

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Edouard LE CARPENTIER

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 15 octobre 2021

Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique du midazolam chez les patients COVID19 en réanimation.
--

Présidente : Madame le Professeur Sonia PROT-LABARTHE

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Matthieu GRÉGOIRE

Membres du jury : Monsieur le Professeur Éric DAILLY
Monsieur le Professeur Emmanuel CANET

Remerciements :

À Madame le Professeur Sonia PROT-LABARTHE, de me faire l'honneur de présider ce jury et juger mon travail.

À Monsieur le Docteur Matthieu GRÉGOIRE, de m'avoir confié ce projet devenu ma thèse. Merci d'avoir encadré et fait confiance au grand stressé que je suis pour ce travail ambitieux. Merci pour ta bienveillance et tes conseils, tous domaines confondus.

À Monsieur le Professeur Éric DAILLY, de me faire l'honneur de juger mon travail. Merci pour votre encadrement et vos enseignements.

À Monsieur le Professeur Emmanuel CANET, d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci d'avoir participé à ce travail.

À Antoine, Erwan, Guillaume et Ronan pour votre soutien moral et/ou technique sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir.

À tous les co-internes pour ces parties de babyfoot endiablés et ces verres en terrasse qui sont toujours de bons moments de franche camaraderie.

À Morgan, Narindra, Adrien, Remi, Grégoire et Julien pour cette amitié que nous conservons malgré la distance et les années.

À Sarah, Arthur, Emmanuel et Martin, mes co-internes de promo, arrivés en même temps que moi et devenu des amis.

À tous mes amis de la Pharmateam, pour ces années de fac, ces bons moments et ces week-ends de bonne ambiance. C'est vous les meilleurs Michels. Merci à Amanda, Maxime et Yoann pour les Tomorrowlands et PYV pour ton amitié et le curling.

À ma famille pour votre soutien et votre présence.

À mes parents pour votre soutien inconditionnel, votre amour et votre générosité. Vous pouvez enfin vous reposer et prendre une retraite bien méritée.

À Alison, pour ton amour, ta patience et toutes tes qualités, qui te permettent de me soutenir et me supporter. Sans toi la vie ne saurait pas si douce, colorée et amusante. Je t'aime ma puce.

Table des matières

Liste des figures :	6
Liste des tableaux :	7
Liste des abréviations :	8
Introduction	9
I. Découverte des benzodiazépines :	9
II. Généralités sur les benzodiazépines :	11
1. Composition	11
2. Mécanisme d'action	11
3. Activités et classification	13
4. Relation structure activité :	13
III. Le Midazolam	15
1. Indications :	15
2. Pharmacocinétique :	15
a. Administration :	15
b. Distribution :	16
c. Biotransformation & Elimination :	16
IV. Impact clinique de l'inflammation sur les cytochromes :	17
1. Les neuroleptiques et médicaments du système nerveux central :	18
2. Les immunosuppresseurs :	18
3. Les antifongiques :	18
4. Autres médicaments :	18
V. Les mécanismes impactant la pharmacocinétique au cours de l'inflammation :	19
1. Régulation transcriptionnelle des cytochromes :	19
2. Dégradation dépendante du NO des cytochromes :	20
3. Modifications épigénétiques des gènes des DMETs :	21
VI. Les principaux marqueurs protéiques de l'inflammation aiguë :	21
1. La CRP :	21
2. L'orosomucoïde :	21
3. L'haptoglobine :	22
4. Le fibrinogène :	22
VII. La maladie COVID-19 et les coronavirus :	22
VIII. Objectifs de l'article :	23
Article Scientifique	24

Discussion :	41
Conclusion :	43
Références :	44

Liste des figures :

Figure 1: Leo Sternbach inventeur du chlordiazépoxyde (main droite) et du diazépam (main gauche), posant fièrement devant les laboratoires Hoffman-La Roche en 1976 à Nutley, New Jersey (3).	10
Figure 2: Structure commune des benzodiazépines	11
Figure 3: Mécanisme d'action des benzodiazépines.	12
Figure 4: Relation structure-activité–pharmacocinétique des benzodiazépines	14
Figure 5: Structure chimique du midazolam	15
Figure 6: Métabolisme hépatocellulaire du midazolam (19)	17
Figure 7: Activité métabolique des CYP3A en fonction des niveaux de CRP.	42
Figure 8: Schéma récapitulatif des mécanismes inflammatoires impactant la pharmacocinétique du midazolam.....	43

Liste des tableaux :

Tableau 1: Classification des benzodiazépines en fonction de la durée d'action (tenant compte de la demi-vie de la molécule mère et de ses métabolites actifs)..... 13

Liste des abréviations :

Ahr	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
ARNm	acides ribonucléiques messagers
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
C/D	concentration / dose
CHU	centre hospitalier universitaire
Cl-	chlore
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CRP	protéine C réactive
CYP	cytochrome P450
DMETs	<i>drug metabolim enzymes and transporters</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
IFN- γ	<i>interferon-γ</i>
IL-1	<i>interleukine-1</i>
IL-1 β	<i>interleukine-1β</i>
IL-6	<i>interleukine-6</i>
iNOS	<i>nitric oxide synthase inductible</i>
LPS	lipopolysaccharide
miRNAs	<i>micro-ribonucleic acids</i>
NO	oxyde nitrique
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
RASS	Richmond Agitation-Sedation Scale
SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SARS-CoV-2	SARS-coronavirus 2
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aiguë
SXR	<i>steroid and xenobiotic receptor</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>

Introduction

I. Découverte des benzodiazépines :

En 1931 Leo Henryck Sternbach (**Figure 1**), pharmacien austro-hongrois et docteur en chimie organique, commence sa carrière à Cracovie en menant des recherches sur des composés tricycliques aux propriétés colorantes. En 1937, il devient l'assistant du futur prix Nobel, Leopold Ruzicka, à Vienne puis assistant de recherche en 1940 pour les laboratoires Hoffman-La Roche à Bâle. Devant le risque d'une invasion allemande, la firme pharmaceutique évacue l'ensemble de son personnel juif vers les Etats-Unis en 1941. Leo Sternbach s'installe donc dans le New-Jersey où se situent les laboratoires états-uniens de son employeur. En 1954, il reprend ses travaux débutés à Cracovie, mais en parallèle il tente, en vain, de dupliquer un nouvel anxiolytique afin de concurrencer celui mis au point par les laboratoires Wallace : le Miltown (méprobamate). Ces recherches débouchent sur la synthèse du Ro 5-0690 qui sera considéré dans un premier temps comme une impasse thérapeutique. La firme pharmaceutique lui ordonne ensuite de délaissé ses travaux en cours et lui donne congé. Il laisse donc son laboratoire et le désordre qui y règnera, intact pendant très longtemps. Mais 18 mois plus tard, sous l'obligation de la direction, il revient avec son équipe de recherche dans son ancien laboratoire afin d'y ranger le désordre abandonné. Un de ses collègues, Earl Reeder, remarque ainsi le composé cristallin oublié depuis 18 mois, le fameux Ro-5-0690. Sternbach, qui ne voulait pas abandonner ses chances de trouver un meilleur « tranquillisant », soumet alors le composé à une expérimentation animale qui montrera les propriétés myorelaxantes du produit. Le 15 mai 1958, Sternbach dépose un brevet pour ce composé, qui prendra ensuite le nom de chlordiazépoxyde, faisant de cette molécule la première benzodiazépine synthétisée (1,2).

Par la suite de nombreuses découvertes seront faites sur les benzodiazépines :

- Diazépam synthétisé en 1959 par Sternbach
- Oxazépam synthétisé en 1961 par Bell
- Lorazépam synthétisé en 1971
- Récepteur des benzodiazépines supposé en 1971
- Midazolam synthétisé en 1976 par Fryer et Walser
- Flumazénil identifié en 1981

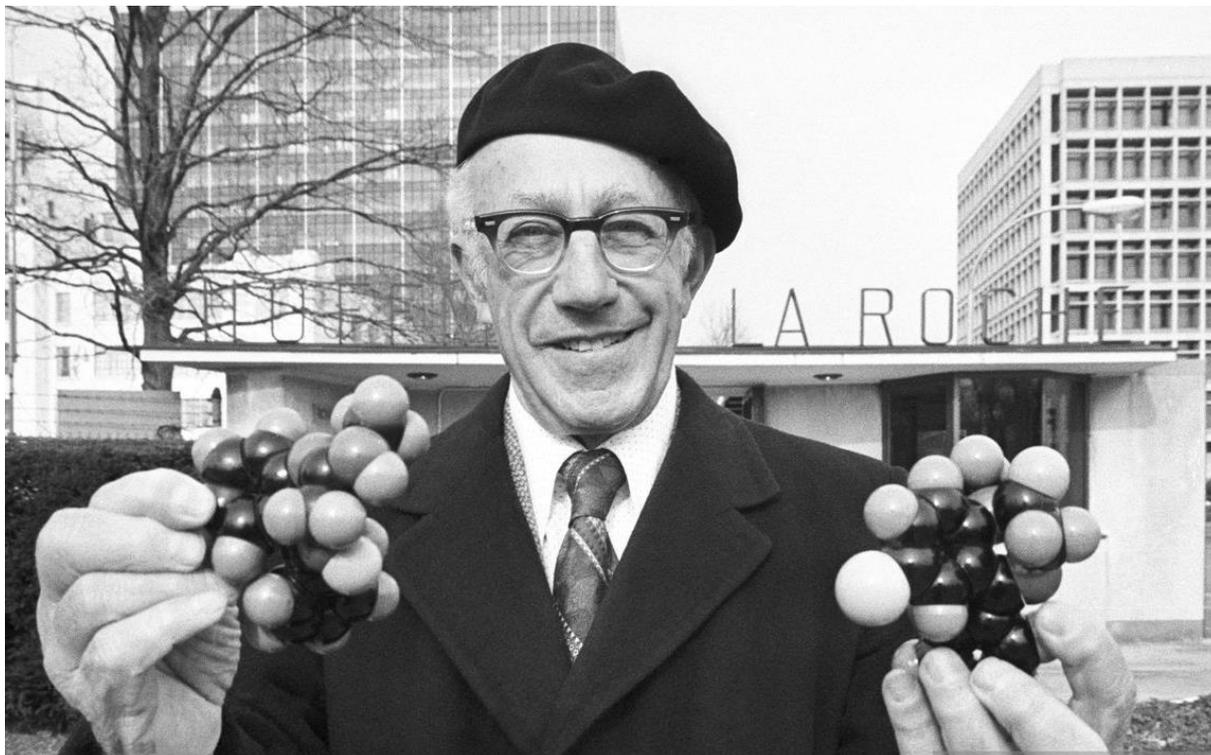


Figure 1: Leo Sternbach inventeur du chlordiazépoxyde (main droite) et du diazépam (main gauche), posant fièrement devant les laboratoires Hoffman-La Roche en 1976 à Nutley, New Jersey (3).

II. Généralités sur les benzodiazépines :

1. Composition

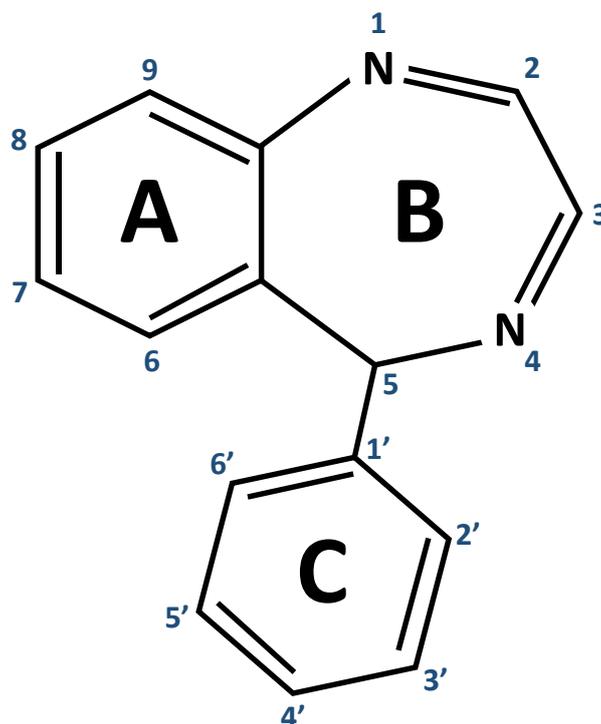


Figure 2: Structure commune des benzodiazépines

Toutes les benzodiazépines sont composées d'un cycle benzène (A) fusionné à un hétérocycle (B) à 7 atomes dont 2 atomes d'azote (diazépine), et un deuxième noyau benzène en position 5(C) (Figure 2) (4).

