicamenteux

FMO3 : Flavin-containing mono-oxygenase 3

HAS : Haute Autorité de Santé

HTA : hypertension artérielle chronique

IAA : acide indole-3-acétique

IC95% : intervalle de confiance à 95%

ICN : inhibiteur de la calcineurine

IMC : indice de masse corporelle

IRA : insuffisance rénale aiguë

IRC : insuffisance rénale chronique

IRCT : insuffisance rénale chronique terminale

IxS : indoxyl sulfate

KDIGO : Kidney Disease: Improving Global Outcomes
MAPK : mitogen-activated protein kinases
MDRD : modification of diet in renal disease
MMSE score : Mini-Mental State Examination score
MRC : maladie rénale chronique
MRM : multiple reaction monitoring
MRP : Multidrug Resistance Associated Protein
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NFAT : nuclear factor of activated T-cells
OAT1 : organic anion transporter 1
OAT3 : organic anion transporter 3
OATP1B : organic anion transporting polypeptide 1B
OATP3B : organic anion transporting polypeptide 3B
OR : odd ratio
PAD : pression artérielle diastolique
PAL : phosphatases alcalines
PAS : pression artérielle systolique
pCS : p-crésyl sulfate
P-gp : glycoprotéine-P
PK : pharmacocinétique
pmh : par million d'habitants
PP : pression pulsée
PTH : parathormone
REIN : réseau épidémiologique et information en néphrologie
rpm : rotation par minute
RR : risque relatif
STP : suivi thérapeutique et pharmacologique
SULT1A1 : sulfotransferase family 1A member 1
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie
TMA : triméthyl-amine
TMAO : triméthylamine-N-oxyde
 t_{max} : temps au bout duquel la concentration maximale est atteinte
TU : toxine urémique

Introduction

1. La maladie rénale chronique

1.1. Généralités et description de la maladie rénale chronique

a) Définition et physiopathologie

La maladie rénale chronique (MRC) est définie par la présence pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale (albuminurie, protéinurie, leucocyturie, anomalies morphologiques ou histologiques) ou par un débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) inférieur à 60 ml/min/1,73 m² [1]. Plusieurs stades sont définis par les recommandations *Kidney Disease : Improving Global Outcomes* (KDIGO) afin d'évaluer la gravité de la MRC et le risque de survenue des complications selon des valeurs précises de DFGe, marqueur de la fonction d'excrétion rénale, et d'albuminurie, marqueur de l'intégrité glomérulaire (Figure 1) [2].

				Albuminurie (mg/mmol)		
				A1	A2	A3
				Normal	Augmentation modérée	Augmentation sévère
				< 3	3-30	> 30
DFGe (ml/min/1,73 m ²)	G1	Normal ou élevé (hyperfiltration)	≥ 90			
	G2	Baisse légère	60-89			
	G3a	Baisse légère à modérée	45-59			
	G3b	Baisse modérée à sévère	30-44			
	G4	Baisse sévère	15-29			
	G5	Insuffisance rénale terminale	< 15			

Vert : risque bas (si pas d'autres marqueurs de maladie rénale, pas d'IRC) ;
Jaune : risque modérée ; Orange : risque élevé ; Rouge : risque très élevé.

Figure 1. Pronostic de la maladie rénale chronique selon le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) et l'albuminurie d'après la classification du KDIGO (KDIGO 2012).

La MRC évolue progressivement vers une atteinte irréversible des néphrons. Au début, la diminution du DFG est compensée par une hyperfiltration glomérulaire et une hypertrophie des néphrons restants, dans le but de maintenir le DFG. L'hypertrophie des néphrons conduit alors à l'élargissement de la surface de filtration et donc à une hypertrophie des podocytes. Au-delà d'un certain seuil, les podocytes ne parviennent plus à former une barrière étanche entre la circulation artérielle et le glomérule, laissant passer les protéines vers l'urine. La protéinurie, et en particulier l'albuminurie, est une des premières manifestations de l'atteinte rénale. Puis les podocytes finissent par se détacher et sont remplacés par du tissu rénal sclérosé [3]. Le DFG continue irrémédiablement à diminuer, jusqu'à atteindre une valeur inférieure à 15ml/min, qui définit le stade terminal de la MRC appelée insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) et qui va nécessiter un traitement de suppléance (dialyse ou transplantation rénale) (Figure 2).

Stade	Nom	Mesure ou estimation DFG
1	MRC (anomalies urinaires, mais fonction rénale normale)	≥ 90 à 120 ml/min
2	IRC légère	60 à 90 ml/min
3	IRC modérée	30 à 59 ml/min
4	IRC sévère	15 à 29 ml/min
5	IRC terminale	< 15 ml/min ou ttt de suppléance*

* Dialyse (hémodialyse ou dialyse péritonéale)

Figure 2. Les différents stades de la maladie rénale chronique en fonction du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe)

b) Épidémiologie et facteurs de risque

La prévalence mondiale moyenne avec intervalle de confiance à 95% (IC95%) de la MRC varie de 9,1% (8,5-9,8%) [4] à 13,4% (11,7-15,1%) [5]. En France, la prévalence de la MRC est de 3300 cas par million d'habitants (pmh) [6] soit environ 10% de la population adulte avec 3 millions de patients [1]. La néphropathie diabétique est la cause la plus fréquente de MRC [7], suivie de la néphroangiosclérose puis de la glomérulonéphrite.

Les facteurs de risque d'aggravation de la MRC en IRCT sont nombreux. L'équipe de Hsu a inclus 177 570 patients soit un total de 5 275 957 patients-année entre 1964 et 1973. Les patients ont été recrutés dans la population générale, avec une exclusion des patients ayant déjà une IRCT en se basant sur la créatininémie. Après avoir identifié 842 cas d'IRCT dans cet échantillon, les auteurs ont défini la protéinurie et le surpoids comme les deux facteurs les plus à risque de développer une IRCT, avec des *hazard ratio* ajustés respectifs de 7,90 [5,35-11,67] et 4,39 [3,38-5,70]. La créatininémie élevée, l'origine ethnique afro-américaine, l'hypertension artérielle (HTA), l'âge, l'origine sociale défavorisée, le sexe masculin, l'hémoglobémie basse sont d'autres facteurs de risques significativement associés au risque de développer une IRCT [8].

c) Complications de la maladie rénale chronique

Dans les pays développés, les causes de décès des patients atteints de MRC sont majoritairement cardiovasculaires [9]. Ainsi, une étude canadienne réalisée par l'équipe de Thompson en 2015, a étudié la cause de décès entre 2002 et 2009 chez 81 064 patients inclus à partir de la population générale. Une stratification sur le DFGe montre que la proportion de décès d'origine cardiovasculaire augmente au fur et à mesure que le DFGe diminue avec 20,7% pour les patients stade 1 KDIGO, 36,8% pour les patients stade 2 KDIGO, 41,2% pour les patients stade 3 KDIGO et 43,7% pour les patients stade 4 KDIGO. Dès le stade 3 KDIGO, les décès d'origine cardiovasculaire représentent ainsi la première cause de décès, devant les décès par cancer (Figure 3).

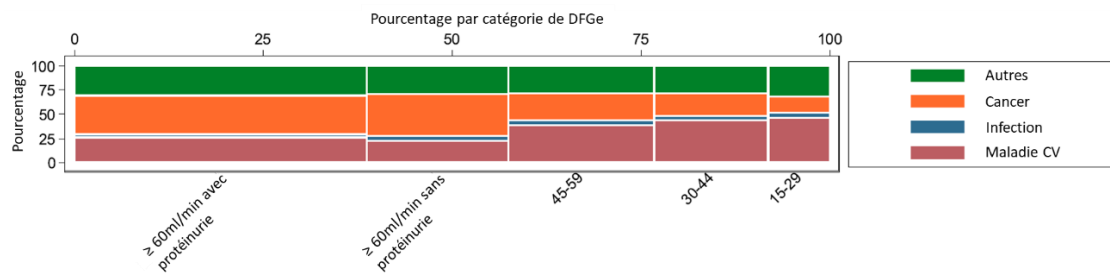


Figure 3. Cause du décès stratifiée sur le DFGe, d'après l'étude de Thompson et al. Image modifiée d'après Thompson et al., 2015 [10].

CV : cardiovasculaire ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé.

Les calcifications valvulaires et vasculaires, intimaux et médiaux, sont des complications caractéristiques de cette pathologie [11]. Ces calcifications des tissus musculaires lisses des valves aortiques et des vaisseaux artériels mènent progressivement au rétrécissement aortique calcifié et à l'athérosclérose. Le décès survient ensuite par ischémie coronarienne ou cérébrale [12] ou par insuffisance cardiaque [13].

Certaines atteintes neurologiques sont également retrouvées de manière prépondérante chez les patients souffrant de MRC, par rapport à la population générale. Ainsi, d'après les résultats des études cliniques, les patients présentent un risque plus élevé de développer des troubles cognitifs, avec une altération majeure des fonctions exécutives, de l'attention et de la cognition [14,15]. Ces résultats sont confirmés *in vivo* sur un modèle de souris ayant subi un accident vasculaire cérébral (AVC). Les animaux atteints d'IRC présentent une perte neuronale, un recrutement des cellules gliales et une infiltration de macrophages inflammatoires plus importants, ainsi qu'une récupération des facultés neuromotrices ralentie, comparés aux souris non IRC [16].

La physiopathologie du développement des troubles neurologiques est complexe et repose sur la présence de plusieurs facteurs de risque chez ces patients. Parmi ces facteurs de risque, on peut citer la présence de dommages cérébrovasculaires plus importants, une polymédication importante, des troubles du sommeil, de l'HTA ou encore du diabète [17].

Enfin, les maladies osseuses et du métabolisme minéral sont fréquentes chez les patients atteints de MRC. En effet, il existe une atteinte systémique du métabolisme minéral et osseux due à la maladie rénale, qui se manifeste par au moins une des caractéristiques suivantes : anomalies du métabolisme du calcium, du phosphate, de la parathormone (PTH) ou de la vitamine D, ostéodystrophie rénale, calcifications des tissus mous [18]. Les études cliniques montrent que la maladie rénale osseuse peut conduire à l'ostéopathie adynamique [19,20] ou à des fragilités osseuses retrouvées par exemple au niveau de la hanche chez des patients dialysés [21].

1.2. La prise en charge du stade terminal de la maladie rénale chronique

a) Les traitements de suppléance

Chaque stade de la MRC nécessite une prise en charge particulière et un intervalle de suivi qui varie selon la gravité de la maladie. Au stade d'IRCT, la gravité des symptômes impose la mise en œuvre d'un traitement de suppléance par dialyse ou par transplantation rénale.

Le Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie (REIN) recense annuellement les données épidémiologiques sur les traitements de suppléance en France. Selon son dernier rapport publié en juillet 2020 sur les données de 2019, l'incidence des patients traités pour une IRCT est de 11 437 nouveaux patients soit 169 pmh (par million d'habitants) en 2018, montant la prévalence des patients traités pour une IRCT à 91 875 soit 1 355 pmh [22]. L'âge moyen d'initiation du traitement de suppléance est de 67,8 ans et 64,7% des nouveaux patients sont des hommes.

b) La dialyse

La majorité des patients débutant un traitement de suppléance commence par la dialyse (95,98%) [22]. La dialyse est un terme générique qui regroupe deux techniques : l'hémodialyse et la dialyse péritonéale. Durant l'hémodialyse, le sang du patient passe dans un dialyseur contenant deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable où des gradients modulent les concentrations en solutés dans le sérum du patient entre le sang et le dialysat. L'objectif est de compenser les fonctions excrétrices défaillantes des reins. Cela conduit à une normalisation des paramètres biologiques sanguins avec notamment une diminution de l'urée et de la créatinine, une augmentation du bicarbonate et une équilibration des ions plasmatiques. La technique de dialyse péritonéale utilise le péritoine comme membrane perméable naturelle à travers laquelle l'eau et les solutés peuvent s'équilibrer. Elle est moins utilisée que l'hémodialyse (seulement 9,7% des patients nouvellement dialysés débutent par la dialyse péritonéale) car elle nécessite une implication plus exigeante du patient et du centre de dialyse.

c) La transplantation rénale

La transplantation rénale est actuellement le traitement de suppléance de choix de l'IRCT car elle permet une meilleure survie que la dialyse et améliore la qualité de vie des patients. Ainsi, les patients transplantés ont 93,9% de chance de survie à 5 ans contre 45,7 % de chance de survie en dialyse [7,22]. Cependant, très peu de patients bénéficient d'une transplantation préemptive (4,02%) (transplantation avant la mise du patient en dialyse) et le délai médian d'inscription sur liste d'attente pour les nouveaux dialysés d'âge supérieur à 60 ans est de 11 mois [22].

La première greffe rénale enregistrée en France date de 1959. Depuis, plus de 91 565 greffes rénales ont été réalisées. La transplantation rénale représente 61,73% du total des greffes en 2019 et 58,70% du total des greffes d'organes en 2020 [23]. Près de 3182 des 50 501 patients sous dialyse (6,3%) ont pu bénéficier d'une greffe en 2018. Le nombre de malades porteurs d'un greffon rénal fonctionnel a été estimé à 41 374 (610 pmh) au 31 décembre 2018 [22].

La prévention du rejet de greffe passe par l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs. Le maintien d'une immunosuppression est indispensable pour prévenir le rejet aigu de greffe en phase initiale d'induction (traitement d'induction) mais également après la phase initiale d'induction (traitement d'entretien). Les médicaments immunosuppresseurs sont également indiqués dans le traitement des rejets aigus.

Il existe plusieurs classes d'immunosuppresseurs : les corticoïdes (prednisone [Cortancyl®], prednisolone [Solupred®]), les inhibiteurs de la calcineurine (ICN) (tacrolimus [Prograf®, Adoport®, Advagraf®, Modigraf®, Envarsus® LP] et ciclosporine [Néoral®, Sandimmun®]), les inhibiteurs de m-TOR (sirolimus [Rapamune®], évérolimus [Certican®]), les antimétabolites (azathioprine [Imurel®], acide mycophénolique [Cellcept®, Myfortic®]), les anticorps monoclonaux (basiliximab [Simulect®]), les anticorps polyclonaux ou sérum antilymphocytaire de lapin (Thymoglobuline®), les protéines de fusion anti-lymphocytaire T (bélatcept [Nulojix®]). Ils agissent à différentes étapes de l'activation des lymphocytes T et sont indispensables pour empêcher le déroulement des réponses immunitaires non souhaitées responsables du rejet de greffe chez les patients transplantés.

1.3. Les inhibiteurs de la calcineurine dans la prise en charge de la maladie rénale chronique

Le tacrolimus et la ciclosporine ont révolutionné la transplantation au début des années 1980. Ils constituent, encore de nos jours, la pierre angulaire du traitement immunosuppresseur en transplantation rénale malgré leurs nombreux effets indésirables.

a) Pharmacodynamique des inhibiteurs de la calcineurine

Une fois dans le cytoplasme du lymphocyte T, la ciclosporine et le tacrolimus se lient à leur immunophiline respective : la cyclophiline A pour la ciclosporine et FKBP12 (*FK506-binding protein*) pour le tacrolimus. Puis le complexe ICN-immunophiline formé se lie à la calcineurine et inhibe son activité. La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium, qui va phosphoryler les sérines du facteur de transcription *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), permettant sa translocation dans le noyau. Cette translocation va induire l'expression génique de molécules pro-inflammatoires et notamment de l'interleukine-2 (IL-2), une interleukine pro-

inflammatoire recrutent les lymphocytes et les macrophages. Les ICN empêchent ainsi la transcription de l'IL-2 par NFAT et le recrutement des cellules immunitaires (Figure 4).

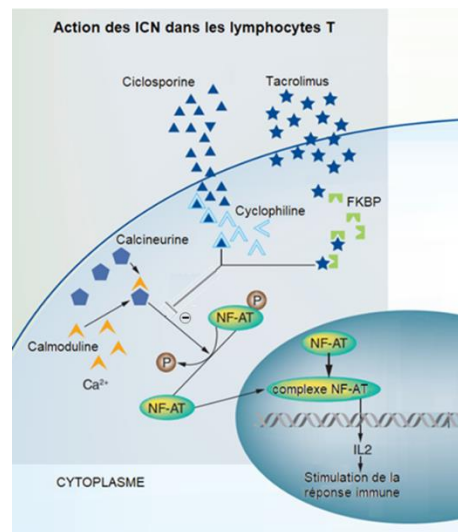


Figure 4. Mécanisme d'action des inhibiteurs de la calcineurine. Image modifiée d'après Fernando et al., 2014 [24].

Ca²⁺ : calcium ; FKBP : FK506 binding protein ; NF-AT : Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic.

b) Pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine

Les ICN présentent des points communs au niveau de leur pharmacocinétique (PK). Ils présentent une biodisponibilité faible et variable ainsi qu'une distribution importante dans les érythrocytes. Leur métabolisme hépatique est médié par le CYP3A4 pour la ciclosporine et par les CYP3A4/3A5 pour le tacrolimus. Enfin, leur élimination biliaire s'effectue majoritairement via la glycoprotéine-P (P-gp). En revanche, les protéines plasmatiques auxquelles ils se lient fortement sont différentes pour chaque molécule, à savoir, l'albumine pour le tacrolimus et les lipoprotéines pour la ciclosporine. Les principaux paramètres PK sont résumés dans le Tableau I.

Tableau I. Paramètres pharmacocinétiques des inhibiteurs de la calcineurine.

	Absorption	Distribution	Métabolisme	Élimination	Référence
Tacrolimus	t _{max} = 1-3h Biodisponibilité : 20-25%	- fraction érythrocytaire majoritaire - fraction plasmatique liée à 98,8% à l'albumine et l'α-1-glycoprotéine acide	CYP450 3A4/3A5 métabolite actif : 31-O-déméthyl-tacrolimus.	voie biliaire (90%) via la P-gp, voie rénale (<10%) t _{1/2} = 15,6h chez le patient transplanté rénal	[25]
Ciclosporine	t _{max} = 1-2h Biodisponibilité : 20-50%	- fraction érythrocytaire majoritaire - fraction plasmatique liée à 90% aux LDL et HDL	CYP450 3A4 environ 15 métabolites, moins actifs que la ciclosporine	voie biliaire (90%) via la P-gp, voie rénale (<10%) t _{1/2} = 11h chez le patient transplanté rénal	[26]

CYP450 : cytochrome P450 ; HDL : high density lipoprotein ; LDL : low density lipoprotein ; P-gp : P-glycoprotein ; t_{max} : temps d'atteinte de la concentration maximale ; t_{1/2} : demi-vie d'élimination.

c) Effets indésirables des inhibiteurs de la calcineurine

Les effets indésirables médicamenteux (EIM) des ICN peuvent être graves [27] : troubles gastro-intestinaux (diarrhées, vomissements, dyspepsie), neurotoxicité (tremblements, paresthésie, céphalées), acné, hirsutisme, alopecie, infection (virale ou bactérienne), néphrotoxicité dose-dépendante (nécrose tubulaire aiguë, néphropathie chronique), syndrome lymphoprolifératif, cancers. Certains EIM sont spécifiques du tacrolimus (comme l'hyperglycémie) et d'autres, de la ciclosporine (comme l'hyperuricémie avec crise de goutte ou l'hyperplasie gingivale).

Les ICN sont des médicaments à marge thérapeutique étroite. Ainsi, leur toxicité se manifeste pour des concentrations plasmatiques proches des concentrations thérapeutiques. La notion de marge thérapeutique étroite sous-entend également qu'un sous-dosage en immunosuppresseur est associé à un risque accru de rejet aigu du greffon. Afin de maintenir une concentration minimale efficace permettant de diminuer le risque de rejet aigu de greffe tout en limitant la survenue et la gravité des EIM, la mesure des concentrations sanguines en ICN est nécessaire. Il s'agit du suivi thérapeutique et pharmacologique (STP).

d) Suivi thérapeutique et pharmacologique des inhibiteurs de la calcineurine

Le STP consiste à mesurer la concentration d'un médicament dans le sang afin d'optimiser son efficacité thérapeutique, tout en minimisant le risque de survenue d'effets indésirables. La concentration peut être mesurée juste avant une nouvelle prise du médicament (concentration résiduelle : C_{\min}) ou au pic d'absorption du médicament (concentration maximale : C_{\max}). Les concentrations ainsi mesurées (C_{\min} , C_{\max}) seront comparées aux concentrations de référence, mesurées dans un contexte thérapeutique, afin de proposer une adaptation de la posologie au patient. Il s'agit donc d'un outil de personnalisation du traitement, particulièrement adapté aux médicaments dont la pharmacocinétique est variable d'un individu à l'autre et pour lesquels des relations concentration-effet et/ou concentration-toxicité ont été démontrées et sont plus pertinentes que les relations dose-effet et/ou dose-toxicité.

Les ICN sont des médicaments qui répondent à ces critères. En effet, ils présentent des variabilités intra-individuelles et inter-individuelles importantes de leur PK, conduisant à une fluctuation importante des concentrations sanguines pour une même dose d'ICN administrée. Toutes les étapes de la PK peuvent être perturbées. Par exemple, la prise alimentaire diminue l'aire sous la courbe (ASC) du tacrolimus de 25-45%. Le jus de pamplemousse, ayant un effet inhibiteur sur le CYP3A4 au niveau des entérocytes, augmente la biodisponibilité des ICN de 200%. De même, les variations d'expression génétique des CYP450, en particulier du CYP3A5, et de la P-gp ainsi que les interactions médicamenteuses avec des médicaments inhibiteurs ou inducteurs de ces protéines

peuvent conduire à une modification de leur absorption intestinale, de leur métabolisme ou de leur élimination hépatique [33,34]. Les ICN sont par conséquent éligibles au STP [28,29].

Pour la ciclosporine, les données de la littérature montrent que les concentrations résiduelles cibles sont comprises entre 75 et 350 ng/mL [30]. De même, celle du tacrolimus se situe entre 5 et 15 ng/mL [31,32].

2. Les toxines urémiques

Au cours de la MRC, la diminution de la capacité de filtration des reins induit la rétention de nombreux métabolites dont certains exercent une action biologique. Les conséquences clinico-biologiques néfastes de la rétention chronique de ces solutés toxiques appelés « toxines urémiques » (TU), sont regroupées sous le terme de « syndrome urémique ».

2.1. Définition et classification

Une TU est définie comme une molécule qui s'accumule dans le sang et dans les organes des patients atteints de MRC où elle exerce des effets délétères sur les fonctions biologiques. Une molécule est classée comme une TU si elle possède les caractéristiques suivantes : la molécule doit être chimiquement identifiée et caractérisée ; son dosage dans les prélèvements biologiques est possible ; les concentrations de la molécule dans les liquides biologiques sont élevées chez les patients insuffisants rénaux ; il y a une relation entre la concentration de la molécule et ses effets pathologiques ; une diminution des concentrations de la molécule est associée à une amélioration clinique ; il est possible de reproduire les effets du syndrome urémique en administrant la molécule chez l'animal [35].

Selon cette définition, près de 150 molécules sont considérées comme des TU et sont classées par le groupe EUTOX (*European Uremic Toxins Work group*) en trois groupes qui dépendent de leurs propriétés physico-chimiques [36,37]. Le groupe des TU hydrosolubles de faible poids moléculaire (PM < 500 Dalton (Da)) est facilement éliminé par dialyse (exemples : urée, triméthylamine-N-oxyde [TMAO]). Le groupe des TU hydrosolubles de poids moléculaire supérieur à 500 Da) comprend le plus souvent des peptides et des petites protéines comme par exemple, la β 2-microglobuline ou la PTH, issus du métabolisme endogène. De par leur grande taille, seules des membranes de dialyse adaptées sont efficaces pour les épurer du plasma des patients (membranes de haut-flux, hémodialyse, hémodiafiltration). La dernière classe regroupe les TU fortement liées aux protéines plasmatiques, et en particulier à l'albumine. Leur liaison aux protéines plasmatiques les empêche d'être hémodialysées, conduisant à une accumulation plasmatique, progressive avec le déclin de la fonction rénale. C'est dans cette classe que se trouvent l'indoxyl sulfate (IxS), le para-crésyl sulfate (pCS) et l'acide indole-3-

acétique (IAA).

2.2. Toxicocinétique

Certaines TU sont issues des acides aminés (AA) provenant de l'alimentation : le tryptophane pour l'IxS et l'IAA, la tyrosine et la phénylalanine pour le pCS, la choline et la phosphatidylcholine pour le TMAO. L'étape de transformation des acides aminés, précédant l'absorption des TU à travers la barrière intestinale dépend du microbiote intestinal et donne naissance à différents précurseurs. Ainsi, le tryptophane sera métabolisé en indole, la tyrosine et la phénylalanine en p-crésol et la choline et la phosphatidylcholine en triméthylamine (TMA). L'urée en revanche, est produite au niveau hépatique lors du cycle de l'urée à partir de l'arginine, est issue du catabolisme de l'ensemble des AA.

Chez des patients IRC qui présentent une dysbiose intestinale (augmentation du pH intestinal, inflammation chronique, modification alimentaire, ...), une modification de la flore bactérienne au profit d'espèces ayant des activités enzymatiques différentes peut être observée. Dans ce contexte, l'émergence de nouveaux profils enzymatiques (tryptophanase, phénolase, tyrosinase) favorise la formation des précurseurs des TU à partir des acides aminés alimentaires [38]. De même, le régime alimentaire, et notamment l'index protéine/fibre, peut moduler les concentrations de TU chez les patients MRC [39,40].

Les précurseurs des TU nouvellement formés traversent les entérocytes pour rejoindre la circulation portale avant d'atteindre le foie où ils seront métabolisés par des enzymes hépatiques (sulfotransferase family 1A member 1 [SULT1A1], flavin-containing mono-oxygenase 3 [FMO3]) en TU. Une fois le compartiment systémique atteint, certaines TU (IxS, pCS) circulent fortement liées aux protéines plasmatiques. C'est la forme libre des TU (forme non liée aux protéines plasmatiques) qui est distribuée aux organes-cibles, principalement au niveau du rein, du système nerveux central (SNC) ou encore du cœur où elle y exerce une toxicité multi-organes. Enfin, les TU sont sécrétées au niveau rénal après avoir été prises en charge par des transporteurs apicaux (BCRP, MRP) et basolatéraux (OAT1/OAT3) exprimés au niveau des cellules tubulaires proximales rénales. Le tableau II résume des paramètres toxicocinétiques de certaines TU (Tableau II).

Tableau II. Paramètres toxicocinétiques des toxines urémiques indoxyl sulfate, para-crésyl sulfate, acide indole-3-acétique, triméthyl-amine-N-oxyde et urée. Images modifiées d'après Nigam et al., 2019 [41].