2. Mécanisme d'action

Les benzodiazépines agissent par potentialisation de l'inhibition neuronale médiée par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les récepteurs du GABA sont des protéines liées à la membrane plasmique des cellules cibles. Il en existe 2 sous-types : les récepteurs GABA_A et GABA_B.

Les récepteurs GABA_A sont des canaux ioniques (récepteurs ionotropes) pentamériques, majoritairement post-synaptiques, retrouvés sur la membrane des neurones (5) impliqués, entre autres, dans la mémoire, la conscience et l'apprentissage (6). Les récepteurs GABA_B sont des récepteurs métabotropes pré et post-synaptiques. Ce sont des hétérodimères, avec une sous-unité GABA_{B1} qui comporte uniquement le site de liaison du GABA et GABA_{B2} qui est nécessaire à l'activation des protéines G_o ou G_i associées au fonctionnement d'un canal cationique (7). Ces récepteurs exercent tous les deux une action inhibitrice sur la neurotransmission (8).

Les benzodiazépines agissent en se liant spécifiquement sur un site différent de celui du GABA sur les récepteurs GABA_A. Ce groupe de molécules n'interagit pas avec les récepteurs GABA_B. L'action des benzodiazépines est indirecte. Elles n'exercent leur effet pharmacologique qu'en présence de GABA et potentialisent l'action de ce dernier (modulation allostérique). Elles augmentent la fréquence d'ouverture des canaux chlore (Cl⁻), laissant ainsi entrer ces ions, ce qui entrainera une hyperpolarisation de la membrane à l'origine de l'inhibition de la neurotransmission (**Figure 3**).

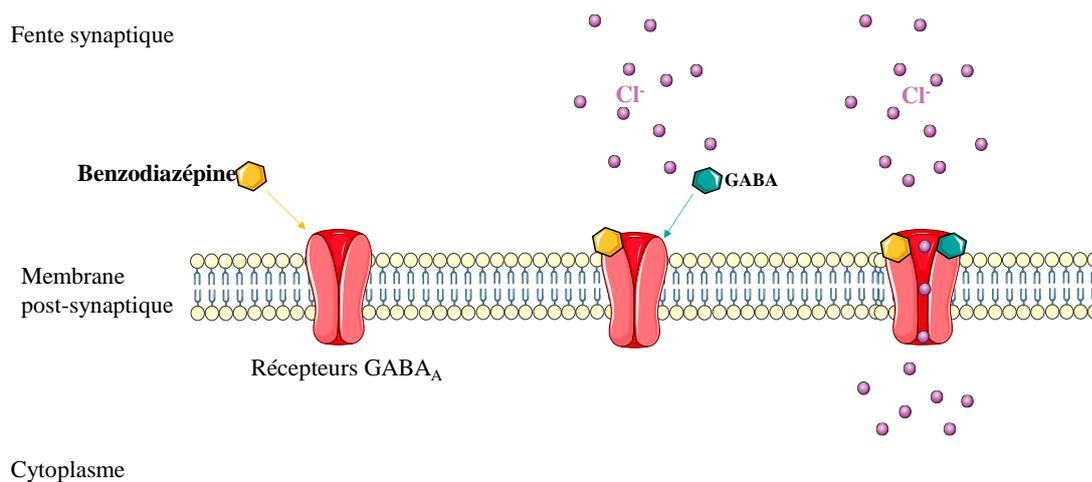


Figure 3: Mécanisme d'action des benzodiazépines.

Les benzodiazépines se fixent sur leur site d'action des récepteurs GABA_A et module l'activité du GABA lorsque celui-ci se fixe sur son site, favorisant ainsi l'entrée des ions Cl⁻.

Les récepteurs GABA_A sont constitués de sous-unités qui auront une influence en termes d'affinité et de propriété. Il existe 6 types de sous-unités α , 3 types de sous-unités β , 3 types de sous-unités γ et des sous-unités δ , ϵ , π , et θ . De nombreuses combinaisons pentamériques sont ainsi possible mais il faut au minimum les sous-unités α et β pour former des canaux ioniques.

Il a été démontré que les propriétés sédatives, amnésiantes et anticonvulsivantes étaient médiées par la sous-unité α_1 (9,10), alors que la sous-unité α_2 intervient plutôt dans les propriétés myorelaxantes et anxiolytiques (11,12). Les sous-unités déterminent aussi la localisation du récepteur. Ainsi, certaines sous unités sont retrouvées de façon ubiquitaire dans le système nerveux central, alors que d'autres sont spécifiques d'une zone (5).

Les combinaisons de récepteurs GABA_A les plus communément retrouvées dans le système nerveux central comportent 2 sous-unités α , 2 sous-unités β et une sous-unité γ ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$ et $\alpha_2\beta_2\gamma_2$).

3. Activités et classification

Les benzodiazépines ont en commun des propriétés anxiolytiques, hypnotiques, sédatives, myorelaxantes, amnésiantes et anticonvulsivantes.

Pour distinguer ces molécules, nous avons fait le choix de les classer en fonction de leur durée d'action (**Tableau 1**). La durée d'action est ici déterminée par la demi-vie de la molécule et de ses métabolites actifs.

Tableau 1: Classification des benzodiazépines en fonction de la durée d'action (tenant compte de la demi-vie de la molécule mère et de ses métabolites actifs).

Classification des benzodiazépines disponibles en France			
Durée d'action longue (demi-vie > 48h)	Durée d'action intermédiaire (demi-vie]24 - 48h])	Durée d'action courte (demi-vie [8 - 24h])	Durée d'action très courte (demi-vie < 8h)
Chlordiazépoxyde	Alprazolam	Loprazolam	Clotiazépam
Clobazam	Bromazepam	Lorazépam	Midazolam
Clonazépam	Estazolam	Lormétazépam	
Clorazépate	Nitrazépam	Oxazépam	
Diazépam			
Loflazépate d'éthyle			
Nordazépam			
Prazépam			

4. Relation structure activité :

Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacologiques de chaque benzodiazépine dépendent en grande partie de sa structure chimique (**Figure 4**).

Pour rappel, la numérotation des atomes part de l'atome d'azote adjacent au noyau aromatique et se déroule d'abord par le cycle à 7 atomes puis sur le noyau aromatique accolé (**Figure 2**). Il est à noter que le noyau phényle en 5 est toujours présent, et que lorsqu'il est substitué, il l'est toujours sur la position ortho (2').

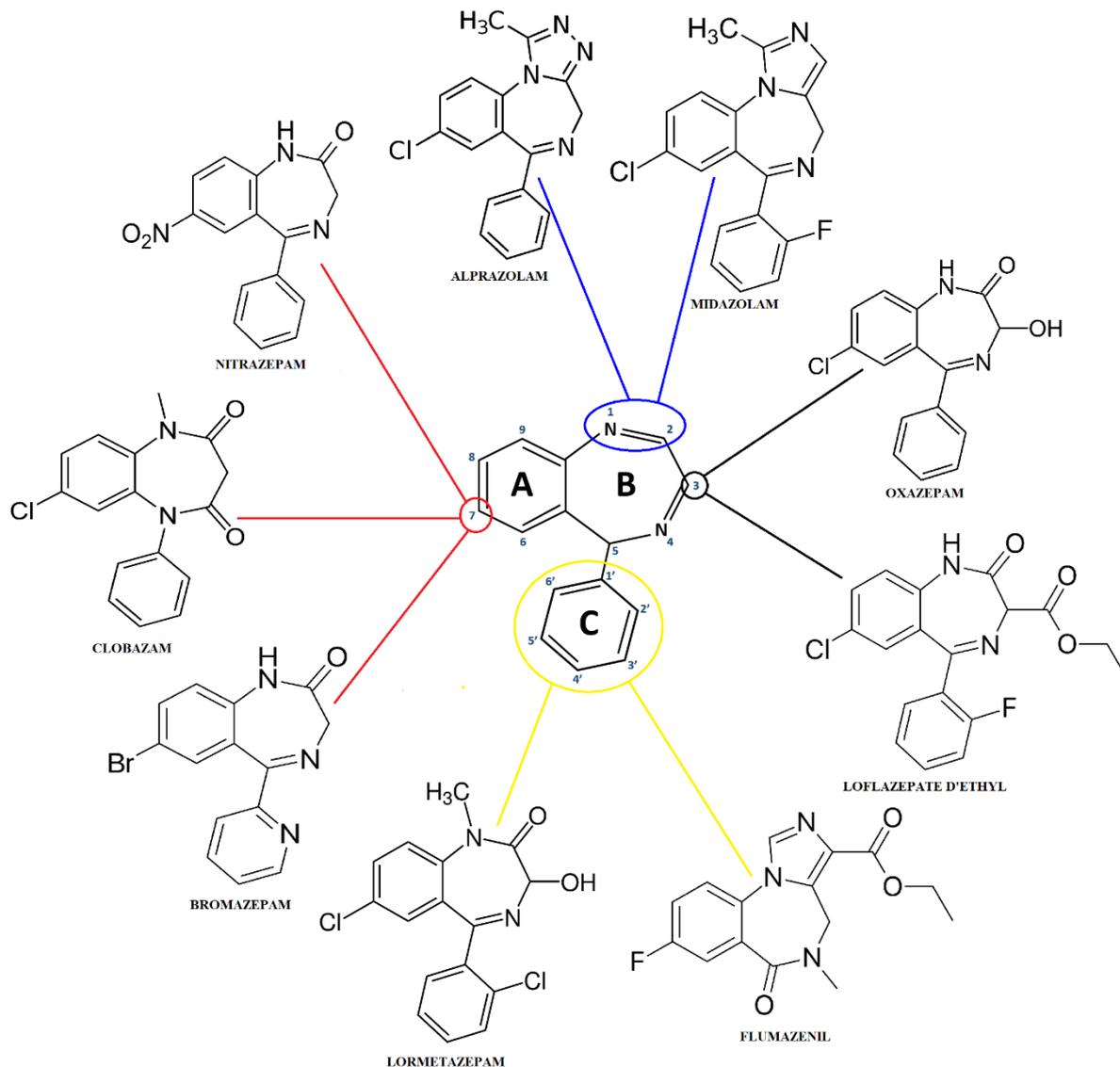


Figure 4: Relation structure-activité-pharmacocinétique des benzodiazépines

Les traits rouges représentent les substitutions en position 7, les traits noirs représentent les substitutions en position 3, les jaunes représentent les substitutions en 5 ou 2' du noyau benzène, et les traits bleus représentent les substitutions en 1 et 2 et concernent uniquement les benzodiazépines de nouvelles générations.

L'activité pharmacodynamique des benzodiazépines dépend de la substitution sur le cycle benzénique en 7, position la plus favorable à l'affinité sur son récepteur. Plus le substituant est électronégatif et plus la molécule sera active :



La substitution en position 7 (Figure 4) par un groupement nitrosé favorisera une plus grande activité (*nitrazepam*) qu'une substitution par un halogène (Br, Cl, F) (*clobazam*, *bromazepam*).

La substitution d'un groupement électronégatif (groupement hydroxyle OH) en position 3 augmentera la polarité et favorisera donc l'élimination par glucuroconjugaison (**Figure 4**). Par exemple, l'*oxazepam* possède une demi-vie courte (8 heures). La substitution par un

groupement carboxylique (COOH) sur cette même position 3 entraînera la création de prodrogue qui nécessitera une activation préalable pour donner le métabolite actif (**Figure 4**). A titre d'exemple, le *loflazépate d'éthyl*, est un ester rapidement hydrolysé par les estérases plasmatiques en métabolite actif.

Par ailleurs, le cycle benzène en 5 est un groupement actif (**Figure 4**), sa suppression induit une perte totale d'activité tout en maintenant l'affinité pour le récepteur (*flumazénil*). Ce groupement participe également à la lipophilie de la molécule et sa substitution par un halogène en ortho entraîne une augmentation de l'activité (*lormétazépam*).

L'addition d'un cycle supplémentaire entre l'atome d'azote en 1 et l'atome en 2 est à la base de l'apparition des benzodiazépines de dernière génération (**Figure 4**) telles que les triazolo-benzodiazépines (*alprazolam*) et les imidazo-benzodiazépines (*midazolam*).

Ce travail de thèse s'est focalisé spécifiquement sur le midazolam.

III. Le Midazolam

Le midazolam (**Figure 5**) appartient aux imidazo-benzodiazépines, des molécules de dernière génération (13).

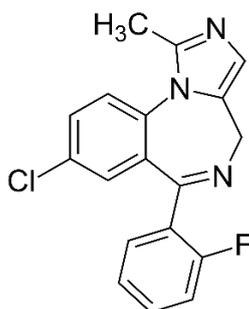


Figure 5: Structure chimique du midazolam

1. Indications :

Les propriétés hypnotique et sédative à action rapide du midazolam, lui permettent d'être indiqué chez l'adulte et l'enfant pour, la sédation vigile, l'anesthésie, ou encore la sédation en unité de soins intensifs.

2. Pharmacocinétique :

a. Administration :

Après administration le midazolam est rapidement absorbé, la concentration maximale plasmatique est atteinte en 30 minutes (14,15).

Le midazolam est utilisé en IV pour la sédation des patients en unités de soins intensifs. Au CHU de Nantes lors de la mise en place d'une ventilation mécanique, une dose de charge de 5 mg est administrée, puis une perfusion continue pour maintenir la sédation est instaurée à une dose de 0,15 mg / kg / h.

L'état de la sédation est évalué par le score Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS) qui va de - 5 (aréactif) à + 4 (agité, combatif), ce score doit être < + 1. Le score cible à atteindre varie selon les objectifs thérapeutiques. Si le score est égal à l'objectif on maintient le débit hypnotique, s'il est inférieur on réduit le débit de 2,5 mg/h et s'il est supérieure on administre un nouveau bolus et augmente le débit de 2,5 mg/h. Le score est par la suite évalué toutes les 4 heures

b. Distribution :

Le midazolam est lipophile et fortement distribué. Le volume de distribution à l'état d'équilibre est de 0,7 à 1,2 L/kg après administration par voie intraveineuse (16).

C'est une molécule fortement liée aux protéines plasmatiques (95-98%) (4). Son passage dans le liquide céphalorachidien est lent et négligeable, de plus de faibles quantités peuvent être retrouvées dans le lait maternel.

c. Biotransformation & Elimination :

Le midazolam est métabolisé par hydroxylation par les isoenzymes 3A4 et 3A5 des cytochromes P450 (CYP), ses deux métabolites principaux sont l' α -hydroxymidazolam et le 4-hydroxymidazolam, qui sont tous les deux pharmacologiquement actifs (17) (**Figure 6**).

L' α -hydroxymidazolam est au moins aussi actif que le midazolam et pourrait contribuer à l'effet de la molécule mère s'il se trouvait à des concentrations suffisamment élevées. On considère que ce métabolite représente 10% de l'effet clinique après administration intraveineuse. Le 4 hydroxymidazolam est lui quantitativement négligeable (18).

Ces deux métabolites sont par la suite rapidement conjugués par l'acide glucuronique pour les transformer en produit pharmacologiquement inactifs (19). Il semblerait que le midazolam possède aussi un métabolisme extra-hépatique (20).

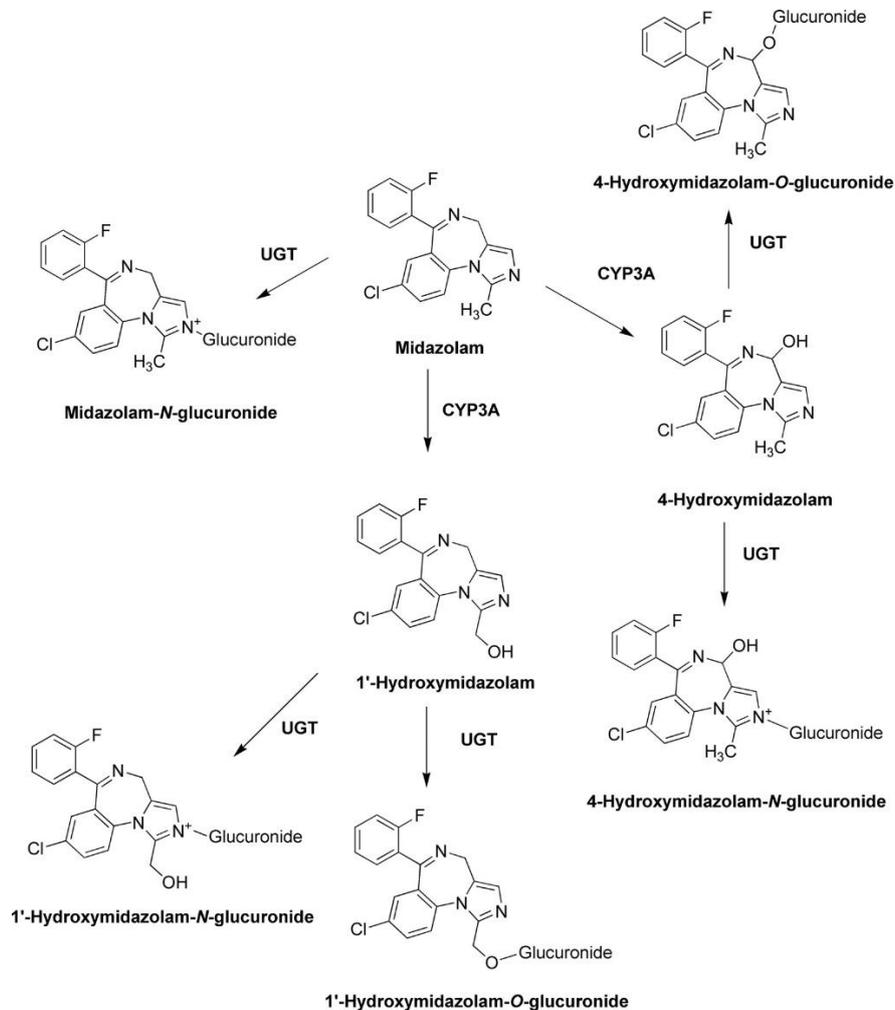


Figure 6: Métabolisme hépatocellulaire du midazolam (19)

La demi-vie d'élimination du midazolam chez le volontaire sain est d'environ 1,7-3,5 heures(13,16,21), cette durée est indépendante de la voie d'administration. L' α -hydroxymidazolam a une demi-vie d'élimination plus courte d'environ 1h (14). Le médicament est éliminé majoritairement (60-80%) dans les urines sous forme glucuroconjuguée(16).

Dans certaines populations, la pharmacocinétique du midazolam peut être modifiée. En effet, chez les insuffisants hépatiques, la demi-vie d'élimination peut être plus longue que chez les sujets sains. On observe aussi un allongement de la demi-vie d'élimination chez les insuffisants cardiaques et les patients en réanimation (22).

IV. Impact clinique de l'inflammation sur les cytochromes :

Le midazolam est métabolisé dans un premier temps par les CYP, et particulièrement les isoenzymes 3A(17). Assez récemment, différents travaux ont montré que l'inflammation pouvait inhiber cette voie métabolique et être un facteur à prendre en compte lors de l'utilisation de médicament à marge thérapeutique étroite (23). Une étude chez des enfants en réanimation

pédiatrique a démontré une diminution de la clairance du midazolam corrélée à la sévérité de la maladie et la protéine C réactive (CRP) mais pas avec les cytokines pro-inflammatoires. Les exemples pour d'autres classes médicamenteuses sont nombreux (24) :

1. Les neuroleptiques et médicaments du système nerveux central :

Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation des concentrations de clozapine chez des patients lors d'un épisode d'inflammation aiguë objectivé par des niveaux pathologiques de CRP (25,26). Certains patients souffrants d'infections respiratoires présentaient même des signes cliniques d'intoxications (27,28).

Il existe quelques données similaires concernant la rispéridone, où il a été observée une élévation du ratio concentration/dose (C/D) de rispéridone en parallèle de l'augmentation de la CRP (25,29). Ces surdosages n'ont cependant pas entraîné de signes cliniques d'intoxication.

Concernant les médicaments antiépileptiques et sédatifs, une étude a observé une augmentation du ratio C/D du perampanel chez des patients épileptiques avec des CRP supérieures à 15 mg/L (30). Une autre étude a observé, chez les patients souffrant d'un traumatisme crânien, une augmentation de la clairance de la phénytoïne (31).

2. Les immunosuppresseurs :

Lors d'une étude il a été démontré, chez 6 patients ayant bénéficié d'une greffe de moelle osseuse et traités par ciclosporine, que les concentrations de ciclosporine étaient corrélées à celles d'Interleukine-6 (IL-6) et d'orosomucoïde après induction d'une réaction inflammation par injection d'IL-6 (32). Dans une autre étude, 2 enfants traités pour une leucémie lymphoïde aiguë ont présenté des concentrations augmentées de sirolimus lors d'épisodes pseudo-grippaux avec une diminution de la clairance de l'ordre de 40 à 50% et nécessitant une adaptation posologique(33).

3. Les antifongiques :

De nombreuses études ont observé chez les patients immunodéprimés traités par voriconazole pour une aspergillose invasive, des concentrations supra-thérapeutiques de voriconazole qui étaient corrélées à l'augmentation de la CRP (34–38).

4. Autres médicaments :

Lors d'infections virales aiguës, il a été observé une diminution du métabolisme de la théophylline chez des enfants asthmatiques présentant des CRP pathologiques et de la fièvre (39).

V. Les mécanismes impactant la pharmacocinétique au cours de l'inflammation :

L'inflammation est un paramètre important expliquant la variabilité pharmacocinétique. Par les modifications des concentrations des protéines sériques, elle impacte la liaison des médicaments à ces protéines. Plus récemment, l'influence des cytokines inflammatoires sur la modulation de l'activité des transporteurs et enzymes intervenant dans la résorption et le métabolisme des médicaments a été décrite.

Le niveau d'expression des CYP est influencé par plusieurs facteurs comme le sexe, l'âge, l'alimentation, les hormones et les médicaments. Il est déjà connu que l'induction des gènes codants pour les CYP est médiée par la liaison de xénobiotiques à des récepteurs nucléaires comme l'*Aryl hydrocarbon receptor* (AhR), le *steroid and xenobiotic receptor* (SXR) et le *constitutive androstane receptor* (CAR).

La régulation des cytochromes par l'inflammation a déjà été explorée sur des modèles animaux, démontrant une régulation négative des CYP. Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer cela : la régulation transcriptionnelle, la dégradation dépendante de l'oxyde nitrique (NO) et les modifications épigénétiques.

1. Régulation transcriptionnelle des cytochromes :

Les principaux mécanismes de régulation négative ont lieu au niveau transcriptionnel (40). Il a été démontré chez la souris que l'inflammation induite par l'administration de lipopolysaccharide (LPS) entraîne une baisse de l'expression des acides ribonucléiques messagers (ARNm) des CYP 3A11, 2C29, 2C55 et 1A2. Cette diminution des niveaux d'ARNm des CYP3A11 est directement associée à la baisse de l'activité du CYP3A (41).

De plus il a été mis en évidence, sur des modèles murins d'infection un corrélat entre l'augmentation des taux d'ARNm de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)) et la diminution de l'expression de certains CYP ((42,43). Cela suggère fortement que les cytokines interviennent dans la régulation négative des CYP au cours de l'inflammation. L'IL-6 est un facteur central de cette régulation (44).

En effet, il a été observé *in vitro* sur des hépatocytes humains, que l'augmentation des concentrations d'IL-6 au-delà des valeurs physiologiques était accompagnée d'une diminution des ARNm des CYP. Il a été également observé que ces effets étaient diminués lors de l'utilisation d'anti-IL-6 (45).

L'utilisation d'anticorps monoclonal anti-TNF- α et des études de délétion du gène codant le TNF- α ont mis en évidence l'implication du TNF- α dans la régulation négative de certains

cytochromes. Ainsi dans ces deux cas, on observait un blocage sélectif de la régulation négative des ARNm des CYP3A11 et 3A25 (46,47). Mais il a aussi été rapporté un effet inducteur sur les CYP2A4 et 2A5, bloqué par les anticorps anti TNF- α (47).