	Origine	Métabolisme	Distribution		Élimination
	AA précurseur	Microbiote intestinal	Foie	Plasma	Tubule contourné proximal
IxS	Trp [42]	Trp => indole [42]	SULT1A1 : indole => IxS [42]	Albumine : 93%[43,44]	OAT1/OAT3, P-gp, BCRP, MRP [45,46]
pCS	Tyr et Phe [42]	Tyr, Phe => p-crésol [42]	SULT1A1 : p-crésol => pCS [42]	Albumine : 94% à 95% [43,44]	OAT1/OAT3, P-gp, BCRP, MRP [45,46]
IAA	Trp [42]	Trp => indole => IAA [42]	/	Albumine : 71% à 73% [43,44]	OAT1/OAT3, P-gp, BCRP, MRP [45,46]
TMAO	Ch, PCh [42]	Ch, PCh => TMA [42]	FMO3 : TMA => TMAO [42]	Hydrosoluble [43,44]	OAT1/OAT3, P-gp, BCRP, MRP [45,46]
Urée	Ornithine	/	Cycle de l'urée	Hydrosoluble	UT-A et UT-B

AA : acide aminé ; BCRP : Breast Cancer Resistance Protein ; Ch : choline ; FMO3 : Flavin-containing mono-oxygenase 3 ; IAA : acide indole-3-acétique ; IxS : indoxyl sulfate ; MRP : Multidrug Resistance Associated Protein ; OAT1/OAT3 : organic anion transporter 1/3 ; PCh : phosphatidylcholine ; pCS : para-crésyl sulfate ; P-gp : P-glycoprotein ; SULT1A1 : sulfotransferase family 1A member 1 ; TMA : triméthylamine ; TMAO : triméthylamine-N-oxyde ; Trp : tryptophane ; Tyr : tyrosine ; UT-A : urea transporter-A ; UT-B : urea transporter-B.

2.3. Toxicité des toxines urémiques

L'ensemble des symptômes induits par les TU est regroupé sous le terme de « syndrome urémique ». Les complications les plus fréquentes du syndrome urémique sont les atteintes cardiovasculaires, la neurotoxicité et les atteintes osseuses.

a) Cardiotoxicité

Le risque de développer une maladie cardiovasculaire dépend de facteurs de risque dits « traditionnels » issus de l'étude de Framingham. Les plus importants sont l'âge, le sexe masculin, l'HTA et le diabète. Il existe également des facteurs de risque dits « non traditionnels », présents seulement chez les patients atteints de MRC tels que : l'albuminurie, l'anémie, le stress oxydant, l'inflammation et les concentrations sanguines (plasmatique ou sérique) en TU [47].

Ainsi, de nombreuses études *in vivo* et cliniques montrent que les TU sont des marqueurs de morbi-mortalité cardiovasculaire chez les patients atteints de MRC (Tableau III).

Tableau III. Exemples d'études cliniques impliquant les toxines urémiques dans la morbi-mortalité cardiovasculaires des patients insuffisants rénaux chroniques.

Référence	IxS [48]	pCS [49]	IAA [50]	TMAO [51]	Urée [52]
Population	139 patients IRC	139 patients IRC	120 patients IRC	252 patients hémodialysés	541 patients avec décompensation cardiaque
Evènement étudié	Toute cause de décès	Toute cause de décès	1) Toute cause de décès 2) Décès de cause cardiovasculaire	1) Toute cause de décès 2) Décès de cause cardiovasculaire	Toute cause de décès
Facteur de risque	Concentration plasmatique en IxS	Concentration plasmatique en pCS	Concentration plasmatique en IAA	Concentration plasmatique en TMAO	Concentration plasmatique en urée
Risque relatif (RR) ou Hazard ratio (HR)	RR = 17,112 [2,268; 129,091] p = 0,006	RR = 4,675 [1,940; 11,264] p = 0,001	1) RR = 2,09 [1,11; 3,93] p = 0,02 2) RR = 1,77 [1,02; 3,09] p = 0,04	1) HR = 1,14 [1,08; 1,21] p < 0,001 2) HR = 1,18 [1,07; 1,29] p = 0,001	HR = 1,9 [[1,2; 3,1] p = 0,01

IAA : acide indole-3-acétique ; IRC : insuffisance rénale chronique ; IxS : indoxyl sulfate ; HR : hazard ratio ; pCS : para-crésyl sulfate ; RR : risque relatif ; TMAO : triméthylamine-N-oxyde.

L'étude des mécanismes de toxicité cellulaire montre *in vitro* que les TU favorisent la différenciation des cellules musculaires lisses, constituant les vaisseaux artériels, en cellules ostéoblaste-like, via l'activation de nombreuses voies moléculaires comme la voie du *nuclear factor-kappa B* (NF-κB), la voie des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), l'activation du stress oxydant [53], la voie de l'*unfolded proteins response* du réticulum endoplasmique [54] ou encore via l'excrétion de vésicules extracellulaires [55].

b) Neurotoxicité

Comme cela a été évoqué au paragraphe 1.1.c, les patients souffrant de MRC sont plus à risque de développer des troubles cognitifs par rapport à la population générale. Le mécanisme physiopathologique des atteintes du SNC dans l'IRC n'est pas totalement compris aujourd'hui. Une des hypothèses pouvant expliquer ce risque incrimine les TU [56]. En effet, il est montré *in vitro* que les TU sont capables d'induire du stress oxydant dans des cellules endothéliales cérébrales [57]. Dans un second temps, il est également démontré chez des rats que l'administration *per os* d'IxS diminue les concentrations en neurotransmetteurs (épinéphrine, norépinéphrine, dopamine, et sérotonine) dans certaines régions du SNC. Leur profil comportemental est également modifié avec une augmentation de l'anxiété, une diminution de la coordination motrice et de la mémoire spatiale, associées à un syndrome d'apathie [58]. Enfin, le travail de l'équipe de Lin publié en 2019 retrouve une association entre la concentration en IxS et en pCS libres et la survenue de troubles cognitifs chez les patients atteints de MRC (diminution du score MMSE et du score CASI) [59].

c) Maladie osseuse rénale

Les mécanismes moléculaires de toxicité induits dans la maladie rénale osseuse sont similaires

à ceux retrouvés dans la cardiotoxicité des TU, à savoir, l'activation du stress oxydant, l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes, l'inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL), l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans l'ostéogénèse, l'inhibition de l'activation de NF- κ B [60,61]. Parmi les études cliniques, il a été retrouvé que la concentration plasmatique en IxS est corrélée négativement à des marqueurs d'ostéoformation comme la PAL [62], et corrélée positivement à la concentration sérique en sclérotine, un inhibiteur plasmatique de la voie Wnt/ β -caténine, et associé à un risque de fracture accru [63–65].

Mais la polytoxicité des TU ne se limite pas aux atteintes cardiaques, neurologiques ou osseuses. D'autres organes peuvent être touchés, comme le rein, la moelle osseuse ou encore le système vasculaire. Il est donc primordial de limiter les effets délétères des TU en réduisant leur accumulation plasmatique.

2.4. Pistes de traitements pour limiter l'accumulation des toxines urémiques

Il existe différentes stratégies pour limiter l'accumulation des TU. L'une d'elles consiste à adsorber les précurseurs des TU à l'aide de chélateurs carbonés comme l'AST-120 (Kremezin®) commercialisé en Asie. Toutefois, son utilisation ne fait pas consensus [66]. En effet, si les études *in vitro* et *in vivo* [67,68] démontrent son efficacité, les études cliniques ont du mal à confirmer ces résultats [69–72]. Une autre stratégie ciblant la phase d'absorption consiste à utiliser des probiotiques pour diminuer la synthèse des TU. Leur utilisation est également controversée, des données *in vivo* démontrant une efficacité [73] et des études cliniques obtenant des résultats mitigés [74,75].

Un autre angle d'approche peut consister à inhiber les enzymes hépatiques qui synthétisent les TU. Ainsi, dans un modèle murin d'insuffisance rénale aiguë, l'administration de molécules inhibitrices de l'enzyme hépatique sulfotransferase (SULT), telles que la quercétine, le resveratrol, le sulforaphane ou le méclofénamate, induit une diminution de l'accumulation plasmatique d'IxS et une restauration de l'élimination de la créatinine et de l'urée [76,77].

Comme les techniques de dialyse conventionnelles ne permettent pas d'éliminer les TU fortement liées aux protéines plasmatiques [78,79], ces dernières s'accumulent au niveau plasmatique et atteignent des concentrations pathologiques. Ainsi, les concentrations plasmatiques mesurées chez les patients atteints d'IRC augmentent de 12 fois pour le pCS à 68 fois pour l'IxS, comparativement aux concentrations mesurées chez l'adulte ayant une fonction rénale normale [80]. Afin d'augmenter l'élimination des TU par dialyse, différentes techniques sont testées [81] avec par exemple, l'association de techniques diffusive et convective en pré ou post hémofiltration [79,82].

L'utilisation d'adsorbant pendant l'hémodialyse (albumine, monolithe nanoporeux, charbon activé, microparticules hautement poreuses) a également montré un intérêt. Une autre méthode consiste à utiliser des molécules ayant une affinité pour l'albumine supérieure à celle des TU. Ceci déplacerait les TU liées aux protéines et augmenterait la fraction libre éliminable par dialyse. Différentes molécules ont été testées comme, par exemple, l'octaonate de sodium [83], le furosémide ou encore l'ibuprofène [84,85].

Finalement, à ce jour, le meilleur moyen de limiter la toxicité des TU reste la greffe rénale. Après la transplantation, la fonction rénale partiellement recouverte permet de réduire les concentrations en TU [86]. Cependant, si la morbidité cognitive [87–89], cardiovasculaire [90] et osseuse [91] diminuent chez les patients transplantés, ils restent exposés aux TU, certes en plus faibles concentrations mais sur une très longue durée. Les effets toxiques des TU à de telles concentrations demeurent inconnus sur le long terme [92]. Par ailleurs, ces patients, avec une polymédication inhérente à la greffe rénale, présentent une charge médicamenteuse élevée (11 ± 3 médicaments en moyenne) et supérieure à celle des patients hémodialysés [93]. Cette polymédication conduit à une augmentation de la fréquence des effets indésirables [94]. Cela pourrait augmenter également théoriquement les interactions PK entre les médicaments et les TU.

3. Rôle des toxines urémiques dans l'altération de la pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine chez les patients transplantés rénaux

3.1. Problématique de l'altération de la pharmacocinétique dans l'insuffisance rénale chronique

Dans la MRC, les atteintes histologiques irréversibles du tissu glomérulaire ou tubulaire altèrent les phénomènes d'excrétion/réabsorption des xénobiotiques par les transporteurs rénaux (OAT, MRP, BCRP, ...), diminuant la clairance rénale des médicaments. D'autres phénomènes d'inhibition enzymatique (CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C19, ...) et d'inhibition des transporteurs hépatiques (P-gp, OATP) modifient également la clairance non rénale [95]. Ainsi, les médicaments à élimination hépatique, comme les ICN, sont susceptibles de s'accumuler, favorisant le risque de survenue des EIM [94]. L'exposition chronique à certaines molécules actives issues du métabolisme comme les TU, explique en partie l'altération de la clairance non rénale, induisant une majoration des EIM chez les patients IRC [96,97].

3.2. État des lieux des connaissances sur l'implication des toxines urémiques dans la modification des paramètres pharmacocinétiques des médicaments

a) Absorption

L'étape d'absorption intestinale est la première étape de pharmacocinétique faisant suite à la prise *per os* d'un médicament. Elle peut notamment faire intervenir des transporteurs et des complexes enzymatiques situés sur la paroi cellulaire intestinale, qui font passer les xénobiotiques de la lumière intestinale vers la circulation portale.

Peu d'études précliniques se sont intéressées aux effets de la MRC sur l'absorption des médicaments. Deux études *in vitro* ont montré une réduction de l'expression protéique et de l'activité des transporteurs intestinaux P-gp, MRP2 et MRP3 après incubation d'entérocytes de rats ou de cellules Caco2 avec du sérum de rats urémiques [98,99]. Concernant l'effet sur l'absorption des médicaments, l'équipe de Leblond montre en 2002 que la N-déméthylation de l'érythromycine par les CYP 3A était diminuée de plus de 25% chez des rats IRC [100]. Cette inhibition de la clairance non rénale (intestinale et hépatique) par les TU participe à l'augmentation de la C_{max} retrouvée pour certains médicaments chez les patients en IRCT, comme la fexofénadine [101].

b) Distribution

Une fois dans la circulation systémique, la majorité des médicaments se lie fortement aux protéines plasmatiques, et notamment à l'albumine. La distribution des molécules vers les tissus-cibles dépend du pourcentage de médicaments liés. C'est donc la fraction libre du médicament, c'est-à-dire la fraction non liée aux protéines plasmatiques, qui est efficace car elle seule peut atteindre le tissu-cible pour y exercer son effet.

Il a été montré que les TU sont capables d'interagir avec la phase de distribution des médicaments. Ces interactions peuvent découler de deux mécanismes distincts. D'une part, il peut exister des phénomènes de compétition directe entre les TU fortement liées à l'albumine et les médicaments. En effet, l'ajout *in vitro* de concentrations croissantes d'IxS et de pCS qui se lie à plus de 95% au site II de l'albumine [102,103] augmentent les fractions libres de théophylline, de phénytoïne et d'aripiprazole [104,105], signant une compétition directe entre les médicaments et les TU au niveau de leur site de liaisons à l'albumine.

Un second mécanisme d'interaction existe. Certains composés sanguins sont capables d'induire des modifications post-traductionnelles irréversibles appelées « carbamylation des protéines plasmatiques et tissulaires » [106,107]. C'est le cas de l'acide isocyanique issu de la décomposition de l'urée sanguine, qui fixe des motifs carbamoyl sur les groupements fonctionnels de certains acides aminés constituant les protéines plasmatiques [108]. Chez les patients atteints de MRC, ayant une

accumulation importante d'urée et donc d'isocyanate, la proportion plus importante de protéines carbamylées retrouvée est associée à une augmentation de la morbi-mortalité [109,110].

Au niveau de la phase de distribution des médicaments, il a été montré que les protéines plasmatiques carbamylées fixent moins les médicaments, augmentant ainsi la fraction libre active et donc le risque de surdosage. C'est ce qu'a montré l'équipe d'Erill et al. pour la sulfadiazine (Figure 5) [111]. Un mécanisme similaire de carbamylation de l'albumine par les TU, avec une augmentation de la fraction libre des médicaments antivitaminé-K (AVK), est proposé pour expliquer le risque accru d'hémorragie survenant chez les patients IRC [112,113] mais il reste à démontrer. Une étude clinique étaié cependant cette hypothèse [114]. En effet, l'équipe de Limdi montre que les patients IRC présentent des posologies en warfarine 9.5% et 19% plus faibles chez les patients ayant respectivement un stade modéré ou sévère d'IRC, par comparaison aux patients sans atteinte rénale. Une augmentation de la fraction libre des AVK chez les patients IRC conduirait ainsi à une diminution de la posologie par le prescripteur pour atteindre un INR similaire à celui des patients contrôles.

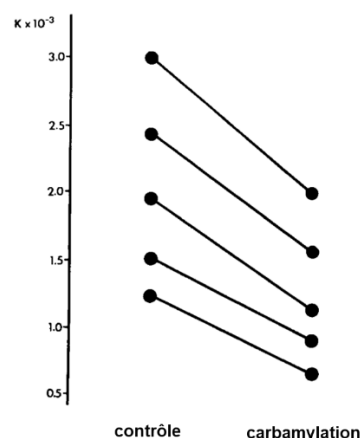


Figure 5. Constante d'affinité de la sulfadiazine aux protéines plasmatiques chez des volontaires sains avant et après carbamylation par 40mM de cyanate de potassium. Image modifiée d'après Erill et al., 2018 [111].

c) Métabolisme

Les médicaments peuvent subir un métabolisme hépatique une fois qu'ils arrivent au niveau du foie. Divers enzymes de phase I (phase de fonctionnalisation) et de phase II (phase de conjugaison) les prennent en charge : cytochromes P450, SULT, UGT, ... Les TU sont capables d'altérer l'activité et l'expression de ces enzymes. C'est ce qui est montré dans le travail de Tsujimoto en 2013 où le métabolisme du paracétamol via le CYP1A2 est inhibé par du sérum de patients en IRCT dans un modèle de microsomes hépatiques humains [115]. Dans une autre étude, la formation du métabolite actif du losartan (EXP 3174) par le CYP2C9 passe de 100% à 40% sous l'effet de l'inhibition de l'activité de ce CYP par l'IxS et le pCS [116]. L'équipe de Michaud montre que l'expression génique et l'expression

protéique des CYP 1A, CYP2C et CYP 3A sont diminuées après exposition d'hépatocytes murins à du sérum urémique de patients en pré-dialyse. L'expression est restaurée lorsque que les hépatocytes sont exposés à du sérum de patients en post-dialyse, c'est-à-dire, en partie débarrassé de composés urémiques [117].

d) Élimination

L'élimination du xénobiotique constitue la dernière phase de la pharmacocinétique. Cette élimination peut avoir lieu dans différents organes (rein, foie, poumons, intestin, ...). Elle fait de nouveau intervenir des transporteurs membranaires (P-gp, OAT, OCT, OATP, ...). L'altération de la phase d'élimination par les TU repose, le plus souvent, sur une diminution de l'expression et/ou de l'activité des transporteurs membranaires. Ainsi, concernant l'élimination rénale, Hsueh et son équipe montrent dans des cellules HEK293 rénales, que sur 72 toxines testées, 12 et 13 TU inhibent respectivement les transporteurs OAT1 et OAT3. L'IXS, l'IAA et le pCS en font partie. Dans ce même travail, les auteurs montrent globalement que l'élimination rénale de nombreux médicaments pris en charge au niveau tubulaire par des transporteurs OAT1/OAT3, est diminuée chez des patients insuffisants rénaux par rapport aux volontaires sains. Cela reflète une action inhibitrice des TU sur l'élimination tubulaire des médicaments substrats de ces transporteurs [118].

De la même manière, au niveau biliaire, l'équipe de Reyes montre en 2011 que l'exposition des cellules hépatiques humaines et murines au sérum urémique inhibe le transport intra-hépatocytaire du losartan et de l'³H-estrone sulfate, respectivement substrats des transporteurs OATP1B1 et OATP1B3 hépatiques [119]. De même, le travail de Sato en 2014 montre que dans des cellules HEK293 transfectées, le transport du méthotrexate via OATP1B et OATP3B est inhibé par l'IXS, l'IAA et le para-crésol [120].

3.3. Cas des inhibiteurs de calcineurine

Les médicaments à élimination hépatique peuvent être concernés par les modifications de PK induites par la MRC et, plus particulièrement, par l'accumulation des TU. Le cas de la ciclosporine a récemment été étudié par l'équipe de Machado qui s'est intéressée au lien entre l'accumulation des TU, les posologies en ciclosporine et l'expression de la P-gp hépatique [121]. Dans la partie *in vitro* de l'étude, Machado et son équipe montrent que l'expression et l'activité de la P-gp sont stimulées par l'IXS. La partie clinique de l'étude montre qu'une posologie élevée de ciclosporine est significativement associée à une forte concentration plasmatique en IXS chez des patients transplantés cardiaque. Les auteurs supposent alors que l'IXS stimule l'expression et l'activité de la P-gp hépatique, qui élimine

davantage la ciclosporine, obligeant les prescripteurs, à la suite du STP de la ciclosporine, à augmenter les posologies pour rester dans l'intervalle des concentrations thérapeutiques (Tableau IV).

Tableau IV. Régression linéaire multiple recherchant une association entre la posologie de ciclosporine et les concentrations en indoxyl sulfate. Image modifiée d'après Santana Machado et al., 2018 [121].

Concentration en ciclosporine mg/kg/J	Coefficient	IC95%	Valeur de p
IxS, μM	0.01	0 to 0.03	0.03
IAA, μM	-0.04	0.14 to 0.07	0.48
Concentration sanguine cible de ciclosporine, mg/L	0.010	0.006 to 0.015	<0.001
Sexe	0.44	0.06 to 0.82	0.02
IMC, kg/m^2	-0.09	-0.14 to -0.05	<0.001
Âge, année	-0.01	-0.03 to 0.01	0.18
Délai depuis la transplantation	0	-0.05 to 0.04	0.83
DFGe (CKD-EPI), $\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$	0.01	-0.01 to 0.02	0.33

CKD-EPI : Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé ; IAA : acide indole-3-acétique ; IC95% : intervalle de confiance à 95% ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate.

Toutefois, l'effet de l'IxS sur la P-gp peut varier en fonction de l'organe étudié. L'équipe de Shibata montre ainsi *in vitro* dans des cellules intestinales Caco2 que l'IxS et le CMPF diminuent l'activité de la P-gp intestinale, induisant une diminution de la perméabilité des cellules intestinales à la ciclosporine, molécule substrat de la P-gp [122].

Concernant le tacrolimus, très peu d'études existent. L'équipe d'Okabe a montré en 2000 que la biodisponibilité du tacrolimus est altérée chez les rats IRC, avec un taux d'absorption intestinal accéléré, une saturation du métabolisme hépatique, ce qui augmente l'exposition sanguine en tacrolimus [123]. Plusieurs mécanismes sont avancés par les auteurs pour expliquer ce phénomène, et notamment la présence dans le sang de molécules inhibitrices des CYP450 intestinaux et hépatiques chez les rats ayant développé une IRA et citent les TU comme potentiellement impliquées.

4. Hypothèse et objectifs

Lors de la transplantation rénale, le traitement des patients par des immunosuppresseurs de type ICN passe par la mise en place du STP. Compte tenu de la variabilité de leur PK, de nombreux paramètres sont à prendre en compte pour maintenir leurs concentrations dans la zone des concentrations thérapeutiques. Pendant la MRC, il est probable que l'accumulation des TU, en particulier des TU fortement liées aux protéines plasmatiques (telles que l'IxS, IAA ou le pCS) puisse également accroître la variabilité de leur PK par le biais de modifications au niveau des étapes de distribution (carbamylation des protéines, modification de la liaison aux protéines plasmatiques) ou de leur élimination (modification de l'expression de la P-gp).

Ainsi, notre hypothèse est qu'une accumulation des TU peut moduler l'exposition aux ICN chez les patients transplantés rénaux. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est de déterminer si l'accumulation de certaines toxines urémiques est associée à une modification des concentrations sanguines en ciclosporine ou en tacrolimus dans une cohorte de patients transplantés rénaux.

Matériels et méthodes

1. L'étude DRUGTOX

1.1. Conception de l'étude

L'étude DRUGTOX est une étude clinique transversale non interventionnelle hors loi Jardé, monocentrique, qui cible une population de patients transplantés rénaux suivis au CHU d'Amiens-Picardie pour le STP de leur traitement immunosuppresseur à base d'ICN. Les patients sont répartis en deux groupes suivant leur DFGe : le groupe 1 avec DFG > 40 ml/min (concentrations en TU faibles) et le groupe 2 avec un DFG \leq 40 ml/min (concentrations en TU élevées).

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- âge supérieur à 18 ans ;
- patient transplanté rénal suivi au CHU d'Amiens-Picardie et transplanté depuis plus d'une année ;
- patient ayant une prise de sang pour évaluation des concentrations en ICN par le laboratoire de pharmacologie toxicologie du CHU Amiens-Picardie ;
- patient affilié à la sécurité sociale ;
- patient n'ayant pas refusé sa participation dans l'étude.

Les patients ne recevant pas d'ICN, faisant un rejet aigu de greffe, sous tutelle ou curatelle ou refusant de participer à l'étude, sont exclus de l'étude.

L'étude est enregistrée à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (numéro d'enregistrement : PI2019_843_0060) et sur le site ClinicalTrials.gov (NCT04963673) [126].

L'objectif primaire de l'étude est d'évaluer s'il existe une différence des concentrations en tacrolimus en fonction des concentrations plasmatiques des toxines urémiques. Pour cela, le critère de jugement principal est de comparer l'exposition en tacrolimus en fonction des concentrations en urée et en toxines urémiques liées aux protéines plasmatiques. L'objectif secondaire de l'étude est d'évaluer s'il existe une différence des concentrations en ciclosporine en fonction des concentrations plasmatiques en urée et en toxines urémiques en comparant l'exposition en ciclosporine en fonction des niveaux de toxines urémiques liées aux protéines plasmatiques.

L'exposition en ICN est évaluée par le ratio de la concentration résiduelle (C_{\min}) sur la posologie journalière en mg/kJ/J (D). Les facteurs confondants susceptibles de modifier les paramètres PK des ICN et donc, l'exposition sanguine des patients, sont inclus dans le recueil de données. Le choix de travailler avec le ratio C_{\min}/D permet de s'affranchir des adaptations de posologies faites par le néphrologue, suite au STP.

1.2. Inclusion des patients

Entre le 4 août 2019 et le 11 mars 2020, 203 patients ayant un DFGe > 40 ml/min/1,73 m² c'est-à-dire ayant des concentrations élevées en TU, sont inclus dans le groupe 1. Le groupe 2 est constitué de 200 patients ayant un DFGe ≤ 40 ml/min/1,73 m², c'est-à-dire ayant une accumulation plus importante de TU. Les inclusions dans les deux groupes ont été réalisées en parallèle. Puis, le groupe 1 ayant été constitué plus rapidement, seule la constitution du groupe 2 a été poursuivie jusqu'à atteindre 200 patients. Chaque patient a été inclus une seule fois.

Les prélèvements sanguins des patients sélectionnés sont analysés au laboratoire de pharmacologie-toxicologie pour doser les concentrations résiduelles (C_{\min}) des ICN, tacrolimus et ciclosporine, dans le cadre du STP de leur traitement par ICN. Le dosage plasmatique des TU est effectué sur le prélèvement ayant servi à doser les concentrations résiduelles en immunosuppresseurs. Ainsi, aucun prélèvement supplémentaire n'est réalisé pour le dosage des TU.

1.3. Recueil des données

Les données sociodémographiques (âge, sexe), anthropométriques (indice de masse corporelle [IMC]), cliniques (pression artérielle systolique [PAS], pression artérielle diastolique [PAD], étiologie de MRC, antécédents d'HTA, insuffisance hépatique, délai post-transplantation) et biologiques (calcémie, phosphatémie, glycémie, acide urique, protéine C-réactive [CRP], protéinémie, albuminémie, aspartate aminotransférases [ASAT], alanine aminotransférases [ALAT], créatininémie) sont relevées dans les dossiers médicaux. L'équation du MDRD (Modification of diet in renal disease) permet de calculer le DFGe et la classification KDIGO est choisie pour les stades d'IRC. Enfin, les médicaments ayant un potentiel inducteur ou inhibiteur fort, faible de la P-gp ou des CYP3A4/5 ou fortement liés aux protéines plasmatiques sont relevés dans l'ordonnance des patients qui couvre le jour du prélèvement sanguin (Tableau V).