Il a également été observé sur des hépatocytes humains l'implication de l'IFN- γ dans la réduction de l'expression et de l'activité de certains CYP notamment le 1A2 et 2E1, mais aucun effet n'était observé sur le 3A4 (48).

De manière générale l'expression génique des CYP est régulée par des récepteurs nucléaires comme le CAR, le AhR et le *pregnane X receptor* (PXR)(49). Lors de la phase aiguë de l'inflammation on observe des changements d'expression de ces récepteurs. Par exemple il a été observé une diminution de l'expression du PXR dans des hépatocytes humains induite par une augmentation des taux d'IL-6 (50). De plus chez des souris exposées au LPS, la diminution des ARNm des CYP2B et 3A est corrélée à celle des ARNm de CAR et PXR (51). Cependant, en fonction du modèle inflammatoire, le PXR n'est pas essentiel dans la régulation négative des CYP. Ainsi, on a observé chez des souris sauvages et des souris knock-out PXR traitées toutes les deux par LPS une diminution de l'expression génique des CYP comparables. Cette diminution n'était cependant pas observée chez les souris dépourvues de PXR lors d'une stimulation par IL-6.

L'ensemble de ces éléments suggèrent que la répression des CYP lors de l'inflammation fait intervenir plusieurs acteurs à différents niveaux.

2. Dégradation dépendante du NO des cytochromes :

La seconde hypothèse est que lors de l'inflammation, la synthèse hépatique de NO est augmentée par l'activation de la voie de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Il a été observé *in vitro* sur des hépatocytes de rats stimulés par des cytokines inflammatoires, une diminution de l'activité des CYP concomitante à l'augmentation de la synthèse de NO. Ce phénomène a été constaté lors de la stimulation par l'interleukin-1 β (IL-1 β) et le TNF- α , mais pas avec l'IL-6. Cette régulation négative des CYP est amplifiée par l'utilisation d'un agent donneur de NO (52). Cependant ce phénomène est atténué par l'inhibition de la voie iNOS, sans pour autant influencer sur la diminution de leurs niveaux d'ARNm(52). Plus récemment, il a été mis en évidence que le NO régule l'activité du cytochrome 2B6 par dégradation protéasomique(53).

3. Modifications épigénétiques des gènes des DMETs :

Enfin, la troisième hypothèse fait intervenir les micro-ARN (miRNAs) qui sont de petits ARN non codants et qui ont un rôle clé dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. Ce sont des acteurs majeurs de l'épigénétique.

Des études ont montré que les miRNAs joueraient un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des cytochromes(54), de plus il semblerait que les taux de certains miRNAs (miR-21 et mi-R130b) soient élevés lors de l'inflammation(55).

Une corrélation négative entre les niveaux de miR-370-3p et du CYP2D6 a été observée, les auteurs ont démontré que le miR-370-3p se lie à une séquence dans la région 3'-UTR (3'-untranslated region) de l'ARNm du CYP2D6 favorisant ainsi la dégradation de cet ARNm.

Ces données fondamentales permettent de mieux comprendre les phénomènes observés cliniquement.

VI. Les principaux marqueurs protéiques de l'inflammation aiguë :

L'ensemble des mécanismes intervenant au cours de l'inflammation entraînent des modifications de concentration de certaines protéines plasmatiques. Ces protéines sont alors utilisables comme marqueurs de l'inflammation, parmi ces dernières on retrouve :

1. La CRP :

Elle est synthétisée par les hépatocytes sous l'effet de cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine 1 (IL-1) et le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).

Elle est présente en très faible quantité chez le sujet sain (<5 mg/L). Sa concentration sérique augmente dès la 6^{ème} heure suivant le stimulus inflammatoire et sa demi-vie d'élimination est de 12 heures.

L'augmentation de la CRP est rapide, cette variation peut être très importante et rapidement retourner aux valeurs normales.

2. L'orosomucoïde :

Cette protéine est synthétisée par les hépatocytes, les polynucléaires et les monocytes, sous l'influence des cytokines pro inflammatoires : IL-6, IL-1, TNF- α .

La concentration sérique de référence se situe entre 0,5 et 1,2 g/L. Elle augmente dès la 3^{ème} ou 4^{ème} heure après le stimulus inflammatoire et le pic est obtenu en 3 à 5 jours. La demi-vie est d'environ 3 jours.

3. L'haptoglobine :

Cette mucoprotéine est synthétisée par les hépatocytes et a pour rôle de neutraliser l'hémoglobine produite lors d'une hémolyse intravasculaire en formant un complexe qui sera éliminé par les macrophages.

Son taux sérique est compris entre 0,3 et 2 g/L, et augmente lors de l'inflammation sous l'action de l'IL-6. L'augmentation de sa concentration survient 12h après le stimulus inflammatoire, et sa demi-vie est de 2 à 5 jours.

4. Le fibrinogène :

Il est synthétisé par le foie. C'est la protéine de la phase de la coagulation mais aussi une protéine de phase aiguë de l'inflammation.

Sa concentration sérique de référence est comprise entre 2 et 4 g/L, elle augmente lors de l'inflammation sous l'action de l'IL-6 à la 24^{ème} heure suivant le stimulus. Le pic est atteint vers le 3^{ème} jour et sa demi-vie est comprise entre 3 à 5 jours (56,57).

Grâce à l'emploi de ces différents marqueurs il a été mis en évidence un lien entre des épisodes d'inflammation aiguë et plusieurs événements indésirables lors de l'utilisation de médicaments à marge thérapeutique étroite.

Ces différents marqueurs ont été utilisés par les services de médecine pour suivre l'inflammation des patients COVID-19.

VII. La maladie COVID-19 et les coronavirus :

En novembre 2019, un nouveau coronavirus, le SARS-coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a été découvert à Wuhan en Chine, chez des patients souffrant d'une infection respiratoire, transmissible de l'homme à l'homme. Cette maladie appelée « *coronavirus disease 2019* » (COVID-19) s'est rapidement étendue et a abouti à la pandémie mondiale de COVID-19. Cette infection est caractérisée par un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA))(58).

Il a été mis en évidence chez les patients COVID-19 sévère, un état inflammatoire important caractérisé par une forte élévation des marqueurs de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires (59). Des études ont d'ailleurs démontré que la sévérité de l'inflammation était corrélée à la sévérité et à la mortalité de la maladie (60). Certains de ces marqueurs ont même

été proposé comme indicateurs prédictifs de l'évolution du SDRA, de la mortalité et du recours à la ventilation mécanique (61).

Les patients COVID-19 hospitalisés au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes nécessitant une ventilation mécanique étaient sédatisés et le midazolam était bien souvent employé à ces fins.

VIII. Objectifs de l'article :

Les patients hospitalisés en réanimation pour une infection par le SARS-CoV-2 présentent un SDRA et un état hyperinflammatoire. Ils nécessitent une sédation parfois assurée avec du midazolam.

L'inflammation étant un facteur connu d'inhibition de l'activité des cytochromes P450, nous avons donc décidé d'étudier l'impact de l'inflammation causée par le SARS-CoV-2 chez les patients de réanimation sédatisés par cette benzodiazépine.

Article Scientifique

Title : Impact of inflammation on midazolam metabolism in severe COVID-19 patients

Edouard Charles LE CARPENTIER¹, Emmanuel CANET², Ronan BELLOUARD¹, Maëlle MARTIN², Guillaume DESLANDES¹, Aurélie GAULTIER⁴, Éric DAILLY¹, Damien MASSON⁵, Matthieu GREGOIRE^{1*}

¹ Laboratoire de pharmacologie clinique, CHU Nantes, Nantes, France

² Médecine Intensive Réanimation, CHU Nantes, Nantes, France

³ EE1701 MiHAR, Université de Nantes, Nantes, France

⁴ Plateforme de Méthodologie et Biostatistique, CHU Nantes, Nantes, France

⁵ Laboratoire de biochimie, CHU Nantes, Nantes, France

*Corresponding author

Corresponding author

Matthieu GREGOIRE. Address : Laboratoire de pharmacologie clinique, CHU Nantes , 9 quai Moncousu 44093, Nantes, France. International phone number/fax : +33 2 40 08 40 12.
E-mail : matthieu.gregoire@chu-nantes.fr

Abstract

Background: Midazolam is a benzodiazepine frequently used for sedation in patients hospitalised in intensive care unit for coronavirus disease 2019 (COVID-19). This drug is primarily metabolised by cytochrome P450 3A (CYP3A) isoenzymes. Several studies have suggested that inflammatory condition, frequently observed in these patients, could modulate CYP activity. The objective of this work was to study the impact of inflammation on midazolam pharmacokinetics in COVID-19 patients.

Materials/methods: Patients hospitalized for COVID-19 and treated with midazolam administered by continuous infusion were included. Midazolam and α -hydroxymidazolam concentrations were measured and patient data, including the use of CYP3A inhibitors, were collected. Total and unbound concentrations were measured in plasma using a validated liquid-chromatography coupled with mass spectrometry method. Inflammatory condition was evaluated by C-reactive protein (CRP) level measurement.

Results: A total of 48 patients was included. Midazolam concentrations and CRP measurements were performed on 354 samples. A correlation between CRP elevation and α -hydroxymidazolam/midazolam ratio decrease was observed. Alpha-hydroxymidazolam/midazolam ratio was significantly lower when patients were treated with CYP3A inhibitors.

Conclusion: In this study we showed that inflammation reduces the metabolism of midazolam by CYP450 3A. These results suggest that molecules with narrow therapeutic margins and metabolised by CYP450 3A should be administrated with care.

Key words: midazolam, cytochrome 3A, benzodiazepine, intensive care unit, SARS-CoV-2, CRP

Introduction

Midazolam is a imidazobenzodiazepine mainly used for anesthesia and sedation because of a short half-life and ease of use¹. Its metabolism is exclusively dependent on P450 3A (CYP3A) isoenzymes². The two metabolites formed are α -hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam, which are considered as pharmacologically active³. The α -hydroxymidazolam is at least as potent as midazolam but only contribute to a little extent (10%) to clinical effects after intravenous administration of midazolam. The 4-hydroxymidazolam appears to be quantitatively not significant⁴. Then, the hydroxymetabolites are metabolized to glucuronide conjugates by UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) which are pharmacologically inactive. Glucuronide conjugates are excreted in the urine⁵.

Severe acute respiratory syndrome–coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was identified in Wuhan, China, and is associated with a high level of inflammation⁶. Indeed, patients hospitalized for coronavirus disease 2019 (COVID-19) display high levels of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α and a high level of serum C-reactive protein (CRP). Several studies have suggested that inflammation can modulate drug-metabolizing enzymes and transporters (DMET) activity⁷. Indeed, a previous study described very high lopinavir concentrations in COVID-19 patients compared to regular HIV patients⁸.

Patients hospitalised in intensive care unit (ICU) for COVID-19 usually require sedation, analgesia and respiratory assistance. In Nantes University Hospital, midazolam was used for sedation in these patients. Herein, we have evaluated the impact of inflammation, measured with CRP levels, on midazolam metabolism in COVID-19 patients.

Methods

Patient population and data collection

Data from COVID-19 patients hospitalized in ICU in the Nantes University Hospital between April 2020 and February 2021 and treated by continuous infusion midazolam for sedation were retrospectively collected and analysed.

For all patients and at each midazolam concentration measurement, the following data were collected: age, sex, weight, height, starting date of midazolam treatment, daily midazolam posology, serum creatinine, serum albumin, C-reactive protein concentration, date of symptoms onset, date of positive SARS-CoV-2 RT-PCR, COVID-19 outcome, comedications including SARS-CoV-2 repositioned drug trials (lopinavir, hydroxychloroquine, remdesivir, interferon, tocilizumab, sarilumab), and Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS). Then, several parameters were calculated: body mass index (BMI), body surface area (BSA) according to the Du Bois formula⁹, estimated glomerular filtration rate (GFR) indexed by BSA (eGFR, mL/min/1.73m²) according to the CKD-EPI formula¹⁰, and absolute value of the GFR (aGFR, mL/min) calculated from patient eGFR and BSA.

The study was noninterventional, and therefore, did not require informed consents and ethical approval according to French laws and regulations (CSP Art L1121e1.1).

Midazolam and α -hydroxymidazolam quantification

Midazolam and α -hydroxymidazolam total plasma concentrations were determined using a validated liquid-chromatography coupled with mass-spectrometry method.

Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged (1,500 x g, 10 min, 4°C) upon reception at the laboratory. Then, 400 μ L of deuterated internal standards solution (25 ng/mL of D4-midazolam and D4-hydroxymidazolam in acetonitrile) were added to 100 μ L of plasma for protein precipitation. The mixture was vortexed for 10 min using a VXR basic Vibrax® shaker (IKA, Staufen, Germany) and centrifuged for 10 min (15,000 x g, 8°C). One hundred

microliters of supernatant were diluted in 700 μ L of a water and methanol mixture (75:25 v/v). Three microliters were injected into the HPLC LC-20AD XR[®] (Shimatzu, Marne-la-Vallée, France). The separation was performed on a ACQUITY UPLC BEH C18 column (50 \times 2.1 mm ID, 1.7 μ m particles) (Waters, Guyancourt, France). The MS/MS system used was a 5500 QTRAP[®] (SCIEX, Villebon-sur-Yvette, France). Analytes were quantified using multiple reaction-monitoring mode (MRM). The flow rate was set to 0.4 mL/min. The column temperature was set to 30°C. For each analyte, two transitions were monitored: one for quantification and the other to confirm identification. The ratio between the peak areas of the two transitions should not deviate more than 20% from the initial fixed value. All analytes were measured using positive-ion electrospray ionization. Data were acquired and processed using Analyst[®] 1.6.3 software (SCIEX).

The lower limit of quantitation for midazolam and α -hydroxymidazolam (LLOQ) was 0.025 mg/L and the upper limit was 10 mg/L. Accuracy was satisfactory, with intra-day and inter-day coefficients of variation being less than 15% (20% for the LLOQ). Imprecision was also less than 15% (20% for the LLOQ).

Unbound midazolam and α -hydroxymidazolam quantification

Ultrafiltration (UF) was used to separate the protein-bound midazolam and α -hydroxymidazolam from the unbound drug in plasma using Amicon[®] UltraCentrifugal Filter Units (molecular weight cut-off 30kDa, UFC5030BK). The driving force for ultrafiltration was provided by centrifugation (Thermo Scientific, Heraeus FRESCO 21 centrifuge, Villebon-sur-Yvette, France).

UF was done with pre-treatment of filter membranes, adapted from the protocol used by Illamola *et al.*¹¹. The UF units were incubated with 0.5 mL of 5% Tween 20 at room temperature for 24h to limit the nonspecific binding (NSB) of free drug to the surface of the device. Then filters were washed with deionized water (0.5 mL) and centrifuged (1,500 \times g and 37°C for 30 min). After this step, filters were inverted and centrifuged (1,000 \times g and

37°C for 3 min) to remove excess water. Patient plasma (0.5 mL), previously incubated at 37°C for 30 min, was then added and centrifuged (14,000 x g and 37°C for 30 min). Fifty microliters of deuterated internal standards solution (D4-midazolam and D4-hydroxymidazolam 5 ng/mL in a water and methanol mixture (75:25 v/v)) were added to 50 microliters of ultrafiltrate. Three microliters were injected into the HPLC system. The lower limit of quantitation for midazolam and α -hydroxymidazolam (LLOQ) was 0.0005 mg/L and the upper limit was 0.5 mg/L.

C-reactive protein measurement

CRP measurement was performed by immunoturbidimetric method on c701 module of a Cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostic[®], Meylan, France). Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged (1,500 x g, 10 min, 4°C) upon reception at the laboratory, 200 μ L were subsequently used to measure CRP.

Statistical analysis

Generalized linear mixed models (GLMM) using a random effect (the patient), was performed to establish correlation between α -hydroxymidazolam/midazolam concentration ratios and CRP levels (identity link), or comparison between patients treated by CYP 3A inhibitors and those without (logit link). The data were analysed using GraphpadPrism[®] and R v. 3.6.0 (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Patient characteristics

A total of 48 patients were included in the study, corresponding to 354 analysed samples. CRP, midazolam and α -hydroxymidazolam plasma concentrations were measured in each of them, all at steady state (at least 18h after midazolam onset, from 18 to 346h). The median daily dose was 15 mg/day, and dose ranged from 0.2 mg/day to 100 mg/day. Patient characteristics are summarized in **Table 1**.

Midazolam pharmacokinetics

Median (IQR) midazolam and α -hydroxymidazolam total plasma concentrations were respectively 1,135 (1,408.5) ng/mL and 219 (222) ng/mL. Median (IQR) α -hydroxymidazolam/midazolam total plasma concentration ratio was 0.2035 (0.1809).

Median (IQR) midazolam and α -hydroxymidazolam unbound plasma concentrations were respectively 31.5 (52.1) ng/mL and 12.9 (20.4) ng/mL. Median (IQR) α -hydroxymidazolam/midazolam unbound plasma concentration ratio was 0.4 (0.3).

Median (IQR) midazolam and α -hydroxymidazolam unbound fraction were 1.8 (2.8) % and 3.8 (6) % respectively.

Midazolam pharmacokinetics data are summarized in **Table 1**

Impact of inflammation and comedications on midazolam metabolism

Total α -hydroxymidazolam/midazolam ratio was reduced when the CRP level was increased (**Figure 1A**) (Regression coefficient: $-6.84E-4$ [$-7.88E-4$; $-5.79E-4$], p-value < 0.001).

Tendency is described by a straight line ($y = -0.0006024 * X + 0.3093$; $R^2 = 0.2675$).

The same observation was done with unbound α -hydroxymidazolam/midazolam ratio (**Figure 1B**) (Regression coefficient: $-1.44E-3$ [$-1.67E-3$; $-1.21E-3$], p-value < 0.001) ; tendency straight line : $y = -0.001271 * X + 0.6410$, $R^2 = 0.2575$).

Assuming that CYP3A activity is maximal and unaltered when CRP < 50 mg/L without CYP3A inhibitors, from this supposition CYP3A activity was estimated relative to the CRP levels: when CRP was between 50 and 150 mg/L ; 150 and 250 mg/L and upper or equal at 250 mg/L CYP3A activity was respectively estimated at 75%, 57% and 37%.

Figure 2 shows that total and unbound α -hydroxymidazolam/midazolam ratios were significantly lower when patients were treated with CYP3A inhibitors according to GLMM (p-value: 0.006 and 0.003 respectively).

Other comedications don't seem to have significant impact on midazolam pharmacokinetics data.

Discussion

The aim of this study was to investigate the impact of inflammatory conditions induced by COVID-19 on midazolam pharmacokinetics in critical care patients.

SARS-CoV-2 induces not only acute respiratory distress syndrome (ARDS) but also a hyperinflammatory syndrome⁶. Clinical studies have shown an important cytokine storm in critical patients with COVID-19¹². Indeed, patients with severe SARS-CoV infection present high serum levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines compared to uncomplicated SARS-CoV patients¹²⁻¹⁴.

Previous studies showed that inflammation is a major factor of pharmacokinetic variability¹⁶. The impact of proinflammatory cytokines on the activity of enzymes and transporters involved in drug resorption and metabolism has been recently described¹⁶. For example, increased CRP levels were associated with increased voriconazole residual concentrations in immunocompromised patients¹⁷⁻²¹. Inhibition of CYP3A4 and CYP2C19 activities was evoked to explain this phenomenon²². Many drugs were repositioned in COVID-19 and pharmacokinetic changes have been observed for several of them. For example, COVID-19 patients treated with lopinavir had concentrations 3 to 5 times higher than HIV patients usually treated with this drug^{8,23}. Similar observations have been made with everolimus²⁴ and clozapine²⁵. A downregulation of CYP 450 isoenzymes by COVID-19 is also evoked in these studies.

In our study, we demonstrated that α -hydroxymidazolam/midazolam ratio is reduced when the CRP level increases. This corroborates previous studies and adds proof that the metabolic capacities of CYP are altered by the high levels of inflammation.

In this work we also showed that there are no significant modifications on plasma protein binding of midazolam in these conditions. The unbound fraction of midazolam was consistent with previous published studies (about 95-98%)²⁶.

These results are clinically important and may explain potential delayed awakening sometimes observed in COVID-19 patients suggesting a slowed metabolism of anesthetic

drugs in these patients. In addition, we also showed the impact of CYP inhibiting molecules (erythromycin, azole antifungal, amiodarone).

This work had some limitations. First of all, CRP was the only inflammatory marker. It could be interesting to measure other parameters like orosomucoid, haptoglobin, IL-6 or TNF α to determine whether a similar correlation existed and whether certain parameters were more predictive of CYP inhibition. Secondly, all patients in this study had low levels of albumin²⁷ probably due to COVID-19 inflammatory conditions²⁸ and their liver function was not evaluated. Therefore, we could not confirm that these parameters had no influence on CYP activity. Thirdly it would be interesting to study the hepatic drug-metabolizing activity for midazolam before and after anti-interleukin-6 drugs, but unfortunately only one patient was treated with tocilizumab before the first midazolam sample collected. Finally we couldn't truly study the effectiveness of the SARS-CoV-2 repositioned drug trials as lopinavir/ritonavir and their impact on midazolam pharmacokinetic because they weren't administrated at the same time as we collected samples.

Conclusion

This work showed the impact of inflammatory condition on the midazolam pharmacokinetics in ICU COVID-19 patients. These results suggest that great care should be taken with molecules with narrow therapeutic margin and with the same metabolic pathway as midazolam. It also allow us a better understanding of midazolam's effect on patients with high inflammatory condition. This data submit that a particular attention to CRP level should be paid during hospitalisation for a better medical care and drug monitoring.

References

1. Kupietzky A, Houpt MI: Midazolam: a review of its use for conscious sedation of children. *Pediatr Dent* 1993; 15:237–41

2. Wandel C, Böcker R, Böhrer H, Browne A, Rügheimer E, Martin E: Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes. *British Journal of Anaesthesia* 1994; 73:658–61
3. Pieri L: Preclinical pharmacology of midazolam. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1983; 16:17S-27S
4. Mandona JW, Tuk B, Steveninck AL van, Breimer DD, Cohen AF, Danhof M: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite α -hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51:715–28
5. Heizmann P, Eckert M, Ziegler W: Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1983; 16:43S-49S
6. Gustine JN, Jones D: Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol* 2021; 191:4–17
7. Shah RR, Smith RL: Inflammation-induced phenocopy of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos* 2015; 43:400–10
8. Gregoire M, Le Turnier P, Gaborit BJ, Veyrac G, Lecomte R, Boutoille D, Canet E, Imbert B-M, Bellouard R, Raffi F: Lopinavir pharmacokinetics in COVID-19 patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020; 75:2702–4
9. Du Bois D, Du Bois EF: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 1989; 303:312–3
10. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Iii AFC, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Coresh J: A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate 2009:16
11. Illamola SM, Labat L, Benaboud S, Tubiana R, Warszawski J, Tréluyer JM, Hirt D: Determination of total and unbound concentrations of lopinavir in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 965:216–23
12. Ye Q, Wang B, Mao J: The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *Journal of Infection* 2020; 80:607–13
13. Channappanavar R, Perlman S: Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017; 39:529–39
14. Zhang Y, Li J, Zhan Y, Wu L, Yu X, Zhang W, Ye L, Xu S, Sun R, Wang Y, Lou J: Analysis of Serum Cytokines in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Infect Immun* 2004; 72:4410–5
15. Wong CK, Lam CWK, Wu AKL, Ip WK, Lee NLS, Chan IHS, Lit LCW, Hui DSC, Chan MHM, Chung SSC, Sung JJY: Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 2004; 136:95–103

16. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R: Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 2020; 215:107627
17. Gautier-Veyret E, Thiebaut-Bertrand A, Roustit M, Bolcato L, Depeisses J, Schacherer M, Schummer G, Fonrose X, Stanke-Labesque F: Optimization of voriconazole therapy for treatment of invasive aspergillosis: Pharmacogenomics and inflammatory status need to be evaluated. *Br J Clin Pharmacol* 2021; 87:2534–41
18. Gautier-Veyret E, Truffot A, Bailly S, Fonrose X, Thiebaut-Bertrand A, Tonini J, Cahn J, Stanke-Labesque F: Inflammation is a potential risk factor of voriconazole overdose in hematological patients. *Fundam Clin Pharmacol* 2018:fcp.12422 doi:10.1111/fcp.12422
19. Naito T, Yamada T, Mino Y, Kawakami J: Impact of inflammation and concomitant glucocorticoid administration on plasma concentration of triazole antifungals in immunocompromised patients. *Clinica Chimica Acta* 2015; 441:127–32
20. Wanrooy MJP van, Span LFR, Rodgers MGG, Heuvel ER van den, Uges DRA, Werf TS van der, Kosterink JGW, Alffenaar J-WC: Inflammation Is Associated with Voriconazole Trough Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:7098–101
21. Encalada Ventura MA, Wanrooy MJP van, Span LFR, Rodgers MGG, Heuvel ER van den, Uges DRA, Werf TS van der, Kosterink JGW, Alffenaar JWC: Longitudinal Analysis of the Effect of Inflammation on Voriconazole Trough Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:2727–31
22. Bolcato L, Khouri C, Veringa A, Alffenaar JWC, Yamada T, Naito T, Lamoureux F, Fonrose X, Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E: Combined Impact of Inflammation and Pharmacogenomic Variants on Voriconazole Trough Concentrations: A Meta-Analysis of Individual Data. *JCM* 2021; 10:2089
23. Schoergenhofer C, Jilma B, Stimpfl T, Karolyi M, Zoufaly A: Pharmacokinetics of Lopinavir and Ritonavir in Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Annals of Internal Medicine* 2020; 173:670–2
24. Meziyerh S, Zwart TC, Etten RW, Janson JA, Gelder T, Alwayn IPJ, Fijter JW, Reinders MEJ, Moes DJAR, Vries APJ: Severe COVID-19 in a renal transplant recipient: A focus on pharmacokinetics. *Am J Transplant* 2020; 20:1896–901
25. Cranshaw T, Harikumar T: COVID-19 Infection May Cause Clozapine Intoxication: Case Report and Discussion. *Schizophrenia Bulletin* 2020; 46:751–751
26. Halliday NJ, Dundee JW, Collier PS, Loughran PG, Harper KW: Influence of plasma proteins on the onset of hypnotic action of intravenous midazolam. *Anaesthesia* 1985; 40:763–6
27. Soeters PB, Wolfe RR, Shenkin A: Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2019; 43:181–93
28. Aziz M, Fatima R, Lee-Smith W, Assaly R: The association of low serum albumin level with severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2020; 24:255

Tables

Table 1: Study population characteristics, outcomes and pharmacological results (n = 48 patients)

Patients characteristics	
Gender, female/men (%)	12/36 (25/75)
Age, years, median (IQR)	62 (10.5)
Weight, kg, median (IQR)	87.5 (19.9)
BMI, kg/m ² , median (IQR)	29.2 (6.9)
Glomerular filtration (CKD-EPI), mL/min/1.73 m ² , median (IQR)	78 (85)
Plasma C-reactive protein (CRP) concentration, mg/L, median (IQR)	113.6 (133.9)
Serum albumin concentration, g/L, median (IQR)	17.95 (5.2)
CYP3A inhibitors, n (%)	23 (47.9)
• Azole antifungal, n (%)	6 (12.5)
• Erythromycin, n (%)	14 (29.2)
• Amiodarone, n (%)	7 (14.6)
• Others, n (%)	1 (2.1)
Dexamethasone, n (%)	22 (45.8)
Tocilizumab, n (%)	1 (2.08)
RASS, median (IQR)	-5 (0)
In-hospital mortality, n (%)	21 (43.7)
Midazolam pharmacokinetics	
Daily dosage, mg, median (IQR)	15 (11.8)
Delay from first symptoms to concentration measurement, day, median (IQR)	20 (12)
Delay from positive RT-PCR to concentration measurement, day, median (IQR)	15 (12.7)
Midazolam concentration, ng/mL, median (IQR)	1,135 (1,408.5)
Unbound midazolam concentration, ng/mL, median (IQR)	31.5 (52.1)
Free fraction midazolam, %, median (IQR)	1.8 (2.8)
α -hydroxymidazolam concentration, ng/mL, median (IQR)	219 (222)
Unbound α -hydroxymidazolam concentration, ng/mL, median (IQR)	12.9 (20.4)
Free fraction α -hydroxymidazolam, %, median (IQR)	3.8 (6)
α -hydroxymidazolam/midazolam ratio, median (IQR)	0.2 (0.2)
Unbound α -hydroxymidazolam/midazolam ratio, median (IQR)	0.4 (0.3)
All samples, n	354
• Samples with dexamethasone, n (%)	88 (24.9)

• Samples without dexamethasone, n (%)	266 (75.1)
• Samples with identified CYP3A inhibitors, n (%)	76 (21.5)
• Samples with no identified CYP3A inhibitors, n (%)	278 (78.5)
○ With CRP < 50 mg/L, n (%)	55 (19.9)
○ With CRP between 50 and 150 mg/L, n (%)	123 (44.2)
○ With CRP between 150 and 250 mg/L, n (%)	58 (20.9)
○ With CRP ≥ 250 mg/L, n (%)	42 (15.1)
• Samples without dexamethasone or identified CYP3A inhibitors	200 (56.5)

IQR, interquartile range; BMI, body mass index; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease

EPIde miology collaboration; RASS, Richmond Agitation-Sedation Scale; CRP, C-reactive protein; CYP3A, cytochrome isoenzymes 3A

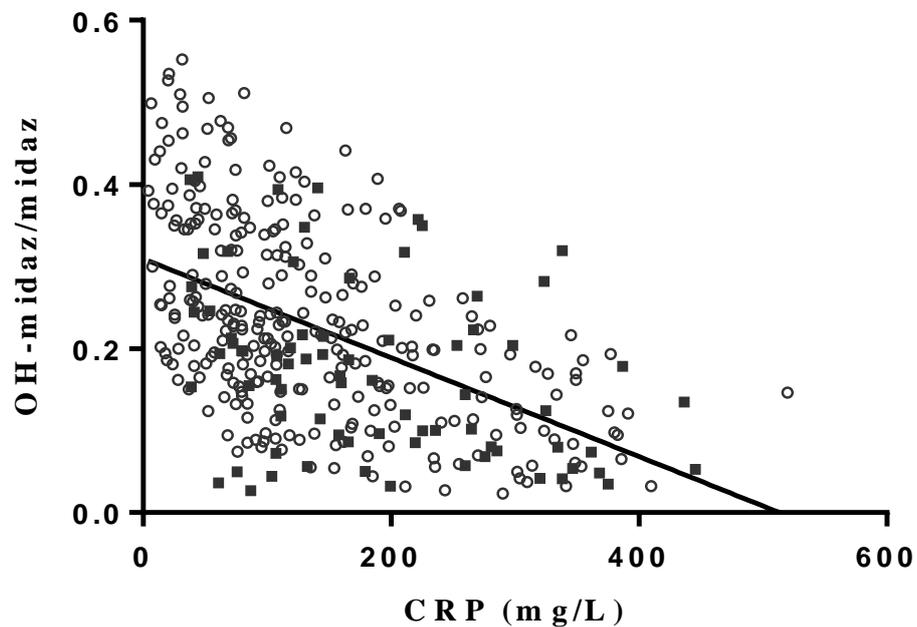


Figure 1A: Correlation between C-reactive protein (CRP) plasma concentrations and α -hydroxymidazolam/midazolam (OH-midaz/midaz) total plasma concentration ratios. Rings represent concentration ratios for patients without CYP3A inhibitors, full squares represent concentration ratio for patients treated with CYP3A inhibitors. The straight line represents the tendency of all samples ($y = -0.0006024 * X + 0.3093$, $R^2 = 0.2675$).

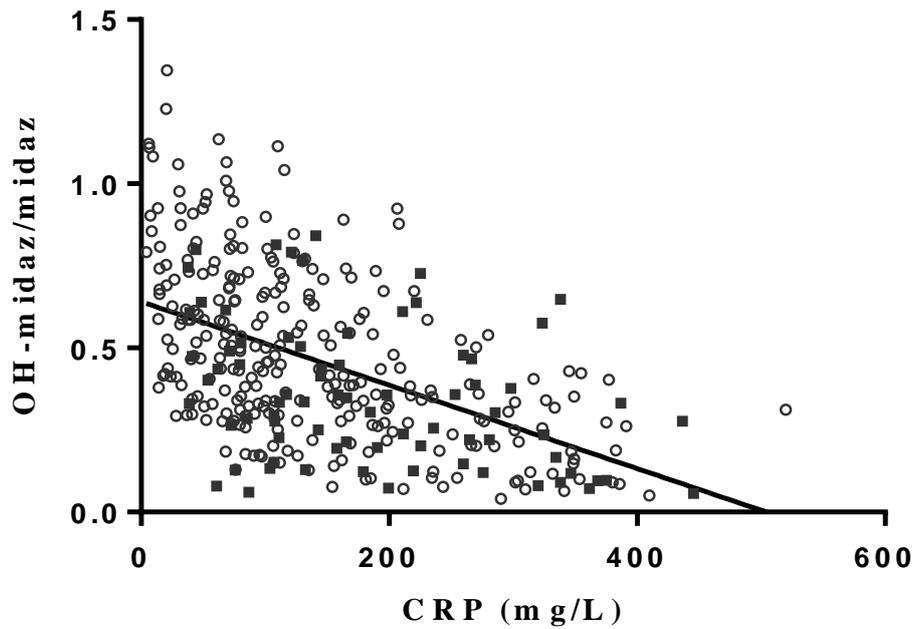


Figure 1B: Correlation between C-reactive protein (CRP) plasma concentrations and α -hydroxymidazolam/midazolam (OH-midaz/midaz) unbound plasma concentration ratios. Rings represent concentration ratios for patients without CYP3A inhibitors, full squares represent concentration ratios for patients treated with CYP3A inhibitors. The straight line represents the tendency of all samples ($y = -0.001271 \cdot X + 0.6410$, $R^2 = 0.2575$).

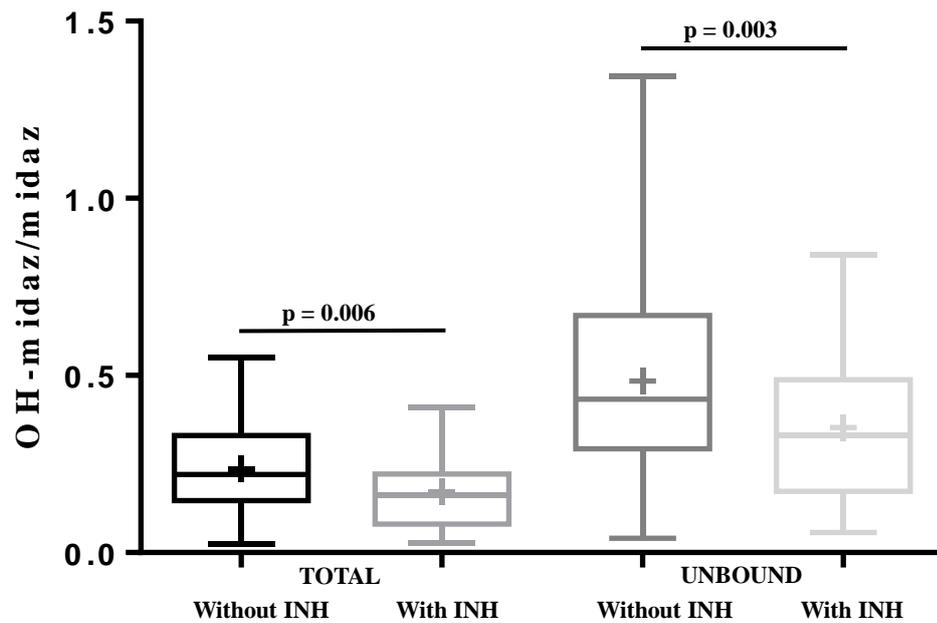


Figure 2: Comparison of total and unbound plasma α -hydroxymidazolam/midazolam concentration ratio in patients with or without CYP3A inhibitors (INH). Boxes show 25th and 75th percentiles, median value, minimum and maximum (whiskers) and mean (plus sign).

Discussion :

Le but de ce travail était d'étudier l'impact de l'inflammation induite par la COVID-19 sur la pharmacocinétique du midazolam chez les patients hospitalisés en service de réanimation.

Au commencement de cette étude nous avons émis 2 hypothèses :

- Le midazolam étant métabolisé par le CYP3A4, l'inflammation pouvait peut-être inhiber l'activité du CYP3A4
- Le midazolam étant lié à 94-96% aux protéines plasmatiques, l'inflammation pouvait peut-être perturber la liaison aux protéines plasmatiques.