Tableau V. Liste des médicaments interagissant avec le CYP3A4, la P-gp et les protéines plasmatiques [127].

Inhibiteurs forts de CYP450 3A4/5	Inducteurs forts de CYP450 3A4/5	Inhibiteurs de la P-gp	Médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques		
amiodarone atazanavir cimétidine clarithromycine darunavir dihydralazine diltiazem doxycycline érythromycine fluconazole fosamprenavir imatinib indinavir itraconazole kétoconazole	bosentan carbamazépine dexaméthasone éfavirenz felbamate méprobamate métamizole millepertuis oxcarbazépine phénobarbital phénytoïne primidone rifampicine topiramate	amiodarone atazanavir clarithromycine désogestrel diltiazem dipyridamole dronédarone duloxétine erlotinib érythromycine fluoxétine halopéridol irbésartan itraconazole	acénocoumarol acétazolamide AINS alfuzosine amiodarone atorvastatine bézafibrate bumétanide buspirone candésartan ceftriaxone cétirizine ciprofibrate chlorpromazine	glibenclamide gliclazide glimépiride glipizide halopéridol irbésartan itraconazole kétoconazole lanzoprazole léflunomide lévocétirizine lorazépam losartan midazolam	tacrolimus tamsulosine telmisartan tertatolol ticlopidine urapidil tolcapone valproate valsartan vérapamil warfarine zolpidem
méthylprednisolone miconazole nelfinavir ritonavir roxithromycine vérapamil voriconazole	Inducteurs faibles de CYP450 3A4/5 cyclophosphamide éthanol étravirine ifosfamide modafinil névirapine rifabutine	kétoconazole lansoprazole lopinavir méthadone nelfinavir nilotinib paroxétine propafénone	ciclosporine cinacalcet cisplatine clindamycine clopidogrel clorazépate clotiazépam cloxacilline	montélukast mycophénolate nébivolol nordazépam olanzapine olmésartan oméprazole pantoprazole	
Inhibiteurs faibles de CYP450 3A4/5 ciprofloxacine dasatinib désogestrel dronédarone éthinylestrodiol fluoxétine fluvoxamine gestodène isoniazide lopinavir nifédipine nilotinib nitrendipine quétiapine saquinavir sorafénib		quétiapine quinidine ritonavir saquinavir sertraline simvastatine vérapamil vinblastine	clozapine diazépam diazoxide digitoxine dihydropyridines doxycycline éconazole éprosartan	pirécamide posaconazole pravastatine prazépam prazosine prométhazine propafénone propranolol	
		Inducteurs de la P-gp carbamazépine dexaméthasone millepertuis névirapine rifabutine rifampicine	entacapone ésoméprazole fénofibrate fébuxostat fluindione fluphénazine fluvastatine furosémide gemfibrozil	quinine rabéprazole répaglinide rifampicine rispéridone rosuvastatine roxithromycine silodosine simvastatine	

2. Détermination des concentrations en inhibiteurs de la calcineurine et en toxines urémiques

2.1. Dosage sanguin des inhibiteurs de la calcineurine

La C_{min} en ICN est déterminée avec une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) (Api3200, Sciex®) qui a été validée selon les critères publiés par l'EMA (European Medicines Agency) [128,129]. Avant de procéder au dosage, 50 µL de sang total sont déprotéinisés avec 100 µL d'une solution de sulfate de zinc contenant les étalons internes deutérés. Après une étape de centrifugation, 30 µL sont injectés dans le système chromatographique pour analyse. La séparation des molécules est assurée par une colonne Luna Phenyl-Hexyl® de dimension 5 µm x 2,0 mm dans un four thermostaté à 60°C. Les

molécules sont ensuite ionisées en mode ESI positif. Les transitions suivantes sont respectivement utilisées pour la quantification de la ciclosporine et du tacrolimus : 1202,8->425,2 et 821,5->768,4.

2.2. Dosage plasmatique des toxines urémiques

Les concentrations plasmatiques en TU (IxS, pCS, IAA et TMAO) sont déterminées par CLHP-SM/SM (3200 QTRAP, Sciex®) [130]. L'échantillon ayant servi à faire le dosage de la C_{min} en ICN est centrifugé 15 minutes à 2250 rpm. L'étape pré-analytique consiste à ajouter 200 µL de solution d'acétonitrile glacé contenant les étalons internes (¹³C₆-IxS, d₄-pCS, [¹³C₆]-IAA et d₉-TMAO) à 50 µL de plasma. Après une centrifugation et une dilution du surnageant au 1/5 dans un mélange eau/acétonitrile (90/10), un volume de 15 µL est injecté dans le système chromatographique. La séparation des TU s'effectue par application d'un gradient d'acétonitrile avec 0,1% d'acide formique et d'eau ultra-pure avec 0,1% d'acide formique, selon un débit de 0,8 mL/min sur une colonne pentafluorophenyl propyl de dimension 5 µm, 50 x 2,1 mm (Restek®). L'acquisition se fait après une ionisation en mode ESI négatif pour l'IxS et le pCS et en mode ESI positif pour le TMAO et l'IAA. Les transitions MRM et les paramètres d'ionisation de chaque TU sont résumés dans le [Tableau VI](#) :

Tableau VI. Paramètres du spectromètre de masse pour l'identification des toxines urémiques.

Molécules	mode ESI	m/z Q1	m/z Q3	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
TMAO	positif	76,1	58	31	12	10	23	4
		76,1	59	31	12	10	15	4
d9-TMAO	positif	85,1	66,1	46	11,5	10	27	4
		85,1	68	46	11,5	10	17	4
IAA	positif	176,2	130,1	31	10,5	12	19	4
		176,2	103,1	31	10,5	12	39	4
[¹³ C ₆]-IAA	positif	182,2	136	11	7	12	47	4
		182,2	109,1	11	7	12	19	4
pCS	négatif	186,8	106,8	-40	-2,5	-12	-30	0
		186,8	79,9	-40	-2,5	-12	-30	0
d4-pCS	négatif	190,8	111	-30	-2,5	-14	-30	0
		190,8	79,9	-30	-2,5	-14	-30	0
IxS	négatif	211,9	79,9	-55	-2,5	-10	-34	0
		211,9	132	-55	-2,5	-10	-24	0
[¹³ C ₆]-IxS	négatif	217,7	79,7	-65	-9,5	-12	-34	0
		217,7	138	-65	-9,5	-12	-24	0

CE : énergie de collision (collision energy) ; CEP : potentiel d'entrée dans la cellule de collision (cell entrance potential) ; CXP : potentiel de sortie de la cellule de collision (collision cell exit potential) ; DP : potentiel de dissociation (decluster potential) ; EP : potentiel d'entrée dans l'analyseur (entrance potential) ; ESI : electrospray ionization (ionisation electrospray) ; IAA : acide indole-3-acétique ; IxS : indoxyl sulfate ; pCS : para-crésyl sulfate ; Q : quadripôle ; TMAO : triméthylamine N-oxide ; V : volt.

Les chromatogrammes obtenus après l'analyse en MRM en mode négatif et en mode positif sont présentés en [Figure 6](#).

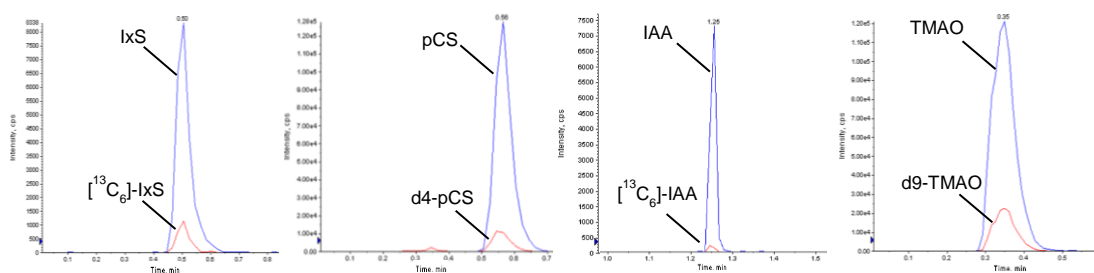


Figure 7. Chromatogrammes des toxines urémiques après acquisition en mode MRM après ionisation en mode négatif pour IxS (a), pCS (b) et en mode positif pour IAA (c) et TMAO (d).

IAA : acide indole-3-acétique ; IxS : indoxyl sulfate ; pCS : para-crésyl sulfate ; TMAO : triméthylamine-N-oxyde.

Le dosage de l'urée est effectué sur l'automate Atellica (Siemens®) selon une réaction enzymatique utilisant l'uréase et la glutamate-déshydrogénase. Le principe de l'analyse est le suivant : l'urée est hydrolysée en présence d'eau et d'uréase pour former de l'ammoniac et du dioxyde de carbone. L'ammoniac réagit avec l' α -cétoglutarate en présence de glutamate déshydrogénase (GLDH) et de NADH. L'oxydation du NADH en NAD est mesurée en cinétique inverse à 340/410 nm (Figure 8).

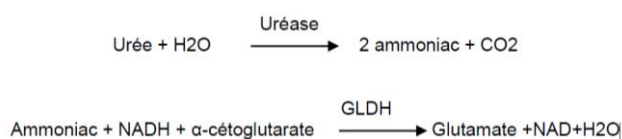


Figure 8. Réaction enzymatique permettant de doser l'urée.

CO₂ : dioxyde de carbone ; H₂O : eau ; NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide ; NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide oxydé.

3. Analyses statistiques

Pour la description des caractéristiques de la population, les variables quantitatives sont décrites à l'aide de la médiane et de l'écart interquartile [EI] ou de la fréquence et du pourcentage. Les variables qualitatives sont décrites par leur fréquence avec un intervalle de confiance de niveau 95 % (IC95%). Un test de Shapiro est effectué pour vérifier la normalité de la distribution des valeurs dans la population. Des tests de Mann-Whitney et de Chi² sont utilisés pour comparer les caractéristiques de chaque sous-groupe (DFGe ≤ 40 ml/min/1,73 m² vs DFGe > 40 ml/min/1,73 m²).

L'analyse du critère principal se fait comme suit. L'hypothèse nulle (le ratio C_{min}/D de tacrolimus et la concentration plasmatique en TU sont identiques entre les deux groupes) est rejetée au profit de l'hypothèse alternative (il y a une différence du ratio C_{min}/D et de concentration plasmatique en TU entre les deux groupes) à l'aide d'un test de Student pour échantillons

indépendants (ou d'un test de Mann-Whitney pour les variables non paramétriques) avec un risque de première espèce bilatéral de 5 %. Les concentrations plasmatiques en TU entre chaque stade KDIGO (stade 1, stade 2/3 et stade 4/5) sont testées selon un test de Kruskal-Wallis (selon que les données suivent ou non une distribution normale). La recherche d'une association entre l'accumulation plasmatique de certaines TU et l'exposition en tacrolimus ou en ciclosporine (ratio C_{min}/D) a été évaluée au moyen d'une régression logistique univariée puis multivariée. L'ensemble des variables pouvant influencer le ratio C_{min}/D de tacrolimus ou de ciclosporine a été inclus dans l'analyse univariée. Les variables ayant un $p < 0,10$ ont été incluses dans la régression logistique multivariée. La colinéarité entre les TU étant trop importante, les analyses uni- et multivariées sont réalisées indépendamment pour chaque TU.

Les analyses statistiques sont effectuées sur les logiciels SPSS (version 18.0, SPSS Inc.) pour Windows®, (Microsoft Corp®) et R® (version 3.5.0, Foundation for Statistical Computing®).

Résultats

1. Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte DRUGTOX

Un total de 403 patients a été inclus dans l'étude, soit 250 hommes (62,03%) et 153 femmes (37,97%). L'âge médian (EI) est de 56 ans (48-66). L'hypertension est présente chez 97,30% des patients et un seul patient a une insuffisance hépatique. L'intervalle de temps médian (EI) entre le jour de la transplantation et le jour de l'inclusion est de 78 mois (40,0-158,5) soit 6,5 ans, avec un minimum d'1 an et un maximum de 40 ans. Le DFGe médian pour l'ensemble de la population est de 41 mL/min/1,73 m² (30-57) et la majorité des patients (56,5%) sont au stade 3 KDIGO. L'ensemble des patients de la cohorte présente une hypoalbuminémie avec une albuminémie médiane à 39,0 g/L, une créatininémie médiane (EI) à 146 µmol/L (116-187) pour des valeurs normales de 44-71 µmol/L et une uricémie médiane (EI) à 471 µmol/L (390-565) (valeurs normales = 180-420 µmol/L) (Tableau VII).

Le groupe 2 (≤ 40 mL/min/1,73 m²) est composé de 54,0% d'hommes et les patients sont plus âgés (âge médian 59 ans) en comparaison au groupe 1. Les patients du groupe 2 présentent un délai post-transplantation plus élevé (85 mois) par rapport au groupe 1 (65 mois). Les paramètres biologiques évaluant la fonction rénale sont plus altérés dans le groupe 2 avec une phosphatémie, une créatininémie, une uricémie et des concentrations en TU plus élevées comparativement aux patients du groupe 1. L'albuminémie est, quant à elle, plus basse.

Tableau VII. Caractéristiques clinico-biologiques des patients de la cohorte DRUGTOX (n=403).

	Tous les patients (n=403)	DFGe (MDRD d'après l'équation MDRD), en mL/min per 1.73 m ²		valeur de p
		1 : DFGe > 40 (n=203)	2 : DFGe ≤ 40 (n=200)	
<u>Caractéristiques démographiques</u>				
hommes	250 (62,0)	142 (69,9)	108 (54,0)	0,001
âge (année)	56,0 (48,0-66,0)	54,00 (44,5-64,0)	59,0 (50,8-90,1)	0,0001
IMC (kg/m ²)	26,5 (23,4-29,7)	26,3 (23,0-29,4)	26,5 (23,7-30,4)	0,153
<u>Caractéristiques cliniques</u>				
Stades d'IRC				
1	13 (3,2)	13 (6,4)		
2	68 (16,9)	68 (33,5)		
3	228 (56,5)	122 (60,1)	106 (53,0)	
4	84 (20,8)		84 (42,0)	
5	10 (2,5)		10 (5,0)	
Cause de l'IRC, n (%)				
1- diabète	20 (4,9)	12 (5,9)	8 (4,0)	
2- atteinte vasculaire	26 (6,5)	10 (4,9)	16 (8,0)	
3- glomérulonéphrite chronique	38 (9,4)	16 (7,9)	22 (11,0)	
4- polykystose hépatorénale	63 (15,4)	31 (15,3)	31 (15,5)	
5- néphrite interstitielle	5 (1,2)	2 (1,0)	3 (1,5)	0,840
6- maladie auto-immune	72 (17,9)	36 (17,7)	36 (18,0)	
7- maladie génétique	45 (11,2)	24 (11,8)	21 (10,5)	
8- autres causes	106 (26,3)	57 (28,1)	49 (24,5)	
9- mixtes (plus d'une cause)	29 (7,2)	15 (7,4)	14 (7,0)	
Intervalle entre la transplantation et l'inclusion (mois)	78,0 (40,0-158,5)	65,0 (32,5-138,0)	85,0 (48,0-179,2)	0,003
Nombre de transplantations				
1	359 (89,1)	177 (87,2)	182 (91,0)	
2	41 (10,2)	25 (12,3)	16 (8,0)	0,312
3	2 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	
4	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,5)	
PAS (mmHg)	142 (132-158)	140 (131-154)	144 (132-160)	0,160
PAD (mmHg)	80 (72-87)	80 (74-85)	80 (70,0-90)	0,720
PP (mmHg)	64 (54-75)	62 (53-70)	66 (54-79)	0,051
Hypertension	392 (97)	195 (96)	196 (98)	0,381
Insuffisance hépatique	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,5)	0,496
<u>Bilan biologique</u>				
calcémie (mmol/L)	2,41 (2,32-2,49)	2,43 (2,35-2,49)	2,39 (2,30-2,48)	0,034
phosphatémie (mmol/L)	1,05 (0,91-1,20)	0,99 (0,87-1,09)	1,14 (0,99-1,30)	< 0,001
protéïnémie (g/L)	67 (64-70)	68 (65-71)	66 (63-69)	< 0,001
albuminémie (g/L)	39,0 (36,7-41,1)	39,8 (38,2-41,9)	37,7 (35,5-40,0)	< 0,001
glycémie (mmol/L)	5,4 (4,8-6,3)	5,3 (4,8-6,1)	5,5 (4,8-6,4)	0,583
ASAT (UI/L)	16 (13-21)	17,00 (13-22)	15 (12-19)	0,073
ALAT (UI/L)	20 (15-27)	23(16-29)	19 (14-24)	0,095
créatinémie (μmol/L)	146 (116-187)	116 (97-115)	187 (163-229)	< 0,0001
DFGe (MDRD) (ml/min/1.73 m ²)	41 (30-57)	57 (49-65)	30 (23-35)	< 0,0001
Acide urique (μmol/L)	471 (390-565)	446 (378-523)	509 (405-598)	0,0003
CRP (mg/L)	3,7 (0,6-9,0)	2,1 (0,6-5,5)	5,4 (0,6-13,5)	0,012
<u>Toxines urémiques</u>				
urée (mmol/L)	11,30 (8,20-15,65)	8,3 (6,45-9,80)	15,45 (12,07-20,60)	< 0,0001
TMAO (μg/mL)	0,71 (0,35-1,54)	0,42 (0,24-0,93)	1,17 (0,58-1,98)	< 0,0001
IAA (μg/mL)	0,39 (0,25-0,57)	0,35 (0,21-0,48)	0,45 (0,28-0,62)	< 0,0001
PCS (μg/mL)	4,32 (1,52-7,76)	3,02 (1,10-5,65)	5,80 (2,88-10,63)	< 0,0001
IxS (μg/mL)	2,22 (1,22-3,43)	1,39 (0,86-2,21)	3,11 (2,24-5,45)	< 0,0001

Les données sont répertoriées selon la médiane (EI) ou la fréquence (%).

ALAT : alanine aminotransférase ; ASAT : aspartate aminotransférase ; CRP : protéine C réactive ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé ; IAA : acide indole-3-acétique ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate ; MDRD : Modification of Diet in Renal Disease ; MRC : maladie rénale chronique ; pCS : para-crésyl sulfate ; PAD : pression artérielle diastolique ; PAS : pression artérielle systolique ; PP : pression pulsée ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

2. Dosage des concentrations plasmatiques en toxines urémiques

Les concentrations plasmatiques en TU s'accroissent significativement au fur et à mesure de l'altération du DFGe, pour les 5 TU étudiées (Figure 9).

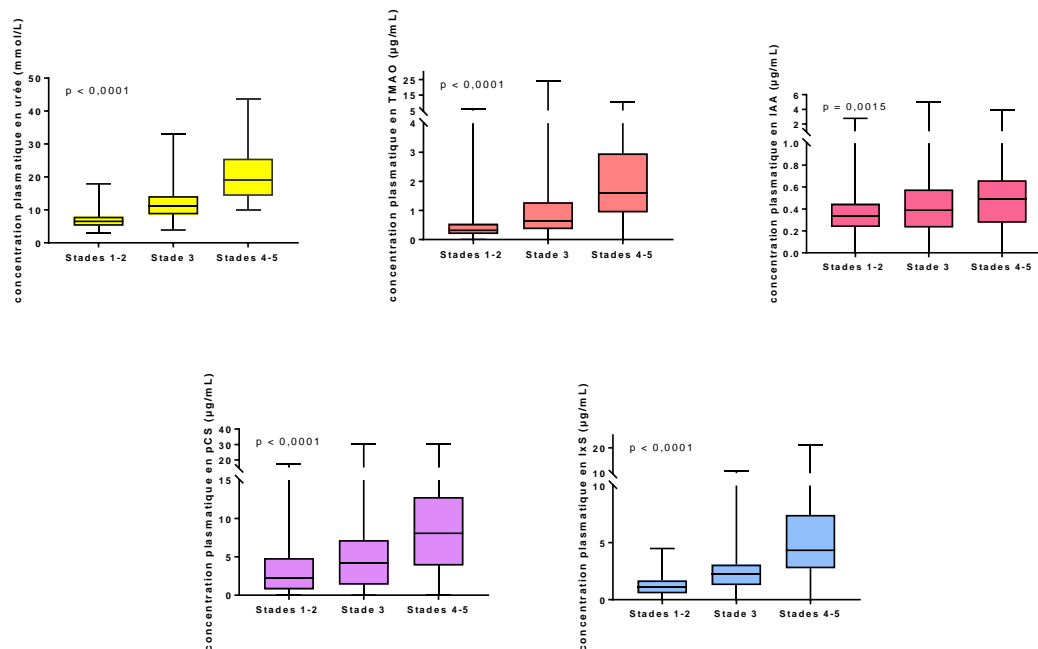


Figure 9. Concentration plasmatique en TU par stade d'IRC (n=403) : stades 1-2 : n= 81 ; stade 3 : n=228 ; stades 4-5 : n=94).

IAA : acide indole-3-acétique ; IxS : indoxyl sulfate ; pCS : para-crésyl sulfate ; TMAO : triméthylamine-N-oxyde.

3. Dosage des concentrations résiduelles sanguines en inhibiteurs de la calcineurine

Un total de 248 patients (soit 61,54% des patients de la cohorte totale) est traité par du tacrolimus. La posologie médiane journalière est de 4 mg/J (3-6) pour une posologie journalière de 0,06 mg/kg/J (0,04-0,08). La concentration sanguine résiduelle (C_{\min}) médiane de tacrolimus est de 7,2 ng/mL (5,6-8,5) donnant un ratio médian C_{\min}/D de 123,7 (81,3-177,1). Parmi les 155 patients traités par de la ciclosporine, la posologie journalière est de 150 mg/J (120-175), correspondant à une posologie journalière de 1,82 mg/j/kg (1,51-2,25). La concentration sanguine résiduelle (C_{\min}) de ciclosporine est de 94 ng/mL (73-123), avec un ratio C_{\min}/D médian de 52,9 (36,4-69,3) (Tableau VIII). Le nombre de patients traités par des médicaments inhibiteurs ou inducteurs des CYP3A4/5 et/ou de la P-gp et/ou des médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques et pouvant avoir un impact sur la PK des ICN est également résumé dans le Tableau VIII.

Tableau VIII. Données pharmacologiques du suivi thérapeutique et pharmacologique du tacrolimus et de la ciclosporine, ainsi que des médicaments pouvant interférer sur les concentrations plasmatiques en ICN (n=403).

	Tous les patients (n=403)
<u>Données concernant les ICN</u>	
<u>Ciclosporine (N=155)</u>	
concentration plasmatique (ng/mL)	94,30 (74,20-123,00)
posologie (mg/J)	150,00 (120,00-175,00)
posologie (mg/kg/J)	1,82 (1,51-2,25)
concentration plasmatique (ng/mL)/posologie (mg/kg/J)	52,89 (36,42-69,25)
<u>Tacrolimus (N=248)</u>	
concentration plasmatique (ng/mL)	7,19 (5,65-8,51)
posologie (mg/J)	4,00 (3,00-6,00)
posologie (mg/kg/J)	0,06 (0,04-0,08)
concentration plasmatique (ng/mL)/posologie (mg/kg/J)	123,70 (81,32-177,05)
<u>Traitements concomitants à la prise d'ICN</u>	
Au moins un inhibiteur fort du CYP3A4/5	14 (3,23)
Au moins un inhibiteur faible CYP3A4/5	5 (1,24)
Au moins un inducteur fort CYP3A4/5	6 (1,49)
Au moins un inducteur faible CYP3A4/5	3 (0,74)
Au moins un inhibiteur de la P-gp	87 (21,34)
Au moins un inducteur de la P-gp	5 (1,24)
Au moins un médicament se lie fortement aux protéines plasmatiques	399 (98,76)

Les données sont répertoriées selon la médiane (EI) ou la fréquence (%).

CYP450 : cytochrome P450 ; ICN : inhibiteur de la calcineurine ; P-gp : glycoprotéine-P.

4. Facteurs associés au ratio C_{min}/D de tacrolimus et de ciclosporine

4.1. Tacrolimus

a) Caractéristiques des patients selon l'exposition en tacrolimus évaluée par le ratio C_{min}/D

Les caractéristiques clinico-biologiques des patients traités par tacrolimus sont comparées entre les patients ayant un ratio C_{min}/D inférieur ou supérieur à la médiane (EI) (soit $<$ ou $>$ 123,70 (81,32-177,05)). Les patients ayant un ratio C_{min}/D de tacrolimus supérieur à la médiane sont davantage des hommes, ont un IMC, une glycémie, une créatininémie et des concentrations en TU supérieures et un DFGe inférieur comparativement aux valeurs mesurées dans le groupe des patients avec un ratio C_{min}/D de tacrolimus inférieur à la médiane (Tableau IX). En revanche, il n'y a pas de différence entre les 2 groupes concernant la présence de médicament interagissant avec les CYP, la P-gp ou la liaison aux protéines plasmatiques (Annexe III).

Tableau IX. Caractéristiques des patients selon leur exposition au tacrolimus (évaluée d'après le ratio de la concentration résiduelle de tacrolimus normalisée par la dose en mg/J/kg (C_{min}/D)) (n=248).