Nous savons maintenant grâce à la bibliographie sur le sujet que le SARS-CoV-2 n'entraîne pas seulement un SDRA mais aussi un syndrome inflammatoire important (« l'orage cytokinique »).

L'inflammation via les cytokines pro-inflammatoires peut inhiber la transcription de gènes codants pour les enzymes et transporteurs qui sont habituellement responsables de la résorption et surtout du métabolisme des médicaments. Ces modifications peuvent conduire à une augmentation de l'exposition aux médicaments substrats, via une élévation de la biodisponibilité ou une diminution de la clairance.

Par exemple, il a été observé chez des patients infectés par le SARS-CoV-2 et traités pour cela par le lopinavir (inhibiteur de la protéase du VIH en repositionnement de molécule), des concentrations plasmatiques 3 à 4 fois supérieures par rapport aux concentrations habituellement retrouvées chez les patients infectés par le VIH (62). Ainsi nous pouvons supposer que l'inflammation causée lors de l'infection au SARS-CoV-2 est suffisante pour moduler négativement l'activité du CYP3A4.

Une autre étude a montré que l'augmentation des concentrations de lopinavir était corrélée positivement aux niveaux de CRP et non expliquée par la dose administrée ou un dysfonctionnement hépatique chez ces patients. De plus ces concentrations étaient significativement plus basses chez les patients traités par un anti IL-6 tel que le tocilizumab (63). Lors d'une infection au SARS-CoV-2 il a été observé chez un patient une augmentation des concentrations de clozapine et de son métabolite la norclozapine à des niveaux supratherapeutiques, alors que ces précédents dosages de suivi thérapeutique étaient normaux (66). A chaque fois les auteurs ont évoqué une régulation négative des isoenzymes des cytochromes P450 par la COVID-19.

Dans notre étude nous avons observé que le ratio α -hydroxymidazolam/midazolam présente une corrélation négative avec la CRP. Cette observation est en accord avec les études précédentes, et corrobore l'hypothèse selon laquelle l'inflammation altère les propriétés et les capacités métaboliques des CYP. De plus nous avons essayé de quantifier le niveau d'activité

des CYP en fonction des niveaux de CRP en supposant que l'inflammation faible (< 50 mg / L) n'influencée pas l'activité du CYP. (Figure 7).

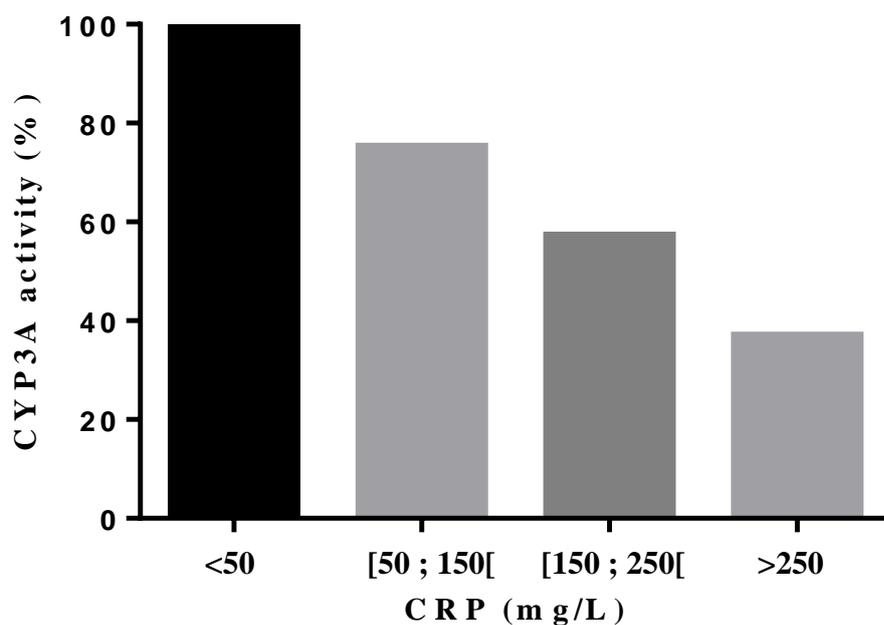


Figure 7: Activité métabolique des CYP3A en fonction des niveaux de CRP.

Activité à 100% quand CRP < 50 mg/L puis à 75%, 57%, 37% lorsque la CRP est entre 50 et 150, 150 et 250 et supérieure 250 respectivement.

Notre deuxième hypothèse basée sur la liaison aux protéines plasmatiques est invalidée par nos résultats. En effet chez les patients de notre étude, nous observons que les fractions libres du midazolam étaient cohérentes avec celles de la bibliographie.

Au cours de cette étude nous avons également pu montrer l'impact des molécules inhibitrices (érythromycine, antifongiques azolés, amiodarone, remdesivir) des cytochromes sur le métabolisme des médicaments substrats. Cependant nous n'avons pas observé de modifications significatives de la pharmacocinétique du midazolam lorsque les patients étaient sous dexaméthasone qui est pourtant considéré comme un inducteur enzymatique connu(67). Il est très possible que cet effet inducteur ait été supplanté par l'effet inhibiteur de l'inflammation sur les cytochromes. Ces 2 effets étant médiés par une activité de régulation transcriptionnelle.

L'ensemble de nos résultats suggèrent un ralentissement du métabolisme des anesthésiques chez les patients de cette étude, permettant d'expliquer les potentiels retards de réveil observés chez certains patients COVID-19.

Ce travail présente cependant quelques limites : La première limite concerne le fait que nous n'avons utilisé que la CRP comme marqueur de l'inflammation. L'utilisation de marqueurs de

l'inflammation complémentaire avec une cinétique différente comme l'orosomucoïde, l'haptoglobine ou le fibrinogène pourraient être intéressante. Nous aurions pu également mesurer les cytokines pro inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF α . Certains de ces paramètres auraient pu être de meilleurs indicateurs de l'inhibition des CYP. Cette limite mérite encore d'être évaluée pour éventuellement ajouter ces données à ce travail. Ensuite, tous les patients présentaient une hypoalbuminémie, probablement causée par l'inflammation liée à la COVID-19 (68,69). Leur fonction hépatique n'a pas été évaluée et nous ne pouvons donc pas en estimer l'influence sur l'activité des CYP. Il aurait également pu être intéressant de savoir si la réduction de l'inflammation par les anti-IL-6 (tocilizumab, et sarilumab) avait un impact sur la métabolisation du midazolam. Cependant le recrutement des échantillons s'est arrêté au moment où ces traitements ont commencé à être employés. Dans notre cohorte un seul patient avait reçu ces traitements.

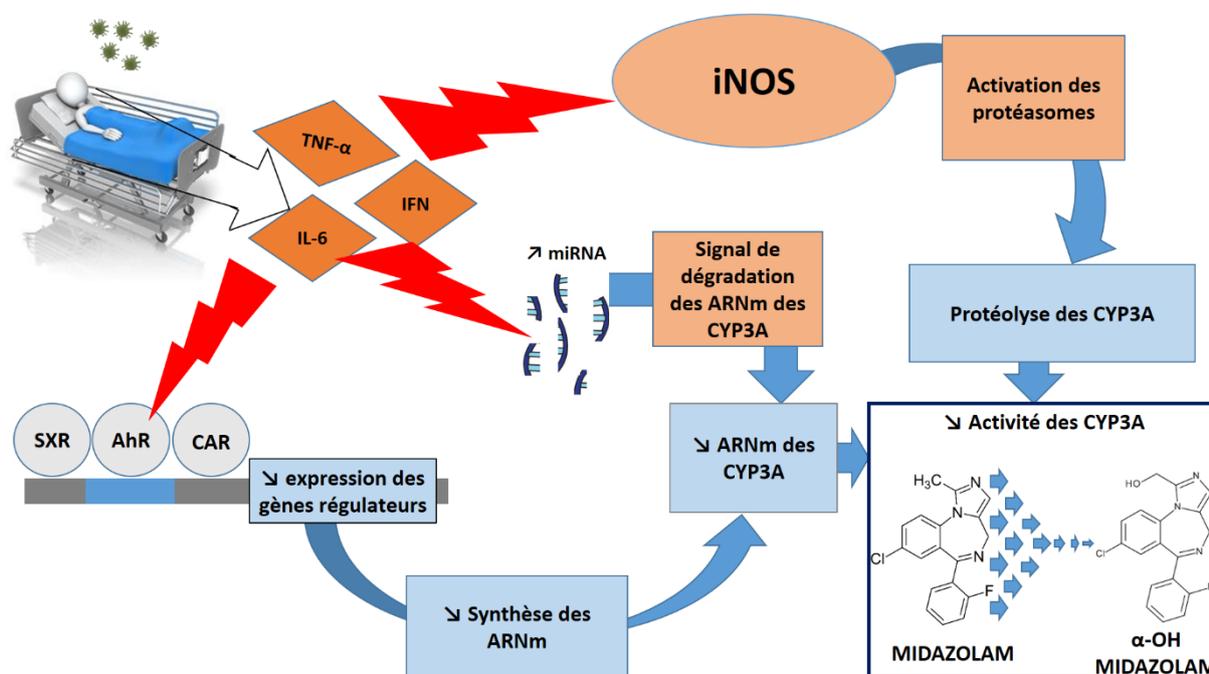


Figure 8: Schéma récapitulatif des mécanismes inflammatoires impactant la pharmacocinétique du midazolam.

Conclusion :

Cette étude présente l'impact de l'inflammation sur le métabolisme hépatique du midazolam chez les patients COVID-19 hospitalisés en service de réanimation (**Figure 8**). Ce travail suggère que les médicaments métabolisés par les mêmes cytochromes que le midazolam sont susceptibles de se comporter de la même manière et que la prudence doit être d'autant plus grande avec des molécules à marge thérapeutique étroite.

Le COVID-19 est, dans ce travail, un modèle d'inflammation permettant de démontrer de façon unique notre hypothèse.

Références :

1. Lefebvre T. Mort de Leo Sternbach (1908-2005), l'inventeur du Valium. :4.
2. Wick JY. The History of Benzodiazepines. The Consultant Pharmacist. 1 sept 2013;28(9):538-48.
3. Visalli S. Leo sternbach. 1976.
4. Olkkola KT, Ahonen J. Midazolam and Other Benzodiazepines. In: Schüttler J, Schwilden H, éditeurs. Modern Anesthetics [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cité 4 mai 2021]. p. 335-60. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 182). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-74806-9_16
5. Sigel E, Steinmann ME. Structure, Function, and Modulation of GABA A Receptors. 2012;287(48):9.
6. Brohan J, Goudra BG. The Role of GABA Receptor Agonists in Anesthesia and Sedation. CNS Drugs. oct 2017;31(10):845-56.
7. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, et al. GABAB-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature. déc 1998;396(6712):683-7.
8. Bacon E, Viennot F. Le système complexe des récepteurs GABA-benzodiazépine. Med Sci (Paris). 1990;6(8):770.
9. Crestani F, Martin JR, Möhler H, Rudolph U. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem *in vivo*: Special Report. British Journal of Pharmacology. déc 2000;131(7):1251-4.
10. Crestani F, Martin JR, Möhler H, Rudolph U. Resolving differences in GABAA receptor mutant mouse studies. Nat Neurosci. nov 2000;3(11):1059-1059.
11. Crestani F, Löw K, Keist R, Mandelli M-J, Möhler H, Rudolph U. Molecular Targets for the Myorelaxant Action of Diazepam. Mol Pharmacol. 1 mars 2001;59(3):442-5.
12. Nusser Z, SIEGHARTt W, BENKEt D, FRITSCHYt J-M, Somogyi P. Differential synaptic localization of two major γ -aminobutyric acid type A receptor subunits on hippocampal pyramidal cells. :6.
13. Greenblatt D, Abernethy D. Midazolam pharmacology and pharmacokinetics. Anesth Rev. 12^e éd. 1985;17-20.
14. Kanto JH. Midazolam: The First Water-soluble Benzodiazepine; Pharmacology, Pharmacokinetics and Efficacy in Insomnia and Anesthesia. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 6 mai 1985;5(3):138-55.
15. Nordt SP, Clark RF. Midazolam: A review of therapeutic uses and toxicity. The Journal of Emergency Medicine. mai 1997;15(3):357-65.

16. Heizmann P, Eckert M, Ziegler W. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*. févr 1983;16(S1):43S-49S.
17. Wandel C, Böcker R, Böhrer H, Browne A, Rügheimer E, Martin E. Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes. *British Journal of Anaesthesia*. nov 1994;73(5):658-61.
18. Mandona JW, Tuk B, van Steveninck AL, Breimer DD, Cohen AF, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite α -hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. juin 1992;51(6):715-28.
19. Seo K-A, Bae SK, Choi Y-K, Choi CS, Liu K-H, Shin J-G. Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7. *Drug Metab Dispos*. nov 2010;38(11):2007-13.
20. Park G, Manara A, Dawling S. Extra-hepatic metabolism of midazolam. *British Journal of Clinical Pharmacology*. mai 1989;27(5):634-7.
21. Allonen H, Ziegler G, Klotz U. Midazolam kinetics. *Clin Pharmacol Ther*. nov 1981;30(5):653-61.
22. Franken LG, Masman AD, de Winter BCM, Baar FPM, Tibboel D, van Gelder T, et al. Hypoalbuminaemia and decreased midazolam clearance in terminally ill adult patients, an inflammatory effect? *Br J Clin Pharmacol*. août 2017;83(8):1701-12.
23. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R. Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. nov 2020;215:107627.
24. Vet NJ, Brussee JM, de Hoog M, Mooij MG, Verlaat CWM, Jerchel IS, et al. Inflammation and Organ Failure Severely Affect Midazolam Clearance in Critically Ill Children. *Am J Respir Crit Care Med*. juill 2016;194(1):58-66.
25. Hefner G, Shams MEE, Unterecker S, Falter T, Hiemke C. Inflammation and psychotropic drugs: the relationship between C-reactive protein and antipsychotic drug levels. *Psychopharmacology*. mai 2016;233(9):1695-705.
26. Pfuhlmann B, Hiemke C, Unterecker S, Burger R, Schmidtke A, Riederer P, et al. Toxic clozapine serum levels during inflammatory reactions. *J Clin Psychopharmacol*. août 2009;29(4):392-4.
27. de Leon J, Diaz FJ. Serious respiratory infections can increase clozapine levels and contribute to side effects: a case report. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. sept 2003;27(6):1059-63.
28. Haack M-J, Bak MLFJ, Beurskens R, Maes M, Stolk LML, Delespaul PAEG. Toxic rise of clozapine plasma concentrations in relation to inflammation. *European Neuropsychopharmacology*. oct 2003;13(5):381-5.
29. Hefner G, Falter T, Bruns K, Hiemke C. Elevated risperidone serum concentrations during acute inflammation, two cases. *Int J Psychiatry Med*. oct 2015;50(3):335-44.

30. Yamamoto Y, Takahashi Y, Horino A, Usui N, Nishida T, Imai K, et al. Influence of Inflammation on the Pharmacokinetics of Perampanel. *Therapeutic Drug Monitoring*. déc 2018;40(6):725-9.
31. McKindley DS, Boucher BA, Hess MM, Rodman JH, Feler C, Fabian TC. Effect of acute phase response on phenytoin metabolism in neurotrauma patients. *J Clin Pharmacol*. févr 1997;37(2):129-39.
32. Chen YL, Le Vraux V, Leneveu A, Dreyfus F, Stheneur A, Florentin I, et al. Acute-phase response, interleukin-6, and alteration of cyclosporine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. juin 1994;55(6):649-60.
33. Mizuno T, O'Brien MM, Vinks AA. Significant effect of infection and food intake on sirolimus pharmacokinetics and exposure in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. févr 2019;128:209-14.
34. Bolcato L, Khouri C, Veringa A, Alffenaar JWC, Yamada T, Naito T, et al. Combined Impact of Inflammation and Pharmacogenomic Variants on Voriconazole Trough Concentrations: A Meta-Analysis of Individual Data. *JCM*. 13 mai 2021;10(10):2089.
35. Encalada Ventura MA, van Wanrooy MJP, Span LFR, Rodgers MGG, van den Heuvel ER, Uges DRA, et al. Longitudinal Analysis of the Effect of Inflammation on Voriconazole Trough Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2016;60(5):2727-31.
36. Gautier-Veyret E, Thiebaut-Bertrand A, Roustit M, Bolcato L, Depeisses J, Schacherer M, et al. Optimization of voriconazole therapy for treatment of invasive aspergillosis: Pharmacogenomics and inflammatory status need to be evaluated. *Br J Clin Pharmacol*. juin 2021;87(6):2534-41.
37. Gautier-Veyret E, Truffot A, Bailly S, Fonrose X, Thiebaut-Bertrand A, Tonini J, et al. Inflammation is a potential risk factor of voriconazole overdose in hematological patients. *Fundam Clin Pharmacol*. 7 déc 2018;fcp.12422.
38. van Wanrooy MJP, Span LFR, Rodgers MGG, van den Heuvel ER, Uges DRA, van der Werf TS, et al. Inflammation Is Associated with Voriconazole Trough Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2014;58(12):7098-101.
39. Yamaguchi A, Tateishi T, Okano Y, Matuda T, Akimoto Y, Miyoshi T, et al. Higher Incidence of Elevated Body Temperature or Increased C-Reactive Protein Level in Asthmatic Children Showing Transient Reduction of Theophylline Metabolism. *The Journal of Clinical Pharmacology*. mars 2000;40(3):284-9.
40. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. REGULATION OF DRUG-METABOLIZING ENZYMES AND TRANSPORTERS IN INFLAMMATION. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. févr 2006;46(1):123-49.
41. Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F. Effect of Lipopolysaccharide on the Xenobiotic-Induced Expression and Activity of Hepatic Cytochrome P450 in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(4):473-80.
42. Richardson TA, Sherman M, Antonovic L, Kardar SS, Strobel HW, Kalman D, et al. HEPATIC AND RENAL CYTOCHROME P450 GENE REGULATION DURING

CITROBACTER RODENTIUM INFECTION IN WILD-TYPE AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 MUTANT MICE. *Drug Metab Dispos.* mars 2006;34(3):354-60.

43. Mimche SM, Lee C, Liu KH, Mimche PN, Harvey RD, Murphy TJ, et al. A non-lethal malarial infection results in reduced drug metabolizing enzyme expression and drug clearance in mice. *Malar J.* déc 2019;18(1):234.
44. Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MaJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin 6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB j.* nov 2002;16(13):1-29.
45. Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, Slatter JG. Effects of Interleukin-6 (IL-6) and an Anti-IL-6 Monoclonal Antibody on Drug-Metabolizing Enzymes in Human Hepatocyte Culture. *Drug Metab Dispos.* août 2011;39(8):1415-22.
46. Nyagode BA, Jahangardi R, Merrell MD, Tansey MG, Morgan ET. Selective effects of a therapeutic protein targeting tumor necrosis factor-alpha on cytochrome P450 regulation during infectious colitis: implications for disease-dependent drug-drug interactions. *Pharmacol Res Perspect* [Internet]. févr 2014 [cité 1 sept 2021];2(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prp2.27>
47. Kinloch RD, Lee C-M, van Rooijen N, Morgan ET. Selective role for tumor necrosis factor- α , but not interleukin-1 or Kupffer cells, in down-regulation of CYP3A11 and CYP3A25 in livers of mice infected with a noninvasive intestinal pathogen. *Biochemical Pharmacology.* août 2011;82(3):312-21.
48. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol.* oct 1993;44(4):707-15.
49. Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced Drug Delivery Reviews.* oct 2010;62(13):1238-49.
50. Yang J, Hao C, Yang D, Shi D, Song X, Luan X, et al. Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes. *Toxicology Letters.* 1 sept 2010;197(3):219-26.
51. Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;5.
52. Carlson TJ, Billings RE. Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol Pharmacol.* mai 1996;49(5):796-801.
53. Lee C-M, Tripathi S, Morgan ET. Nitric oxide-regulated proteolysis of human CYP2B6 via the ubiquitin-proteasome system. *Free Radical Biology and Medicine.* juill 2017;108:478-86.
54. Lamba V, Ghodke Y, Guan W, Tracy TS. microRNA-34a is associated with expression of key hepatic transcription factors and cytochromes P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* mars 2014;445(2):404-11.
55. Rieger JK, Klein K, Winter S, Zanger UM. Expression Variability of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion-Related MicroRNAs in Human Liver: Influence of

- Nongenetic Factors and Association with Gene Expression. *Drug Metab Dispos.* oct 2013;41(10):1752-62.
56. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum.* déc 1990;20(3):129-47.
 57. Weisel JW. FIBRINOGEN AND FIBRIN. *Advances in Protein Chemistry.* 2005;70:247-99.
 58. Seyed Hosseini E, Riahi Kashani N, Nikzad H, Azadbakht J, Hassani Bafrani H, Haddad Kashani H. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology.* déc 2020;551:1-9.
 59. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet.* févr 2020;395(10223):497-506.
 60. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet.* mars 2020;395(10229):1033-4.
 61. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* juill 2020;146(1):128-136.e4.
 62. Gregoire M, Le Turnier P, Gaborit BJ, Veyrac G, Lecomte R, Boutoille D, et al. Lopinavir pharmacokinetics in COVID-19 patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 sept 2020;75(9):2702-4.
 63. Marzolini C, Stader F, Stoeckle M, Franzeck F, Egli A, Bassetti S, et al. Effect of Systemic Inflammatory Response to SARS-CoV-2 on Lopinavir and Hydroxychloroquine Plasma Concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2020;64(9):9.
 64. Meziyerh S, Zwart TC, Etten RW, Janson JA, Gelder T, Alwayn IPJ, et al. Severe COVID-19 in a renal transplant recipient: A focus on pharmacokinetics. *Am J Transplant.* juill 2020;20(7):1896-901.
 65. Testa S, Prandoni P, Paoletti O, Morandini R, Tala M, Dellanoce C, et al. Direct oral anticoagulant plasma levels' striking increase in severe COVID-19 respiratory syndrome patients treated with antiviral agents: The Cremona experience. *J Thromb Haemost.* juin 2020;18(6):1320-3.
 66. Cranshaw T, Harikumar T. COVID-19 Infection May Cause Clozapine Intoxication: Case Report and Discussion. *Schizophrenia Bulletin.* 8 juill 2020;46(4):751-751.
 67. Doi M, Kajikawa N, Aiba T. Effects of dexamethasone to reverse decreased hepatic midazolam metabolism in rats with acute renal failure. *Xenobiotica.* 3 mai 2020;50(5):506-14.
 68. Soeters PB, Wolfe RR, Shenkin A. Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* févr 2019;43(2):181-93.

69. Aziz M, Fatima R, Lee-Smith W, Assaly R. The association of low serum albumin level with severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* déc 2020;24(1):255.

Nom : LE CARPENTIER**Prénoms :** Edouard, Charles, Hugues**Titre de la thèse :** Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique du midazolam chez les patients COVID19 en réanimation.

Résumé de la thèse :

La pharmacocinétique des médicaments peut être impactée par plusieurs facteurs dont l'inflammation. Il a déjà été mis en évidence que l'inflammation causée par une infection pouvait être à l'origine d'inhibition du métabolisme de certains médicaments. Lors de la pandémie mondiale de COVID-19, les patients infectés par le SARS-CoV-2 présentaient un syndrome de détresse respiratoire aiguë et une forte inflammation. Ceux hospitalisés dans le Service de Réanimation du CHU de Nantes nécessitant une ventilation mécanique étaient sédatisés à l'aide de midazolam. Le but de ce travail est d'étudier l'impact de l'inflammation estimée par la CRP sur la pharmacocinétique du midazolam chez les patients COVID-19 en Réanimation.

MOTS CLÉS : BENZODIAZEPINE, COVID-19, CRP, CYTOCHROME, MIDAZOLAM, REANIMATION

JURY

PRÉSIDENTE :	Madame le Professeur Sonia PROT-LABARTHE
DIRECTEUR DE THÈSE :	Monsieur le Docteur Matthieu GRÉGOIRE
ASSESEURS :	Monsieur le Professeur Éric DAILLY
	Monsieur le Professeur Emmanuel CANET

Adresse de l'auteur :

Mr LE CARPENTIER Edouard
2 rue Louis Marin
44200 NANTES
FRANCE