	Tous les patients (n=248)	$C_{min}/D < 123,70$ (n=124)	$C_{min}/D > 123,70$ (n=124)	valeur de p
<u>Caractéristiques démographiques</u>				
hommes	156 (62,90)	70 (56,45)	86 (69,35)	0,04863
âge (année)	55,00 (44,75-64,25)	50,50 (41,00-59,00)	58,00 (49,00-67,00)	< 0,0001
IMC (kg/m ²)	25,91 (23,02-29,07)	24,91 (21,80-28,17)	26,86 (24,52-30,20)	< 0,0001
<u>Caractéristiques cliniques</u>				
Stades d'IRC				
1	11 (4,44)	7 (5,65)	4 (3,23)	0,6093
2	48 (19,35)	26 (20,97)	22 (17,74)	
3	141 (56,85)	71 (57,26)	70 (56,45)	
4	44 (17,74)	18 (14,52)	26 (20,97)	
5	4 (1,61)	2 (1,61)	2 (1,61)	
Cause de l'IRC, n (%)				
1- diabète	15 (6,05)	8 (6,45)	7 (5,65)	0,0207
2- atteinte vasculaire	18 (7,26)	7 (5,65)	11 (8,87)	
3- glomérulonéphrite chronique	15 (6,05)	10 (8,06)	5 (4,03)	
4- polykystose hépatorénale	36 (14,52)	15 (12,10)	21 (16,94)	
5- néphrite interstitielle	3 (1,21)	3 (2,42)	0 (0,00)	
6- maladie auto-immune	51 (20,56)	23 (18,55)	28 (22,58)	
7- maladie génétique	28 (11,29)	15 (12,10)	13 (10,48)	
8- autres causes	60 (24,19)	38 (30,65)	22 (17,74)	
9- mixtes (plus d'une cause)	22 (8,87)	5 (4,03)	17 (13,71)	
Intervalle entre la transplantation et l'inclusion (mois)	54,00 (26,75-100,25)	48,00 (26,00-88,00)	58,50 (27,00-108,00)	0,3731
Nombre de transplantations				
1	210 (84,68)	100 (80,65)	110 (88,71)	0,1884
2	35 (14,11)	22 (17,74)	13 (10,48)	
3	2 (0,81)	1 (0,81)	1 (0,81)	
4	1 (0,40)	1 (0,81)	0 (0,00)	
PAS (mmHg)	142,00 (134,00-155,00)	140,00 (131,00-152,50)	144,00 (135,00-158,80)	0,0762
PAD (mmHg)	80,00 (72,00-87,25)	80,00 (72,00-87,50)	80,00 (73,00-87,00)	0,8140
PP (mmHg)	63,00 (54,00-75,00)	62,00 (53,00-70,00)	66,00 (55,00-80,00)	0,1054
Hypertension	239 (96,37)	118 (95,16)	121 (97,58)	0,4997
Insuffisance hépatique	1 (0,40)	0 (0,00)	1 (0,40)	1,0000
<u>Bilan biologique</u>				
calcémie (mmol/L)	2,40 (2,32-2,48)	2,39 (2,31-2,47)	2,41 (2,33-2,49)	0,1882
phosphatémie (mmol/L)	1,03 (0,90-1,16)	1,03 (0,89-1,14)	1,03 (0,90-1,19)	0,4826
protéïnémie (g/L)	67,00 (64,00-69,00)	66,50 (64,00-70,00)	67,00 (63,75-69,00)	0,6832
albuminémie (g/L)	38,30 (37,20-41,60)	39,30 (37,40-41,90)	39,30 (37,10-41,40)	0,5364
glycémie (mmol/L)	5,50 (4,90-6,30)	5,30 (4,80 -6,10)	5,50 (5,00-6,48)	0,0395
ASAT (UI/L)	15,00 (12,00-20,00)	15,00 (12,50-20,00)	15,00 (12,00-18,00)	0,9419
ALAT (UI/L)	19,00 (14,00-24,00)	18,00 (14,00-24,50)	19,00 (16,00-24,00)	0,3168
créatinémie (μmol/L)	138,00 (111,00-177,20)	132,50 (108,50-166,20)	146,00 (119,00-182,80)	0,0276
DFGe (MDRD) (ml/min/1.73 m ²)	43,00 (32,00-58,25)	47,00 (34,75-60,25)	40,00 (30,00-58,00)	0,0326
Acide urique (μmol/L)	462,00 (395,00-552,00)	449,50 (392,80-531,20)	483,00 (397,00-574,50)	0,0568
CRP (mg/L)	3,87 (0,89-41,60)	4,09 (1,26-8,31)	3,17 (0,65-12,75)	0,8282
<u>Toxines urémiques</u>				
urée (mmol/L)	10,10 (7,48-14,00)	9,35 (7,00-13,15)	10,90 (8,15-15,70)	0,0217
TMAO (μg/mL)	0,53 (0,27-1,32)	0,43 (0,25-1,34)	0,70 (0,31-1,31)	0,0921
IAA (μg/mL)	0,38 (0,25-0,56)	0,36 (0,25-0,53)	0,40 (0,26-0,57)	0,4662
PCS (μg/mL)	3,45 (1,20-6,21)	2,76 (0,89-5,25)	4,52 (1,47-6,87)	0,0044
IxS (μg/mL)	1,92 (1,14-3,07)	1,49 (1,01-2,94)	2,22 (1,26-3,26)	0,0199

Les données sont répertoriées selon la médiane (EI) ou la fréquence (%).

ALAT : alanine aminotransférase ; ASAT : aspartate aminotransférase ; CRP : protéine C réactive ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé ; IAA : acide indole-3-acétique ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate ; MDRD : Modification of Diet in Renal Disease ; MRC : maladie rénale chronique ; PCS : para-crésyl sulfate ; PAD : pression artérielle diastolique ; PAS : pression artérielle systolique ; PP : pression pulsée ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

b) Analyse de l'association entre les concentrations en toxines urémiques et l'exposition en tacrolimus évaluée par le ratio C_{\min}/D

Une régression logistique univariée est utilisée pour rechercher une association entre l'exposition en tacrolimus et les concentrations en TU. L'ensemble des facteurs pouvant avoir un impact sur le ratio C_{\min}/D de tacrolimus sont inclus dans l'analyse. Les résultats montrent une association significative entre le ratio C_{\min}/D de tacrolimus supérieur à la médiane et l'augmentation des concentrations en urée, en pCS et en IxS, avec des odds ratio avec intervalles de confiance à 95% (OR [IC95%]) respectivement calculés à 2,08 [1,21 ; 3,60] ($p=0,008$), à 1,27 [1,04 ; 1,54] ($p=0,018$) et à 1,41 [1,06 ; 1,86] ($p = 0,018$). D'autres cofacteurs sont également associés au ratio C_{\min}/D élevé : le sexe, l'IMC et l'âge du patient (Tableau X).

Tableau X. Régression logistique univariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de tacrolimus (n=248).

	Tacrolimus C_{\min}/D ratio		
	OR	[IC95%]	valeur de p
Age (année)	1,05	[1,02 ; 1,07]	<0,0001
Sexe (homme vs. femme)	1,75	[1,04 ; 2,94]	0,036
IMC (kg/m²)	1,12	[1,06 ; 1,19]	<0,0001
Intervalle entre la transplantation et l'inclusion (mois)	1,00	[0,99 ; 1,00]	0,393
Protéïnémie (g/L)	0,99	[0,95 ; 1,05]	0,995
Albuminémie (g/l)	0,93	[0,79 ; 1,09]	0,378
ASAT (UI/L)	1,01	[0,97 ; 1,05]	0,786
ALAT (UI/L)	1,01	[0,98 ; 1,04]	0,636
Au moins un inhibiteur de CYP3A4/5	0,74	[0,21 ; 3,03]	0,735
Au moins un inducteur de CYP3A4/5	0,39	[0,07 ; 2,05]	0,266
Au moins un inhibiteur de P-gp	1,59	[0,84 ; 2,99]	0,153
Au moins un inducteur de P-gp	0,33	[0,3 ; 3,19]	0,337
Urée (normalisée sur log)	2,08	[1,21 ; 3,6]	0,008
TMAO (normalisée sur log)	1,06	[0,86 ; 1,30]	0,594
pCS (normalisée sur log)	1,27	[1,04 ; 1,54]	0,018
IxS (normalisée sur log)	1,41	[1,06 ; 1,86]	0,018
IAA (normalisée sur log)	1,18	[0,79 ; 1,77]	0,410

ALAT : alanine aminotransférase ; ASAT : aspartate aminotransférase ; CYP3A4 : cytochrome P450 3A4 ; IAA : acide indole-3-acétique ; IC95% : intervalle de confiance à 95% ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate ; OR : odds ratio ; pCS : para-crésyl sulfate ; P-gp : glycoprotéine-P ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

Dans l'analyse multivariée après ajustement sur les cofacteurs, l'association entre le ratio C_{\min}/D du tacrolimus et la concentration plasmatique en IxS reste significative indépendamment de l'âge, du sexe et de l'IMC, avec un OR [IC95%] calculé à 1,36 (1,00 ; 1,85) ($p = 0,047$) (Tableau XI). L'association entre le ratio C_{\min}/D du tacrolimus et la concentration plasmatique en urée n'est plus significative après ajustement sur les autres co-facteurs (OR [IC95%] : 1,71 (0,93 ; 3,16) ($p = 0,085$)) (Tableau XII). Il en est de même pour l'association entre le ratio C_{\min}/D du tacrolimus et la concentration plasmatique en pCS (OR [IC95%] = 1,22 (0,99 ; 1,55) ($p = 0,067$)) (Tableau XIII).

Tableau XI. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en indoxyl sulfate (normalisé sur la fonction ln) (n=248).

	OR	[IC95%]	valeur de p
<i>Non ajusté</i>			
Ln IxS	1,41	[1,06 ; 1,86]	0,018
<i>Modèle 1, ajusté sur le sexe</i>			
Ln IxS	1,43	[1,07 ; 1,91]	0,015
Sexe	1,83	[1,07 ; 3,12]	0,027
<i>Modèle 2, ajusté sur le sexe et l'IMC</i>			
Ln IxS	1,44	[1,28 ; 4,09]	0,017
Sexe	1,85	[1,11 ; 3,35]	0,029
IMC	1,12	[1,06 ; 1,19]	<0,0001
<i>Modèle 3, ajusté sur le sexe, l'IMC et l'âge</i>			
Ln IxS	1,36	[1,00 ; 1,85]	0,047
Sexe	2,03	[1,15 ; 3,60]	0,015
IMC	1,11	[1,04 ; 1,18]	0,001
Age	1,04	[1,02 ; 1,06]	<0,0001

IMC : indice de masse corporel ; IxS : indoxyl-sulfate; Ln : normalisé sur la fonction log ; OR : odds ratio.

Tableau XII. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en urée (normalisé sur la fonction ln) (n=248).

	OR	[IC95%]	valeur de p
<i>Non ajusté</i>			
Ln urée	2,08	[1,21 ; 3,6]	0,008
<i>Modèle 1, ajusté sur le sexe</i>			
Ln urée	2,24	[1,28 ; 3,92]	0,005
Sexe	1,89	[1,11 ; 3,24]	0,019
<i>Modèle 2, ajusté sur le sexe et l'IMC</i>			
Ln urée	2,29	[1,28 ; 4,09]	0,005
Sexe	1,93	[1,11 ; 3,35]	0,020
IMC	1,12	[1,06 ; 1,19]	<0,0001
<i>Modèle 3, ajusté sur le sexe, l'IMC et l'âge</i>			
Ln urée	1,71	[0,93 ; 3,16]	0,085
Sexe	2,04	[1,16 ; 3,60]	0,014
IMC	1,11	[1,05 ; 1,18]	0,001
Age	1,04	[1,01 ; 1,06]	0,001

IMC : indice de masse corporel ; Ln : normalisé sur la fonction log ; OR : odds ratio.

Tableau XIII. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de tacrolimus et à la concentration plasmatique en para-crésyl sulfate (normalisé sur la fonction ln) (n=248).

	OR	[IC95%]	valeur de p
<i>Non ajusté</i>			
Ln pCS	1,27	[1,04 ; 1,54]	0,018
<i>Modèle 1 ajusté sur le sexe</i>			
Ln pCS	1,27	[1,04 ; 1,56]	0,017
Sexe	1,88	[1,10 ; 3,20]	0,021
<i>Modèle 2 ajusté sur le sexe et l'IMC</i>			
Ln pCS	1,31	[1,06 ; 1,62]	0,011
Sexe	1,93	[1,11 ; 3,37]	0,020
IMC	1,13	[1,06 ; 1,20]	<0,0001
<i>Modèle 3 ajusté sur le sexe, l'IMC et l'âge</i>			
Ln pCS	1,22	[0,99 ; 1,51]	0,067
Sexe	2,07	[1,17 ; 3,67]	0,012
IMC	1,11	[1,05 ; 1,18]	0,001
Age	1,04	[1,02 ; 1,06]	0,001

IMC : indice de masse corporel ; Ln : normalisé sur la fonction log ; OR : odds ratio ; pCS : para-crésyl sulfate.

4.2. Ciclosporine

a) Caractéristiques des patients selon l'exposition en ciclosporine évaluée par le ratio C_{\min}/D

Les patients ayant une exposition sanguine (ratio C_{\min}/D) pour la ciclosporine supérieure à la médiane (EI) de 52,89 (36,42-69,25) sont plus âgés, avec une proportion de femmes plus importante, un IMC et une glycémie plus élevés (Tableau XIV). Comme pour le tacrolimus, le nombre de médicaments prescrits pouvant avoir un impact sur la PK de la ciclosporine ne diffère pas selon que le ratio C_{\min}/D de la ciclosporine est inférieur ou supérieur à la médiane (Annexe IV). En revanche, les patients plus exposés à la ciclosporine ($C_{\min}/D > \text{médiane}$) ont des concentrations en TMAO plus élevées comparativement aux patients moins exposés ($C_{\min}/D < \text{médiane}$).

Tableau XIV. Caractéristiques des patients selon leur exposition à la ciclosporine (évaluée d'après le ratio de la concentration résiduelle de ciclosporine normalisée par la dose en mg/J/kg (C_{min}/D) (n=155).

	Tous les patients (n=155)	$C_{min}/D < 52,89$ (n=78)	$C_{min}/D > 52,89$ (n=77)	valeur de p
<u>Caractéristiques démographiques</u>				
hommes	94 (60,65)	55 (70,51)	39 (50,65)	0,0180
âge (année)	60,0 (50,5-69,0)	55,50 (49,00-64,00)	63,00 (54,00-71,00)	0,0012
IMC (kg/m ²)	27,45 (23,84-31,66)	25,52 (22,48-28,50)	29,73 (26,72-34,17)	< 0,0001
<u>Caractéristiques cliniques</u>				
Stades d'IRC				
1	2 (1,29)	2 (2,56)	0 (0,00)	0,6100
2	20 (12,90)	12 (15,38)	8 (10,39)	
3	87 (56,13)	43 (55,13)	44 (57,14)	
4	40 (25,81)	18 (23,08)	22 (28,57)	
5	6 (3,87)	3 (3,85)	3 (3,90)	
Cause de l'IRC, n (%)				
1- diabète	5 (3,23)	2 (2,56)	3 (3,90)	0,1502
2- atteinte vasculaire	8 (5,16)	4 (5,13)	4 (5,19)	
3- glomérulonéphrite chronique	23 (14,84)	11 (14,10)	12 (15,58)	
4- polykystose hépatorenale	26 (16,77)	10 (12,82)	16 (20,78)	
5- néphrite interstitielle	2 (1,29)	1 (1,28)	1 (1,30)	
6- maladie auto-immune	21 (13,55)	17 (21,79)	4 (5,19)	
7- maladie génétique	17 (10,97)	9 (11,54)	8 (10,39)	
8- autres causes	46 (29,68)	22 (28,21)	24 (31,17)	
9- mixtes (plus d'une cause)	7 (4,52)	2 (2,56)	5 (6,49)	
Intervalle entre la transplantation et l'inclusion (mois)				
	157,0 (65,5-162,0)	168,50 (95,75-240,00)	143,00 (64,00-215,00)	0,1027
Nombre de transplantations				
1	149 (96,13)	74 (94,87)	75 (97,40)	0,6813
2	6 (3,87)	4 (5,13)	2 (2,60)	
3	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
4	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
PAS (mmHg)	144,00 (130,00-159,00)	144,50 (130,2-157,8)	142,00 (130,00-159,20)	0,9683
PAD (mmHg)	80,00 (72,00-87,00)	80,00 (74,00-86,75)	77,00 (70,75-87,25)	0,2786
PP (mmHg)	64,00 (54,00-75,75)	62,00 (52,00-75,00)	65,50 (54,00-76,50)	0,3925
Hypertension	152 (98,06)	76 (97,44)	76 (98,70)	1,0000
Insuffisance hépatique	155 (100,00)	78 (100,00)	77 (100,00)	0,9360
<u>Bilan biologique</u>				
calcémie (mmol/L)	2,43 (2,32-2,52)	2,41 (2,32-2,52)	2,43 (2,33-2,52)	0,5321
phosphatémie (mmol/L)	1,10 (0,96-1,25)	1,095 (0,98-1,25)	1,11 (0,96-1,25)	0,6125
protéïnémie (g/L)	68,00 (65,00-70,50)	68,00 (65,00-71,00)	68,00 (65,00-70,00)	0,9456
albuminémie (g/L)	38,40 (36,40-40,30)	39,10 (36,70-40,60)	37,70 (36,20-39,90)	0,0764
glycémie (mmol/L)	5,20 (4,70-6,20)	5,00 (4,60-5,60)	5,70 (4,98-6,73)	0,0015
ASAT (UI/L)	18,00 (13,75-24,00)	18,00 (13,00-27,00)	19,00 (14,00-23,00)	0,8250
ALAT (UI/L)	23,00 (16,00-31,25)	23,00 (16,00-32,50)	23,00 (16,00-29,00)	1,0000
créatinémie (μmol/L)	159,00 (120,50-206,00)	150,00 (120,80-199,80)	163,00 (121,00-209,00)	0,5584
DFGe (MDRD) (ml/min/1.73 m ²)	36,00 (28,00-52,00)	39,50 (28,25-54,75)	34,00 (27,00-47,00)	0,0978
Acide urique (μmol/L)	485,00 (381,50-580,50)	486,00 (391,50-557,10)	472,5 (372,80-615,50)	0,7830
CRP (mg/L)	2,99 (0,46-8,35)	1,79 (0,46-6,97)	4,18 (0,83-14,03)	0,0685
<u>Toxines urémiques</u>				
urée (mmol/L)	13,60 (9,15-19,15)	12,35 (8,70-16,77)	14,30 (9,40-20,60)	0,0982
TMAO (μg/mL)	0,94 (0,51-1,93)	0,77 (0,39-1,61)	1,04 (0,64-2,37)	0,0353
IAA (μg/mL)	0,42 (0,25-0,59)	0,42 (0,24-0,55)	0,43 (0,26-0,63)	0,8063
PCS (μg/mL)	6,03 (2,99-10,20)	6,01 (3,30-9,55)	6,03 (1,97-12,30)	0,9929
IxS (μg/mL)	2,70 (1,61-4,16)	2,65 (1,64-3,62)	2,71 (1,56-4,48)	0,4228

Les données sont répertoriées selon la médiane (EI) ou la fréquence (%).

ALAT : alanine aminotransférase ; ASAT : aspartate aminotransférase ; CRP : protéine C réactive ; DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé ; IAA : acide indole-3-acétique ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate ; MDRD : Modification of Diet in Renal Disease ; MRC : maladie rénale chronique ; PCS : para-crésyl sulfate ; PAD : pression artérielle diastolique ; PAS : pression artérielle systolique ; PP : pression pulsée ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

b) Analyse de l'association entre les concentrations en toxines urémiques et l'exposition en ciclosporine évaluée par le ratio C_{\min}/D

La régression logistique univariée montre une association entre une exposition sanguine en ciclosporine (ratio C_{\min}/D) supérieure à la médiane et une concentration élevée en TMAO (Tableau XV). L'âge, le sexe et l'IMC sont également associés à l'exposition en ciclosporine dans l'analyse univariée.

Tableau XV. Régression logistique univariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de ciclosporine (n=155).

	OR	[IC95%]	valeur de p
Age (année)	1,04	[1,02 ; 1,08]	0,003
Sexe (homme vs. femme)	0,43	[0,22 ; 0,83]	0,012
IMC (kg/m²)	1,18	[1,10 ; 1,27]	<0,0001
Intervalle entre la transplantation et l'inclusion (mois)	1,00	[0,99 ; 1,00]	0,173
Protéïnémie (g/L)	1,00	[0,94 ; 1,07]	0,953
Albuminémie (g/l)	1,09	[0,89 ; 1,33]	0,424
ASAT (UI/L)	0,97	[0,92 ; 1,02]	0,176
ALAT (UI/L)	0,99	[0,96 ; 1,02]	0,394
Au moins un inhibiteur de CYP3A4/5	2,14	[0,52 ; 8,90]	0,294
Au moins un inducteur de CYP3A4/5	1,01	[0,06 ; 16,5]	0,993
Au moins un inhibiteur de la P-gp	1,26	[0,60 ; 2,64]	0,542
Au moins un inducteur de la P-gp	/	/	/
Urée (normalisé sur log)	1,64	[0,87 ; 3,09]	0,123
TMAO (normalisé sur log)	1,37	[1,00 ; 1,87]	0,046
pCS (normalisé sur log)	0,93	[0,72 ; 1,20]	0,596
IxS (normalisé sur log)	1,06	[0,76 ; 1,47]	0,748
IAA (normalisé sur log)	1,04	[0,66 ; 1,64]	0,870

ALAT : alanine aminotransférase ; ASAT : aspartate aminotransférase ; CYP3A4 : cytochrome P450 3A4 ; IAA : acide indole-3-acétique ; IC95% : intervalle de confiance à 95% ; IMC : indice de masse corporelle ; IxS : indoxyl sulfate ; OR : odds ratio ; pCS : para-crésyl sulfate ; P-gp : glycoprotéine-P ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

La régression logistique multivariée montre qu'après ajustement sur l'âge, le sexe et l'IMC, la concentration plasmatique en TMAO n'est plus associée significativement à une augmentation de l'exposition sanguine en ciclosporine (OR = 1,12 (0,78 ; 1,61)) (Tableau XVI).

Tableau XVI. Régression logistique multivariée des facteurs associés au ratio C_{\min}/D de ciclosporine et à la concentration plasmatique en TMAO (normalisé sur la fonction ln) (n=155).

	OR	[IC95%]	valeur de p
<i>Non ajusté</i>			
Ln TMAO	1,37	[1,00 ; 1,87]	0,046
<i>Modèle 1, ajusté sur le sexe</i>			
Ln TMAO	1,39	[1,01 ; 1,92]	0,042
Sexe	0,42	[0,21 ; 0,82]	0,012
<i>Modèle 2, ajusté sur le sexe et l'IMC</i>			
Ln TMAO	1,26	[0,90 ; 1,76]	0,182
Sexe	0,40	[0,19 ; 0,83]	0,014
IMC	1,18	[1,09 ; 1,27]	<0,0001
<i>Modèle 3, ajusté sur le sexe l'IMC et l'âge</i>			
Ln TMAO	1,12	[0,78 ; 1,61]	0,540
Sexe	0,33	[0,15 ; 0,72]	0,005
IMC	1,20	[1,10 ; 1,30]	<0,0001
Age	1,06	[1,02 ; 1,09]	0,002

IMC : indice de masse corporel ; Ln : normalisé sur la fonction log ; OR : odds ratio ; TMAO : triméthylamine N-oxide.

Discussion

Dans cette étude, nous montrons que les concentrations plasmatiques en TU sont associées à une augmentation de l'exposition sanguine en ICN. Toutefois, le type de toxine impliquée diffère selon qu'il s'agisse d'une exposition en ciclosporine ou en tacrolimus. Cette différence pourrait en partie s'expliquer par le fait que la nature de la liaison des deux ICN à leurs protéines plasmatiques respectives diffère.

Dans ce travail, nous avons d'abord déterminé les concentrations plasmatiques de 5 TU (IxS, pCS, IAA, TMAO et urée) dans une cohorte de patients transplantés rénaux dont le délai post-transplantation variait entre 1 an et 40 ans. Les concentrations en TU mesurées dans notre cohorte sont plus faibles que celles publiées dans des études menées chez des patients non transplantés [86,90]. Ces résultats traduisent une reprise partielle des fonctions excrétrices rénales après la transplantation. Cependant, à l'instar des patients non greffés, les concentrations en TU sont significativement supérieures chez les patients ayant un DFGe plus altéré, par rapport aux patients ayant un DFGe moins altéré [86] et augmente avec le déclin de la fonction rénale.

De nombreuses études montrent que la MRC n'altère pas seulement la clairance rénale des médicaments mais aussi leur absorption, leur distribution et leur clairance non-rénale. Les TU, qui s'accumulent au fur et à mesure que la fonction rénale se détériore [48,131,132], sont aujourd'hui incriminées dans les modifications des paramètres PK [133]. Dans ce travail, nous nous sommes posés la question des effets des TU sur la PK des ICN, car ils demeurent inconnus à ce jour.

Les résultats de notre étude montrent que la concentration plasmatique en IxS est significativement associée à l'exposition sanguine en tacrolimus. Cette association est indépendante de facteurs modulant la PK de cet ICN comme l'âge, le sexe ou l'IMC. Pour le pCS, l'association avec l'exposition au tacrolimus est indépendante du sexe et de l'IMC. Cependant, cette association n'est plus significative après l'ajustement sur l'âge.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de l'exposition en tacrolimus lorsque les concentrations en IxS augmentent. Il pourrait s'agir en particulier d'interactions qui peuvent avoir lieu aux différentes étapes de la PK de l'ICN, que ce soit lors du métabolisme par le CYP3A4/5 [120,134–136], lors de la phase d'élimination biliaire par la P-gp [121] ou encore par le biais d'interaction via la liaison à l'albumine [106,107,109–111]. En effet, l'accumulation de TU au cours de la MRC est susceptible de moduler l'expression des protéines ou des enzymes ayant un rôle clé dans ces différentes étapes [133]. Des études complémentaires fondamentales sont donc indispensables

pour identifier et comprendre les mécanismes moléculaires expliquant une modification de l'exposition en tacrolimus chez les patients ayant des concentrations plus élevées d'IxS. Par ailleurs, il est impossible d'exclure complètement une implication de l'altération de la fonction rénale dans l'augmentation des concentrations en TU dans le groupe des patients dont le ratio C_{\min}/D de tacrolimus est supérieur à la médiane. De la même manière, il est difficile de déterminer si la baisse du DFG dans ce groupe est due à une exposition sanguine au tacrolimus plus élevée, l'ICN étant lui-même néphrotoxique [137], au même titre que les TU [138].

Les concentrations en TU fortement liées aux protéines plasmatiques telles que l'IxS et le pCS, ne sont pas les seules associées à l'exposition sanguine en tacrolimus. En effet, les concentrations plasmatiques en urée sont elles aussi associées à l'augmentation de l'exposition sanguine en tacrolimus chez les patients transplantés de la cohorte dans le modèle univarié.

L'altération de la PK des médicaments par l'urée a fait l'objet de plusieurs études. Ce phénomène trouve son explication dans la capacité de l'urée à carbamyliser les protéines tissulaires et plasmatiques [106]. Cette carbamylation des protéines plasmatiques de transport des molécules est associée à une baisse de leur affinité pour les médicaments. La baisse de la fraction liée à l'albumine conduit à une augmentation de la fraction libre et donc à un risque de surdosage [111], mais aussi à une augmentation de la morbi-mortalité des patients IRC [109,110]. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'augmentation de l'urémie sur la carbamylation de l'albumine dans le groupe des patients ayant un ratio C_{\min}/D de tacrolimus augmenté et d'étudier son impact sur la liaison du tacrolimus à l'albumine. De la même manière, des dosages des formes libres de TU et d'ICN permettraient de tester cette hypothèse.

Le second ICN étudié dans ce travail est la ciclosporine. Contrairement aux résultats obtenus chez les patients traités par le tacrolimus, il n'a pas été retrouvé d'association entre les concentrations en IxS, en pCS et en urée et le ratio C_{\min}/D de ciclosporine. Pour expliquer cette différence, nous sommes revenus sur les données PK de chaque immunosuppresseur. S'ils partagent nombreux paramètres PK, leur étape de distribution diffère quant au type de protéine plasmatique impliquée dans leur transport : le tacrolimus se lie à l'albumine et à l' α -glycoprotéine, et la ciclosporine, aux lipoprotéines HDL et LDL [139]. Une hypothèse concernant l'absence d'association entre l'exposition sanguine en ciclosporine et les concentrations plasmatiques en TU est qu'aucune TU ne se lie aux lipoprotéines transportant la ciclosporine, empêchant ainsi toute interaction au niveau de l'étape de distribution.

En revanche, nos résultats montrent une association entre l'exposition en ciclosporine et les concentrations en TMAO dans le modèle univarié. Le TMAO est une TU qui a déjà été corrélée à la

diminution de la concentration en HDL, aggravant l'athérosclérose chez les souris [140] et à la morbi-mortalité chez les patients atteints de MRC [141–143]. Des études complémentaires visant à étudier l'impact indirect de l'accumulation du TMAO sur la distribution de la ciclosporine par la HDL, pourraient donc être envisagées dans ce contexte.

Finalement, dans ce travail, les patients ayant une exposition sanguine en tacrolimus plus élevée présentent des concentrations en TU plus élevée comparativement au groupe moins exposé. Bien qu'ayant bénéficié d'un STP et d'ajustement des posologies de tacrolimus, ils présentent également une hyperglycémie, une élévation de leur pression artérielle systolique et une hypercréatininémie, qui sont des effets indésirables du tacrolimus. Il est possible que l'accumulation des TU chez ces patients puisse participer aux altérations de la PK du tacrolimus, augmentant le risque de survenue des EIM (notamment par le biais de l'augmentation de la concentration de la fraction libre du médicament). Cela confirme l'intérêt d'études supplémentaires pour comprendre quels mécanismes moléculaires sont impliqués à chaque étape de la PK du tacrolimus, et les conséquences cliniques chez des patients transplantés traités par du tacrolimus accumulant de manière importante l'IxS, le pCS et l'urée.

Les conséquences d'une altération de la liaison aux protéines plasmatiques des médicaments par les TU n'ont été montrées ni *in vivo* ni en clinique. Seules quelques rares études *in vitro* présentent des résultats préliminaires. Par exemple, l'équipe de Nishi publie en 2021 une étude sur l'interaction entre l'IxS, du pCS et de l'IAA et l'aripiprazole sur le site II de Sudlow de l'albumine, faisant passer de 2% à près de 10% la fraction libre d'aripiprazole [144]. La théophylline, la phénytoïne et le méthotrexate présentent également une fraction liée significativement diminuée, passant respectivement de 63%, 92% et 43% après ajout des molécules dans du plasma prélevés chez 9 patients sains à 44, 76 et 28% dans le plasma de 12 patients hémodialysés [145].

Plusieurs limites doivent être soulevées dans ce travail. Dans un premier temps, certains cofacteurs influant sur la PK des ICN n'ont pas pu être pris en compte (polymorphisme génétique [146], alimentation [147], dysbiose intestinale [148]). Par ailleurs, le grand nombre de facteurs susceptibles d'influencer la PK des ICN rend l'interprétation de l'association entre l'accumulation des TU et l'exposition en tacrolimus délicate.

De même, la conception transversale de l'étude ne permet pas d'évaluer la toxicité liée à une élévation des concentrations en TU ni les conséquences sur le long terme liées à une fluctuation plus importante des concentrations en ICN dans le groupe des patients ayant des concentrations en TU plus élevées (majoration du risque de rejet de greffe, altération de la fonction rénale, majoration du risque de toxicité). Ainsi, un suivi des patients de la cohorte sur plusieurs années, avec de nouveaux dosages

des ICN et des TU, pourrait permettre d'étudier l'apparition des EIM chez les patients présentant des concentrations élevées en TU.

Enfin, les niveaux d'exposition plus faibles en TU chez les patients transplantés n'ont peut-être pas permis de mettre en évidence d'association pour toutes les TU dans notre étude. Le choix de se tourner vers des patients IRC non transplantés et vers une autre classe de médicament, comme les antivitamines-K qui sont des médicaments à MTE souvent surdosés et responsables de nombreux EIM chez les patients atteints de MRC [94], semble pertinent pour poursuivre l'étude de l'effet de l'accumulation des TU sur la PK des médicaments.

Notre étude présente également plusieurs points forts, comme l'utilisation d'une méthode validée et sensible permettant de déterminer les concentrations en TU connues pour être néfastes [130]. C'est également l'une des premières études qui cherche à évaluer l'association entre les concentrations en TU et les concentrations plasmatiques en médicaments dans une étude clinique.

Conclusion et perspectives

Chez les patients transplantés rénaux, que leur charge médicamenteuse importante expose à un risque accru d'EIM, l'utilisation du STP pour les immunosuppresseurs de type ICN (tacrolimus et ciclosporine) permet de limiter les fluctuations de leurs concentrations sanguines liées à une variabilité importante de leur PK. Lors de la MRC, des études montrent que l'accumulation des TU est également capable de modifier la PK des médicaments, exposant ainsi les patients à un risque de surdosage ou d'inefficacité thérapeutique. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail est que l'accumulation des TU chez les patients transplantés rénaux peut perturber la PK des ICN. Ainsi, une association entre l'accumulation plasmatique de certaines TU et l'exposition sanguine en ICN dans une cohorte de patients transplantés rénaux a été recherchée.

Dans notre étude, menée chez 403 patients transplantés rénaux, nous avons montré une association significative entre les concentrations plasmatiques en IxS et l'exposition sanguine en tacrolimus. En revanche, les résultats ne mettent pas en évidence d'association significative avec la ciclosporine. Les deux ICN ne se lient pas aux mêmes protéines de transport, il serait intéressant de compléter notre étude par des expérimentation *in vitro* afin d'explorer l'hypothèse d'une interaction au niveau de la phase de distribution. De même, l'évaluation via une étude prospective, de l'impact clinique d'une interaction entre les TU et tacrolimus permettrait de mieux appréhender l'effet de l'accumulation des TU sur la toxicité des ICN notamment.

Toutefois, même si les mécanismes restent à explorer, nous montrons pour la première fois dans une cohorte de patients transplantés rénaux, une corrélation entre les concentrations de trois TU (IxS, pCS et urée) et l'exposition plasmatique en ICN.

Références bibliographiques

1. Guide du parcours de soins – Maladie Rénale Chronique de l’adulte Available online: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-04/guide_parcours_de_soins_mrc_web.pdf (accessed on 23 September 2021).
2. Levin, A.; Stevens, P.E. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: Behind the Scenes, Need for Guidance, and a Framework for Moving Forward. *Kidney International* **2014**, *85*, 49–61, doi:10.1038/ki.2013.444.
3. Romagnani, P.; Remuzzi, G.; Glasscock, R.; Levin, A.; Jager, K.J.; Tonelli, M.; Massy, Z.; Wanner, C.; Anders, H.-J. Chronic Kidney Disease. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, 17088, doi:10.1038/nrdp.2017.88.
4. Bikbov, B.; Purcell, C.A.; Levey, A.S.; Smith, M.; Abdoli, A.; Abebe, M.; Adebayo, O.M.; Afarideh, M.; Agarwal, S.K.; Agudelo-Botero, M.; et al. Global, Regional, and National Burden of Chronic Kidney Disease, 1990–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **2020**, *395*, 709–733, doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
5. Hill, N.R.; Fatoba, S.T.; Oke, J.L.; Hirst, J.A.; O’Callaghan, C.A.; Lasserson, D.S.; Hobbs, F.D.R. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158765, doi:10.1371/journal.pone.0158765.
6. Frimat, L.; Loos-Ayav, C.; Briançon, S.; Kessler, M. Épidémiologie des maladies rénales chroniques. *EMC - Néphrologie* **2005**, *2*, 139–157, doi:10.1016/j.emcnep.2005.09.003.
7. Kramer, A.; Boenink, R.; Noordzij, M.; Bosdriesz, J.R.; Stel, V.S.; Beltrán, P.; Ruiz, J.C.; Seyahi, N.; Comas Farnés, J.; Stendahl, M.; et al. The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017: A Summary. *Clinical Kidney Journal* **2020**, *13*, 693–709, doi:10.1093/ckj/sfaa048.
8. Hsu, C.; Iribarren, C.; McCulloch, C.E.; Darbinian, J.; Go, A.S. Risk Factors for End-Stage Renal Disease: 25-Year Follow-Up. *Arch Intern Med* **2009**, *169*, 342, doi:10.1001/archinternmed.2008.605.
9. Foley, R.; Parfrey, P.; Sarnak, M. Clinical Epidemiology of Cardiovascular Disease in Chronic Renal Disease. *American Journal of Kidney Diseases* **1998**, *32*, S112–S119, doi:10.1053/ajkd.1998.v32.pm9820470.
10. Thompson, S.; James, M.; Wiebe, N.; Hemmelgarn, B.; Manns, B.; Klarenbach, S.; Tonelli, M. Cause of Death in Patients with Reduced Kidney Function. *JASN* **2015**, *26*, 2504–2511, doi:10.1681/ASN.2014070714.
11. London, G.M. Arterial Media Calcification in End-Stage Renal Disease: Impact on All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2003**, *18*, 1731–1740, doi:10.1093/ndt/gfg414.
12. Drüeke, T.B.; Massy, Z.A. Atherosclerosis in CKD: Differences from the General Population. *Nat Rev Nephrol* **2010**, *6*, 723–735, doi:10.1038/nrneph.2010.143.
13. Blacher, J.; Guerin, A.P.; Pannier, B.; Marchais, S.J.; London, G.M. Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* **2001**, *38*, 938–942, doi:10.1161/hy1001.096358.
14. Sarnak, M.J.; Tighiouart, H.; Scott, T.M.; Lou, K.V.; Sorensen, E.P.; Giang, L.M.; Drew, D.A.; Shaffi, K.; Strom, J.A.; Singh, A.K.; et al. Frequency of and Risk Factors for Poor Cognitive Performance in Hemodialysis Patients. *Neurology* **2013**, *80*, 471–480, doi:10.1212/WNL.0b013e31827f0f7f.
15. Yaffe, K.; Ackerson, L.; Tamura, M.K.; Le Blanc, P.; Kusek, J.W.; Sehgal, A.R.; Cohen, D.; Anderson, C.; Appel, L.; DeSalvo, K.; et al. Chronic Kidney Disease and Cognitive Function in Older Adults: Findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort Cognitive Study: CHRONIC KIDNEY DISEASE AND COGNITIVE FUNCTION. *Journal of the American Geriatrics Society* **2010**, *58*, 338–345, doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02670.x.
16. Hénaut, L.; Grissi, M.; Brazier, F.; Assem, M.; Poirot-Leclercq, S.; Lenglet, G.; Boudot, C.; Avondo, C.; Boullier, A.; Choukroun, G.; et al. Cellular and Molecular Mechanisms Associated with Ischemic Stroke Severity in Female Mice with Chronic Kidney Disease. *Sci Rep* **2019**, *9*, 6432, doi:10.1038/s41598-019-42933-0.

17. Drew, D.A.; Weiner, D.E.; Sarnak, M.J. Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention. *American Journal of Kidney Diseases* **2019**, *74*, 782–790, doi:10.1053/j.ajkd.2019.05.017.
18. Moe, S.; Drüeke, T.; Cunningham, J.; Goodman, W.; Martin, K.; Olgaard, K.; Ott, S.; Sprague, S.; Lameire, N.; Eknoyan, G. Definition, Evaluation, and Classification of Renal Osteodystrophy: A Position Statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International* **2006**, *69*, 1945–1953, doi:10.1038/sj.ki.5000414.
19. Coen, G. Adynamic Bone Disease: An Update and Overview. *J Nephrol* **2005**, *18*, 117–122.
20. Bover, J.; Ureña, P.; Brandenburg, V.; Goldsmith, D.; Ruiz, C.; DaSilva, I.; Bosch, R.J. Adynamic Bone Disease: From Bone to Vessels in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol* **2014**, *34*, 626–640, doi:10.1016/j.semnephrol.2014.09.008.
21. Alem, A.M.; Sherrard, D.J.; Gillen, D.L.; Weiss, N.S.; Beresford, S.A.; Heckbert, S.R.; Wong, C.; Stehman-Breen, C. Increased Risk of Hip Fracture among Patients with End-Stage Renal Disease. *Kidney Int* **2000**, *58*, 396–399, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00178.x.
22. Rapport Annuel 2019 Du Réseau Épidémiologique et Information En Néphrologie (REIN) Available online: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapport_rein_2019_2021-07-15.pdf (accessed on 23 September 2021).
23. Agence de Biomédecine Organes -Grefe d'organes : Données Générales et Méthodes Available online: <https://rams.agence-biomedecine.fr/grefe-dorganes-donnees-generales-et-methodes> (accessed on 24 September 2021).
24. Fernando, M.; Peake, P.W.; Endre, Z.H. Biomarkers of Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Transplantation. *Biomarkers in Medicine* **2014**, *8*, 1247–1262, doi:10.2217/bmm.14.86.
25. European Medicines Agency (EMA) Prograf - Article 30 Referral - Annex I, II, III 2006.
26. European Medicines Agency (EMA) Sandimmun Neroal - Article 30 Referral - Annex III 2013.
27. Jose, M. Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation: Adverse Effects. *Nephrology* **2007**, *12*, S66–S74, doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00731.x.
28. Böttiger, Brattström; Tydén; Säwe; Groth Tacrolimus Whole Blood Concentrations Correlate Closely to Side-Effects in Renal Transplant Recipients: Short Report. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1999**, *48*, 445–448, doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00007.x.
29. Lindholm, A. Therapeutic Monitoring of Cyclosporin ? An Update. *Eur J Clin Pharmacol* **1991**, *41*, 273–283, doi:10.1007/BF00314952.
30. F. Saint-Marcoux, P. Marquet, E.M. Billaud Suivi Thérapeutique Pharmacologique de La Ciclosporine. **2007**, doi:10.1016/S2211-9698(20)75444-0.
31. Wallemacq, P.; Armstrong, V.W.; Brunet, M.; Haufroid, V.; Holt, D.W.; Johnston, A.; Kuypers, D.; Le Meur, Y.; Marquet, P.; Oellerich, M.; et al. Opportunities to Optimize Tacrolimus Therapy in Solid Organ Transplantation: Report of the European Consensus Conference. *Ther Drug Monit* **2009**, *31*, 139–152, doi:10.1097/FTD.0b013e318198d092.
32. É.-M. Billaud, P. Marquet, F. Saint-Marcoux Suivi Thérapeutique Pharmacologique Du Tacrolimus. **2018**, 240.
33. van Gelder, M.K.; Middel, I.R.; Vernooij, R.W.M.; Bots, M.L.; Verhaar, M.C.; Masereeuw, R.; Grooteman, M.P.; Nubé, M.J.; van den Dorpel, M.A.; Blankestijn, P.J.; et al. Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis Patients Relate to Residual Kidney Function, Are Not Influenced by Convective Transport, and Do Not Relate to Outcome. *Toxins* **2020**, *12*, 234, doi:10.3390/toxins12040234.
34. Christians, U.; Jacobsen, W.; Benet, L.Z.; Lampen, A. Mechanisms of Clinically Relevant Drug Interactions Associated with Tacrolimus: *Clinical Pharmacokinetics* **2002**, *41*, 813–851, doi:10.2165/00003088-200241110-00003.
35. Glasscock, R.J. Uremic Toxins: What Are They? An Integrated Overview of Pathobiology and Classification. *Journal of Renal Nutrition* **2008**, *18*, 2–6, doi:10.1053/j.jrn.2007.10.003.
36. Rosner, M.H.; Reis, T.; Husain-Syed, F.; Vanholder, R.; Hutchison, C.; Stenvinkel, P.; Blankestijn, P.J.; Cozzolino, M.; Juillard, L.; Kashani, K.; et al. Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure. *Clin J Am Soc Nephrol* **2021**, CJN.02660221, doi:10.2215/CJN.02660221.

37. Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Deppisch, R.; et al. Review on Uremic Toxins: Classification, Concentration, and Interindividual Variability. *Kidney International* **2003**, *63*, 1934–1943, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
38. Rysz, J.; Franczyk, B.; Ławiński, J.; Olszewski, R.; Ciałkowska-Rysz, A.; Gluba-Brzózka, A. The Impact of CKD on Uremic Toxins and Gut Microbiota. *Toxins (Basel)* **2021**, *13*, 252, doi:10.3390/toxins13040252.
39. Sirich, T.L.; Plummer, N.S.; Gardner, C.D.; Hostetter, T.H.; Meyer, T.W. Effect of Increasing Dietary Fiber on Plasma Levels of Colon-Derived Solutes in Hemodialysis Patients. *CJASN* **2014**, *9*, 1603–1610, doi:10.2215/CJN.00490114.
40. Rossi, M.; Johnson, D.W.; Xu, H.; Carrero, J.J.; Pascoe, E.; French, C.; Campbell, K.L. Dietary Protein-Fiber Ratio Associates with Circulating Levels of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease Patients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2015**, *25*, 860–865, doi:10.1016/j.numecd.2015.03.015.
41. Nigam, S.K.; Bush, K.T. Uraemic Syndrome of Chronic Kidney Disease: Altered Remote Sensing and Signalling. *Nat Rev Nephrol* **2019**, *15*, 301–316, doi:10.1038/s41581-019-0111-1.
42. Lim, Y.J.; Sidor, N.A.; Tonial, N.C.; Che, A.; Urquhart, B.L. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* **2021**, *13*, 142, doi:10.3390/toxins13020142.
43. Fabresse, N.; Uteem, I.; Lamy, E.; Massy, Z.; Larabi, I.A.; Alvarez, J.-C. Quantification of Free and Protein Bound Uremic Toxins in Human Serum by LC-MS/MS: Comparison of Rapid Equilibrium Dialysis and Ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta* **2020**, *507*, 228–235, doi:10.1016/j.cca.2020.04.032.
44. Eloit, S.; Schneditz, D.; Cornelis, T.; Van Biesen, W.; Glorieux, G.; Dhondt, A.; Kooman, J.; Vanholder, R. Protein-Bound Uremic Toxin Profiling as a Tool to Optimize Hemodialysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147159, doi:10.1371/journal.pone.0147159.
45. Masereeuw, R.; Mutsaers, H.A.M.; Toyohara, T.; Abe, T.; Jhavar, S.; Sweet, D.H.; Lowenstein, J. The Kidney and Uremic Toxin Removal: Glomerulus or Tubule? *Seminars in Nephrology* **2014**, *34*, 191–208, doi:10.1016/j.semnephrol.2014.02.010.
46. Wu, W.; Bush, K.T.; Nigam, S.K. Key Role for the Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in the in Vivo Handling of Uremic Toxins and Solutes. *Sci Rep* **2017**, *7*, 4939, doi:10.1038/s41598-017-04949-2.
47. Sarnak, M.J.; Levey, A.S.; Schoolwerth, A.C.; Coresh, J.; Culeton, B.; Hamm, L.L.; McCullough, P.A.; Kasiske, B.L.; Kelepouris, E.; Klag, M.J.; et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* **2003**, *42*, 1050–1065, doi:10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
48. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox) Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *CJASN* **2009**, *4*, 1551–1558, doi:10.2215/CJN.03980609.
49. Liabeuf, S.; Barreto, D.V.; Barreto, F.C.; Meert, N.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; et al. Free P-Cresylsulphate Is a Predictor of Mortality in Patients at Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2010**, *25*, 1183–1191, doi:10.1093/ndt/gfp592.
50. Dou, L.; Sallée, M.; Cerini, C.; Poitevin, S.; Gondouin, B.; Jourde-Chiche, N.; Fallague, K.; Brunet, P.; Calaf, R.; Dussol, B.; et al. The Cardiovascular Effect of the Uremic Solute Indole-3 Acetic Acid. *JASN* **2015**, *26*, 876–887, doi:10.1681/ASN.2013121283.
51. Zhang, P.; Zou, J.-Z.; Chen, J.; Tan, X.; Xiang, F.-F.; Shen, B.; Hu, J.-C.; Wang, J.-L.; Wang, Y.-Q.; Yu, J.-B.; et al. Association of Trimethylamine N -Oxide with Cardiovascular and All-Cause Mortality in Hemodialysis Patients. *Renal Failure* **2020**, *42*, 1004–1014, doi:10.1080/0886022X.2020.1822868.
52. Aronson, D.; Mittleman, M.A.; Burger, A.J. Elevated Blood Urea Nitrogen Level as a Predictor of Mortality in Patients Admitted for Decompensated Heart Failure. *The American Journal of Medicine* **2004**, *116*, 466–473, doi:10.1016/j.amjmed.2003.11.014.

53. Hénaut, L.; Chillon, J.-M.; Kamel, S.; Massy, Z.A. Updates on the Mechanisms and the Care of Cardiovascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Nephrology* **2018**, *38*, 233–250, doi:10.1016/j.semnephrol.2018.02.004.
54. Panda, D.K.; Bai, X.; Sabbagh, Y.; Zhang, Y.; Zaun, H.-C.; Karellis, A.; Koromilas, A.E.; Lipman, M.L.; Karaplis, A.C. Defective Interplay between MTORC1 Activity and Endoplasmic Reticulum Stress-Unfolded Protein Response in Uremic Vascular Calcification. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2018**, *314*, F1046–F1061, doi:10.1152/ajprenal.00350.2017.
55. Yaker, L.; Kamel, S.; Ausseil, J.; Boullier, A. Effects of Chronic Kidney Disease and Uremic Toxins on Extracellular Vesicle Biology. *Toxins* **2020**, *12*, 811, doi:10.3390/toxins12120811.
56. Assem, M.; Lando, M.; Grissi, M.; Kamel, S.; Massy, Z.; Chillon, J.-M.; Hénaut, L. The Impact of Uremic Toxins on Cerebrovascular and Cognitive Disorders. *Toxins* **2018**, *10*, 303, doi:10.3390/toxins10070303.
57. Stinghen, A.; Chillon, J.-M.; Massy, Z.; Boullier, A. Differential Effects of Indoxyl Sulfate and Inorganic Phosphate in a Murine Cerebral Endothelial Cell Line (BEnd.3). *Toxins* **2014**, *6*, 1742–1760, doi:10.3390/toxins6061742.
58. Karbowska, M.; Hermanowicz, J.M.; Tankiewicz-Kwedlo, A.; Kalaska, B.; Kaminski, T.W.; Nosek, K.; Wisniewska, R.J.; Pawlak, D. Neurobehavioral Effects of Uremic Toxin–Indoxyl Sulfate in the Rat Model. *Sci Rep* **2020**, *10*, 9483, doi:10.1038/s41598-020-66421-y.
59. Lin, Y.-T.; Wu, P.-H.; Liang, S.-S.; Mubanga, M.; Yang, Y.-H.; Hsu, Y.-L.; Kuo, M.-C.; Hwang, S.-J.; Kuo, P.-L. Protein-Bound Uremic Toxins Are Associated with Cognitive Function among Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *Sci Rep* **2019**, *9*, 20388, doi:10.1038/s41598-019-57004-7.
60. Hou, Y.-C.; Lu, C.-L.; Lu, K.-C. Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease: Mineral Bone Disorders in CKD. *Nephrology* **2018**, *23*, 88–94, doi:10.1111/nep.13457.
61. Fujii, H.; Goto, S.; Fukagawa, M. Role of Uremic Toxins for Kidney, Cardiovascular, and Bone Dysfunction. *Toxins* **2018**, *10*, 202, doi:10.3390/toxins10050202.
62. Goto, S.; Fujii, H.; Hamada, Y.; Yoshiya, K.; Fukagawa, M. Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients: Indoxyl Sulfate and PTH Resistance. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* **2010**, *14*, 417–423, doi:10.1111/j.1744-9987.2010.00813.x.
63. Batteux, B.; Bodeau, S.; André, C.; Hurtel-Lemaire, A.-S.; Gras-Champel, V.; Desailly-Henry, I.; Masmoudi, K.; Bennis, Y.; Massy, Z.A.; Kamel, S.; et al. Association between Uremic Toxin Concentrations and Bone Mineral Density after Kidney Transplantation. *Toxins* **2020**, *12*, 715, doi:10.3390/toxins12110715.
64. Ardawi, M.-S.M.; Rouzi, A.A.; Al-Sibiani, S.A.; Al-Senani, N.S.; Qari, M.H.; Mousa, S.A. High Serum Sclerostin Predicts the Occurrence of Osteoporotic Fractures in Postmenopausal Women: The Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *J Bone Miner Res* **2012**, *27*, 2592–2602, doi:10.1002/jbmr.1718.
65. Desjardins, L.; Liabeuf, S.; Oliveira, R.B.; Louvet, L.; Kamel, S.; Lemke, H.-D.; Vanholder, R.; Choukroun, G.; Massy, Z.A. Uremic Toxicity and Sclerostin in Chronic Kidney Disease Patients. *Néphrologie & Thérapeutique* **2014**, *10*, 463–470, doi:10.1016/j.nephro.2014.04.002.
66. Yamaguchi, J.; Tanaka, T.; Inagi, R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron* **2017**, *135*, 201–206, doi:10.1159/000453673.
67. Sato, E.; Saigusa, D.; Mishima, E.; Uchida, T.; Miura, D.; Morikawa-Ichinose, T.; Kisu, K.; Sekimoto, A.; Saito, R.; Oe, Y.; et al. Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins* **2017**, *10*, 19, doi:10.3390/toxins10010019.
68. Nakada, Y.; Onoue, K.; Nakano, T.; Ishihara, S.; Kumazawa, T.; Nakagawa, H.; Ueda, T.; Nishida, T.; Soeda, T.; Okayama, S.; et al. AST-120, an Oral Carbon Absorbent, Protects against the Progression of Atherosclerosis in a Mouse Chronic Renal Failure Model by Preserving SFlt-1 Expression Levels. *Sci Rep* **2019**, *9*, 15571, doi:10.1038/s41598-019-51292-9.
69. Bennis, Y.; Cluet, Y.; Titeca-Beauport, D.; El Esper, N.; Ureña, P.; Bodeau, S.; Combe, C.; Dussol, B.; Fouque, D.; Choukroun, G.; et al. The Effect of Sevelamer on Serum Levels of Gut-Derived Uremic Toxins: Results from In Vitro Experiments and A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *Toxins* **2019**, *11*, 279, doi:10.3390/toxins11050279.

70. Goto, S.; Yoshiya, K.; Kita, T.; Fujii, H.; Fukagawa, M. Uremic Toxins and Oral Adsorbents: Uremic Toxins and Oral Adsorbents. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* **2011**, *15*, 132–134, doi:10.1111/j.1744-9987.2010.00891.x.
71. Schulman, G.; Berl, T.; Beck, G.J.; Remuzzi, G.; Ritz, E.; Arita, K.; Kato, A.; Shimizu, M. Randomized Placebo-Controlled EPPIC Trials of AST-120 in CKD. *JASN* **2015**, *26*, 1732–1746, doi:10.1681/ASN.2014010042.
72. Cha, R.; Kang, S.W.; Park, C.W.; Cha, D.R.; Na, K.Y.; Kim, S.G.; Yoon, S.A.; Han, S.Y.; Chang, J.H.; Park, S.K.; et al. A Randomized, Controlled Trial of Oral Intestinal Sorbent AST-120 on Renal Function Deterioration in Patients with Advanced Renal Dysfunction. *CJASN* **2016**, *11*, 559–567, doi:10.2215/CJN.12011214.
73. Fang, C.-Y.; Lu, J.-R.; Chen, B.-J.; Wu, C.; Chen, Y.-P.; Chen, M.-J. Selection of Uremic Toxin-Reducing Probiotics in Vitro and in Vivo. *Journal of Functional Foods* **2014**, *7*, 407–415, doi:10.1016/j.jff.2014.01.018.
74. de Faria Barros, A.; Borges, N.A.; Nakao, L.S.; Dolenga, C.J.; do Carmo, F.L.; de Carvalho Ferreira, D.; Stenvinkel, P.; Bergman, P.; Lindholm, B.; Mafra, D. Effects of Probiotic Supplementation on Inflammatory Biomarkers and Uremic Toxins in Non-Dialysis Chronic Kidney Patients: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Functional Foods* **2018**, *46*, 378–383, doi:10.1016/j.jff.2018.05.018.
75. Thongprayoon, C.; Kaewput, W.; Hatch, S.T.; Bathini, T.; Sharma, K.; Wijarnpreecha, K.; Ungprasert, P.; D’Costa, M.; Mao, M.A.; Cheungpasitporn, W. Effects of Probiotics on Inflammation and Uremic Toxins Among Patients on Dialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci* **2019**, *64*, 469–479, doi:10.1007/s10620-018-5243-9.
76. Saito, H.; Saigo, C.; Nomura, Y.; Yamamoto, Y.; Sagata, M.; Matsunaga, R.; Jono, H.; Nishi, K. Meclofenamate Elicits a Nephroprotective Effect in a Rat Model of Ischemic Acute Kidney Injury by Suppressing Indoxyl Sulfate Production and Restoring Renal Organic Anion Transporters. *DDDT* **2014**, *1073*, doi:10.2147/DDDT.S67456.
77. Saito, H.; Yoshimura, M.; Saigo, C.; Komori, M.; Nomura, Y.; Yamamoto, Y.; Sagata, M.; Wakida, A.; Chuman, E.; Nishi, K.; et al. Hepatic Sulfotransferase as a Nephroprotective Target by Suppression of the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Accumulation in Ischemic Acute Kidney Injury. *Toxicological Sciences* **2014**, *141*, 206–217, doi:10.1093/toxsci/kfu119.
78. Itoh, Y.; Ezawa, A.; Kikuchi, K.; Tsuruta, Y.; Niwa, T. Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis Patients Measured by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Their Effects on Endothelial ROS Production. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *403*, 1841–1850, doi:10.1007/s00216-012-5929-3.
79. Paats, J.; Adoberg, A.; Arund, J.; Dhondt, A.; Fernström, A.; Fridolin, I.; Glorieux, G.; Leis, L.; Luman, M.; Gonzalez-Parra, E.; et al. Serum Levels and Removal by Haemodialysis and Haemodiafiltration of Tryptophan-Derived Uremic Toxins in ESKD Patients. *IJMS* **2020**, *21*, 1522, doi:10.3390/ijms21041522.
80. Eutox – European Uremic Toxin (EUTox) Uremic Solutes Database Available online: <https://database.uremic-toxins.org/soluteList.php> (accessed on 23 September 2021).
81. Florens, N.; Yi, D.; Juillard, L.; Soulage, C.O. Using Binding Competitors of Albumin to Promote the Removal of Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis: Hope or Pipe Dream? *Biochimie* **2018**, *144*, 1–8, doi:10.1016/j.biochi.2017.09.018.
82. Meert, N.; Eloit, S.; Schepers, E.; Lemke, H.-D.; Dhondt, A.; Glorieux, G.; Van Landschoot, M.; Waterloos, M.-A.; Vanholder, R. Comparison of Removal Capacity of Two Consecutive Generations of High-Flux Dialysers during Different Treatment Modalities. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2011**, *26*, 2624–2630, doi:10.1093/ndt/gfq803.
83. de Loor, H.; Meijers, B.K.I.; Meyer, T.W.; Bammens, B.; Verbeke, K.; Dehaen, W.; Evenepoel, P. Sodium Octanoate to Reverse Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate Albumin Binding in Uremic and Normal Serum during Sample Preparation Followed by Fluorescence Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 4684–4688, doi:10.1016/j.chroma.2009.04.015.

84. Tao, X.; Thijssen, S.; Kotanko, P.; Ho, C.-H.; Henrie, M.; Stroup, E.; Handelman, G. Improved Dialytic Removal of Protein-Bound Uraemic Toxins with Use of Albumin Binding Competitors: An in Vitro Human Whole Blood Study. *Sci Rep* **2016**, *6*, 23389, doi:10.1038/srep23389.
85. Madero, M.; Cano, K.B.; Campos, I.; Tao, X.; Maheshwari, V.; Brown, J.; Cornejo, B.; Handelman, G.; Thijssen, S.; Kotanko, P. Removal of Protein-Bound Uremic Toxins during Hemodialysis Using a Binding Competitor. *CJASN* **2019**, *14*, 394–402, doi:10.2215/CJN.05240418.
86. Huang, S.-T.; Shu, K.-H.; Cheng, C.-H.; Wu, M.-J.; Yu, T.-M.; Chuang, Y.-W.; Chen, C.-H. Serum Total P-Cresol and Indoxyl Sulfate Correlated With Stage of Chronic Kidney Disease in Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* **2012**, *44*, 621–624, doi:10.1016/j.transproceed.2011.11.023.
87. Van Sandwijk, M.S.; Ten Berge, I.J.M.; Majoie, C.B.L.M.; Caan, M.W.A.; De Sonnevile, L.M.J.; Van Gool, W.A.; Bemelman, F.J. Cognitive Changes in Chronic Kidney Disease and After Transplantation. *Transplantation* **2016**, *100*, 734–742, doi:10.1097/TP.0000000000000968.
88. Harciarek, M.; Biedunkiewicz, B.; Lichodziejewska-Niemierko, M.; Dębska-Ślizień, A.; Rutkowski, B. Continuous Cognitive Improvement 1 Year Following Successful Kidney Transplant. *Kidney International* **2011**, *79*, 1353–1360, doi:10.1038/ki.2011.40.
89. Radić, J.; Ljutić, D.; Radić, M.; Kovačić, V.; Dodig-Ćurković, K.; Šain, M. Kidney Transplantation Improves Cognitive and Psychomotor Functions in Adult Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* **2011**, *34*, 399–406, doi:10.1159/000330849.
90. Liabeuf, S.; Desjardins, L.; Massy, Z.A.; Brazier, F.; Westeel, P.F.; Mazouz, H.; Titeca-Beauport, D.; Diouf, M.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; et al. Levels of Indoxyl Sulfate in Kidney Transplant Patients, and the Relationship With Hard Outcomes. *Circ J* **2016**, *80*, 722–730, doi:10.1253/circj.CJ-15-0949.
91. Batteux, B.; Bodeau, S.; André, C.; Hurtel-Lemaire, A.-S.; Gras-Champel, V.; Desailly-Henry, I.; Masmoudi, K.; Bennis, Y.; Massy, Z.A.; Kamel, S.; et al. Association between Uremic Toxin Concentrations and Bone Mineral Density after Kidney Transplantation. *Toxins* **2020**, *12*, 715, doi:10.3390/toxins12110715.
92. DiNicolantonio, J.J.; McCarty, M.; OKeefe, J. Association of Moderately Elevated Trimethylamine N-Oxide with Cardiovascular Risk: Is TMAO Serving as a Marker for Hepatic Insulin Resistance. *Open Heart* **2019**, *6*, e000890, doi:10.1136/openhrt-2018-000890.
93. Marianne, J.; Laville, S.M.; Caillard, P.; Batteux, B.; Gras-Champel, V.; Masmoudi, K.; Choukroun, G.; Liabeuf, S. Evaluation of Changes Over Time in the Drug Burden and Medication Regimen Complexity in ESRD Patients Before and After Renal Transplantation. *Kidney International Reports* **2021**, *6*, 128–137, doi:10.1016/j.ekir.2020.10.011.
94. Laville, S.M.; Gras-Champel, V.; Moragny, J.; Metzger, M.; Jacquelinet, C.; Combe, C.; Fouque, D.; Laville, M.; Frimat, L.; Robinson, B.M.; et al. Adverse Drug Reactions in Patients with CKD. *CJASN* **2020**, *15*, 1090–1102, doi:10.2215/CJN.01030120.
95. Nolin, T.D.; Frye, R.F.; Matzke, G.R. Hepatic Drug Metabolism and Transport in Patients with Kidney Disease. *American Journal of Kidney Diseases* **2003**, *42*, 906–925, doi:10.1016/j.ajkd.2003.07.019.
96. Prokopienko, A.J.; Nolin, T.D. Microbiota-Derived Uremic Retention Solutes: Perpetrators of Altered Nonrenal Drug Clearance in Kidney Disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2018**, *11*, 71–82, doi:10.1080/17512433.2018.1378095.
97. Lea-Henry, T.N.; Carland, J.E.; Stocker, S.L.; Sevastos, J.; Roberts, D.M. Clinical Pharmacokinetics in Kidney Disease: Fundamental Principles. *CJASN* **2018**, *13*, 1085–1095, doi:10.2215/CJN.00340118.
98. Veau, C.; Leroy, C.; Banide, H.; Auchère, D.; Tardivel, S.; Farinotti, R.; Lacour, B. Effect of Chronic Renal Failure on the Expression and Function of Rat Intestinal P-Glycoprotein in Drug Excretion. *Nephrol Dial Transplant* **2001**, *16*, 1607–1614, doi:10.1093/ndt/16.8.1607.
99. Naud, J.; Michaud, J.; Boisvert, C.; Desbiens, K.; Leblond, F.A.; Mitchell, A.; Jones, C.; Bonnardeaux, A.; Pichette, V. Down-Regulation of Intestinal Drug Transporters in Chronic Renal Failure in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *320*, 978–985, doi:10.1124/jpet.106.112631.
100. Leblond, F.A.; Petrucci, M.; Dubé, P.; Bernier, G.; Bonnardeaux, A.; Pichette, V. Downregulation of Intestinal Cytochrome P450 in Chronic Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13*, 1579–1585, doi:10.1097/O1.asn.0000017575.50319.77.

101. Nolin, T.D.; Frye, R.F.; Le, P.; Sadr, H.; Naud, J.; Leblond, F.A.; Pichette, V.; Himmelfarb, J. ESRD Impairs Nonrenal Clearance of Fexofenadine but Not Midazolam. *JASN* **2009**, *20*, 2269–2276, doi:10.1681/ASN.2009010082.
102. Sakai, T.; Takadate, A.; Otagiri, M. Characterization of Binding Site of Uremic Toxins on Human Serum Albumin. *Biol Pharm Bull* **1995**, *18*, 1755–1761, doi:10.1248/bpb.18.1755.
103. Watanabe, H.; Noguchi, T.; Miyamoto, Y.; Kadowaki, D.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Miyamura, S.; Ishima, Y.; Otagiri, M.; Maruyama, T. Interaction between Two Sulfate-Conjugated Uremic Toxins, *p*-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate, during Binding with Human Serum Albumin. *Drug Metab Dispos* **2012**, *40*, 1423–1428, doi:10.1124/dmd.112.045617.
104. Vanholder, R.; Van Landschoot, N.; De Smet, R.; Schoots, A.; Ringoir, S. Drug Protein Binding in Chronic Renal Failure: Evaluation of Nine Drugs. *Kidney International* **1988**, *33*, 996–1004, doi:10.1038/ki.1988.99.
105. Nishi, K.; Sakurama, K.; Watanabe, H.; Maruyama, T.; Yamasaki, K.; Otagiri, M. Effects of Uremic Toxins on the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin. *Biol Pharm Bull* **2021**, *44*, 437–441, doi:10.1248/bpb.b20-00929.
106. Pietrement, C.; Gorisse, L.; Jaisson, S.; Gillery, P. Chronic Increase of Urea Leads to Carbamylated Proteins Accumulation in Tissues in a Mouse Model of CKD. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82506, doi:10.1371/journal.pone.0082506.
107. Klammt, S.; Wojak, H.-J.; Mitzner, A.; Koball, S.; Rychly, J.; Reisinger, E.C.; Mitzner, S. Albumin-Binding Capacity (ABiC) Is Reduced in Patients with Chronic Kidney Disease along with an Accumulation of Protein-Bound Uraemic Toxins. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2012**, *27*, 2377–2383, doi:10.1093/ndt/gfr616.
108. Kraus, L.M.; Kraus, A.P. Carbamoylation of Amino Acids and Proteins in Uremia. *Kidney Int Suppl* **2001**, *78*, S102-107, doi:10.1046/j.1523-1755.2001.59780102.x.
109. Koeth, R.A.; Kalantar-Zadeh, K.; Wang, Z.; Fu, X.; Tang, W.H.W.; Hazen, S.L. Protein Carbamylation Predicts Mortality in ESRD. *JASN* **2013**, *24*, 853–861, doi:10.1681/ASN.2012030254.
110. Berg, A.H.; Drechsler, C.; Wenger, J.; Buccafusca, R.; Hod, T.; Kalim, S.; Ramma, W.; Parikh, S.M.; Steen, H.; Friedman, D.J.; et al. Carbamylation of Serum Albumin as a Risk Factor for Mortality in Patients with Kidney Failure. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, doi:10.1126/scitranslmed.3005218.
111. Erill, S.; Calvo, R.; Carlos, R. Plasma Protein Carbamylation and Decreased Acidic Drug Protein Binding in Uremia. *Clin Pharmacol Ther* **1980**, *27*, 612–618, doi:10.1038/clpt.1980.87.
112. Olesen, J.B.; Lip, G.Y.H.; Kamper, A.-L.; Hommel, K.; Køber, L.; Lane, D.A.; Lindhardsen, J.; Gislason, G.H.; Torp-Pedersen, C. Stroke and Bleeding in Atrial Fibrillation with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 625–635, doi:10.1056/NEJMoa1105594.
113. Arnson, Y.; Hoshen, M.; Berliner-Sendrey, A.; Reges, O.; Balicer, R.; Leibowitz, M.; Avgil Tsadok, M.; Haim, M. Risk of Stroke, Bleeding, and Death in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation and Chronic Kidney Disease. *Cardiology* **2020**, *145*, 178–186, doi:10.1159/000504877.
114. Limdi, N.A.; Limdi, M.A.; Cavallari, L.; Anderson, A.M.; Crowley, M.R.; Baird, M.F.; Allon, M.; Beasley, T.M. Warfarin Dosing in Patients with Impaired Kidney Function. *Am J Kidney Dis* **2010**, *56*, 823–831, doi:10.1053/j.ajkd.2010.05.023.
115. Tsujimoto, M.; Sugimoto, S.; Nagatomo, M.; Furukubo, T.; Izumi, S.; Yamakawa, T.; Minegaki, T.; Nishiguchi, K. Possibility of Decrease in CYP1A2 Function in Patients With End-Stage Renal Disease: Dysfunction in CYP1A2 in HD Patients. *Ther Apher Dial* **2014**, *18*, 174–180, doi:10.1111/1744-9987.12100.
116. Tsujimoto, M.; Higuchi, K.; Shima, D.; Yokota, H.; Furukubo, T.; Izumi, S.; Yamakawa, T.; Otagiri, M.; Hirata, S.; Takara, K.; et al. Inhibitory Effects of Uraemic Toxins 3-Indoxyl Sulfate and *p*-Cresol on Losartan Metabolism *in Vitro*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 133–138, doi:10.1211/jpp.62.01.0015.
117. Michaud, J.; Nolin, T.D.; Naud, J.; Dani, M.; Lafrance, J.-P.; Leblond, F.A.; Himmelfarb, J.; Pichette, V. Effect of Hemodialysis on Hepatic Cytochrome P450 Functional Expression. *J Pharmacol Sci* **2008**, *108*, 157–163, doi:10.1254/jphs.08042fp.

118. Hsueh, C.-H.; Yoshida, K.; Zhao, P.; Meyer, T.W.; Zhang, L.; Huang, S.-M.; Giacomini, K.M. Identification and Quantitative Assessment of Uremic Solutes as Inhibitors of Renal Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13*, 3130–3140, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00332.
119. Reyes, M.; Benet, L.Z. Effects of Uremic Toxins on Transport and Metabolism of Different Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System Xenobiotics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100*, 3831–3842, doi:10.1002/jps.22640.
120. Sato, T.; Yamaguchi, H.; Kogawa, T.; Abe, T.; Mano, N. Organic Anion Transporting Polypeptides 1B1 and 1B3 Play an Important Role in Uremic Toxin Handling and Drug-Uremic Toxin Interactions in the Liver. *J Pharm Pharm Sci* **2014**, *17*, 475, doi:10.18433/J3M89Q.
121. Santana Machado, T.; Poitevin, S.; Paul, P.; McKay, N.; Jourde-Chiche, N.; Legris, T.; Mouly-Bandini, A.; Dignat-George, F.; Brunet, P.; Masereeuw, R.; et al. Indoxyl Sulfate Upregulates Liver P-Glycoprotein Expression and Activity through Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *J Am Soc Nephrol* **2018**, *29*, 906–918, doi:10.1681/ASN.2017030361.
122. Shibata, N.; Inoue, Y.; Fukumoto, K.; Nishimura, A.; Fukushima, K.; Yoshikawa, Y.; Spittler, G.; Takada, K. Evaluation of Factors to Decrease Bioavailability of Cyclosporin A in Rats with Gentamicin-Induced Acute Renal Failure. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*, 384–391, doi:10.1248/bpb.27.384.
123. Okabe, H.; Hashimoto, Y.; Inui, K.-I. Pharmacokinetics and Bioavailability of Tacrolimus in Rats with Experimental Renal Dysfunction. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *52*, 1467–1472, doi:10.1211/0022357001777676.
124. Hori, R.; Okumura, K.; Yasuhara, M.; Katayama, H. Reduced Hepatic Uptake of Propranolol in Rats with Acute Renal Failure. *Biochemical Pharmacology* **1985**, *34*, 2679–2683, doi:10.1016/0006-2952(85)90567-2.
125. Terao, N.; Shen, D.D. Reduced Extraction of l-Propranolol by Perfused Rat Liver in the Presence of Uremic Blood. *J Pharmacol Exp Ther* **1985**, *233*, 277–284.
126. Evaluation of Interaction Between Immunosuppressive Drugs and Protein-Bound Uremic Toxins in Renal Transplant Patients (DRUGTOX) Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04963673>.
127. Centre d'informations thérapeutiques et de pharmacovigilance, Service de pharmacologie et toxicologie cliniques, Hôpitaux Universitaires de Genève Interactions Médicamenteuses, Cytochromes P450 et P-Glycoprotéine (Pgp) Available online: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/pharmacologie_et_toxicologie_cliniques/a5_cyt_ochromes_6_2.pdf (accessed on 23 September 2021).
128. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* **2013**, *37*, 452–474, doi:10.1093/jat/bkt054.
129. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on Bioanalytical Method Validation 2011.
130. André, C.; Bennis, Y.; Titeca-Beauport, D.; Caillard, P.; Cluet, Y.; Kamel, S.; Choukroun, G.; Maizel, J.; Liabeuf, S.; Bodeau, S. Two Rapid, Accurate Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Methods for the Quantification of Seven Uremic Toxins: An Application for Describing Their Accumulation Kinetic Profile in a Context of Acute Kidney Injury. *Journal of Chromatography B* **2020**, *1152*, 122234, doi:10.1016/j.jchromb.2020.122234.
131. Liabeuf, S.; Drüeke, T.B.; Massy, Z.A. Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies. *Toxins* **2011**, *3*, 911–919, doi:10.3390/toxins3070911.
132. Liabeuf, S.; Neiryneck, N.; Drüeke, T.B.; Vanholder, R.; Massy, Z.A. Clinical Studies and Chronic Kidney Disease: What Did We Learn Recently? *Seminars in Nephrology* **2014**, *34*, 164–179, doi:10.1016/j.semnephrol.2014.02.008.
133. Naud, J.; Nolin, T.D.; Leblond, F.A.; Pichette, V. Current Understanding of Drug Disposition in Kidney Disease. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2012**, *52*, doi:10.1177/0091270011413588.
134. Tsujimoto, M.; Sugimoto, S.; Nagatomo, M.; Furukubo, T.; Izumi, S.; Yamakawa, T.; Minegaki, T.; Nishiguchi, K. Possibility of Decrease in CYP1A2 Function in Patients With End-Stage Renal Disease: Dysfunction in CYP1A2 in HD Patients. *Ther Apher Dial* **2014**, *18*, 174–180, doi:10.1111/1744-9987.12100.

135. Tsujimoto, M.; Higuchi, K.; Shima, D.; Yokota, H.; Furukubo, T.; Izumi, S.; Yamakawa, T.; Otagiri, M.; Hirata, S.; Takara, K.; et al. Inhibitory Effects of Uraemic Toxins 3-Indoxyl Sulfate and *p*-Cresol on Losartan Metabolism *in Vitro*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 133–138, doi:10.1211/jpp.62.01.0015.
136. Nolin, T.D.; Appiah, K.; Kendrick, S.A.; Le, P.; McMonagle, E.; Himmelfarb, J. Hemodialysis Acutely Improves Hepatic CYP3A4 Metabolic Activity. *JASN* **2006**, *17*, 2363–2367, doi:10.1681/ASN.2006060610.
137. Jose, M. Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation: Adverse Effects. *Nephrology* **2007**, *12*, S66–S74, doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00731.x.
138. Enomoto, A.; Takeda, M.; Tojo, A.; Sekine, T.; Cha, S.H.; Khamdang, S.; Takayama, F.; Aoyama, I.; Nakamura, S.; Endou, H.; et al. Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of Its Nephrotoxicity. *JASN* **2002**, *13*, 1711–1720, doi:10.1097/01.ASN.0000022017.96399.B2.
139. Venkataramanan, R.; Swaminathan, A.; Prasad, T.; Jain, A.; Zuckerman, S.; Warty, V.; McMichael, J.; Lever, J.; Burckart, G.; Starzl, T. Clinical Pharmacokinetics of Tacrolimus: *Clinical Pharmacokinetics* **1995**, *29*, 404–430, doi:10.2165/00003088-199529060-00003.
140. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B.J.; Koeth, R.; Levison, B.S.; DuGar, B.; Feldstein, A.E.; Britt, E.B.; Fu, X.; Chung, Y.-M.; et al. Gut Flora Metabolism of Phosphatidylcholine Promotes Cardiovascular Disease. *Nature* **2011**, *472*, 57–63, doi:10.1038/nature09922.
141. Subramaniam, S.; Fletcher, C. Trimethylamine N-Oxide: Breathe New Life: Trimethylamine N-Oxide (TMAO): Breathe New Life. *British Journal of Pharmacology* **2018**, *175*, 1344–1353, doi:10.1111/bph.13959.
142. Tomlinson, J.A.P.; Wheeler, D.C. The Role of Trimethylamine N-Oxide as a Mediator of Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease. *Kidney International* **2017**, *92*, 809–815, doi:10.1016/j.kint.2017.03.053.
143. Kim, R.B.; Morse, B.L.; Djurdjev, O.; Tang, M.; Muirhead, N.; Barrett, B.; Holmes, D.T.; Madore, F.; Clase, C.M.; Rigatto, C.; et al. Advanced Chronic Kidney Disease Populations Have Elevated Trimethylamine N-Oxide Levels Associated with Increased Cardiovascular Events. *Kidney International* **2016**, *89*, 1144–1152, doi:10.1016/j.kint.2016.01.014.
144. Nishi, K.; Sakurama, K.; Watanabe, H.; Maruyama, T.; Yamasaki, K.; Otagiri, M. Effects of Uremic Toxins on the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2021**, *44*, 437–441, doi:10.1248/bpb.b20-00929.
145. Vanholder, R.; Van Landschoot, N.; De Smet, R.; Schoots, A.; Ringoir, S. Drug Protein Binding in Chronic Renal Failure: Evaluation of Nine Drugs. *Kidney International* **1988**, *33*, 996–1004, doi:10.1038/ki.1988.99.
146. Božina, N.; Bradamante, V.; Lovrić, M. Genetic Polymorphism of Metabolic Enzymes P450 (CYP) as a Susceptibility Factor for Drug Response, Toxicity, and Cancer Risk. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **2009**, *60*, 217–242, doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1885.
147. Rossi, M.; Johnson, D.W.; Xu, H.; Carrero, J.J.; Pascoe, E.; French, C.; Campbell, K.L. Dietary Protein-Fiber Ratio Associates with Circulating Levels of Indoxyl Sulfate and *p*-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease Patients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2015**, *25*, 860–865, doi:10.1016/j.numecd.2015.03.015.
148. Vaziri, N.D.; Wong, J.; Pahl, M.; Piceno, Y.M.; Yuan, J.; DeSantis, T.Z.; Ni, Z.; Nguyen, T.-H.; Andersen, G.L. Chronic Kidney Disease Alters Intestinal Microbial Flora. *Kidney International* **2013**, *83*, 308–315, doi:10.1038/ki.2012.345.

Annexes

Annexe I : Article original publié dans *Nephrology Dialysis Transplantation*

Potential interactions between uraemic toxins and drugs: an application in kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors

Camille André^{1,2}, Gabriel Choukroun^{1,3}, Youssef Bennis^{1,2}, Said Kamel^{1,4}, Anne Sophie Lemaire-Hurtel², Kamel Masmoudi², Sandra Bodeau^{1,2,*} and Sophie Liabeuf^{1,2,*} 

¹MP3CV Laboratory, EA7517, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France, ²Department of Clinical Pharmacology, Amiens University Medical Center, Amiens, France, ³Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, Amiens University Medical Center, Amiens, France and ⁴Department of Biochemistry, Amiens University Medical Center, Amiens, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Sophie Liabeuf; E-mail: liabeuf.sophie@chu-amiens.fr

ABSTRACT

Background. The uraemic toxins that accumulate as renal function deteriorates can potentially affect drug pharmacokinetics. This study's objective was to determine whether plasma concentrations of certain uraemic toxins are correlated with blood concentrations of two immunosuppressants.

Methods. DRUGTOX was a cross-sectional study of 403 adult patients followed up after kidney transplantation and who had undergone therapeutic drug monitoring (TDM) of calcineurin inhibitors (tacrolimus or cyclosporin) between August 2019 and March 2020. For each patient, immunosuppressant trough concentrations (C_0) were measured in whole blood samples and then normalized against the total daily dose ($C_0:D$ ratio). The sample was assayed for five uraemic toxins [urea, trimethylamine N-oxide (TMAO), indole acetic acid (IAA), *p*-cresylsulphate (PCS) and indoxylsulphate (IxS)] using liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Results. The median age was 56 years [interquartile range (IQR) 48–66] and the median estimated glomerular filtration rate was 41 mL/min/1.73 m² (IQR 30–57). Age, sex, body mass index (BMI), urea, IxS and PCS were significantly associated with an increment in the tacrolimus $C_0:D$ ratio. A multivariate analysis revealed an independent association with IxS [odds ratio 1.36 (95% confidence interval 1.00–1.85)] after adjustment for sex, age and BMI, whereas adjustment for age weakened the association for PCS and urea. In a univariate logistic analysis, age, sex, BMI and the TMAO level (but not PCS, IxS, IAA or urea) were significantly associated with an increment in the cyclosporine $C_0:D$ ratio.

Conclusions. Even though TDM and dose adaptation of immunosuppressants keep levels within the therapeutic window,

increased exposure to tacrolimus (but not cyclosporine) is associated with an accumulation of PCS, IxS and urea.

Keywords: cyclosporine, kidney transplantation, tacrolimus, uraemic toxins

INTRODUCTION

Kidney disease has a major effect on overall health, both as a direct cause of morbidity and mortality and as an important risk factor for cardiovascular disease [1]. Patients with chronic kidney disease (CKD) typically present several comorbidities and thus require polymedication [2–4]. CKD patients having undergone kidney transplantation have the highest drug burden and the most complex drug regimens [5]. Immunosuppressive agents increase the complexity of patient care due to their pharmacokinetic variability and their low therapeutic index, which prompt a need for therapeutic drug monitoring (TDM).

Drug management is particularly difficult in CKD patients. Kidney disease directly affects drug pharmacokinetics and, in parallel with the decrease in the glomerular filtration rate (GFR) and tubular secretion, leads to a decrease in renal drug clearance. Furthermore, CKD modifies the absorption, distribution, metabolism and non-renal clearance of drugs [6].

As CKD progresses, many molecules accumulate as a result of the kidneys' decreased excretory capacity, such as compounds called uraemic toxins. They are defined in particular by their concentration-dependent deleterious effects. These molecules are classified, according to their molecular weight, into small molecules such as urea and trimethylamine N-oxide (TMAO), medium molecules and molecules

KEY LEARNING POINTS

What is already known about this subject?

- In addition to affecting renal clearance of drugs, chronic kidney disease (CKD) changes the absorption, distribution, metabolism and non-renal clearance of drugs. As CKD progresses, the accumulation of uraemic toxins might contribute to changes in drug pharmacokinetics. Given the requirement for therapeutic drug monitoring (TDM) with most immunosuppressants, the latter are good models for understanding the potential impact of uraemic toxins on blood concentrations of drugs.

What this study adds?

- In 403 kidney transplant recipients, the blood tacrolimus concentration was significantly associated with plasma urea, indoxylsulphate (IxS) and *p*-cresylsulphate (PCS) levels. IxS and PCS bind to albumin with high affinity and might directly compete for tacrolimus binding sites on the protein, whereas urea might carbamylate albumin and thus modify tacrolimus binding. The blood concentration of cyclosporine (which mainly binds to lipoprotein rather than albumin) was not associated with plasma IxS, PCS and urea levels.

What impact this may have on practice or policy?

- Our findings have potential implications for other drugs that bind to albumin with high affinity (since an elevated free fraction might induce adverse drug reactions) and emphasize the need for more research on how to decrease uraemic toxin levels.

strongly bound to plasma proteins [such as *p*-cresylsulphate (PCS), indoxylsulphate (IxS) and indole acetic acid (IAA)]. All the aforementioned uraemic toxins accumulate when kidney function deteriorates and all have been linked to harmful effects on the cardiovascular system [7–11], bone and kidney in CKD patients [12, 13]. Uraemic toxins can also modify drug pharmacokinetics. For example, urea is able to carbamylate albumin [14, 15], which in turn alters the protein binding of many drugs. Several studies have shown that the interactions between uraemic toxins and organic anion transporters (OATs) 1/3 [16, 17] and other proteins [6, 18, 19] can affect renal or non-renal clearance of drugs and thus lead to toxin accumulation and toxicity. Among the drugs used in patients with CKD, immunosuppressants require TDM in order to maintain their concentration within the therapeutic range after kidney transplantation. The resulting dose adjustments are essential for preventing the onset of acute graft rejection and minimizing drug-related toxicity. The two calcineurin inhibitors tacrolimus and cyclosporine constitute the cornerstone of immunosuppressive treatment. They have similar pharmacological properties: low and variable bioavailability, major binding to plasma proteins, metabolism by cytochrome P450 3A4/5 and excretion in the bile [20]. The main difference between the two concerns the plasma protein to which the drug binds: albumin for tacrolimus and lipoprotein for cyclosporine. The impact of uraemic toxins on blood concentrations of these two immunosuppressants has not been comprehensively characterized [21]. Indeed, patients having undergone kidney transplantation could present a few years after transplantation with an elevation in uraemic toxin levels in line with estimated GFR (eGFR) decline.

Our starting hypothesis was that uraemic toxins influence the exposure of immunosuppressants. The study's objective was therefore to determine whether the accumulation of certain uraemic toxins was associated with differences in the blood concentrations of the immunosuppressants tacrolimus and cyclosporine.

MATERIALS AND METHODS

The present results are reported according to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology guidelines [22].

Study design and participants

DRUGTOX was a cross-sectional study of adult patients being monitored after kidney transplantation at Amiens University Medical Centre (Amiens, France) and who underwent calcineurin inhibitor TDM between 4 August 2019 and 11 March 2020. The main inclusion criteria were age ≥ 18 years, kidney transplantation 12 months previously, treatment with a calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporine) and available calcineurin inhibitor assay data. Patients with acute graft rejection and/or who refused to participate were not included in the study.

In line with the study's objective, we planned to include 200 patients with an $eGFR \leq 40$ mL/min/1.73 m² (since these patients usually present high uraemic toxin levels) and 200 patients with an $eGFR > 40$ mL/min/1.73 m² (since these patients usually present low uraemic toxin levels). First, all consecutive patients meeting the inclusion criteria were included in one eGFR category or the other. Second, the $eGFR > 40$ mL/min/1.73 m² group was the first to attain 200 patients;

thenceforth, only consecutive patients with $\text{eGFR} \leq 40 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ were included (up to a limit of 200). Each patient was included once only.

Blood samples were analysed routinely in the pharmacology department in order to determine tacrolimus or cyclosporine trough concentrations during the follow-up of kidney transplant patients. Next, for each patient, levels of uraemic toxins were measured (after centrifugation) in unused plasma from the same initial sample.

In line with French legislation on non-interventional studies, approval by an investigational review board was neither required nor sought. However, the study was registered with the French National Data Protection Commission (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, Paris, France; registration PI2019_843_0060). Patients were provided with information about the study and were free to refuse to participate. Due to French regulations, data are not available to share.

Study endpoints

The study's objective was to determine whether the accumulation of certain uraemic toxins was associated with tacrolimus or cyclosporine exposure [evaluated by the ratio of tacrolimus or cyclosporine trough concentration (C_0) to the dose (D) in milligrams per kilogram ($C_0:D$)] and uraemic toxin concentrations. Confounding factors that might have modified calcineurin inhibitor pharmacokinetics, and thus exposure, were included in the analysis.

Given that clinicians routinely adjust the tacrolimus or cyclosporine dose (to maintain concentrations within the therapeutic range), we analysed the $C_0:D$ ratio rather than C_0 alone.

Collected data

The patients' sociodemographic (age and sex), anthropometric [body mass index (BMI)], clinical (blood pressure, aetiology of CKD, history of hypertension or liver disease and time since transplantation) and clinical biochemistry data [calcium, phosphate, glucose, uric acid, C-reactive protein (CRP), protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine] were extracted from the medical records. We used the Modification of Diet in Renal Disease equation to calculate the eGFR [23]. CKD stages were evaluated according to the Kidney Disease: Improving Global Outcomes classification [24].

Each prescribed drug was recorded and classified as a strong or weak inhibitor or inducer of P450 cytochrome 3A4 or 3A5 (CYP3A4/5), an inhibitor or inducer of glycoprotein P (P-gp) and/or a compound that bound strongly to plasma proteins (Supplementary data, Table S1). For each patient, the total set of prescribed drugs was used to construct the following variables: at least one strong CYP3A4/5 inhibitor, at least one weak CYP3A4/5 inhibitor, at least one strong CYP3A4/5 inducer, at least one weak CYP3A4/5 inducer, at least one P-gp inhibitor, at least one P-gp inducer and at least one drug with major plasma protein binding.

Tacrolimus and cyclosporine assays

Calcineurin inhibitor concentrations were determined using an European Medicines Agency validated liquid chromatography (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France)–tandem mass spectrometry (Api3200, Sciex, Les Ulis, France) method. A sample of 50 μL of whole blood was deproteinized with 100 μL of a zinc sulphate solution containing a mixture of deuterated internal standards. The compounds were separated on a Luna Phenyl-Hexyl column (5 μm , $50 \times 2.0 \text{ mm}$, Phenomenex, Le Pecq, France). The $1202.8 \rightarrow 425.2$ and $821.5 \rightarrow 768.4$ transitions were used to quantify cyclosporine and tacrolimus, respectively, after positive-mode electrospray ionization.

Uraemic toxin assays

Blood levels of uraemic toxins (IAA, IxS, PCS and TMAO) were determined using liquid chromatography (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France)–tandem mass spectrometry (3200 QTRAP, Sciex, Les Ulis, France) [25]. Briefly, uraemic toxins were extracted from 50 μL of plasma by adding 200 μL of an ice-cold acetonitrile solution containing internal standards ($^{13}\text{C}_6$ -IxS, d_4 -PCS and d_9 -TMAO). The compounds were separated on a pentafluorophenyl propyl column (5 μm , $50 \times 2.1 \text{ mm}$, Restek, Lisses, France) using a gradient of acetonitrile with 0.1% formic acid and ultrapure water with 0.1% formic acid and a flow rate of 0.8 mL/min . Data were acquired in multiple reaction monitoring mode after negative-mode electrospray ionization (for IxS and PCS) or positive-mode electrospray ionization (for IAA and TMAO) [26].

The Atellica CH Urea Nitrogen Assay (Siemens, Munich, Germany) was used to quantify urea nitrogen in human plasma.

Statistical analyses

Baseline characteristics were described for all participants and by subgroup according to the baseline eGFR (<40 or $\geq 40 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). The results were expressed as the median [interquartile range (IQR)] or the frequency (percentage). Student's t -test, Mann-Whitney test or chi-squared test were used for intergroup comparisons.

For each uraemic toxin, the plasma levels at each CKD stage were compared by Kruskal–Wallis test. We used logistic regression models to estimate the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for uraemic toxins and other factors associated with the $C_0:D$ ratio for tacrolimus and cyclosporine. First, univariate logistic analyses were performed for uraemic toxins and variables that might influence the $C_0:D$ ratio for tacrolimus or cyclosporine. Variables with P -values >0.10 in the crude model were removed from the multivariate analyses. Due to the collinearity of the uraemic toxins tested, separate multivariate logistic regression models were built for each uraemic toxin with $P > 0.10$ in the crude model. Confounders included age, sex and BMI. As all uraemic toxins have a high correlation with eGFR , they are considered as a proxy of eGFR . As eGFR is in the causal

pathway of the association between uraemic toxins and C₀:D, it is not a confounding factor and multivariate models were not adjusted for eGFR.

Statistical analyses were performed with SPSS for Windows version 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and R version 3.5.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Baseline characteristics

A total of 403 patients (250 men) were included in the study. The median age was 56 years (IQR 48–66). Hypertension was present in 97.2% of the study population and only one patient had liver failure. The time interval between kidney

Table 1. Baseline characteristics of the study population

Variables	All patients (N = 403)	Baseline eGFR (MDRD equation; mL/min/1.73 m ²)		P-value
		eGFR > 40 (n = 203)	eGFR ≤ 40 (n = 200)	
Demographic characteristics				
Males, n (%)	250 (62.0)	142 (69.9)	108 (54.0)	0.001
Age (years), median (IQR)	56.0 (48.0–66.0)	54.00 (44.5–64.0)	59.0 (50.8–90.1)	0.0001
BMI (kg/m ²), median (IQR)	26.5 (23.4–29.7)	26.3 (23.0–29.4)	26.5 (23.7–30.4)	0.153
Clinical characteristics				
CKD stage, n (%)				
1	13 (3.2)	13 (6.4)		–
2	68 (16.9)	68 (33.5)		–
3	228 (56.5)	122 (60.1)	106 (53.0)	–
4	84 (20.8)		84 (42.0)	–
5	10 (2.5)		10 (5.0)	–
Cause of CKD, n (%)				
Diabetes	20 (4.9)	12 (5.9)	8 (4.0)	0.840
Vascular disorder	26 (6.5)	10 (4.9)	16 (8.0)	
Chronic glomerulonephritis	38 (9.4)	16 (7.9)	22 (11.0)	
Polycystic kidney disease	63 (15.4)	31 (15.3)	31 (15.5)	
Interstitial nephritis	5 (1.2)	2 (1.0)	3 (1.5)	
Autoimmune disease	72 (17.9)	36 (17.7)	36 (18.0)	
Genetic cause	45 (11.2)	24 (11.8)	21 (10.5)	
Other causes	106 (26.3)	57 (28.1)	49 (24.5)	
Several causes	29 (7.2)	15 (7.4)	14 (7.0)	
Time since transplantation (months), median (IQR)	78.0 (40.0–158.5)	65.0 (32.5–138.0)	85.0 (48.0–179.2)	0.003
Transplantations, n (%)				
1	359 (89.1)	177 (87.2)	182 (91.0)	0.312
2	41 (10.2)	25 (12.3)	16 (8.0)	
3	2 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	
4	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.5)	
SBP (mmHg), median (IQR)	142 (132–158)	140 (131–154)	144 (132–160)	0.160
DBP (mmHg), median (IQR)	80 (72–87)	80 (74–85)	80 (70.0–90)	0.720
PP (mmHg), median (IQR)	64 (54–75)	62 (53–70)	66 (54–79)	0.051
Hypertension, n (%)	392 (97)	195 (96)	196 (98)	0.381
Liver disease, n (%)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.5)	0.496
Blood laboratory data, median (IQR)				
Calcium (mmol/L)	2.41 (2.32–2.49)	2.43 (2.35–2.49)	2.39 (2.30–2.48)	0.034
Phosphate (mmol/L)	1.05 (0.91–1.20)	0.99 (0.87–1.09)	1.14 (0.99–1.30)	<0.001
Protein (g/L)	67 (64–70)	68 (65–71)	66 (63–69)	<0.001
Albumin (g/L)	38.9 (36.7–40.9)	39.4 (38.3–41.5)	37.5 (35.9–40.0)	0.009
Glucose (mmol/L)	5.4 (4.8–6.3)	5.3 (4.8–6.1)	5.5 (4.8–6.4)	0.583
AST (IU/L)	16 (13–21)	17.00 (13–22)	15 (12–19)	0.073
ALT (IU/L)	20 (15–27)	23 (16–29)	19 (14–24)	0.095
Creatinine (μmol/L)	146 (116–187)	116 (97–115)	187 (163–229)	<0.0001
eGFR (MDRD; mL/min/1.73 m ²)	41 (30–57)	57 (49–65)	30 (23–35)	<0.0001
Uric acid (μmol/L)	471 (390–565)	446 (378–523)	509 (405–598)	0.0003
CRP (mg/L)	3.7 (0.6–9.0)	2.1 (0.6–5.5)	5.4 (0.6–13.5)	0.012
Uraemic toxins, median (IQR)				
Urea (mmol/L)	11.30 (8.20–15.65)	8.3 (6.45–9.80)	15.45 (12.07–20.60)	<0.0001
TMAO (μg/mL)	0.71 (0.35–1.54)	0.42 (0.24–0.93)	1.17 (0.58–1.98)	<0.0001
IAA (μg/mL)	0.39 (0.25–0.57)	0.35 (0.21–0.48)	0.45 (0.28–0.62)	<0.0001
PCS (μg/mL)	4.32 (1.52–7.76)	3.02 (1.10–5.65)	5.80 (2.88–10.63)	<0.0001
IxS (μg/mL)	2.22 (1.22–3.43)	1.39 (0.86–2.21)	3.11 (2.24–5.45)	<0.0001

DBP, diastolic blood pressure; PP, pulse pressure; SBP, systolic blood pressure; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease.

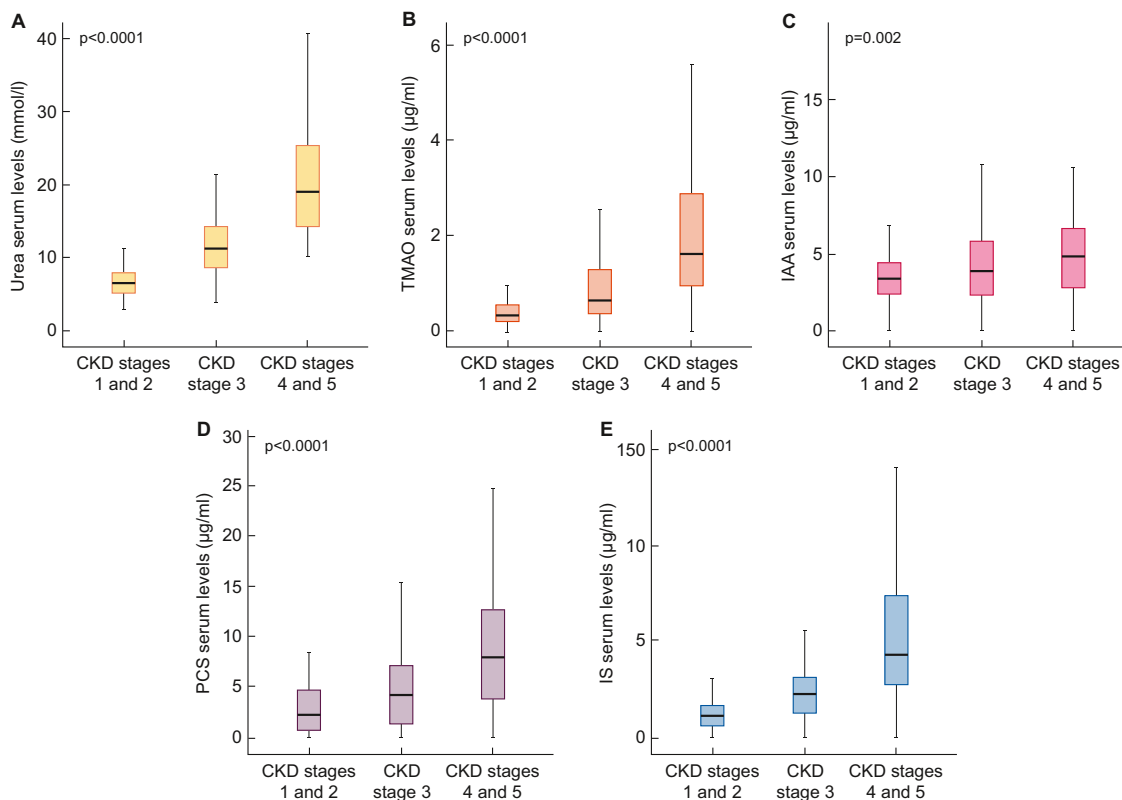


FIGURE 1: Plasma levels of uraemic toxins by CKD stage: (A) urea, (B) TMAO, (C) IAA, (D) PCS and (E) IxS.

transplantation and study inclusion ranged from 1 to 40 years, with a median of 6.5 years. The median eGFR was 41 mL/min/1.73 m² (IQR 30–57) and the majority of the patients (56.5%) were at CKD Stage 3 (Table 1).

The group of patients with an eGFR <40 mL/min/1.73 m² was significantly older and had a higher median time since transplantation and a higher proportion of women when compared with the group with an eGFR >40 mL/min/1.73 m². When considering the laboratory data, patients with an eGFR <40 mL/min/1.73 m² had higher plasma levels of phosphate, uric acid, CRP and uraemic toxins (Table 1).

Uraemic toxin levels

The data on plasma urea, TMAO, IAA, PCS and IxS levels are summarized by CKD stage in Figure 1 and Supplementary data, Table S2. For all the uraemic toxins studied here, the level rose progressively with the CKD stage and peaked at CKD Stages 4 and 5.

Immunosuppressant treatment

A total of 248 patients were being treated with tacrolimus. The median dose was 4 mg/day (IQR 3–6), which corresponded to a median dose of 0.06 mg/kg/day (IQR 0.04–0.08). The median blood tacrolimus concentration was 7.2 ng/mL (IQR 5.6–8.5) and the median C₀:D ratio for tacrolimus was 123.7 (IQR 81.3–177.1) (Table 2).

Among the 155 patients being treated with cyclosporine, the median dose was 150 mg/day (IQR 120–175); this corresponded to a median dose of 1.82 mg/kg/day (IQR 1.5–2.25).

Table 2. TDM of tacrolimus and cyclosporine and data on potential drug interactions

Variables	Values
Characteristics of calcineurin inhibitors	
Cyclosporine (n = 155)	
Plasma concentration (ng/mL), median (IQR)	94.30 (74.20–123.00)
Dose (mg/day), median (IQR)	150.00 (120.00–175.00)
Dose (mg/kg/day), median (IQR)	1.82 (1.51–2.25)
Plasma concentration (ng/mL)/dose (mg/kg/day), median (IQR)	52.89 (36.42–69.25)
Tacrolimus (n = 248)	
Plasma concentration (ng/mL), median (IQR)	7.19 (5.65–8.51)
Dose (mg/day), median (IQR)	4.00 (3.00–6.00)
Dose (mg/kg/day), median (IQR)	0.06 (0.04–0.08)
Plasma concentration (ng/mL)/dose (mg/kg/day), median (IQR)	123.70 (81.32–177.05)
Concomitant treatments, n (%)	
At least one strong CYP3A4/5 inhibitor	14 (3.23)
At least one weak CYP3A4/5 inhibitor	5 (1.24)
At least one strong CYP3A4/5 inducer	6 (1.49)
At least one weak CYP3A4/5 inducer	3 (0.74)
At least one P-gp inhibitor	87 (21.34)
At least one P-gp inducer	5 (1.24)
At least one drug that binds strongly to plasma proteins	399 (98.76)

The median blood cyclosporine concentration was 94 ng/mL (IQR 74–123) and the median C₀:D ratio for cyclosporine was 52.9 (IQR 36.4–69.3) (Table 2).

Factors associated with the C₀:D ratio for tacrolimus and/or cyclosporine

Tacrolimus. When we dichotomized the 248 tacrolimus-treated patients according to the median C₀:D ratio, patients with an above-median ratio were significantly older, more likely to be male and had a higher BMI, higher glycaemia values, higher creatininaemia values and lower eGFR relative to patients with a below-median ratio. There were no differences in the use of drugs that interact with CYP3A4/5 or P-gp or that bind strongly to plasma proteins. Patients with an above-median tacrolimus C₀:D ratio presented significantly higher plasma levels of urea, PCS and IxS (but not of TMAO or IAA) (Supplementary data, Table S3). Univariate logistic analyses gave the same results and thus highlighted the association between a high tacrolimus C₀:D ratio and three uraemic toxins (namely urea, PCS and IxS) (Supplementary data, Table S4).

In a multivariate analysis, age, sex and BMI were independently associated with the tacrolimus C₀:D ratio. The significant association between the tacrolimus C₀:D ratio and plasma IxS levels [OR 1.36 (95% CI 1.00–1.85)] was independent of sex, BMI and age (Table 3, plasma IxS levels). The association between the tacrolimus C₀:D ratio and plasma urea levels was still significant after adjustment for sex and BMI [OR 2.29 (95% CI 1.28–4.09)], whereas the association was no longer significant after full adjustment for sex, BMI and age [OR 1.71 (95% CI 0.93–3.16)] (Table 3, plasma urea levels). The association between the tacrolimus C₀:D ratio and plasma PCS levels was still significant after adjustment for sex and BMI [OR 1.31 (95% CI 1.06–1.62)] but not after adjustment for sex, BMI and age [OR 1.22 (95% CI 0.99–1.51)] (Table 3, plasma PCS levels).

Cyclosporine. When we dichotomized the 155 patients treated with cyclosporine according to the median cyclosporine C₀:D ratio, patients with an above-median ratio were significantly older, more likely to be female and had a higher BMI and higher glycaemia values. There were no differences with regard to the use of drugs that interacted with CYP3A4/5, P-gp or plasma proteins. Patients with an above-median cyclosporine C₀:D ratio presented significantly higher plasma levels of TMAO but not of urea, PCS, IxS or IAA (Supplementary data, Table S5). A univariate logistic analysis gave the same results and again highlighted the association between a high cyclosporine C₀:D ratio and the plasma TMAO level (Supplementary data, Table S6).

In a multivariate analysis, age, sex and BMI were independently associated with the cyclosporine C₀:D ratio. However, the association between the cyclosporine C₀:D ratio and the plasma TMAO level was no longer significant [OR 1.12 (95% CI 0.78–1.61)] after adjustment for sex, BMI and age (Table 4).

DISCUSSION

In the present cross-sectional study of a cohort of kidney transplant recipients, we found that elevated plasma concentrations of certain uraemic toxins were associated with elevated blood concentrations of the calcineurin inhibitors tacrolimus and cyclosporine. However, the nature of the associations differed

Table 3. Multivariate logistic regression analysis of factors associated with the tacrolimus C₀:D ratio and considered as a continuous [log-normalized (ln)] variable (n = 248)

Variables	OR (95% CI)	P-value
Plasma IxS levels		
Unadjusted		
ln IxS	1.41 (1.06–1.86)	0.018
Model 1, including ln IxS and sex		
ln IxS	1.43 (1.07–1.91)	0.015
Sex	1.83 (1.07–3.12)	0.027
Model 2, including ln IxS, sex and BMI		
ln IxS	1.44 (1.28–4.09)	0.017
Sex	1.85 (1.11–3.35)	0.029
BMI	1.12 (1.06–1.19)	<0.0001
Model 3, including ln IxS, sex, BMI and age		
ln IxS	1.36 (1.00–1.85)	0.047
Sex	2.03 (1.15–3.60)	0.015
BMI	1.11 (1.04–1.18)	0.001
Age	1.04 (1.02–1.06)	<0.0001
Plasma urea levels		
Unadjusted		
ln urea	2.08 (1.21–3.6)	0.008
Model 1, including ln urea, sex		
ln urea	2.24 (1.28–3.92)	0.005
Sex	1.89 (1.11–3.24)	0.019
Model 2, including ln urea, sex and BMI		
ln urea	2.29 (1.28–4.09)	0.005
Sex	1.93 (1.11–3.35)	0.020
BMI	1.12 (1.06–1.19)	<0.0001
Model 3, including ln urea, sex, BMI and age		
ln urea	1.71 (0.93–3.16)	0.085
Sex	2.04 (1.16–3.60)	0.014
BMI	1.11 (1.05–1.18)	0.001
Age	1.04 (1.01–1.06)	0.001
Plasma PCS levels		
Unadjusted		
ln PCS	1.27 (1.04–1.54)	0.018
Model 1 including ln PCS and sex		
ln PCS	1.27 (1.04–1.56)	0.017
Sex	1.88 (1.10–3.20)	0.021
Model 2 including ln PCS, sex and BMI		
ln PCS	1.31 (1.06–1.62)	0.011
Sex	1.93 (1.11–3.37)	0.020
BMI	1.13 (1.06–1.20)	<0.0001
Model 3 including ln PCS, sex, BMI and age		
ln PCS	1.22 (0.99–1.51)	0.067
Sex	2.07 (1.17–3.67)	0.012
BMI	1.11 (1.05–1.18)	0.001
Age	1.04 (1.02–1.06)	0.001

between tacrolimus and cyclosporine; indeed, both drugs have the same pharmacological target but bind strongly to different plasma proteins.

We first studied plasma levels of five notable uraemic toxins (IAA, IxS, PCS, TMAO and urea) in a cohort of patients in whom the time since transplantation ranged from 1 to 40 years. In fact, most studies of uraemic toxins

Table 4. Multivariate logistic regression analysis of factors associated with the cyclosporine C₀:D ratio, with plasma TMAO levels entered as a continuous [log-normalized (ln)] variable (n = 155)

	OR (95% CI)	P-value
Unadjusted		
ln TMAO	1.37 (1.00–1.87)	0.046
Model 1, including		
ln TMAO and sex		
ln TMAO	1.39 (1.01–1.92)	0.042
Sex	0.42 (0.21–0.82)	0.012
Model 2, including ln TMAO, sex and BMI		
ln TMAO	1.26 (0.90–1.76)	0.182
Sex	0.40 (0.19–0.83)	0.014
BMI	1.18 (1.09–1.27)	<0.0001
Model 3, including ln TMAO, sex, BMI and age		
ln TMAO	1.12 (0.78–1.61)	0.540
Sex	0.33 (0.15–0.72)	0.005
BMI	1.20 (1.10–1.30)	<0.0001
Age	1.06 (1.02–1.09)	0.002

have focused on pre-dialysis and dialysis patients rather than kidney transplant recipients [27, 28]. Hence the present report extends the data on a panel of important uraemic toxins in a large number of patients at variable times since transplantation. We confirmed that uraemic toxin levels were significantly higher in patients with lower eGFRs than in patients with higher eGFRs [28]. However, the uraemic toxin levels were lower than those described in dialysis patients, reflecting the kidney's functional activity after transplantation. The broad range of uraemic toxin levels enabled us to evaluate the latter's association with the blood concentration of calcineurin inhibitors.

Many studies have demonstrated that CKD not only decreases renal drug clearance, but also modifies drug absorption, distribution and non-renal clearance [6]. Uraemic toxins accumulate as renal function deteriorates and have been linked to adverse outcomes [13, 29, 30]. These toxins might also affect drug pharmacokinetics [6]. As immunosuppressive drugs require TDM, kidney transplant recipients constitute a good model for studying the potential impact of uraemic toxins on blood levels of calcineurin inhibitors, especially since these drugs are also cleared through non-renal pathways.

In this study we found that elevated plasma levels of IxS and PCS (both of these toxins bind strongly to albumin) were associated with a higher tacrolimus C₀:D ratio (98.8% of which is bound to albumin and alpha-1-acid glycoprotein *in vivo* [20]). These associations were independent of other factors that can modify immunosuppressant concentrations, such as the co-prescription of CYP3A4/5 or P-gp inducers or inhibitors, albuminaemia, liver disorders, sex, BMI and age for IxS. However, adjustment for age weakened the association with PCS. Indeed, IxS and PCS bind with high affinity to albumin, specifically with Sudlow site II [31], and might compete directly with other substrates for binding to albumin [31, 32]. Hence we hypothesize that IxS and PCS compete with tacrolimus and

lead to an increase in the C₀:D ratio. However, it is hard to say whether the putative effect of IxS and PCS on the C₀:D ratio is a specific effect or, in contrast, is indirectly linked to the deterioration in renal function. The mechanisms underlying uraemic toxin accumulation and the extent to which uraemic toxin accumulation may or not enhance the renal toxicity of tacrolimus require further study.

On the same lines, elevated plasma urea levels were independently associated with a higher tacrolimus C₀:D ratio; however, adjustment for age weakened this association. Indeed, it is well known that age-related physiological changes induce changes in drug distribution, metabolism and elimination [33]. Furthermore, a chronic increase in the urea level is significantly associated with a higher mean protein carbamylation in animals [15] and humans [14]. Although carbamylation is a post-translational modification of some proteins, urea-derived isocyanic acid can react non-enzymatically with proteins and this induces structural and functional modifications. A high degree of albumin carbamylation might decrease the protein's binding of some drugs [34].

In contrast to results obtained in patients treated with tacrolimus, we failed to find an association between IxS, PCS and urea levels and the cyclosporine C₀:D ratio. This lack of an association might be due to lower accumulation of uraemic toxins in patients treated with cyclosporine or to the fact that, unlike tacrolimus (which binds to albumin), cyclosporine binds strongly to high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein [20]. We also found that elevated TMAO levels were associated with an elevated cyclosporine C₀:D ratio. This association was no longer significant after adjustment for age, sex and BMI. TMAO is a small, water-soluble, gut-derived uraemic toxin produced by the oxidation of trimethylamine. Over the last decade, a growing body of pre-clinical and clinical evidence has identified TMAO as an important contributor to the pathogenesis of cardiovascular disease [35]. Indeed, elevated TMAO levels are associated with a greater incident risk of major cardiovascular adverse events [10, 36]. We are not aware of data linking TMAO to changes in drug pharmacokinetics/pharmacodynamics. However, pre-clinical data have shown an inverse association between TMAO and HDL, with a reduction in HDL-mediated reverse cholesterol transport as TMAO levels rise [37].

Maintaining levels of immunosuppressant within the therapeutic range is essential for preventing acute graft rejections while minimizing drug-related toxicity. In the present analysis, patients with a higher tacrolimus C₀:D ratio presented higher glycaemia, blood pressure (BP) and creatininaemia values, all of which are well-known adverse drug reactions associated with calcineurin inhibitors. Even though TDM and dose adjustment can maintain tacrolimus levels within the therapeutic window, it appears that the accumulation of uraemic toxins (PCS, IxS and urea) can increase exposure to tacrolimus. This finding has potential implications for other drugs that bind strongly to albumin, since a larger free fraction might lead to unexpected exposures, which can alter their efficacy and/or tolerance. This finding emphasizes the need for more research on how to decrease uraemic toxin levels.

In the present report we focused on two drugs with similar pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Both drugs have low bioavailability, bind strongly to plasma proteins, are mainly metabolized by cytochrome P450 3A4/5 and are mainly excreted in the bile [20]. The main difference relates to the type of plasma protein to which they bind: albumin for tacrolimus and lipoproteins for cyclosporine. We hypothesize that our present results can be explained (at least in part) by this difference in binding. Furthermore, we suggest that some uraemic toxins might modify the tacrolimus $C_0:D$ ratio by affecting its binding to albumin. Although protein binding is a major determinant of drug activity, the latter is influenced by many other factors. For example, uraemic toxins such as parathyroid hormone can induce the downregulation of cytochrome P450 or modify the activity of certain drug transporters [38, 39]. Machado *et al.* [21] recently suggested that IxS increases the expression and activity of the efflux transporter P-gp and that this effect depends on the aryl hydrocarbon receptor pathway. In addition, IxS and PCS are substrates of the membrane transporters OATs, which are expressed in the kidneys but also in other tissues, such as the liver and the small intestine. These transporters play a central role in the cell uptake and clearance of gut microbiota metabolites, including IxS and PCS [40]. Although tacrolimus does not appear to have an impact on the *in vitro* activity of OAT1 and OAT3 [41], an interaction between tacrolimus and the transporters involving uraemic toxins is not excluded and deserves further investigation. All of these factors may influence drug pharmacokinetics and blood concentration. Consequently it is very difficult to identify specific molecular mechanisms in patients.

Our study had some limitations. The cross-sectional design prevented us from evaluating possible changes over time in adverse drug reactions and outcomes related to concentrations of uraemic toxins and immunosuppressants. Even though we adjusted our multivariate analyses, it is possible that the association between uraemic toxins and the immunosuppressant concentration was due to other confounders. Likewise, we adjusted for potential drug interactions but cannot rule out potential interactions related to the patients' polypharmacy. Lastly, and as mentioned above, the large number of factors influencing drug pharmacokinetics means that it is difficult to prove the presence of an interaction between certain uraemic toxins and tacrolimus. However, this study also had strengths, such as its use of sensitive, validated assays of five uraemic toxins known to have harmful effects in kidney transplant recipients [25]. It is one of the first studies to have simultaneously evaluated blood uraemic toxin levels and drug concentrations in a clinical setting.

CONCLUSION

In a cross-sectional study of 403 kidney transplant recipients, we observed an association between plasma levels of certain uraemic toxins and the blood levels of two calcineurin inhibitors. In particular, we observed a relationship between elevated plasma PCS, IxS and urea levels and elevated blood tacrolimus $C_0:D$ ratios, suggesting a potential interaction through binding sites on albumin. The potential clinical impact of this

relationship must now be evaluated prospectively for tacrolimus and other drugs that bind strongly to albumin.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [ndt](https://ndt.oxfordjournals.org/) online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr David Fraser (Biotech Communication SARL, Ploudalmézeau, France) for copy-editing assistance.

FUNDING

The uraemic toxin assays were funded by a grant from Santhély (Loos, France).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

C.A., Y.B., S.K., A.L.H., K.M. S.B. and S.L. have nothing to declare. G.C. received fees for advisory board participation from Amgen, Vifor, Astellas and Takeda and grants for clinical research, none related to this work. Results presented in this article have not been published previously in whole or part, except in abstract format.

REFERENCES

1. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020; 395: 709–733
2. Liabeuf S, Laville M. Drug prescription in patients with chronic kidney disease: a true challenge. *Nephrol Dial Transplant* 2020; 36: 385–386
3. Laville SM, Metzger M, Stengel B *et al.* Evaluation of the adequacy of drug prescriptions in patients with chronic kidney disease: results from the CKD-REIN cohort. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84: 2811–2823.
4. Hayward S, Hole B, Denholm R *et al.* International prescribing patterns and polypharmacy in older people with advanced chronic kidney disease: results from the European Quality study. *Nephrol Dial Transplant* 36: 503–511
5. Marienne J, Laville SM, Caillard P *et al.* Evaluation of changes over time in the drug burden and medication regimen complexity in ESRD patients before and after renal transplantation. *Kidney Int Rep* 2020; 6: 128–137
6. Naud J, Nolin TD, Leblond FA *et al.* Current understanding of drug disposition in kidney disease. *J Clin Pharmacol* 2012; 52(1 Suppl): 10S–22S
7. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S *et al.* Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1551–1558
8. Gross P, Massy ZA, Henaut L *et al.* Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J Cell Physiol* 2015; 230: 2927–2935
9. Zhu W, Gregory JC, Org E *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 2016; 165: 111–124
10. Tomlinson JAP, Wheeler DC. The role of trimethylamine N-oxide as a mediator of cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; 92: 809–815
11. Dou L, Sallée M, Cerini C *et al.* The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 876–887
12. Fujii H, Nakai K, Fukagawa M. Role of oxidative stress and indoxyl sulfate in progression of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial* 2011; 15: 125–128
13. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S *et al.* Effects of uremic toxins on vascular and bone remodeling. *Semin Dial* 2009; 22: 433–437
14. Berg AH, Drechsler C, Wenger J *et al.* Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci Transl Med* 2013; 5: 175ra29

15. Pietrement C, Gorisse L, Jaisson S *et al.* Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. *PLoS One* 2013; 8: e82506
16. Faucher Q, Alarcan H, Marquet P *et al.* Effects of ischemia-reperfusion on tubular cell membrane transporters and consequences in kidney transplantation. *J Clin Med* 2020; 9: 2610
17. Mihaila SM, Faria J, Stefens MFJ *et al.* Drugs commonly applied to kidney patients may compromise renal tubular uremic toxins excretion. *Toxins* 2020; 12: 391
18. Prokopenko AJ, Nolin TD. Microbiota-derived uremic retention solutes: perpetrators of altered nonrenal drug clearance in kidney disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018; 11: 71–82
19. Sato T, Yamaguchi H, Kogawa T *et al.* Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver. *J Pharm Pharm Sci* 2014; 17: 475–484
20. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T *et al.* Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 404–430
21. Machado TS, Poitevin S, Paul P *et al.* Indoxyl sulfate upregulates liver P-glycoprotein expression and activity through aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29: 906–918
22. von Elm E, Altman DG, Egger M *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 2008; 61: 344–349
23. Kilbride HS, Stevens PE, Eaglestone G *et al.* Accuracy of the MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) study and CKD-EPI (CKD Epidemiology Collaboration) equations for estimation of GFR in the elderly. *Am J Kidney Dis* 2013; 61: 57–66
24. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 2013; 158: 825–830
25. André C, Bennis Y, Titeca-Beauport D *et al.* Two rapid, accurate liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the quantification of seven uremic toxins: an application for describing their accumulation kinetic profile in a context of acute kidney injury. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2020; 1152: 122234
26. Boelaert J, Lynen F, Glorieux G *et al.* A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 1937–1947
27. Liabeuf S, Desjardins L, Massy ZA *et al.* Levels of indoxyl sulfate in kidney transplant patients, and the relationship with hard outcomes. *Circ J* 2016; 80: 722–730
28. Huang ST, Shu KH, Cheng CH *et al.* Serum total p-cresol and indoxyl sulfate correlated with stage of chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012; 44: 621–624
29. Liabeuf S, Neiryck N, Drüeke TB *et al.* Clinical studies and chronic kidney disease: what did we learn recently? *Semin Nephrol* 2014; 34: 164–179
30. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins (Basel)* 2011; 3: 911–919
31. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y *et al.* Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos* 2012; 40: 1423–1428
32. Takamura N, Maruyama T, Otagiri M. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin Chem* 1997; 43: 2274–2280
33. Mangoni AA, Jackson SHD. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 6–14
34. Erill S, Calvo R, Carlos R. Plasma protein carbamylation and decreased acidic drug protein binding in uremia. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 27: 612–618
35. Subramaniam S, Fletcher C. Trimethylamine N-oxide: breathe new life. *Br J Pharmacol* 2018; 175: 1344–1353
36. Kim RB, Morse BL, Djurdjev O *et al.* Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int* 2016; 89: 1144–1152.
37. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472: 57–63
38. Michaud J, Naud J, Chouinard J *et al.* Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3041–3048
39. Naud J, Michaud J, Beauchemin S *et al.* Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 1363–1369
40. Nigam SK, Wu W, Bush KT *et al.* Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10: 2039–2049
41. El-Sheikh AAK, Greupink R, Wortelboer HM *et al.* Interaction of immunosuppressive drugs with human organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3, and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 and MRP4. *Transl Res* 2013; 162: 398–409

Received: 22.2.2021; Editorial decision: 27.3.2021

Potential interactions between uremic toxins and drugs: an application in kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors

Authors: Camille André ^{1,2}, Gabriel Choukroun^{1,3}, Youssef Bennis^{1,2}, Said Kamel^{1,4}, Sandra Bodeau^{1,2}, Sophie Liabeuf^{1,2}

Authors' institutions:

¹ MP3CV Laboratory, EA7517, Jules Verne University of Picardie, Amiens, F-80000 Amiens, France

² Department of Clinical Pharmacology, Amiens University Medical Center, F-80000 Amiens, France

³ Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, Amiens University Medical Center, F-80000 Amiens, France

⁴ Department of Biochemistry, Amiens University Medical Center, F-80000 Amiens, France

Running title: Uremic toxins and immunosuppressant therapy

Corresponding author:

Sophie Liabeuf, PharmD, PhD

Pharmacology Department

Amiens University Medical Center

F-80054 Amiens

France

Phone: + 33-322-087-995

E-mail: liabeuf.sophie@chu-amiens.fr

Keywords: uremic toxins, tacrolimus, cyclosporine, kidney transplantation

ABSTRACT

Background: In addition to affecting glomerular filtration rate, chronic kidney disease (CKD) changes the absorption, distribution and nonrenal clearance of a number of drugs. The uremic toxins that accumulate with as renal function deteriorates can potentially affect drug pharmacokinetics. Given the requirement for therapeutic drug monitoring (TDM) with most immunosuppressants, the latter are good models for understanding the potential impact of uremic toxins on blood concentrations of drugs. We focused on two calcineurin inhibitors (tacrolimus and cyclosporine) with similar pharmacological properties: low but variable oral bioavailability, strong binding to plasma proteins (albumin for tacrolimus and lipoproteins for cyclosporine), metabolism by cytochrome P450 3A4/5, and excretion in the bile. Our starting hypothesis was that uremic toxins influence the exposure of immunosuppressants. The study's objective was to determine whether plasma concentrations of certain uremic toxins were correlated with blood concentrations of the two immunosuppressants.

Methods: DRUGTOX was a cross-sectional study of 403 adult patients followed up after kidney transplantation at Amiens University Medical Center (Amiens, France) and who had undergone TDM of calcineurin inhibitors between August 4th, 2019, and March 11th, 2020. The patients had been treated daily with oral tacrolimus or cyclosporine. Two groups were constituted: 203 patients with low uremic toxin levels (estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to the Modification of Diet in Renal Disease equation >40 mL/min/1.73m²) and 200 patients with high uremic toxin levels (eGFR <40 mL/min/1.73m²). For each patient, immunosuppressant trough concentrations (C_0) were measured in whole-blood samples and then normalized against the total daily dose: C_0/D ratio. After centrifugation, the sample was assayed for five uremic toxins (urea, trimethylamine N-oxide (TMAO), indole acetic acid (IAA), para-cresylsulfate (PCS), and indoxylsulfate (IxS)) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Univariate and multivariate logistic regressions were used to evaluate the associations between plasma uremic toxin levels and the blood tacrolimus or cyclosporine C_0/D ratio.

Results: The median [interquartile range] age was 56 [48-66] and the median eGFR was 41 [30-57] ml/min/1.73 m². The majority of the patients (56.5%) were at CKD stage 3. A total of 248 (61.5%) patients were being treated with tacrolimus and 155 (38.5%) were being treated with cyclosporine. The median time between transplantation and study inclusion was 6.5 years. Plasma urea, TMAO, IAA, PCS and IxS levels rose progressively with the CKD stage. In a univariate logistic analysis, age, sex, BMI, urea, IxS and PCS were significantly associated with an increment in the tacrolimus C_0/D ratio. A multivariate analysis revealed an independent association with IxS (odds ratio [95% confidence interval]: 1.36 [1.00; 1.85], after adjustment for sex, age and BMI, whereas adjustment for age weakened the association for PCS (OR: 1.22 (0.99; 1.55)) and urea (OR: 1.71 (0.93; 3.16)). In a univariate logistic analysis, age, sex, BMI, and the TMAO level (but neither PCS, IxS, IAA nor urea) were significantly associated with an increment in the cyclosporine C_0/D ratio.

Conclusion: Even though TDM and dose adaptation of immunosuppressants keeps levels within the therapeutic window, elevated exposure to tacrolimus (but not cyclosporine) is associated with an accumulation of PCS, IxS and urea. This might be explained by an interaction between tacrolimus and highly albumin-bound uremic toxins. Our findings may have implications for other drugs that bind with high affinity to albumin (since an elevated free fraction might lead to unexpected exposures, which can alter their efficacy and/or tolerance).

Annexe III : traitements pris de manière concomitante au tacrolimus et susceptibles d'interagir avec ses paramètres pharmacocinétiques (n = 248)

	Tous les patients (n=248)	R < 123,70 (n=124)	R > 123,70 (n=124)	valeur de p
<i>Traitements concomitants à la prise de tacrolimus</i>				
Au moins un inhibiteur fort du CYP3A4/5	6 (2,42%)	3 (2,42%)	3 (2,42%)	1,0000
Au moins un inhibiteur faible CYP3A4/5	3 (1,21%)	2 (1,61%)	1 (0,81%)	1,0000
Au moins un inducteur fort CYP3A4/5	5 (2,02%)	3 (2,42%)	2 (1,61%)	1,0000
Au moins un inducteur faible CYP3A4/5	2 (0,81%)	2 (1,61%)	0 (0,00%)	0,4980
Au moins un inhibiteur de la P-gp	49 (19,76%)	20 (16,13%)	29 (23,39%)	0,2020
Au moins un inducteur de la P-gp	4 (1,61%)	3 (2,42%)	1 (0,81%)	0,6219
Au moins un médicament se lie fortement aux protéines plasmatiques	243 (97,98%)	121 (97,58%)	122 (98,39%)	1,0000

CYP3A4/5 : cytochrome P450 3A4/5 ; P-gp : glycoprotéine-P

Annexe IV : traitements pris de manière concomitante avec la ciclosporine et susceptibles d'interagir avec ses paramètres pharmacocinétique (n = 155)

	Tous les patients (n=155)	R < 52,89 (n=78)	R > 52,89 (n=77)	valeur de p
<u>Traitements concomitants à la prise de ciclosporine</u>				
Au moins un inhibiteur fort du CYP3A4/5	7 (4,52)	2 (2,56)	5 (6,49)	0,2762
Au moins un inhibiteur faible CYP3A4/5	2 (1,29)	1 (1,28)	1 (1,30)	1,0000
Au moins un inducteur fort CYP3A4/5	1 (0,65)	1 (1,28)	0 (0,00)	1,0000
Au moins un inducteur faible CYP3A4/5	1 (0,65)	0 (0,00)	1 (1,30)	0,4968
Au moins un inhibiteur de la P-gp	37 (23,87)	17 (21,79)	20 (25,97)	0,6732
Au moins un inducteur de la P-gp	1 (0,65)	1 (1,28)	0 (0,00)	1,0000
Au moins un médicament se lie fortement aux protéines plasmatiques	155 (100,00)	78 (100,00)	77 (100,00)	NA

CYP3A4/5 : cytochrome P450 3A4/5 ; P-gp : glycoprotéine-P



Faculté de pharmacie



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté,

je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité.

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

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession.

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens.

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Étude des interactions entre les toxines urémiques et les médicaments inhibiteurs de la calcineurine dans une cohorte de patients transplantés rénaux

Thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie

Université de Picardie-Jules Verne

par Camille ANDRÉ

Présentée et soutenue publiquement le 07 avril 2022

Mots clefs : toxines urémiques, tacrolimus, ciclosporine, transplantation rénale, interactions pharmacocinétiques

Résumé

Contexte : En plus d'affecter le débit de filtration glomérulaire, la maladie rénale chronique modifie l'absorption, la distribution et la clairance non-rénale de nombreux médicaments. Les toxines urémiques (TU), qui s'accumulent avec la détérioration de la fonction rénale, peuvent potentiellement affecter les paramètres pharmacocinétiques des médicaments. Les immunosuppresseurs de la classe des inhibiteurs de la calcineurine (ICN), tacrolimus et ciclosporine, sont un bon modèle pour comprendre le potentiel impact des TU sur les concentrations sanguines en médicaments, de par leur élimination hépatique indépendante de la fonction rénale, et grâce au suivi thérapeutique et pharmacologique (STP) appliqué aux immunosuppresseurs. Notre hypothèse est la suivante : les TU influent sur la pharmacocinétique des ICN chez les patients transplantés rénaux. L'objectif de cette étude est donc de déterminer si les concentrations plasmatiques en TU sont corrélées à l'exposition sanguine en ICN.

Matériels et méthodes : Une étude transversale de 403 patients suivis au CHU d'Amiens-Picardie pour le STP de leur traitement par ICN, a été constituée. Pour chaque patient, la concentration résiduelle en ICN (C_{min}) a été mesurée dans le sang total et rapportée à la posologie journalière en mg/kg/J (D), permettant de calculer le ratio C_{min}/D , reflétant l'exposition sanguine en ICN. Sur le même échantillon, la concentration plasmatique de 5 TU a été dosée par méthode enzymatique ou par chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem : l'urée, le triméthylamine N-oxide (TMAO), l'acide indole-acétique (IAA), le p-crésyl sulfate (pCS) et l'indoxyl sulfate (IxS).

Résultats : Les concentrations plasmatiques en TU augmentent progressivement au fur et à mesure de la dégradation de la fonction rénale. L'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC), l'urée, l'IxS et le pCS sont significativement associés à l'augmentation du ratio C_{min}/D de tacrolimus. L'analyse multivariée montre une association indépendante du ratio C_{min}/D avec l'IxS (odd ratio 1 ;36 [intervalle de confiance à 95% : 1,00 ; 1,85]) après ajustement sur l'âge, le sexe et l'IMC. L'association n'est plus significative pour la ciclosporine.

Conclusion : L'augmentation de l'exposition sanguine du tacrolimus est associée significativement à l'accumulation d'IxS, de pCS et d'urée et ce, malgré la mise en place du STP, nécessaire pour garder les concentrations de tacrolimus dans la zone thérapeutique.

Président du Jury : Saïd KAMEL, Professeur des Universités -Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Directeur de thèse : Sophie LIABEUF, Professeur des Université - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Sandra BODEAU Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Membres du jury : Pauline CAILLARD, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens
Thomas DUFLOT, Assistant-Hospitalo-Universitaire, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen