

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE SCIENCE-TECHNOLOGIE-SANTE ED 258

FACULTE de MEDECINE

Equipe DEXO (Devenir et Effet des Xénobiotiques dans l'Organisme) EA 3838

Année : 2005

N°.....

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : *Pharmacologie*

Présentée et soutenue par

Nicolas PICARD

Le 19 octobre 2005

**Etudes *in vitro* et *in vivo* du métabolisme du
mycophénolate et des interactions métaboliques
entre médicaments immunosuppresseurs**

Directeur de Thèse : Pr. Pierre Marquet

Jury :

Président :

Dr. Annick Rousseau, Maître de Conférences (Université de Limoges)

Rapporteurs :

Pr. André Guillouzo, Professeur (INSERM U620, Université de Rennes I)

Pr. Jean-Marc Tréluyer, Professeur-Praticien Hospitalier (Université de Paris V)

Membres :

Pr. Pierre Marquet, Professeur-Praticien Hospitalier (Université de Limoges)

Pr. Yannick Le Meur, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU de Limoges)

Dr. Jean Debord, Praticien Hospitalier Attaché (CHU de Limoges)

A Louise...

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet

Merci pour la confiance que vous m'avez accordé pendant ces années de recherche. J'ai le sentiment d'avoir beaucoup appris à vos côtés, toujours dans une ambiance agréable et dans une équipe que vous avez su maintenir en constante évolution. Merci pour votre disponibilité permanente, vos compétences et votre rigueur qui offre un encadrement de grande qualité.

A Monsieur le Professeur André Guillouzo

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et c'est un honneur que de vous compter parmi les membres de ce jury.

A Monsieur le Professeur Jean-Marc Tréluyer

Merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être rapporteur et de l'honneur que vous me faites en participant à ce jury.

A Monsieur le Professeur Yannick Le Meur

Vous êtes pour beaucoup dans la réalisation de ce travail, fruit d'une collaboration étroite entre le service de Néphrologie et celui de Pharmacologie et Toxicologie. Je suis très sensible à votre présence dans ce jury de thèse.

A Madame le Docteur Annick Rousseau

C'est un grand plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury de Thèse. Merci pour vos conseils tout au long de ces années de recherche.

A Monsieur le Docteur Jean Debord

J'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à ce travail en acceptant de la juger et suis honoré par votre présence dans ce jury.

A Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre

En m'accueillant dans le service de Pharmacologie et Toxicologie, vous m'avez permis de réaliser ce travail de Thèse dans des conditions optimales. Soyez assuré de ma reconnaissance.

A Monsieur Damrong Ratanasavangh et Madame Dominique Riché

Les quelques jours passés à Brest m'auront permis d'expérimenter les méthodologies d'étude du métabolisme *in vitro* à la base de la réalisation de cette thèse. Merci pour votre aide et vos conseils.

A Monsieur Thierry Cresteil

Votre collaboration à ce travail a été précieuse. J'ai pu à plusieurs reprises bénéficier de vos conseils avisés. Soyez assuré de ma reconnaissance.

A Francois-Ludovic Sauvage, Karine Delaune, Jean-Louis Dupuy et Franck Giraudie

Merci pour vos conseils d'expert et pour votre aide.

A Jean-Hervé Comte

A tout problème, vous avez à la solution (informatique, technique, logistique ...). Merci pour tout.

A Virginie de Mérindol et Dorra Driddi

Cela a été un grand plaisir que de travailler avec vous deux. Merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail.

A Aurélie Prémaud, Franck Saint-Marcoux, Nassim Djebli, et Belkacem Boussera

Il s'agit avant tout d'un travail d'équipe, merci à tous pour votre aide, vos conseils et critiques.

A tout le personnel du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges

Merci pour tout ce que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail.

Résumé

Les médicaments immunosuppresseurs présentent une fenêtre thérapeutique étroite et sont donc soumis au Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP). Le métabolisme, pouvant être responsable de variations d'exposition et d'interactions médicamenteuses, est un facteur à prendre en compte dans le choix des associations thérapeutiques et des doses administrées. Ce travail concerne l'étude du métabolisme de l'acide mycophénolique (MPA, forme active du mycophénolate mofétil, Cellcept®) et des interactions métaboliques entre médicaments immunosuppresseurs. Les voies métaboliques de phase I et de phase II du MPA ont été identifiées *in vitro* (métabolites, isoformes enzymatiques, localisation tissulaire). Ces études ont mis en évidence le rôle majoritaire des UGT 1A9 et 2B7 dans la formation des deux métabolites principaux du MPA (MPA-phényl-glucuronide, MPAG et MPA-acyl-glucuronide, AcMPAG). Le polymorphisme génétique de l'*UGT 1A9* n'a pas pu être associé à des variations des concentrations sanguines du MPAG. En revanche, la mutation G-840A de l'*UGT 2B7* semble à l'origine d'une exposition variable à l'AcMPAG, métabolite suspecté d'être à l'origine d'une part de la toxicité du MMF. Nous avons mis en évidence chez des patients transplantés rénaux des différences d'exposition au MPA et à ses métabolites en fonction de l'immunosuppresseur associé (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus). Elles impliquent vraisemblablement deux interactions différentes : un effet de la ciclosporine sur l'excrétion biliaire des métabolites du MPA et un effet du tacrolimus sur la pharmacocinétique du MPA, dont la nature exacte reste à étudier. Enfin, à partir de résultats obtenus *in vitro* nous suggérons que l'interaction métabolique existant entre la ciclosporine et le sirolimus fait essentiellement intervenir le CYP 3A4. Le CYP 3A5, qui contribue largement à la biodisponibilité de la molécule lorsqu'il est exprimé, n'interviendrait que de façon minoritaire dans cette interaction.

Mots-clés : immunosuppresseurs, métabolisme, interactions pharmacocinétiques, pharmacogénétique, spectrométrie de masse

Abstract

The immunosuppressive drugs have a narrow therapeutic window and thus require Therapeutic Drug Monitoring (TDM). Metabolism could lead to changes in drug exposure as well as to drug-drug interactions. It should be considered for the choice of drug combination and dosages. This work focuses on the metabolism of mycophenolic acid (MPA, the active moiety of mycophenolate mofetil, Cellcept ®) and drug-drug interactions between immunosuppressive drugs. MPA phase I and phase II metabolic pathways were characterized *in vitro* (metabolites, enzyme isoforms, tissue locations). These studies showed that UGT 1A9 and UGT 2B7 are the main contributors to the production of the two main MPA metabolites (MPA-phenyl-glucuronide, MPAG and MPA-acyl-glucuronide, AcMPAG). *UGT 1A9* genetic polymorphism was not associated with changes in MPAG plasma concentrations. On the contrary, the *UGT 2B7* G-840A mutation influenced AcMPAG exposure, a metabolite presumably responsible for a part of MMF toxicity. In renal transplant patients, we observed variations in the exposure to MPA and metabolite, depending on the immunosuppressive drug associated (cyclosporin, tacrolimus, or sirolimus). This seems to involve two different interactions: an effect of cyclosporin on MPAG biliary excretion as well as an effect of tacrolimus on MPA pharmacokinetics (of which the mechanism remains to be explored). Finally, based on *in vitro* experiments, we suggest that the metabolic interaction between cyclosporin and sirolimus mainly involves CYP 3A4. CYP 3A5, which largely contributes to sirolimus bioavailability (when expressed), would only play a minor role in this interaction.

Key-words: immunosuppressive drugs, metabolism, pharmacokinetic interactions, pharmacogenetics, mass spectrometry

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
---------------------	-----------

PARTIE 1 : METHODES D'ETUDE DU METABOLISME DES MEDICAMENTS	19
---	-----------

I. PLACE DES ETUDES DE METABOLISME EN PHARMACOLOGIE	20
II. MODELES BIOLOGIQUES D'ETUDE DU METABOLISME	22
II-1. Fractions sub-cellulaires	22
II-1-1. Microsomes	22
II-1-2. Fraction S9	23
II-1-3. Fraction cytosolique	24
II-2. Culture cellulaire	24
II-2-1. Hépatocytes et lignées cellulaires hépatiques	24
II-2-1-1. Culture primaire d'hépatocytes	24
II-2-1-2. Lignées cellulaires hépatiques	25
II-2-2. Lignées cellulaires transgéniques	25
II-3. « Slices »	26
II-4. Enzymes recombinantes	26
III. METHODES D'ETUDE DU METABOLISME <i>IN VITRO</i>	28
III-1. Identification des métabolites et des voies métaboliques	28
III-2. Identification des isoformes enzymatiques impliquées dans une réaction métabolique	28
III-2-1. Utilisation des enzymes recombinantes	29
III-2-1-1. Test de compétence	29
III-2-1-2. Extrapolation des résultats	29
III-2-2. Etude d'inhibitions spécifiques	34
III-2-3. Test de corrélation	35
III-3. Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme	36
IV. EXTRAPOLATION <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	37
IV-1. Etude de cinétique enzymatique	37
IV-1-1. Optimisation des conditions expérimentales	37
IV-1-2. Détermination des paramètres de la cinétique enzymatique	38

IV-1-2-1. Cinétiques Michaeliennes _____	38
IV-1-2-2. Cinétiques atypiques _____	40
IV-1-3. Choix du modèle _____	40
IV-1-4. Interprétation et extrapolation _____	41
IV-1-4-1. Clairance intrinsèque (Cl_{int}) _____	41
IV-1-4-2. Cas particulier des cinétiques atypiques _____	42
IV-1-5. Méthode de la demi-vie <i>in vitro</i> _____	43
IV-1-6. Extrapolation de la clairance métabolique <i>in vivo</i> _____	45
IV-2. Prédiction des interactions médicamenteuses _____	46
IV-2-1. Interactions par inhibition enzymatique _____	46
IV-2-1-1. Les différents types d'inhibition _____	46
IV-2-1-2. Evaluation <i>in vitro</i> d'une interaction médicamenteuse par inhibition _____	48
IV-2-2. Interactions par induction enzymatique _____	52
V. METHODES ANALYTIQUES _____	53
V-1. Evolution des techniques analytiques _____	53
V-2. Utilisation de la spectrométrie de masse dans les études de métabolisme _____	55
V-2-1. Recherche de métabolites inconnus _____	55
V-2-1-1. Utilisation de la spectrométrie simple masse (LC-MS) _____	55
V-2-1-2. Utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) _____	57
V-2-2. Etude structurale des métabolites _____	58
V-2-3. Couplage de la détection et de l'étude structurale des métabolites (Acquisition dépendante de l'information) _____	60
V-2-4. Etude quantitative _____	61

PARTIE 2 : METABOLISME ET INTERACTIONS METABOLIQUES DES IMMUNOSUPPRESSEURS _____	62
---	-----------

I. METABOLISME DES IMMUNOSUPRESSEURS _____	63
I-1. Métabolisme du mycophénolate mofétil _____	63
I-2. Métabolisme des inhibiteurs de la calcineurine _____	66
I-2-1. Métabolisme de la ciclosporine _____	66
I-2-2. Métabolisme du tacrolimus _____	67
I-3. Métabolisme des inhibiteurs de la m-TOR _____	68
I-3-1. Métabolisme du sirolimus _____	68
I-3-2. Métabolisme de l'évérolimus _____	69

II.	INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE IMMUNOSUPPRESSEURS	70
II-1.	Interactions métaboliques avec le mycophénolate mofétile _____	70
II-1-1.	Interactions entre le mycophénolate et les inhibiteurs de la calcineurine __	70
II-1-2.	Interaction entre le mycophénolate et les inhibiteurs de la m-TOR _____	72
II-2.	Interactions métaboliques entre les inhibiteurs de la calcineurine et ceux de la m-TOR _____	72
II-2-1.	Interaction entre le sirolimus ou l'évérolimus et la ciclosporine _____	72
II-2-2.	Interactions entre le sirolimus et le tacrolimus _____	74
II-2-3.	Interactions métaboliques impliquant les corticostéroïdes _____	74

PARTIE 3 : TRAVAUX PERSONNELS	76
--------------------------------------	-----------

I.	INTRODUCTION	77
-----------	---------------------	-----------

II.	ETUDE DE METABOLISME <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DU MYCOPHENOLATE MOFETIL	79
------------	--	-----------

II-1.	Identification des métabolites et des voies métaboliques du MPA _____	79
-------	---	----

(Articles 1, 2 et lettre à l'éditeur)

II-2.	Influence du polymorphisme des UGT 1A9 et 2B7 sur le métabolisme du MPA chez des patients transplantés renaux _____	84
-------	---	----

II-2-1.	Matériel et méthodes _____	85
---------	----------------------------	----

II-2-1-1.	Patients et pharmacocinétique _____	85
-----------	-------------------------------------	----

II-2-1-2.	Dosages du MPA et de ses métabolites _____	85
-----------	--	----

II-2-1-3.	Génotypage _____	86
-----------	------------------	----

II-2-1-4.	Analyse de la distribution allélique _____	86
-----------	--	----

II-2-1-5.	Calcul et analyse statistique _____	87
-----------	-------------------------------------	----

II-2-2.	Résultats _____	87
---------	-----------------	----

II-2-3.	Discussion et perspectives _____	90
---------	----------------------------------	----

III.	ETUDES DES INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE MEDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS	92
-------------	--	-----------

III-1.	Anticalcineurines, sirolimus, évérolimus et métabolisme du MPA _____	92
--------	--	----

III-1-1.	Etude des interactions pharmacocinétiques <i>in vivo</i> entre le mycophénolate et la ciclosporine ou le sirolimus et des voies métaboliques potentiellement impliquées _____	92
----------	---	----

(Article 3)

III-1-2.	Tacrolimus et métabolisme du MPA	95
III-1-2-1.	Méthode	95
III-1-2-2.	Résultats et discussion	96
III-2.	MPA et métabolisme des anticalcineurines	104
III-2-1.	Contexte, résultats préliminaires et objectifs	104
III-2-2.	Matériel et méthode	105
III-2-2-1.	Réactifs et microsomes	105
III-2-2-2.	Protocole expérimental	105
III-2-2-3.	Etude <i>in vivo</i> de l'interaction MPA/tacrolimus	106
III-2-2-4.	Méthodes analytiques	106
III-2-2-5.	Calculs et interprétation	107
III-2-3.	Résultats	108
III-2-3-1.	Effet <i>in vitro</i> du MPA sur le métabolisme du tacrolimus par des microsomes humains et les CYP 3A4 et 3A5	108
III-2-3-2.	Relation entre l'exposition au MPA et celle au tacrolimus	109
III-2-4.	Discussion	112
III-3.	Interaction métabolique du sirolimus avec la ciclosporine	115
III-3-1.	Contexte et objectifs	115
III-3-2.	Matériel et méthodes	115
III-3-2-1.	Réactifs et préparations microsomales	115
III-3-2-2.	Protocole général d'incubation avec les microsomes	116
III-3-2-3.	Inhibition des CYP 3A par la troléandomycine	117
III-3-2-4.	Etude de l'interaction sirolimus/ciclosporine <i>in vitro</i>	117
III-3-2-5.	Méthodes analytiques	117
III-3-2-6.	Analyse des résultats	118
III-3-3.	Résultats	119
III-3-4.	Discussion et perspectives	124
IV.	CONCLUSION	128

DISCUSSION GENERALE	130
----------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
------------------------------------	------------

Liste des figures

- Figure II-1** : illustration de l'isolement des fractions sub-cellulaires _____ 22
- Figure II-2** : comparaison de l'activité de 6-beta-hydroxylation de la testostérone entre des microsomes hépatiques humains (A ; activité fixée à 1) et des enzymes recombinantes produites à partir de lymphoblastes (B) ou de cellules d'insecte (C). _____ 27
- Figure IV-1** : courbes représentant la vitesse de biotransformation (v) en fonction de la concentration de substrat (S) et les transformations de Eadie-Hofstee correspondantes pour des profils Michaeliens à une (A) ou deux enzymes (B); d'auto-activation (C) ou d'auto-inhibition (D). _____ 39
- Figure IV-2** : graphique d'inhibition de Dixon (A, B, C) et de Lineweaver-Burk (D, E, F) pour une inhibition compétitive (A, D), non-compétitive (B, E) ou incompétitive (C, F). ___ 50
- Figure I-1** : structure du mycophénolate mofétil (MMF) _____ 63
- Figure I-2** : métabolisme de l'acide mycophénolique _____ 64
- Figure II-1** : AUC_{0-9h} d'AcMPAG (brutes et pondérées par la dose de MMF) et ratio d' AUC AcMPAG/MPA en fonction du génotype de l'UGT 2B7 (G-840A) chez des patients recevant MMF et sirolimus ou MMF et ciclosporine _____ 88
- Figure II-2** AUC_{0-9h} de MPAG (brutes et pondérées par la dose de MMF) et ratio d' AUC MPAG/MPA en fonction du génotype de l'UGT 1A9*3 chez des patients recevant MMF et sirolimus ou MMF et ciclosporine _____ 89
- Figure III-1** : courbes de concentrations moyennes en fonction du temps de MPA, MPAG, AcMPAG et MPAGls rapportées à la dose de MMF pour les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine (cercle plein), au sirolimus (cercle vide) ou au tacrolimus (croix) _____ 100
- Figure III-2** : comparaison des ratios métaboliques (AUC_{0-9h} métabolite/ AUC_{0-9h} MPA) entre les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine, au sirolimus ou au tacrolimus _____ 100
- Figure III-3** : AUC_{0-9h} de MPA rapportées à la dose de MMF pour des patients co-traités avec de la ciclosporine (n=19), du sirolimus (n=12) ou du tacrolimus (n=10) _____ 101

Figure III-4 : métabolisme hépatique microsomal du tacrolimus en fonction du temps en présence de concentrations croissantes de MPA	108
Figure III-5 : inhibition par le MPA de la clairance intrinsèque de métabolisme du tacrolimus. Chaque point représente la moyenne des Cl_{int} estimées à partir de deux incubations différentes par la méthode de la demi-vie in vitro	108
Figure III-6 : métabolisme du tacrolimus par les CYP 3A4 et 3A5 et influence du MPA (10 mg/l). Les valeurs de Cl_{int} ont été estimées à partir de la méthode de la demi-vie in vitro et sont les moyennes de trois incubations différentes	109
Figure III-7 : relations entre les doses de tacrolimus et les AUC (A) ou C_{max} de MPA (B), chez 10 patients transplantés rénaux (38 cinétiques) durant le premier mois post-tranplantation	110
Figure III-8 : relations entre la clairance apparente du MPA et les AUC (A), C_{max} (B) ou doses de tacrolimus (C) obtenues chez 10 patients transplantés rénaux durant le premier mois post-tranplantation	111
Figure III-9 : spectres de fragmentation MS/MS et chromatogrammes des transitions MRM du sirolimus et de ses métabolites hydroxylé (OH-SIR) et déméthylé (DES-SIR) produits par les microsomes humains	120
Figure III-10 : métabolisme microsomal hépatique du sirolimus : cinétiques enzymatiques de formation du métabolite hydroxylé (OH-SIR) et du métabolite déméthylé (DES-SIR) (HAUT) et cinétique de disparition du sirolimus en fonction de la durée d'incubation (BAS)	121
Figure III-11 : cinétiques enzymatiques de formation du métabolite hydroxylé du sirolimus (OH-SIR) par les CYP 3A4 et CYP3A5 recombinants	122
Figure III-12 : inhibition du métabolisme microsomal hépatique du sirolimus par des concentrations croissantes de ciclosporine. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à un contrôle sans ciclosporine	123
Figure III-13 : métabolisme du sirolimus par les CYP 3A4 et 3A5, et influence de la ciclosporine (750 ng/ml). Les Cl_{int} ont été estimées par la méthode de la demi-vie in vitro à partir de deux séries d'incubations différentes	124

Liste des tableaux

Tableau III-1 : contenu hépatique en CYP chez l'homme, déterminé par des méthodes immunochimiques _____	30
Tableau III-2 : réactions spécifiques pouvant être utilisées pour le calcul des coefficients RAF _____	33
Tableau IV-1 : facteurs d'extrapolation in vitro-in vivo _____	45
Tableau V-1 : réactions métaboliques et changements de masse associés _____	56
Tableau V-2 : caractéristiques de fragmentation MS/MS de quelques métabolites conjugués _____	58
Tableau III-1 : caractéristiques démographiques des patients, fonction rénale et dose de prednisolone _____	97
Tableau III-2 : répartition des doses journalière de MMF _____	97
Tableau III-3 : indices d'exposition au MPA et à ses métabolites rapportés à la dose de MMF _____	98
Tableau III-4 : paramètres cinétiques de la formation des métabolites du sirolimus par des microsomes hépatiques humains _____	121
Tableau III-5 : paramètres cinétiques de la formation de l'hydroxy-sirolimus (OH-SIR) par les CYP 3A4 et 3A5 recombinants _____	122

Liste des publications

Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 600-608.

Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 139-146.

Picard N, Marquet P In vitro study of mycophenolic acid glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 1524 (lettre).

Picard N, Prémaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Marquet P. A comparison of the effect of cyclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients. *Brit J Clin Pharmacol* (sous-presse).

INTRODUCTION

Des premiers essais datant du début du siècle à aujourd'hui, la transplantation d'organe a connu un essor considérable mais répond toujours à autant d'objectifs et de contraintes : il s'agit de sauver un malade irrémédiablement condamné, lui assurer après l'opération une existence la plus normale possible et lui garantir une espérance de vie, sinon égale au moins proche de celle des sujets non transplantés du même âge.

Outre les difficultés techniques liées à l'acte chirurgical, le problème fondamental de la greffe d'organe est sans aucun doute la lutte contre le rejet du greffon, dont peut dépendre la survie du patient. Le greffé, quoique « sauvé », est condamné à un traitement immunosuppresseur à vie, sous une surveillance régulière. L'évolution de la transplantation d'organe a d'ailleurs toujours été subordonnée à celle des traitements immunosuppresseurs. La ciclosporine découverte par Borel en 1972 offre un mécanisme d'action original, l'inhibition de la calcineurine, et a révolutionné la thérapeutique basée jusqu'alors sur l'association de corticoïdes et d'azathioprine après induction par un sérum antilymphocytaire. La ciclosporine est dépourvue d'hématotoxicité et permet de réduire la corticothérapie. Elle est restée longtemps la « pierre angulaire » des protocoles immunosuppresseurs. En 1995, le tacrolimus, lui-même inhibiteur de la calcineurine, a été proposé comme alternative intéressante bien que présentant toujours autant d'effets indésirables. En 1996, le mycophénolate mofétil (MMF), pro-drogue de l'acide mycophénolique (MPA), inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), a été proposé comme alternative à l'azathioprine. Le MPA inhibe, sans incorporation à l'ADN, la synthèse *de novo* des nucléotides à base de guanine, permettant une action sélective sur les cellules lymphocytaires. Récemment deux nouvelles molécules, inhibitrices de la mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ont fait leur apparition. Il s'agit du sirolimus et d'un analogue structural, l'évérolimus. Le sirolimus, non néphrotoxique, est proposé en association à de faibles doses de ciclosporine ou au MMF. L'évérolimus présente une meilleure biodisponibilité et une pharmacocinétique moins complexe avec un profil similaire d'activité et de sécurité (Billaud, 2004). Il est aujourd'hui proposé en association à la ciclosporine.

Il est probable que les innovations thérapeutiques dans ce domaine vont continuer. Il n'en demeure pas moins que la réussite d'un traitement immunosuppresseur passe par une surveillance clinique régulière, mais pas seulement... Dès l'introduction de la ciclosporine dans les schémas immunosuppresseurs, la nécessité d'ajuster la dose de médicament à administrer à chaque individu, pour garantir des concentrations sanguines efficaces et non toxiques, s'est imposée. La ciclosporine est une des premières molécules pour laquelle le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) a été imposé dans les recommandations réglementaires du Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) (Marquet et col., 2004). Le recours au STP est également justifié pour les autres immunosuppresseurs précédemment cités (Billaud et col., 2004; Vidal, 2005), mais aussi le MMF (Marquet et col., 2004).

Par définition, le STP s'intéresse à l'individu et requiert donc une bonne connaissance des facteurs individuels ou contextuels pouvant affecter la pharmacocinétique et secondairement l'activité et/ou la toxicité d'une molécule.

Parmi les facteurs contextuels, certaines pathologies peuvent profondément altérer la pharmacocinétique d'un médicament : la mucoviscidose est à l'origine d'importantes modifications de la pharmacocinétique de la ciclosporine (Saint-Marcoux, 2004), l'insuffisance hépatocellulaire peut affecter sa clairance métabolique, etc. Les comédications, inévitables en transplantation, peuvent être responsables d'interactions médicamenteuses et sont également des facteurs déterminants dans le choix des posologies à administrer. D'autres facteurs spécifiques à l'individu participent à la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique des médicaments. Beaucoup sont des facteurs génétiques, des mutations affectant l'activité d'une enzyme du métabolisme ou d'un transporteur d'efflux.

Comprendre, anticiper et prendre en compte l'influence de ces facteurs, devrait permettre d'individualiser au mieux les posologies des médicaments soumis au STP et en particulier celles des immunosuppresseurs.

Parmi les facteurs pouvant être étudiés de manière plus approfondie, ceux affectant le métabolisme sont en bonne place. Des modèles validés d'étude *in vitro* existent et permettent l'étude des voies enzymatiques participant à l'élimination d'une molécule, les interactions médicamenteuses ou encore les mutations génétiques pouvant l'affecter. Ils

peuvent permettre d'expliquer la survenue d'effets indésirables liés à un métabolite toxique.

Les immunosuppresseurs ont fait l'objet des études de métabolisme qu'imposait la réglementation lors de leur commercialisation. Cependant les données issues de ces travaux ne sont pas toutes publiées ou sont aujourd'hui à compléter : les premières études du métabolisme de la ciclosporine ou du tacrolimus rapportaient l'implication des cytochromes P450 « 3A », mais aujourd'hui c'est plus particulièrement le 3A5, longtemps considéré comme accessoire, qui est au centre des préoccupations. L'évolution des modèles biologiques d'étude du métabolisme et des techniques analytiques permettent actuellement l'étude de voies métaboliques jusqu'alors inaccessibles, méconnues ou délaissées. La glucuroconjugaison par exemple n'a suscité un intérêt que très tardivement par rapport au métabolisme oxydatif. Or, elle participe très largement à l'élimination du MPA et une meilleure connaissance de cette voie métabolique pourrait permettre d'expliquer la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique caractéristique de ce produit (Prémaud, 2004), l'existence d'interactions médicamenteuses et peut-être d'effets secondaires. Il nous semble important que des équipes indépendantes s'impliquent dans les études de métabolisme intervenant après la commercialisation (lorsque celles-ci semblent justifiées), pour permettre « d'actualiser » les données industrielles et pour les prendre éventuellement en compte dans le STP.

C'est dans cette logique que nos travaux ont été consacrés à :

- l'identification des métabolites de phase I et de phase II du MPA,
- l'identification des isoformes d'UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et de cytochromes P450 impliquées dans ces voies métaboliques,
- l'étude *in vitro* et *in vivo* des interactions médicamenteuses pouvant affecter le métabolisme du MPA ou celles dont il pourrait être responsable,
- l'étude de l'activité comparée des CYP 3A4 et 3A5 dans le métabolisme du sirolimus et de l'influence de la ciclosporine sur ce métabolisme.

La première partie de notre thèse présente les différentes méthodes d'étude du métabolisme des xénobiotiques et les techniques analytiques les plus récentes correspondantes. Dans une seconde partie, nous évoquons la connaissance actuelle du métabolisme et des

interactions entre les médicaments immunosuppresseurs. La troisième partie reprend l'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Enfin, la discussion générale envisage les répercussions possibles de ces résultats sur les pratiques thérapeutiques actuelles, sur les techniques d'adaptation individuelle de posologie et les perspectives en matière de validation clinique de ces nouvelles approches.

PARTIE 1 :

**METHODES D'ETUDE DU METABOLISME DES
MEDICAMENTS**

I. PLACE DES ETUDES DE METABOLISME EN PHARMACOLOGIE

Bien que faisant partie intégrante des études pharmacocinétiques, les études de métabolisme représentent une activité à part entière dans le processus de recherche et de développement de nouveaux médicaments. Ces études interviennent avant toute administration à l'homme pour la sélection des molécules à développer avec un enjeu économique et sécuritaire (avant les essais de phase I). Elles permettent de connaître les voies métaboliques empruntées par un médicament et les enzymes qui sont impliqués, et qui pourraient potentiellement être inhibées ou induites par le médicament et/ou ses métabolites, l'existence potentielle de métabolites toxiques. Ces données permettent de comprendre et éventuellement de prédire la pharmacocinétique, la pharmacologie et la toxicologie d'un médicament, administré seul ou en association à d'autres médicaments, pouvant eux-mêmes induire ou inhiber les voies métaboliques identifiées. Elles continuent à apporter des renseignements précieux sur des médicaments déjà commercialisés, permettant d'améliorer leurs modalités d'administration ou leur sécurité d'emploi.

L'intégration des études de métabolisme dans le développement pharmaceutique commence dans les années 50, la préoccupation principale étant alors de rendre compte de l'élimination du produit de l'organisme, principalement par le suivi de produits radio-marqués. L'isolement et l'identification des métabolites sont réalisées accessoirement, principalement à partir d'urines ou de faeces, par des méthodes de cristallisation suivies d'analyse infra-rouge ou de spectrométrie de masse. Ces études restent principalement descriptives, n'apportant pas ou peu d'information sur la localisation du métabolisme, les enzymes impliquées, la régulation du phénomène (White, 1998)

Le développement des études de métabolisme « modernes » est intimement lié à l'intérêt porté aux cytochromes P450 (CYP). Après leur identification dans les années 1960 (Klingenberg, 1958; Omura et Sato, 1962), la démonstration de leur fonction oxydasique et de leur rôle dans le métabolisme des médicaments, Sladek et Manering seront les premiers à démontrer qu'il existe plusieurs CYP grâce à une étude d'induction utilisant le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrène (Sladek et Manering, 1966). Des études

ultérieures, d'isolation et de caractérisation biochimique confirmeront la notion nouvelle d'isoformes enzymatiques. Au début des années 1990, la famille des CYP est bien connue. Les études de comparaison inter-espèces, des variations inter-individuelles, des phénomènes d'induction ou d'inhibition et de la contribution individuelle des CYP se développent et sont intégrées de façon systématique à la recherche pré-clinique.

Les réactions de conjugaison et en particulier la glucuro-conjugaison ont longtemps été considérées comme de simples réactions de détoxification et ont par conséquent suscité moins d'intérêt. Ceci explique probablement la moins bonne connaissance des enzymes de phase II et en particulier des UDP-glucuronyltransférases (UGT) par rapport aux CYP. Il y a en particulier peu de substrats ou d'inhibiteurs spécifiques connus et les isoformes recombinantes des UGT humaines ne sont disponibles que depuis peu. Depuis quelques années, la tendance s'inverse et les travaux sur les UGT augmentent avec l'étude de leur implication dans la variabilité inter-individuelle de réponse aux médicaments, les interactions médicamenteuses ou la survenue d'effets secondaires. Ainsi, la recherche d'acyl-glucuronides et de leur fixation irréversible aux protéines plasmatiques (responsable d'effets secondaires) est maintenant réalisée systématiquement pour les médicaments ayant une fonction acide carboxylique (White, 1998).

La mise en place et la validation de modèles d'étude *in vitro*, facilitant la réalisation des études, et de techniques d'extrapolation des résultats ont fortement contribué au développement des études de métabolisme. Il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes d'études des réactions de phase I ou de phase II, utilisant des modèles biologiques plus ou moins complexes et présentant chacune des avantages ou inconvénients spécifiques. Les principaux de ces modèles et méthodes sont décrits dans les chapitres suivants.

II. MODELES BIOLOGIQUES D'ETUDE DU METABOLISME

Les modèles biologiques utilisés dans les études de métabolisme connaissent un développement permanent et une évaluation croissante. Ils sont pour la plupart disponibles pour plusieurs espèces animales, mais les modèles humains sont toutefois préférés pour faciliter l'extrapolation des résultats à la clinique.

II-1. FRACTIONS SUB-CELLULAIRES

Les fractions sub-cellulaires sont obtenues par broyage tissulaire, lyse cellulaire et centrifugation différentielle.

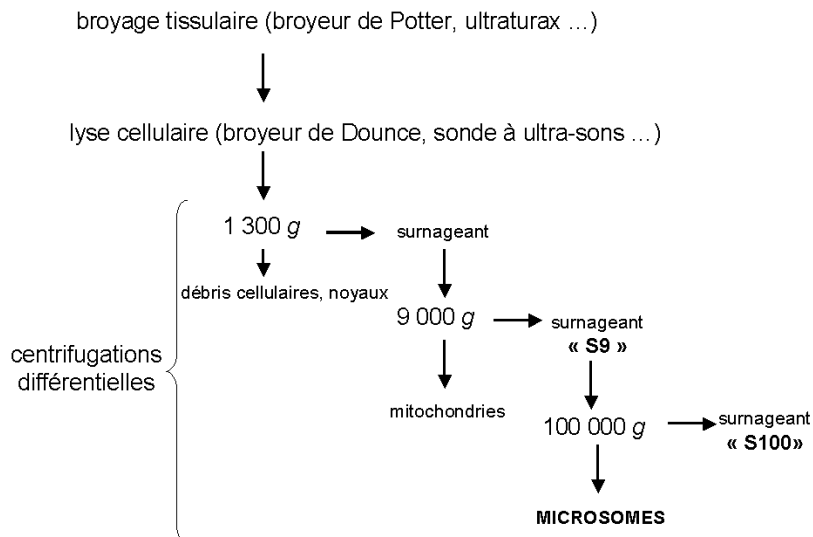


Figure II-1 : illustration de l'isolement des fractions sub-cellulaires

II-1-1. Microsomes

Les microsomes sont des vésicules de réticulum endoplasmique lisse. Ils contiennent les enzymes membranaires (microsomaux) : CYP, mono-oxygénases à flavine, UGT.

L'utilisation de co-facteurs particuliers ou de conditions expérimentales spécifiques permet la sélection de l'enzyme à étudier. Ainsi les mono-oxygénases nécessitent un co-substrat de type NADPH. Les UGT requièrent de l'acide UDP-glucuronique ainsi qu'une activation pour rendre accessible le site actif de l'enzyme, activation obtenue par l'emploi de détergents ou d'alamethicin (Fisher et col., 2001). Les microsomes individuels (préparés à partir d'un échantillon hépatique provenant d'un seul individu) sont à distinguer des microsomes en mélange (préparés à partir d'échantillons provenant de plusieurs individus). Les microsomes en mélange reflètent une activité métabolique moyenne (le nombre de donneurs doit être suffisant). Les microsomes individuels auront des concentrations, et donc des activités enzymatiques, variables. Une banque de microsomes individuels permet notamment d'étudier la corrélation entre le contenu enzymatique et l'activité pour un substrat inconnu ou d'évaluer l'effet de caractéristiques particulières (mutation génétique...) sur le métabolisme d'une molécule à tester.

La préparation de microsomes est assez simple à réaliser et des préparations sont également disponibles commercialement. Les microsomes peuvent être conservés à -80°C pendant plusieurs années sans variation notable de l'activité enzymatique. Les manipulations utilisant des microsomes sont simples à mettre en œuvre. Elles permettent la réalisation de comparaisons inter-espèce, d'identification de métabolites et d'identification d'enzymes impliqués dans une réaction métabolique.

En revanche, les microsomes ne permettent pas d'obtenir un profil métabolique complet en raison de l'absence des enzymes solubles (De Graaf et col., 2002). De plus, les activités métaboliques obtenues à partir de microsomes surestiment souvent la réalité du métabolisme *in vivo*. Les enzymes sont en effet concentrées et en dehors de tout environnement physiologique. Les microsomes ne sont donc pas un modèle à choisir pour l'extrapolation quantitative de clairance métabolique (De Graaf et col., 2002; Brandon et col., 2003).

II-1-2. Fraction S9

Le surnageant de la centrifugation, réalisée avant l'ultra-centrifugation permettant d'obtenir la fraction microsomale (Figure II-1), est appelée fraction S9 (en référence à la force de centrifugation : 9000 g). Le « S9 » contient les enzymes microsomales et les

enzymes cytosoliques (solubles). L'activation des enzymes nécessite, du NADPH pour les CYP, de l'acide UDP-glucuronique pour les UGT, de l'adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate pour les sulfo-transférases, de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), du dithiothréitol et un système régénérateur d'acétyl-CoA pour les N-acétyl-transférases.

Comme les microsomes, le S9 peut se conserver à -80°C pendant plusieurs années. Son contenu enzymatique permet d'évaluer une activité métabolique globale. Cette fraction est particulièrement intéressante pour l'étude de réactions séquentielles (phase I/phase II).

L'activité enzymatique de ce type de préparation est toutefois inférieure à celle pouvant être obtenue avec des microsomes (pour les enzymes microsomales) ou du cytosol (pour les enzymes solubles) (Brandon et col., 2003).

II-1-3. Fraction cytosolique

La surnageant restant après sédimentation des microsomes par ultra-centrifugation à 100000 g correspond au cytosol ou « S100 ». Cette fraction contient trois enzymes solubles de phase II : les N-acétyltransférases, glutathion-S-transférases et sulfo-transférases. Ces enzymes fonctionnent après apport de leur co-substrat respectif. La fraction cytosolique est disponible commercialement pour la plupart des espèces animales.

L'avantage principal de cette préparation est de disposer des trois enzymes solubles de phase II à des concentrations supérieures par rapport au S9 et de pouvoir étudier spécifiquement chacune de ces enzymes en fonction du co-substrat utilisé.

II-2. CULTURE CELLULAIRE

II-2-1. Hépatocytes et lignées cellulaires hépatiques

II-2-1-1. Culture primaire d'hépatocytes

L'isolation d'hépatocytes à partir de foies entiers d'animaux par perfusion à la collagénase date de 1967 (Howard et col., 1967). Cette méthode a ensuite été adaptée à des prélèvements de foies humains (Strom et col., 1982). Une fois isolés les hépatocytes

peuvent être maintenus en suspension pendant quelques heures ou en culture mono-couche pendant au maximum 4 semaines (Brandon et col., 2003). Cependant, des phénomènes de dé-différentiation avec perte des activités métaboliques et d'inductibilité interviennent assez rapidement (Donato et Castell, 2003). Pour pallier cet inconvénient, des méthodes de cryo-conservation des hépatocytes ont été développées (Guillouzo et col., 1999) et permettent de disposer de lots d'hépatocytes de sources identiques. Ce type de préparation est disponible commercialement.

La culture primaire d'hépatocytes est considérée comme un des meilleurs modèles *in vitro* d'étude du métabolisme en particulier pour la prédiction de la clairance intrinsèque et des interactions médicamenteuses *in vivo* (Houston et Carlile, 1997). Les hépatocytes contiennent l'ensemble des enzymes de phase I et de phase II, permettant une étude globale du métabolisme d'un médicament avec prise en compte du passage intra-cellulaire. Les phénomènes d'induction enzymatique, ou de cytotoxicité peuvent également être évalués.

II-2-1-2. Lignées cellulaires hépatiques

Des lignées d'adénomes ou de carcinomes hépatiques ont été développées comme alternative à la culture primaire d'hépatocytes (HepG2, BC2 ...). Elles ont l'avantage d'une culture facile avec des concentrations en enzymes du métabolisme relativement stables, mais présentent, dans la plupart des cas une faible activité enzymatique constitutive (Wilkening et col., 2003) avec un profil enzymatique incomplet, largement influencé par le milieu de culture (Brandon et col., 2003). L'INSERM a récemment caractérisé une lignée (HepaRG) au phénotype très proche des hépatocytes (Gripon et col., 2002) et exprimant les enzymes du métabolisme en quantité proche des hépatocytes natifs, ainsi que les récepteurs nucléaires permettant l'induction.

II-2-2. Lignées cellulaires transgéniques

La transfection cellulaire peut être utilisée pour obtenir des cellules exprimant de façon stable les enzymes du métabolisme à des niveaux d'expression importants.

Des lignées cellulaires transfectées existent pour l'ensemble des CYP humains impliqués dans le métabolisme des médicaments et pour la plupart des UGT humaines.

Ce modèle permet de disposer en culture de cellules exprimant spécifiquement chacune des isoformes enzymatiques pour étudier leur rôle spécifique dans une réaction enzymatique. Il peut également être utilisé pour produire des métabolites et réaliser leur étude structurale ou le test de leurs propriétés pharmacologiques (Brandon et col., 2003).

II-3. « SLICES »

L'utilisation de « micro-tranches » hépatiques est restée longtemps impopulaire en raison de la variabilité des résultats. La mise au point de microtomes de haute précision, permettant l'obtention de tranches fines (250 µm) et d'épaisseur régulière de façon reproductible a donné une nouvelle impulsion à cette technique (Brandon et col., 2003). Ce modèle est très proche de la situation *in vivo*. L'ensemble des enzymes du métabolisme est exprimé et l'environnement tissulaire est conservé (jonctions cellulaires, transporteurs, ...). Il a été utilisé dans de nombreuses études de métabolisme avec des résultats très pertinents (Ekins, 1996). L'architecture complexe de ce modèle qui limite la diffusion du substrat au centre de la tranche, est cependant à l'origine d'une activité métabolique plus faible que celle pouvant être observée avec les hépatocytes (De Graaf et col., 2002). Ceci peut être compensé par des durées d'incubation plus longues (allant jusqu'à 24 heures). Ce modèle est une alternative à la culture d'hépatocytes pour les études d'induction (Edwards et col., 2003). L'absence de technique de cryoconservation limite les applications à grande échelle de ce modèle.

II-4. ENZYMES RECOMBINANTES

Les préparations microsomales contenant les isoformes enzymatiques humaines recombinantes de manière individuelle sont très utiles pour l'évaluation de l'activité d'isoformes enzymatiques (Crespi et Miller, 1999). Les enzymes recombinantes sont obtenues par des méthodes conventionnelles de préparation des microsomes à partir de différents systèmes d'expression transfectés : des bactéries (*Escherichia coli*), des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), des cellules d'insectes et des cellules de mammifères (lymphoblastes). Ces systèmes permettent l'expression d'une seule enzyme ou, dans le cas des CYP, associée à un partenaire oxydo-réducteur : cytochrome oxydoréductase et cytochrome *b5*.

Les enzymes recombinantes sont disponibles commercialement pour la plupart des enzymes du métabolisme (CYP et UGT). Ce modèle permet l'étude d'enzymes faiblement exprimées *in vivo*.

Les vitesses de biotransformation observées avec les enzymes recombinantes sont souvent très différentes de celle observées avec les microsomes hépatiques. Les activités diffèrent également d'un système d'expression à l'autre, les enzymes issues de cellules d'insectes étant la plupart du temps plus actives que celle exprimées à partir de lymphoblastes (Figure II-2). Ces différences ne sont pas liées à l'enzyme elle-même mais à son environnement proche, en particulier la différence de quantité de partenaire oxydo-réducteur (cytochrome *b5*, NADPH cytochrome P450 oxydo-reductase) et la composition de la membrane lipidique (Rommel et Burchell, 1993; Crespi et Miller, 1999) pour les CYP. De plus, dans ce modèle, un seul cytochrome interagit avec les partenaires oxydo-réducteur alors que dans le cas de microsomes hépatiques, il y a compétition entre plusieurs CYP et ces partenaires.

Des méthodes d'extrapolation ont été développées pour pallier à cet inconvénient (cf. paragraphe III-2-1-2).

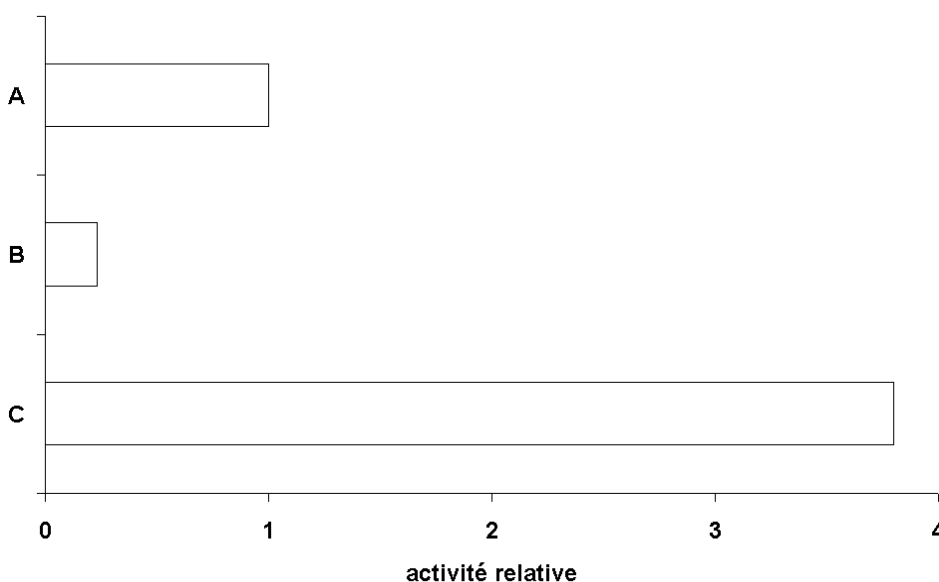


Figure II-2 : comparaison de l'activité de 6-beta-hydroxylation de la testostérone entre des microsomes hépatiques humains (A ; activité fixée à 1) et des enzymes recombinantes produites à partir de lymphoblastes (B) ou de cellules d'insecte (C). Données issues de BD Biosciences GENTEST.

III. METHODES D'ETUDE DU METABOLISME

IN VITRO

III-1. IDENTIFICATION DES METABOLITES ET DES VOIES METABOLIQUES

In vitro, l'identification des métabolites peut être réalisée à partir d'incubations utilisant des préparations hépatiques humaines. Le choix des modèles et/ou des co-substrat permettra l'identification du type de voies métaboliques (phase I ou phase II). Des modèles plus complet (hépatocytes, slices) permettent une approche globale. L'identification structurale des métabolites passe par des techniques analytiques spécifiques détaillées au chapitre V.

III-2. IDENTIFICATION DES ISOFORMES ENZYMATIQUES IMPLIQUEES DANS UNE REACTION METABOLIQUE

Lorsque les métabolites sont identifiés, l'étude des isoformes de CYP ou d'UGT participant à leur production est nécessaire. La nature et le nombre des isoformes enzymatiques impliquées dans une réaction métabolique influencent la variabilité inter-individuelle. Par ailleurs, la connaissance des voies métaboliques peut permettre d'anticiper un risque d'interactions médicamenteuses.

Les différentes approches utilisées à l'heure actuelle pour l'étude de l'implication des CYP ont été développées à la fin des années 80. A cette époque, les méthodes d'étude étaient encore peu rodées. Il était difficile de trouver des inhibiteurs spécifiques pour l'ensemble des isoformes enzymatiques et les modèles biologiques (enzymes recombinantes) n'étaient que peu développés. Il était alors de rigueur de combiner plusieurs approches (test d'inhibition, test de corrélation d'activités microsomaux ...) pour garantir la fiabilité des résultats. D'après Lu et col., la qualité et la disponibilité des « outils » ayant été nettement améliorées, la multiplication des approches ne serait plus une nécessité absolue, dès lors que les modèles sont utilisés de façon rigoureuse (Lu et col., 2003). Certaines approches

seraient plus pertinentes que d'autres. Pour les UGT beaucoup de progrès restent à faire en raison du manque de connaissance de cette famille enzymatique.

III-2-1. Utilisation des enzymes recombinantes

III-2-1-1. Test de compétence

Les enzymes recombinantes sont très utiles dans l'identification d'isoformes enzymatiques compétentes pour une réaction métabolique. Le substrat à tester est incubé avec chacune des isoformes, individuellement et à une seule concentration. Si une seule isoforme enzymatique est active, l'interprétation est facilitée. Si au contraire plusieurs isoformes sont actives, l'interprétation est plus délicate : la mesure de la vitesse de formation du métabolite (ou de consommation du produit parent) par les isoformes actives ne suffit pas pour conclure sur leurs implications relatives.

Les enzymes recombinantes peuvent également être utilisées de façon quantitative. Les paramètres de la cinétique enzymatique (K_m , V_{max} , Cl_{int}) peuvent être calculés. Le K_m apparent d'une enzyme recombinante reflète bien l'affinité de l'enzyme pour le substrat *in vivo* quel que soit le système d'expression (Crespi et Miller, 1999). Des valeurs proches de K_m entre une isoforme recombinante et des microsomes peuvent être utilisées comme argument pour confirmer l'implication unique ou majoritaire de cette isoforme. Cependant, les différences d'activité entre microsomes hépatiques et enzymes recombinantes nécessitent d'utiliser des méthodes d'extrapolation pour interpréter de façon pertinente des résultats obtenus.

III-2-1-2. Extrapolation des résultats

L'activité microsomale hépatique d'une isoforme individuelle pourra être estimée à partir des résultats obtenus par utilisation d'une enzyme recombinante. La plupart de ces méthodes concernent les CYP. En effet le manque d'information sur la spécificité des substrats, la localisation et la quantité respective des isoformes d'UGT fait défaut et limite l'extrapolation des résultats obtenus avec cette famille enzymatique.

III-2-1-2-1. Méthode du contenu relatif en enzyme

Une des méthodes les plus simples pour transposer *in vivo* l'activité d'une isoforme spécifique *in vitro* consiste à multiplier le taux de formation du métabolite obtenu avec l'enzyme recombinante exprimé par unité d'enzyme (pmole), par la quantité de cette enzyme présente en moyenne dans des microsomes hépatiques humains (Q_i). Bien qu'une grande variabilité existe, la quantité moyenne d'isoformes de CYP peut être obtenue à partir de la littérature (Tableau III-1) (Guengerich et Turvy, 1991; Shimada et col., 1994).

Tableau III-1 : contenu hépatique en CYP chez l'homme, déterminé par des méthodes immunochimiques (Shimada et col., 1994)

Cytochromes	Quantité (pmoles/mg de protéine)
CYP 1A2	42
CYP 2A6	14
CYP 3A	96
CYP 2B6	1
CYP 2C	60
CYP 2D6	5
CYP 2E1	22

La somme linéaire des activités observées pour chaque isoforme active (i) permet d'estimer l'activité hépatique totale (Équation 1).

$$V(S) = \sum_{i=1}^n Q_i V_i(S)$$

Équation 1

Le pourcentage de contribution relative (CR) de chaque isoforme (i) pourra alors être estimé par l'équation 2.

$$CR_i = \frac{Q_i V_i(S)}{\sum_{i=1}^n Q_i V_i(S)} \times 100$$

Équation 2

L'inconvénient majeur de cette méthode est lié aux différences d'activité existantes entre microsomes hépatiques et enzymes recombinantes dont le coefficient Q ne tient pas compte.

III-2-1-2-2. Méthode RAF

Une approche utilisant des facteurs d'activité relative (RAF, relative activity factors) a été développée pour corriger les différences d'activité entre les enzymes recombinantes et microsomes hépatiques (Crespi et Miller, 1999; Venkatakrishnan et col., 2001a; Venkatakrishnan et col., 2001b).

Cette méthode implique la mesure de l'activité métabolique de microsomes hépatiques humains et d'une isoforme enzymatique pour un substrat spécifique de cette isoforme. Le coefficient RAF de l'isoforme (i) est calculé par le rapport de l'activité observée avec les microsomes et celle observée avec l'enzyme recombinante, les deux activités étant exprimées dans la même unité (pmol/mg de protéine/min) (Équation 3; Tableau III-2).

Pour que le coefficient RAF soit le plus pertinent possible, il est recommandé d'utiliser des microsomes préparés à partir de multiples donneurs ou des activités moyennes obtenues à partir de plusieurs préparations individuelles (Crespi et Miller, 1999).

$$RAF_i = \frac{\text{activité de microsomes humains pour un substrat spécifique de } i}{\text{activité de } i \text{ recombinante pour son substrat spécifique}}$$

Équation 3

$$V(S) = \sum_{i=1}^n RAF_i V_i(S)$$

Équation 4

$$CR_i = \frac{RAF_i V_i(S)}{\sum_{i=1}^n RAF_i V_i(S)} \times 100$$

Équation 5

L'activité obtenue avec une enzyme recombinante pour un substrat à tester sera multipliée par le coefficient RAF de l'isoforme. L'activité calculée reflétera l'activité microsomale moyenne liée à cette isoforme. Si l'enzyme recombinante est plus active que les microsomes hépatiques, le coefficient RAF sera inférieur à 1, l'activité observée pour un substrat à tester sera pondérée. Si au contraire, l'activité de l'enzyme recombinante est inférieure à celle de microsomes hépatique, le coefficient RAF sera supérieur à 1, il permettra d'augmenter l'activité observée pour le substrat testé.

La méthode RAF peut également être directement appliquée à la clairance intrinsèque.

Les substrats sondes utilisés pour le calcul des coefficients RAF doivent être parfaitement spécifiques de l'isoforme étudiée dans les conditions expérimentales. Ce type de substrat sonde existe pour les CYP(Tableau III-2), ce n'est pas le cas pour l'ensemble des UGT.

Tableau III-2 : réactions spécifiques pouvant être utilisées pour le calcul des coefficients RAF (Donato et Castell, 2003)

Cytochromes P450	substrat	réactions
CYP 1A2	phénacétine	o-déséthylation
CYP 2A6	coumarine	7-hydroxylation
CYP 3A4	testostérone	6- β -hydroxylation
	midazolam	1-hydroxylation
CYP 2B6	(S)-méphénytoïne	N-déméthylation
CYP 2C8	paclitaxel	6- α -hydroxylation
CYP 2C9	diclofénac	4-hydroxylation
CYP 2C18	-	-
CYP 2C19	(S)-méphénytoïne	4-hydroxylation
CYP 2D6	bufuralol	1-hydroxylation
CYP 2E1	chlozoxazone	6-hydroxylation

La méthode RAF prend en compte à la fois le contenu hépatique en enzyme (de façon indirecte) et les différences d'activité entre les microsomes et le système recombinant.

Elle permet de calculer des paramètres cinétiques reflétant l'activité d'une isoforme enzymatique *in vivo*. Cette méthode est également très utile pour déduire l'implication respective des CYP dans une réaction métabolique.

Un étude réalisée dans le laboratoire nous a permis de comparer l'approche RAF et l'influence d'inhibiteurs spécifiques pour l'étude de l'implication des CYP 3A4 et 2C8 dans le métabolisme de la buprénorphine (Picard et col., 2005a). Les résultats se sont révélés parfaitement identiques. D'autres travaux ont validé cette méthode (Venkatakrisnan et col., 2001a; Projean et col., 2003).

La méthode RAF autorise l'utilisation de préparations enzymatiques issues de systèmes d'expression différents, ce qui limite les problèmes de disponibilité des enzymes recombinantes (qui ne sont pas toujours toutes disponibles dans un même système d'expression).

III-2-2. Etude d'inhibitions spécifiques

Cette approche nécessite l'utilisation d'agents inhibiteurs spécifiques et puissants, qu'il s'agisse d'anticorps ou d'inhibiteurs chimiques. Elle peut être utilisée avec des fractions sub-cellulaires ou éventuellement en culture cellulaire à la condition que l'inhibiteur utilisé soit non cytotoxique et facilement transporté dans la cellule. L'inhibition microsomale d'une isoforme par un inhibiteur spécifique renseignera sur l'implication et la contribution relative de cette isoforme dans le métabolisme microsomal global.

Les problèmes ou difficultés potentiellement rencontrés dans ce type d'étude sont :

- le manque de spécificité des inhibiteurs : il est nécessaire que la concentration inhibant 50% de l'activité d'une isoforme (CI_{50}) soit 100 fois plus faible que pour les autres isoformes ;
- le manque de puissance inhibitrice : inhibition incomplète à des concentrations assurant la spécificité ;
- Des problèmes d'interférences chromatographiques si la technique analytique n'est pas suffisamment spécifique.

Beaucoup de molécules inhibitrices spécifiques d'isoformes de CYP sont disponibles (Donato et Castell, 2003) et sont très largement utilisées dans les études de métabolisme *in vitro*, avec un recul qui permet d'assurer la pertinence de cette approche. Il existe également dans le commerce des anticorps dirigés contre une séquence protéique proche ou correspondant au site de liaison du substrat à l'enzyme. Leur utilisation est moins répandue en raison du coût important engendré pour un intérêt limité par rapport aux inhibiteurs chimiques (Lu et col., 2003).

Pour les UGT, ce type d'approche est moins fréquent. Les isoformes recombinantes étant désormais disponibles pour la quasi-totalité des UGT, l'identification d'inhibiteurs

spécifiques devrait être facilitée. Actuellement, les inhibiteurs utilisés sont des substrats qui ne possèdent pas forcément une forte activité inhibitrice. La bilirubine est souvent utilisée comme substrat inhibiteur de l'UGT 1A1 (Hagenauer et col., 2001; Williams et col., 2002), l'acide méfénamique (Wynalda et col., 2003) et le propofol (Hagenauer et col., 2001) pour l'UGT 1A9, la buprénorphine pour l'UGT 1A3, Le naphtol pour l'UGT 1A6 et l'imipramine pour l'UGT 1A4 (Wynalda et col., 2003).

Les éléments critiques à optimiser avec le test d'inhibition sont les concentrations de substrats et d'inhibiteurs ainsi que les concentrations de solvants. Les solvants utilisés (acétonitrile, diméthyl sulfoxyde, méthanol, éthanol), peuvent stimuler ou diminuer à eux seuls l'activité de certaines enzymes (UGT ou CYP 450) (Chauret et col., 1998; Busby et col., 1999). Deux isoformes de la même famille enzymatique peuvent réagir différemment à un même solvant : le DMSO (1%) inhibe 80 % de l'activité microsomale du CYP 2E1, alors qu'il est sans effet sur les CYP 2A6, 2D6, 3A4 (Hickman et col., 1998). L'acétonitrile est le solvant ayant le moins de conséquence sur l'activité des CYP (Chauret et col., 1998; Easterbrook et col., 2001). Pour les UGT, en revanche ce solvant ainsi que l'éthanol sont à éviter. Le DMSO suivi du méthanol semble être les solvants de choix pour cette famille enzymatique (Dehal et col., 2002). Dans tous les cas il est recommandé, si possible, de limiter le volume de solvant à 1% du volume d'incubation final et d'ajouter aux incubations contrôles une quantité de solvant identique.

III-2-3. Test de corrélation

Le test de corrélation nécessite l'utilisation d'une banque de microsomes individuels. Pour chaque préparation les activités spécifiques des isoformes enzymatiques sont connues. Des corrélations sont recherchées entre les activités de chaque isoforme et la vitesse de biotransformation du médicament à tester. Une corrélation significative démontre l'implication de l'isoforme testée.

Une autre approche consiste à rechercher une corrélation entre la quantité d'isoforme déterminée par technique de Western Blot et la vitesse de biotransformation du substrat.

Pour être pertinent le test de corrélation doit être réalisé avec une banque d'au moins 10 préparations individuelles. Les résultats de ce type d'étude confirment le plus souvent les résultats obtenus à partir d'autres tests (test de compétence, test d'inhibition). Cependant

des incohérences sont parfois décrites. Elles peuvent être liées à des spécificités de substrat chevauchantes (Venkatakrishnan et col., 2001c).

III-3. PHARMACOGENETIQUE DES ENZYMES DU METABOLISME

Toutes les enzymes intervenant dans le métabolisme des médicaments sont génétiquement régulées. Une mutation d'une enzyme du métabolisme peut aboutir à un variant enzymatique ayant une activité plus importante, plus faible ou nulle. Elle peut dans certains cas provoquer l'absence totale de protéine enzymatique.

Par conséquent, les facteurs génétiques peuvent être responsables de différences notables d'exposition au médicament ou à ses métabolites. Les premiers exemples connus concernaient le CYP 2D6 mais les récentes avancées dans la connaissance du génome humain et l'intérêt suscité par la pharmacogénétique a conduit à la découverte de nouveaux polymorphismes pertinents.

Plusieurs équipes utilisent des préparations microsomales pour lesquelles elles disposent de l'ADN génomique. Ces banques de microsomes permettent de rechercher *in vitro* l'impact d'un polymorphisme et constituent une alternative ou éventuellement un préalable aux études cliniques. Ainsi, Girard et col. ont démontré *in vitro* que les variations inter-individuelles d'expression et d'activité de glucuroconjugaison (propofol et acide mycophénolique) de l'UGT1A9 pouvaient être en partie liées à un polymorphisme génétique (Girard et col., 2004).

La contrainte est de disposer d'une banque de microsomes suffisante pour envisager l'étude de mutations intervenant avec des fréquences faibles.

IV. EXTRAPOLATION IN VITRO-IN VIVO

L'extrapolation *in vitro-in vivo* des activités métaboliques s'intéresse à la prédiction de la clairance intrinsèque (Cl_{int}) d'un xénobiotique et de ses interactions médicamenteuses.

Dans tous les cas les extrapolations ne sont que semi-quantitatives car prenant difficilement en compte tous les facteurs de variabilité physiologique comme le flux sanguin hépatique, la fixation aux protéines plasmatiques, ...

IV-1. ETUDE DE CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

L'étude d'une réaction de biotransformation nécessite l'estimation des paramètres de la cinétique enzymatique de production du métabolite (affinité apparente, K_m et activité maximale, V_{max}). La clairance intrinsèque (Cl_{int}) pourra alors être estimée : première étape de l'extrapolation *in vivo*. Cette détermination passe par une modélisation mathématique de la vitesse de biotransformation (v) en fonction de la concentration en substrat (S).

IV-1-1. Optimisation des conditions expérimentales

La détermination *in vitro* des paramètres cinétiques est réalisée le plus souvent à partir de microsomes, par incubation de concentrations croissantes de substrat avec une concentration fixe de protéines microsomales. Cette détermination est précédée par une optimisation des conditions expérimentales : La durée d'incubation ainsi que la concentration en enzymes ou en protéines microsomales doivent être choisies de façon à se situer dans une zone linéaire de production du métabolite. De plus, la consommation de substrat doit être faible, n'excédant pas 10 % de la quantité incubée (Venkatakrisnan et col., 2001c). Le choix d'une concentration en protéines microsomales faible (< 0.5 mg/ml) permet de limiter la fixation non-spécifique du substrat aux protéines, responsable d'erreur dans l'estimation des paramètres cinétiques (Venkatakrisnan et col., 2000). Enfin, la sensibilité des techniques de détection doit également être prise en compte pour le choix des conditions expérimentales : le substrat et son métabolite doivent pouvoir être quantifiés, de manière fiable.

IV-1-2. Détermination des paramètres de la cinétique enzymatique

IV-1-2-1. Cinétiques Michaeliennes

Le plus classique des modèles de cinétique enzymatique est celui de Michaelis-Menten, caractérisé par une fonction hyperbolique (Équation 6).

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$$

Équation 6

La constante de Michaelis (K_m) décrit l'affinité de l'enzyme, ou l'affinité apparente des microsomes pour le substrat et correspond à la concentration de substrat permettant d'obtenir la moitié de l'activité maximale (V_{\max}). *In vivo*, les concentrations thérapeutiques des médicaments sont la plupart du temps inférieures au K_m observé *in vitro*. Pour des valeurs inférieures à 10 % du K_m , la relation entre l'activité enzymatique et la concentration de substrat reste linéaire.

Le modèle de Michaelis-Menten (hyperbolique) peut être vérifié par linéarisation de Eadie-Hofstee. Ce graphique représente (v) en fonction du rapport v/S , la pente de cette droite est égale à $-K_m$.

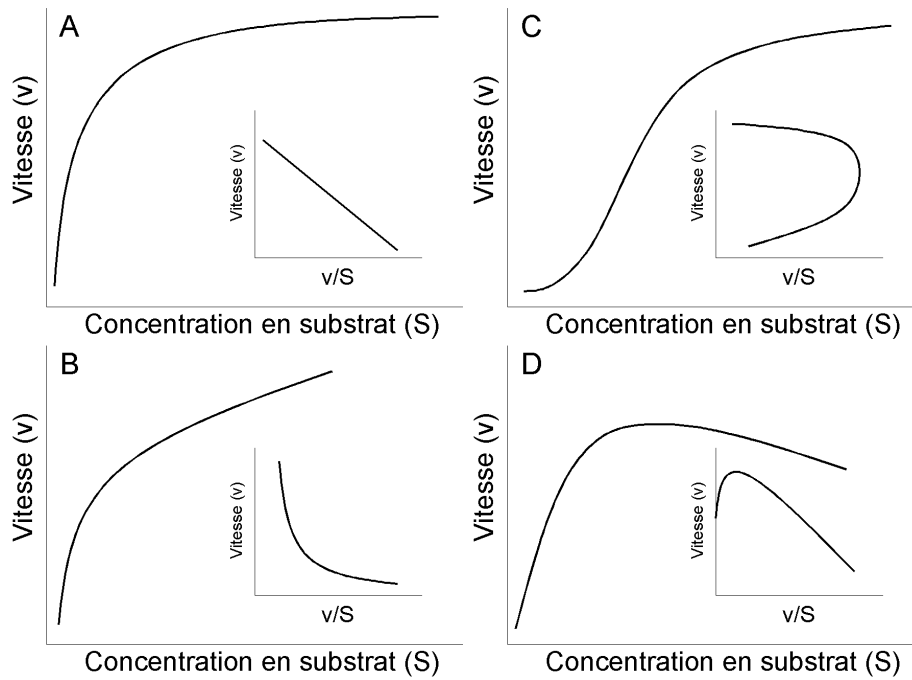


Figure IV-1 : courbes représentant la vitesse de biotransformation (v) en fonction de la concentration de substrat (S) et les transformations de Eadie-Hofstee correspondantes pour des profils Michaeliens à une (A) ou deux enzymes (B); d'auto-activation (C) ou d'auto-inhibition (D).

Lorsque deux isoformes enzymatiques interviennent et que leurs affinités sont suffisamment différentes, la relation entre v et S est bi-phasique correspondant à la somme linéaire de 2 fonctions de Michaelis (Équation 7) avec une composante de faible et de forte affinité. Dans ce cas, la droite de Eadie-Hofstee n'est plus linéaire mais concave (Figure IV-1).

$$v = \frac{V_{\max 1} \times S}{K_{m1} + S} + \frac{V_{\max 2} \times S}{K_{m2} + S}$$

Équation 7

L'observation d'une cinétique mono-phasique ne garantit pas nécessairement que la réaction métabolique n'est liée qu'à une isoforme enzymatique. La distinction d'un processus impliquant 2 enzymes par la représentation de Eadie-Hofstee dépend de l'affinité et de l'implication respective des 2 enzymes. Dans le cas où les 2 iso-enzymes ont une affinité comparable, les deux composantes ne seront pas dissociées. De même, l'observation de cinétiques bi-phasiques n'implique pas forcément que seules deux iso-enzymes participent au métabolisme.

IV-1-2-2. Cinétiques atypiques

Toutes les réactions de biotransformation ne sont pas décrites par une cinétique Michaelienne. Les cinétiques enzymatiques s'écartant de cette fonction sont qualifiées de cinétiques atypiques ou non-Michaeliennes. Il existe principalement deux types de modèles atypiques : le modèle d'activation et d'inhibition.

Les cas d'activation donnent lieu à un temps de latence de l'activité enzymatique à l'origine d'un profil sigmoïdal. Ce type de cinétiques enzymatiques est modélisé par l'équation de Hill (Équation 8) où S_{50} correspond au K_m apparent et (n) au coefficient de Hill. La linéarisation de Eadie-Hofstee est alors caractérisée par un profil convexe (Figure IV-1).

$$v = \frac{V_{\max} \times S^n}{S_{50}^n + S^n}$$

Équation 8

Les cas d'inhibition donnent lieu à une courbe au profil convexe, en raison d'une vitesse de biotransformation non maintenue à fortes concentrations de substrat (Houston et Kenworthy, 2000). Ce type d'inhibition par le substrat peut être assimilé à un cas d'inhibition non compétitive et décrit par l'équation 9 où K_{si} est la constante décrivant l'inhibition par le substrat. La transformation de Eadie-Hofstee apporte là encore une confirmation visuelle (Figure IV-1).

$$v = \frac{V_{\max}}{(1 + (K_m / S) + (S / K_{si}))}$$

Équation 9

IV-1-3. Choix du modèle

Pour les fonctions les plus simples, le choix du modèle peut être visuel par rapport à la qualité d'adéquation des données expérimentales à la fonction de modélisation et par rapport à la représentation de Eadie-Hofstee.

Pour des modèles plus complexes ou si un doute existe, il est recommandé de vérifier l'ajustement du modèle aux données expérimentales par des critères statistiques (test F, critère d'information akaïké) (Venkatakrisnan et col., 2001c).

IV-1-4. Interprétation et extrapolation

IV-1-4-1. Clairance intrinsèque (Cl_{int})

La Cl_{int} est le coefficient entre la vitesse de biotransformation et la concentration de substrat (Équation 10). Elle reflète donc l'activité enzymatique *in vitro* par unité enzymatique. Cette unité peut être des picomoles d'enzyme, des millions de cellules ou plus fréquemment des milligrammes de protéines microsomales.

$$v = Cl_{int} \times S$$

Équation 10

La clairance intrinsèque est le premier élément permettant l'extrapolation *in vivo*. C'est une mesure directe de l'activité enzymatique sans influence de paramètres *in vivo* (perfusion sanguine de l'organe ou fixation aux protéines plasmatiques). Si la cinétique enzymatique est modélisée par l'équation de Michaelis-Menten (Équation 6) et en considérant que les concentrations *in vivo* sont très inférieures au K_m (< 10%), alors l'équation peut être simplifiée en négligeant le terme S au dénominateur (puisque $K_m \gg S$) (Équation 11). La clairance intrinsèque est alors estimée par le rapport V_{max}/K_m (Équation 12).

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m}$$

Équation 11

$$Cl_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

Équation 12

Il est envisageable d'estimer la Cl_{int} à partir d'un seul point expérimental, si la concentration testée est très inférieure au K_m (< 10 %). Cette méthode de calcul est peu précise et moins informative que l'estimation effectuée à partir d'une cinétique complète.

IV-1-4-2. Cas particulier des cinétiques atypiques

Avant de chercher à interpréter les résultats d'une cinétique enzymatique atypique, il est souhaitable d'éliminer les sources expérimentales ayant pu conduire, artificiellement, à ce type de profil. Plusieurs exemples ont été décrits : une consommation excessive de substrat (> 10%) peut aboutir à un profil de cinétique sigmoïdal en limitant la vitesse de biotransformation pour les points de basses concentrations, ce problème peut être éliminé en étudiant en parallèle la consommation du substrat et la production du métabolite.

Une sensibilité analytique insuffisante, responsable d'une sous-estimation du métabolite pour de faibles concentrations de substrat incubé, peut générer également un profil sigmoïdal.

Une faible solubilité du substrat (à fortes concentrations) peut aboutir à un profil d'auto-inhibition (Hutzler et Tracy, 2002). Enfin, lorsque qu'un système pluri-enzymatique (microsomes) a été utilisé, il convient d'être prudent avant de conclure à une cinétique enzymatique atypique. En effet, le phénomène observé peut être lié à la combinaison d'activités de plusieurs enzymes et non au comportement atypique d'une seule enzyme. Il est donc nécessaire de vérifier l'existence du phénomène en utilisant un modèle mono-enzymatique (enzymes recombinantes) (Hutzler et Tracy, 2002).

L'observation de cinétiques enzymatiques atypiques rend délicate l'utilisation des résultats obtenus et en particulier leur extrapolation *in vivo* (Houston et Kenworthy, 2000). La possibilité que ce ne soit qu'un phénomène *in vitro* est souvent évoquée. Cependant le problème de l'extrapolation *in vivo* reste entier. Les cas d'auto-inhibition, nécessitant de fortes concentrations de substrat, n'existeraient vraisemblablement pas *in vivo*. Au contraire, les phénomènes d'auto-activation suscitent plus d'intérêt. Les enzymes impliquées dans la régulation d'un processus physiologique (UGT 1A1 et bilirubine par exemple) démontrent souvent une auto-activation *in vitro* (Ekins et col., 1998). Dans cette situation, on peut supposer que l'activité métabolique de l'enzyme régulatrice augmente dès qu'il y a augmentation de la concentration en substrat, permettant une diminution

rapide du substrat régulateur (Soars et col., 2003). Ainsi dans le cas de la bilirubine, l'augmentation des taux de bilirubine libre entraînerait une auto-activation de l'UGT 1A1 permettant une détoxification rapide par glucuro-conjugaison.

Dans les cas d'auto-activation, l'équation ci-dessous permet de calculer la clairance la plus élevée atteinte avant saturation de l'enzyme (Cl_{\max}) (Houston et Kenworthy, 2000).

$$Cl_{\max} = \frac{v}{S} = \frac{V_{\max}}{S_{50}} \times \frac{(n-1)}{n(n-1)^{1/n}}$$

Équation 13

Dans le cas d'auto-inhibition, la V_{\max} est délicate à estimer et l'estimation de la Cl_{int} à partir d'un seul point expérimental (inférieur à 10 % de la valeur du K_m) est alors recommandée.

IV-1-5. Méthode de la demi-vie *in vitro*

La Cl_{int} peut également être estimée par la méthode de la « demi-vie *in vitro* » (Obach et col., 1997; Obach, 1999). Cette méthode consiste à suivre la disparition du substrat dans le temps. La disparition du substrat (S) est modélisée par une équation exponentielle décroissante, où S_0 représente la concentration de substrat incubé et k, la constante de disparition du substrat :

$$S = S_0 \times e^{-k \cdot T}$$

Équation 14

La demi-vie ($T_{1/2}$) *in vitro* correspond au temps au bout duquel 50% du substrat incubé a été métabolisé :

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

Équation 15

La Cl_{int} est alors obtenue par :

$$Cl_{int} = \frac{0,693}{T_{1/2}} \times \frac{V_i}{Q}$$

Équation 16

où V_i correspond au volume de l'incubation (ml) et Q la quantité de microsomes (mg).

La condition impérative pour ce type de détermination est que la concentration du substrat testée soit inférieure au K_m .

De plus, Jones et Houston ont montré qu'il était souhaitable d'utiliser des concentrations faibles de microsomes (< 0,5 mg/ml) ou d'hépatocytes (< 0,5 x 10⁶ cellules /ml) pour éviter les phénomènes de fixation protéique du substrat qui entraîne une sous-estimation de la Cl_{int} (Jones et Houston, 2004).

De même il a été montré qu'au delà de 30 minutes d'incubation, la perte d'activité enzymatique pouvait être à l'origine d'un profil bi-phasique (Jones et Houston, 2004).

Enfin, il peut être important de vérifier qu'il n'existe pas de métabolite inhibiteur de l'enzyme du métabolisme du substrat.

Cette méthode est une alternative intéressante à l'étude des cinétiques de formation des métabolites pour les molécules dont le dosage des métabolites est techniquement impossible (absence de molécules pures) ou difficile (existence de multiples métabolites). Elle nécessite cependant qu'au moins 20 % de la quantité incubée disparaisse sur la durée totale d'incubation pour différencier le métabolisme de l'imprécision de la méthode de dosage.

IV-1-6. Extrapolation de la clairance métabolique *in vivo*

Il existe des facteurs permettant d'extrapoler les Cl_{int} *in vivo* à partir de Cl_{int} calculée *in vitro* (Tableau IV-1). Les modèles complexes (culture d'hépatocytes ou slices) donnent les meilleurs résultats d'extrapolation *in vivo*. Les microsomes sont inadaptés pour ce type de prédiction (Brandon et col., 2003).

Tableau IV-1 : facteurs d'extrapolation *in vitro-in vivo*

Facteurs d'extrapolation	Références
50 mg de protéines microsomales par gramme de foie	(Carlile et col., 1999)
0,32 nmol CYP /mg de protéines microsomales	(Bowalgaha et Miners, 2001)
0,14 nmol de CYP / 10^6 hépatocytes	(Houston, 1994)
120×10^6 cellules par gramme de foie	(Carlile et col., 1999)

Dans tous les cas, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des voies métaboliques qu'elles soient parallèles ou séquentielles. Les Cl_{int} de plusieurs voies métaboliques parallèles sont additives. Dans le cas de voies métaboliques séquentielles, il est nécessaire d'étudier la disparition du substrat plutôt que la formation du métabolite. Enfin, il est nécessaire de prendre en compte le métabolisme extra-hépatique.

La prise en compte d'autres facteurs physiologiques comme le flux sanguin hépatique, la fixation aux protéines plasmatiques nécessite l'utilisation de modèles pharmacocinétiques *in vivo*. Ils permettront l'estimation de la clairance métabolique.

IV-2.PREDICTION DES INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

Les interactions médicamenteuses sont recherchées très tôt dans le développement d'un nouveau médicament. Les études d'interaction réalisées chez l'animal ont une pertinence limitée et les modèles biologiques *in vitro* humains sont une alternative très souvent adoptée et recommandée par les instances de contrôle de la mise sur le marché des médicaments.

IV-2-1. Interactions par inhibition enzymatique

Les microsomes hépatiques humains sont très largement utilisés pour la prédiction d'interactions pharmacocinétiques par inhibition. Les slices, hépatocytes ou enzymes recombinantes peuvent également être utilisés.

L'hypothèse est que la diminution de clairance *in vivo* d'un substrat par co-administration d'un inhibiteur métabolique sera égale à la diminution de vitesse de biotransformation du substrat lié à la co-incubation de l'inhibiteur.

IV-2-1-1. Les différents types d'inhibition

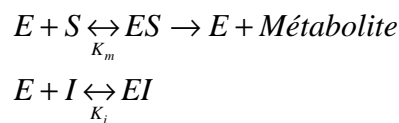
Les mécanismes d'inhibition ont été essentiellement décrits pour les CYP. Trois mécanismes d'inhibition principaux existent : réversible, quasi-irréversible et irréversible (inhibition suicide).

Les mécanismes quasi-irréversible ou irréversible concernent les CYP et interviennent pendant ou à la suite du transfert d'oxygène et fonctionnent après une étape d'activation (formation d'un métabolite réactif). Ces métabolites inhibiteurs vont former un complexe stable avec le CYP (inhibition quasi-irréversible) ou altérer sa structure de manière définitive dans le cas des inhibitions suicides (alkylation, liaison covalente de fonctions diverses) (Lin et Lu, 1998). *In vitro*, le complexe formé lors d'une inhibition quasi-irréversible peut être dissocié par incubation de substrat très lipophile ou par oxydation du CYP, la fonction du CYP étant alors restaurée. *In vivo* ce n'est pas le cas, seule la synthèse

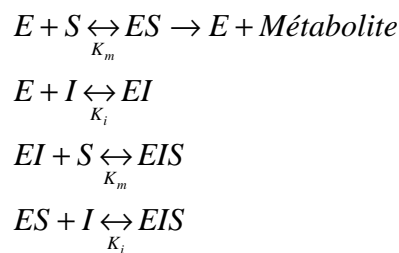
de nouvelles protéines enzymatiques permet de retrouver l'activité initiale (Lin et Lu, 1998).

L'inhibition réversible est la plus fréquente. Elle intervient au moment de la fixation du substrat à l'enzyme.

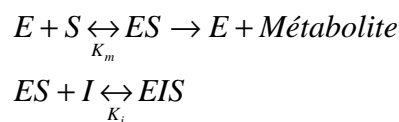
Les inhibitions réversibles peuvent être compétitive, non-compétitive, ou incompétitive. Dans le cas d'inhibition compétitive, l'inhibiteur (I) et le substrat (S) sont en compétition pour la liaison au site actif de l'enzyme (E) :



Dans le cas d'inhibition non-compétitive, l'inhibiteur se fixe à un site différent du site actif de l'enzyme et il n'a pas d'effet sur la liaison du substrat mais le complexe enzyme-inhibiteur-substrat (EIS) est inactif :



Dans le cas d'une inhibition incompétitive, l'inhibiteur ne se fixe pas à l'enzyme libre mais au complexe enzyme-substrat, le complexe enzyme-inhibiteur-substrat est alors inactif (Ito et col., 1998b; Lin et Lu, 1998).



IV-2-1-2. Evaluation *in vitro* d'une interaction médicamenteuse par inhibition

IV-2-1-2-1. *Choix des conditions expérimentales*

Les conditions expérimentales diffèrent en fonction du type d'inhibition étudiée. Pour des inhibiteurs irréversibles ou quasi-irréversibles, une étape d'activation de l'inhibiteur est nécessaire (formation de l'intermédiaire réactif). L'inhibiteur est pré-incubé avec les microsomes et le co-facteur enzymatique avant d'ajouter le substrat. Dans le cas d'une inhibition réversible, substrat et inhibiteur peuvent être incubés en même temps.

La concentration en protéines microsomales est un élément important à ajuster lors de l'étude d'une interaction *in vitro*. En effet, la fixation non-spécifique de l'inhibiteur aux protéines microsomales peut fausser les résultats en diminuant la quantité d'inhibiteur disponible. Il est conseillé d'utiliser la plus faible concentration de microsomes nécessaire.

Deux paramètres permettent d'évaluer le caractère inhibiteur d'une molécule : la concentration d'inhibiteur provoquant 50 % d'inhibition de la vitesse de biotransformation (CI_{50}) et la constante d'inhibition K_i .

IV-2-1-2-2. *Calcul de la CI_{50}*

Le calcul de la CI_{50} est réalisé à concentration fixe de substrat en évaluant l'effet de concentrations croissantes d'inhibiteur sur la vitesse de biotransformation de ce substrat. La CI_{50} est la concentration responsable de 50 % de l'inhibition maximale. Cette détermination ne nécessite pas de calcul de la cinétique de biotransformation du substrat. Il n'est pas nécessaire de connaître le mécanisme d'inhibition.

En fonction de la concentration de substrat, les isoformes impliquées dans une voie métabolique peuvent varier. Par conséquent, l'inhibition d'une isoforme particulière sur le métabolisme global du substrat peut être différente en fonction de la concentration incubée. Il est important de choisir une concentration pertinente pour ce type d'étude. Cette concentration doit dans tout les cas être inférieure au K_m .

IV-2-1-2-3. Calcul du K_i

Le modèle mathématique qui décrit l'influence d'un inhibiteur sur la cinétique d'une réaction enzymatique dépend du type d'inhibition (compétitive, non-compétitive ou incompétitive ; Equation 17, 18, 19).

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

Équation 17

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{(K_m + S) \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Équation 18

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Équation 19

Le choix du modèle et le calcul du K_i peut être réalisé en fonction des représentations graphiques de Lineweaver-Burk ou de Dixon (Figure IV-2). La méthode de Dixon consiste à représenter l'inverse de la vitesse de formation du métabolite à concentration fixe de substrat ($1/v$) en fonction des concentrations croissantes d'inhibiteur. La méthode de Lineweaver-Burk consiste à représenter $1/v$ en fonction de l'inverse de la concentration de substrat incubé (concentration croissante) pour différentes concentrations d'inhibiteur. Par rapport à la méthode de Dixon, cette représentation a l'avantage de fournir, en plus du K_i , les constantes de la réaction enzymatique.

Des logiciels de régression non-linéaire permettent un calcul plus précis de la constante d'inhibition (Kakkar et col., 1999). Le logiciel INHIB 1.1 développé par le Dr Jean Debord, (Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU de Limoges), en est un exemple.

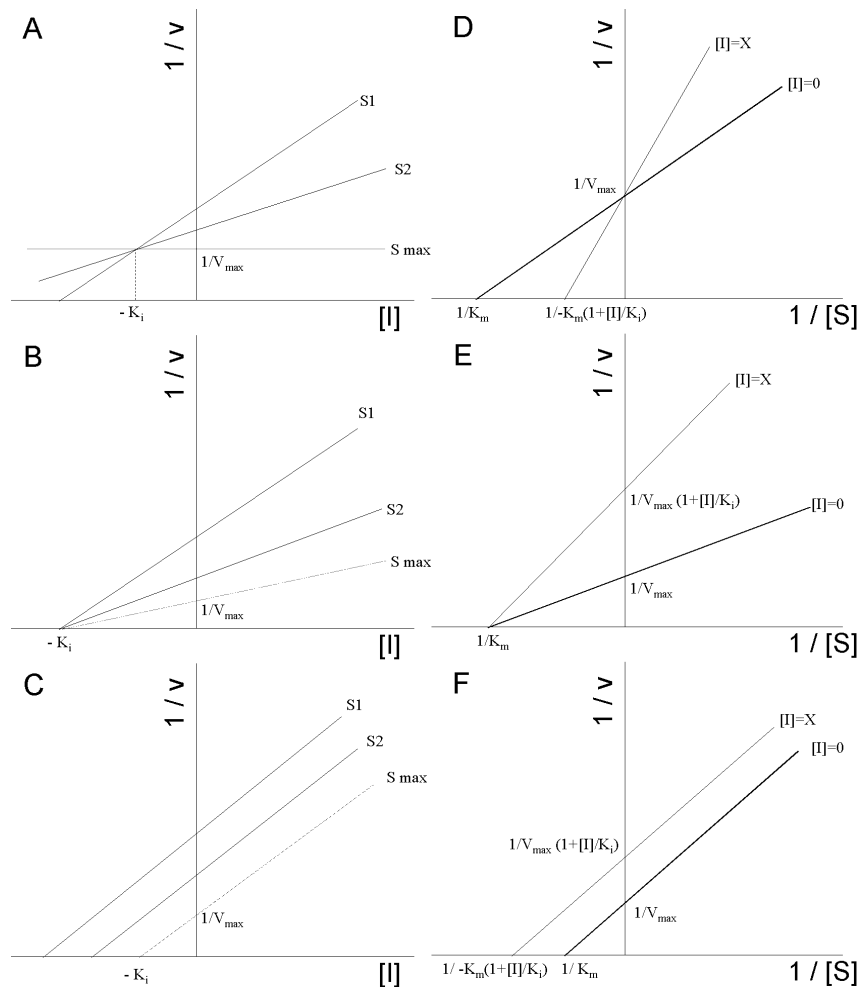


Figure IV-2 : graphique d'inhibition de Dixon (A, B, C) et de Lineweaver-Burk (D, E, F) pour une inhibition compétitive (A, D), non-compétitive (B, E) ou incompétitive (C, F).

Il n'y a pas de modèle permettant de calculer le K_i pour une réaction enzymatique présentant une cinétique enzymatique sigmoïdale (Venkatakrishnan et col., 2001c).

Le K_i reflète l'inhibition d'une seule isoforme enzymatique par un inhibiteur, par conséquent il est supposé qu'une seule enzyme intervient dans le métabolisme du substrat et que l'inhibiteur n'inhibe que cette enzyme. Cette hypothèse n'est pas toujours vraie. La détermination du K_i en utilisant des enzymes recombinantes permet d'obtenir un K_i spécifique d'une enzyme.

Une interaction par inhibition enzymatique peut entraîner, en fonction de son mécanisme soit une diminution de la V_{max} soit une augmentation du K_m . Il en résulte, quelque soit le mécanisme d'inhibition, une diminution de la clairance intrinsèque.

En supposant que la concentration de substrat *in vivo* est inférieure au K_m , l'intensité de l'interaction est évaluée par la formule suivante (Ito et col., 1998b) :

$$R = \frac{V(\text{avec inhibiteur})}{V(\text{sans inhibiteur})} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Équation 20

Ce coefficient peut être appliqué à la clairance ou aux AUC observées *in vivo* pour estimer l'effet de l'interaction. L'intensité de l'interaction dépend donc bien sûr du K_i mais également de la concentration de l'inhibiteur à laquelle l'enzyme est exposée.

Par conséquent, pour assurer la pertinence de l'extrapolation, l'estimation de la concentration d'inhibiteur (I) intra-hépatocytaire est essentielle. En se basant sur le principe pharmacocinétique que seules les molécules non-liées aux protéines plasmatiques peuvent diffuser dans l'hépatocyte, Ito et col. (Ito et col., 1998a) proposent d'utiliser la concentration plasmatique maximale d'inhibiteur non-lié aux protéines. Bien sûr, ceci ne permet pas de prendre en compte les phénomènes de transport actif ni la fixation de l'inhibiteur aux protéines hépatocytaires.

IV-2-1-2-4. Utilisation de la méthode de la demi-vie *in vitro*

Beaucoup de composés sont métabolisés par plusieurs enzymes simultanément. Dans ce cas, il apparaît important de prendre en compte l'ensemble des voies métaboliques pour évaluer l'effet d'un inhibiteur. L'étude de formation des métabolites est impossible ou difficile à réaliser lorsque les voies métaboliques sont inconnues ou nombreuses. L'étude de la déplétion du substrat dans le temps par la méthode de la demi-vie *in vitro* permet d'estimer la CL_{int} de disparition du produit avec et sans inhibiteur. Cette méthode est relativement moins utilisée, alors que son concept est plus proche de la situation *in vivo*. Les études ayant comparé cette approche à celle du suivi de la production de métabolites pour l'évaluation d'une interaction médicamenteuse ont obtenu des résultats comparables (Hemeryck et col., 2001; Jones et col., 2004).

IV-2-2. Interactions par induction enzymatique

L'induction des enzymes du métabolisme répond à un mécanisme complexe. Le plus souvent la fixation de l'inducteur à un récepteur nucléaire augmente la transcription du gène de l'enzyme et donc la synthèse de protéine enzymatique. Pour d'autres molécules, elle implique un mécanisme non transcriptionnel : la stabilisation de l'ARN messager (ex. effet de l'éthanol et CYP 2E1) ou l'inhibition de la dégradation protéique (ex. troléandomycine et CYP 3A) (Lin et Lu, 1998).

La recherche d'un effet inducteur ne peut être réalisée qu'avec un modèle *in vitro* où l'intégrité cellulaire est conservée (hépatocytes et slices). Des lignées cellulaires, préalablement transfectées pour exprimer une enzyme spécifique, peuvent également être utilisées (Kremers, 2002). Une incubation de l'inducteur avec les cellules pendant quelques heures est nécessaire avant de pouvoir détecter un effet.

L'évaluation de l'induction se fait par rapport à un contrôle selon différents critères (Kremers, 2002):

- mesure d'activité enzymatique
- mesure de protéine enzymatique par méthode immunochimique
- mesure d'ARN messager par PCR en temps réel

L'intensité de l'induction dépend de la nature de l'inducteur, de sa concentration et du temps d'exposition. Elle peut également être influencé par l'origine des cellules et les conditions de culture (milieu, densité cellulaire...). Par conséquent, l'étude *in vitro* et l'extrapolation des phénomènes d'induction est délicate à réaliser.

V. METHODES ANALYTIQUES

V-1. EVOLUTION DES TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les modifications structurales résultant du métabolisme peuvent être minimales (ajout d'un atome d'oxygène) ou majeures (conjugaison) aboutissant à des composés dont les propriétés peuvent être très différentes. Les métabolites peuvent être produits en très faible quantité et malgré tout présenter des propriétés pharmacologiques ou toxiques imposant leur étude. Par conséquent, les techniques doivent être polyvalentes, sensibles et spécifiques. Beaucoup de méthodes ont été utilisées dans les études de métabolisme, mais peu répondaient à l'ensemble de ces exigences.

Les stratégies traditionnelles consistaient à séparer les métabolites potentiels, les isoler pour ensuite les identifier avec différentes techniques plus ou moins informatives comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (MS) ou la mesure de radioactivité. L'apparition des techniques chromatographiques « modernes » ont favorisé le couplage de la séparation, de la détection et de l'identification, difficilement envisageable avec les techniques les plus rudimentaires comme la chromatographie planaire.

La chromatographie en phase gazeuse, présente un excellent pouvoir de séparation, mais n'est pas directement compatible avec les molécules polaires, thermolabiles et de haut poids moléculaire, caractéristiques assez fréquentes pour les métabolites en particulier conjugués. En couplage avec la spectrométrie de masse, elle permet d'obtenir des spectres très informatifs. Elle est utilisée dans les études de métabolisme de certaines classes de composés comme par exemple les dérivés des amphétamines (Kraemer et col., 2000; Staack et col., 2004).

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) autorise une large gamme de polarité et de masse moléculaire, un critère de choix pour la séparation de métabolites qui par nature ont des masses ou des polarités très variables. Son évolution récente vers l'UPLC (Ultra-high Performance Liquid Chromatography) offre de nouvelles perspectives. L'UPLC utilise des phases stationnaires composées de particules inférieures à 2 µm avec

une séparation améliorée permettant de raccourcir les temps d'analyse. L'étude de Castro-Perez et col. a démontré l'intérêt du couplage de l'UPLC à la spectrométrie de masse (MS) dans les études de métabolisme (Castro-Perez et col., 2005). Le gain de résolution chromatographique évite les phénomènes de co-élution, améliore très nettement la sensibilité et atténue les phénomènes de suppression d'ion.

Différents systèmes de détection ont été associés à la chromatographie liquide pour la détection des métabolites (UV, fluorescence, radioactivité). Cependant, ils n'offraient pas d'informations structurales ce qui limitait leur utilisation.

C'est la spectrométrie de masse qui remporte les suffrages. Sa polyvalence et ses qualités (spécificité, sensibilité) associées à l'universalité de l'HPLC font de ce couplage une technique de référence dans le domaine des études de métabolisme.

L'apparition des sources d'ionisation à pression atmosphérique de type electrospray (ElectroSpray Ionisation ; ESI) ou APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) a largement contribué à l'essor du couplage et en particulier à son application plus systématique aux études de métabolisme. Les sources ESI et APCI permettent la détection de composés assez peu polaires à très polaires jusqu'à des masses élevées. Elles permettent une ionisation relativement douce, requise pour les composés labiles comme les métabolites conjugués. L'introduction récente des sources APPI (Atmospheric Pressure Photo-Ionisation) a permis d'élargir l'utilisation de la MS à l'étude des composés très apolaires avec une sensibilité supérieure aux sources APCI (Marquet, 2005).

Les systèmes utilisant un simple quadripôle qui permettent la recherche de métabolites en fonction de leur masse moléculaire ont laissé place aux systèmes de masse en tandem (MS/MS) qui présentent des fonctionnalités supplémentaires pour l'identification des métabolites et leur dosage spécifique.

Pour les métabolites les plus difficiles à identifier, le couplage direct de la LC-MS avec la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) peut être intéressant, bien que la sensibilité atteinte soit encore relativement faible.

La recherche semble enfin s'orienter vers l'association de la spectrométrie de masse à des systèmes miniaturisés de « puces à métabolisme ». Cette technologie devrait permettre de réaliser des micro-réactions métaboliques (4 μ l) et l'extraction en phase solide au sein de

puces de dimensions réduites, couplées à un détecteur MS ou MS/MS (Benetton et col., 2003).

V-2. UTILISATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE DANS LES ETUDES DE METABOLISME

V-2-1. Recherche de métabolites inconnus

Différentes stratégies de recherche de métabolites peuvent être adoptées en LC-MS et LC-MS/MS.

V-2-1-1. Utilisation de la spectrométrie simple masse (LC-MS)

V-2-1-1-1. Mode de balayage complet (« full scan » MS)

En mode de balayage complet, la recherche de métabolite est réalisée sans critère de sélection *a priori* : l'ensemble des masses et donc des métabolites potentiels est analysé. L'échantillon testé est comparé à un contrôle qui ne contient pas de métabolite.

Le nombre considérable de données produites par des acquisitions en balayage complet a donné lieu au développement de logiciels de retraitement. Ces logiciels procèdent par recherche d'ions à partir de gain et de perte de masse par rapport à la masse du produit parent (Tableau V-1).

Tableau V-1 : réactions métaboliques et changements de masse associés (Kostiainen et col., 2003)

Réaction métabolique	Modification de masse (unité)
Déméthylation	- 14
Hydroxylation	+16
Epoxydation	+16
N-hydroxylation	+16
N-oxydation	+16
Acétylation	+42
Glucuroconjugaison	+176
Sulfuration	+80
Desulfuration oxydative	- 32
Conjugaison au glutathion	+305.1

Lorsque les composés étudiés comportent un atome de chlore ou de brome, l'abondance isotopique sera un argument supplémentaire pour la détection des métabolites.

V-2-1-1-2. Suivi d'ions sélectionnés (« Selected Ion Monitoring » ; SIM)

L'utilisation du mode de suivi spécifique d'un ou plusieurs ions moléculaires permet une recherche plus ciblée. Les masses à rechercher seront définies en fonction de la structure de la molécule et d'hypothèses de métabolites (Tableau V-1). La restriction de la zone de balayage par rapport au mode de balayage complet augmente de façon importante la sensibilité de détection. Là encore, la comparaison à un contrôle sans métabolite est indispensable. Cette méthode permet de vérifier des hypothèses mais ne garantit pas que l'ensemble des métabolites ont été détectés.

V-2-1-2. Utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Les systèmes MS/MS les plus fréquemment utilisés se composent de trois systèmes quadripolaires successifs. Les ions pénétrant dans le détecteur sont détectés et peuvent être sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1), fragmentés dans le second par impact avec les molécules d'un gaz neutre (cellule de collision). Les ions produits (ions fils) sont enfin détectés dans le dernier quadripôle (Q3), globalement en mode de balayage ou spécifiquement en mode d'ions sélectionnés.

Le mode de balayage des ions fils (ou « product ion scan mode ») permet d'obtenir le spectre de fragmentation d'un ion sélectionné en Q1. Le mode de balayage des ions précurseurs permet de connaître l'ensemble des ions ayant produit un fragment sélectionné en Q3. Le mode « perte de neutre » permet la recherche des molécules ayant perdu une masse neutre définie. Le mode de transitions sélectionnées (ou « multiple reaction monitoring mode ») correspond au mode SIM de la MS simple : il suit les fragments sélectionnés provenant d'un ion parent particulier.

V-2-1-2-1. Etude des ions précurseurs ou de la perte de neutre

Les analyses LC-MS/MS en mode balayage des ions précurseurs ou perte de neutre sont très appropriées à la recherche de métabolites conjugués (métabolites de phase II) (Kostiainen et col., 2003; Levsen et col., 2005). La fragmentation des métabolites libère le groupement conjugué, ionisé ou non, et la molécule aglycone. Les molécules ayant libéré par fragmentation un ion de masse identique à l'aglycone ou au groupe conjugué (mode balayage des ions précurseurs), ou ayant perdu une masse neutre correspondant à un groupe conjugué (mode perte de neutre) seront de potentiels métabolites. Le Tableau V-2 liste quelques métabolites pouvant être recherchés par cette méthode.

Tableau V-2 : caractéristiques de fragmentation MS/MS de quelques métabolites conjugués (Kostiainen et col., 2003)

Métabolites	Mode d'ionisation	Mode d'acquisition
Glucuro-conjugués	+/-	Perte de neutre 176 u (-C ₆ H ₈ O ₆)
Sulfo-conjugués phénoliques	+	Perte de neutre 80 u (-SO ₃)
Sulfo-conjugués aliphatiques	-	Précurseurs de m/z 97 (HSO ₄)
Conjugués à la N-acétyl-cystéine	-	Perte de neutre 129 u (-C ₅ H ₇ NO ₃)

Ce type d'acquisition peut également être mis à profit pour la recherche de métabolites de phase I (non-conjugués) en se basant sur les similitudes de fragmentation pouvant exister entre la molécule et ses métabolites. En effet, les métabolites suivent souvent les mêmes schémas de fragmentation que le produit parent, avec parfois des fragments communs. La recherche des précurseurs des ions fragments caractéristiques de la molécule étudiée peut permettre la détection de ces métabolites. Ainsi Blum et col. ont identifié plusieurs métabolites de l'épothilone en utilisant la recherche de précurseurs de l'ion m/z 166, un fragment caractéristique de ce composé (Blum et col., 2001).

Dans tous les cas, l'étude en mode précurseur ou en perte de neutre se base sur des hypothèses théoriques de fragmentation et ne garantit donc pas la détection systématique de l'ensemble des métabolites d'une molécule.

V-2-2. Etude structurale des métabolites

V-2-2-1-1. Etude MS

Les données structurales pouvant être obtenues avec les systèmes à simple quadripôle sont limitées. Une fragmentation peut être obtenue au niveau de la source d'ionisation mais sans critère de sélectivité.

V-2-2-1-2. Etude MS/MS

Le mode de balayage d'ions fils permet d'obtenir des spectres de fragmentation spécifiques du produit parent et du métabolite à identifier. La comparaison des voies de fragmentation des métabolites et du produit parent permet la plupart du temps de situer précisément le site de la modification métabolique. L'identification du site de liaison des groupements conjugués des métabolites de phase II peut cependant être plus délicate. En effet, le premier site de fragmentation se situe souvent au niveau de la liaison labile entre le groupe conjugué et l'aglycone, sans qu'il existe de fragment permettant de situer cette liaison (Levsen et col., 2005).

Un système novateur de « trappe quadripolaire » a été proposé par la société Applied-Bio-Systems pour accroître la sensibilité du mode de balayage d'ion fils. Il s'agit d'un spectromètre de masse en tandem dont le troisième quadripôle permet le piégeage et l'accumulation des ions avant qu'ils ne soient éjectés vers le détecteur (Marquet, 2005). Les spectres de fragmentation obtenus sont plus complets et facilite l'identification structurale des métabolites (Xia et col., 2003). La trappe permet également des études de MS/MS/MS (MS^3) par fragmentation résonnante des ions accumulés dans la trappe (Marquet, 2005).

Des logiciels tel que Mass Frontier (société HighChem) peuvent éventuellement aider à l'interprétation des spectres en proposant à partir de la structure de la molécule, la structure des fragments pouvant être produits avec ou sans réarrangement, en mode d'ionisation positif ou négatif.

V-2-2-1-3. Etude MS^n

Les systèmes de trappe à ions conventionnels dit en 3D ont une sensibilité importante, appropriée à la recherche de métabolites inconnus et permettent la réalisation d'études structurales poussées grâce aux fragmentations successives (MS^n).

L'étude MS^n s'avère en particulier intéressante pour l'étude des métabolites de phase II. Elle fournit les fragments du métabolite conjugué complet (en MS^2) puis secondairement ceux du métabolite de phase I (aglycone) en MS^3 , MS^4 , ... (Levsen et col., 2005)

V-2-2-1-4. *Mesure de masse exacte*

La résolution des détecteurs à temps de vol (TOF ; Time Of Flight) permet d'obtenir une spécificité de détection supérieure à celle des systèmes quadripolaires ou à trappe. Cette sélectivité augmente de façon significative la sensibilité de détection (Zhang et col., 2000). Les systèmes hybrides incluant un filtre quadripolaire (Q-TOF), qui permettent la fragmentation d'ions parents sélectionnés et la détermination de la formule atomique des fragments à partir de leur masse exacte, sont très appropriés à l'identification structurale (Marquet, 2005).

De nouveaux systèmes à triple-quadripôle offrant une mesure de masse plus précise tels que le Quantum Ultra AM de la société Thermo-Electron, offrent une solution intermédiaire en conservant les avantages de la MS/MS et semblent être un bon compromis pour la réalisation d'études de métabolisme.

V-2-3. Couplage de la détection et de l'étude structurale des métabolites (Acquisition dépendante de l'information)

Pour répondre au besoin de rapidité des industriels, les méthodes de détection et d'identification des métabolites de nouveaux médicaments évoluent vers l'automatisation. Le principe de l'acquisition dépendante de l'information sous les noms commerciaux d'IDA (Information Dependent Acquisition) chez Applied-Biosystems ou de DDA (Data Dependent Acquisition) chez Thermo-Electron, a prouvé son efficacité pour la recherche et l'identification de métabolites (Fernandez-Metzler et col., 1999). L'IDA consiste à réaliser une acquisition en balayage complet, et de définir une seconde acquisition à réaliser (spectre en mode balayage d'ions fils par exemple) lorsqu'une masse est détectée avec une intensité supérieure à un seuil prédéfini. L'ensemble des acquisitions est réalisé à partir de la même injection. Ce système combine donc les avantages de la recherche sans critère restrictif, propre aux acquisitions en balayage complet, à ceux de la MS/MS (sélectivité, information structurale) avec un gain de temps et une économie d'échantillon.

Ce type d'acquisition génère des données riches (spectres de masse MS/MS) en quantité importante. Les principaux fabricants de systèmes MS/MS proposent des logiciels assurant un retraitement automatisé et rapide. Les masses pouvant correspondre à un métabolite sont recherchées dans la liste des acquisitions MS/MS à partir d'une bibliothèque de perte

ou de gain de masse par rapport au produit parent, puis des scores de corrélation entre les spectres du produit parent et des métabolites potentiels sont calculés.

V-2-4. Etude quantitative

La LC-MS en mode d'ions sélectionnés ou la LC-MS/MS en mode de transitions sélectionnées (Single Reaction Monitoring, SRM ou Multiple Reaction Monitoring, MRM) offrent une excellente sensibilité et permettent l'étude quantitative des médicaments et de leurs métabolites à faibles concentrations dans des matrices de nature variable (plasma, urine, surnageant d'incubation). Il apparaît dans tous les cas souhaitable d'utiliser au moins trois ions ou deux transitions pour assurer une bonne spécificité (Marquet, 2005). La haute sélectivité et la bonne résolution offerte par les détecteurs MS/MS permettent de diminuer au maximum les temps de séparation chromatographique et par conséquent le temps d'analyse.

PARTIE 2 :

METABOLISME ET INTERACTIONS METABOLIQUES DES IMMUNOSUPPRESSEURS

I. METABOLISME DES IMMUNOSUPRESSEURS

I-1. METABOLISME DU MYCOPHENOLATE MOFÉTIL

Le mycophénolate mofétil (MMF) est une prodrogue inactive, ester de l'acide mycophénolique (MPA) (Figure I-1).

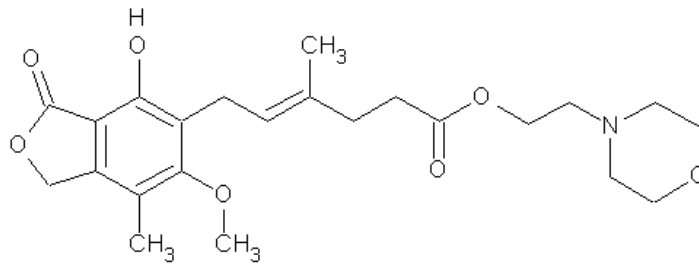


Figure I-1 : structure du mycophénolate mofétil (MMF)

Après administration orale, le MMF est rapidement absorbé puis complètement hydrolysé en MPA ; le MMF n'est pas mesurable dans le plasma. Le MPA est principalement métabolisé en un métabolite glucuro-conjugué inactif : le MPA-7-O-glucuronide ou MPA-phényl-glucuronide (MPAG) (Bullingham et col., 1998).

Le MPAG est principalement éliminé par excrétion rénale. Cependant une fraction non négligeable, excrétée dans la bile, est responsable d'une circulation entéro-hépatique du MPAG avec hydrolyse en MPA par la flore digestive. Ce phénomène explique en partie l'existence de cinétiques particulières, comprenant un premier pic plasmatique précoce de MPA suivi d'un second pic intervenant 6 à 12 heures après la prise. Ce mécanisme, qui présente une forte variabilité inter-individuelle, a été proposé pour expliquer la survenue de certains effets secondaires digestifs ou certaines interactions médicamenteuses du MMF (Bullingham et col., 1998).

La présence d'autres métabolites a été rapportée : Mojarrabi et Mackenzie observaient 2 glucuro-conjugués supplémentaires du MPA après incubation sur cellules COS-7 transfectées avec une UDP-glucuronosyltransférase intestinale, proposant un acyl-glucuronide et un di-glucuronide (Mojarrabi et Mackenzie, 1997); Bullingham et col.

suggéraient également la présence d'un acyl-glucuronide du MPA dans les urines de patients sous MMF (Bullingham et col., 1998).

Une étude ultérieure utilisant la spectrométrie de masse a permis de confirmer l'existence de MPA-acyl-glucuronide (M2 ou AcMPAG) et de détecter un autre métabolite : le 7-O-glucose MPA (M1 ou MPAGls) dans le plasma de patients (Shipkova et col., 1999). Contrairement aux deux autres métabolites, l'AcMPAG serait actif (Schutz et col., 1999; Shipkova et col., 2001b) et il est reconnu par l'anticorps de la méthode immunoenzymatique (EMIT) de dosage du MPA (Schutz et col., 1998). Un métabolite supplémentaire, supposé être l'AMP-acyl-glucoside (AcMPAGls) a été détecté à partir d'incubations en présence de microsomes rénaux (seuls capables de le former), mais ce métabolite n'a pas été retrouvé chez des patients traités (Shipkova et col., 2001a).

Un dernier métabolite (M3) de structure exacte et d'activité inconnue a été détecté à partir d'incubations en présence de microsomes hépatiques humains et de NADPH. La production de ce métabolite de phase I était inhibée à 90 % par un inhibiteur général des CYP 450 (aminobenzotriazole) et à environ 40 % par la troléandomycine, un inhibiteur spécifique des CYP 3A (Shipkova et col., 1999).

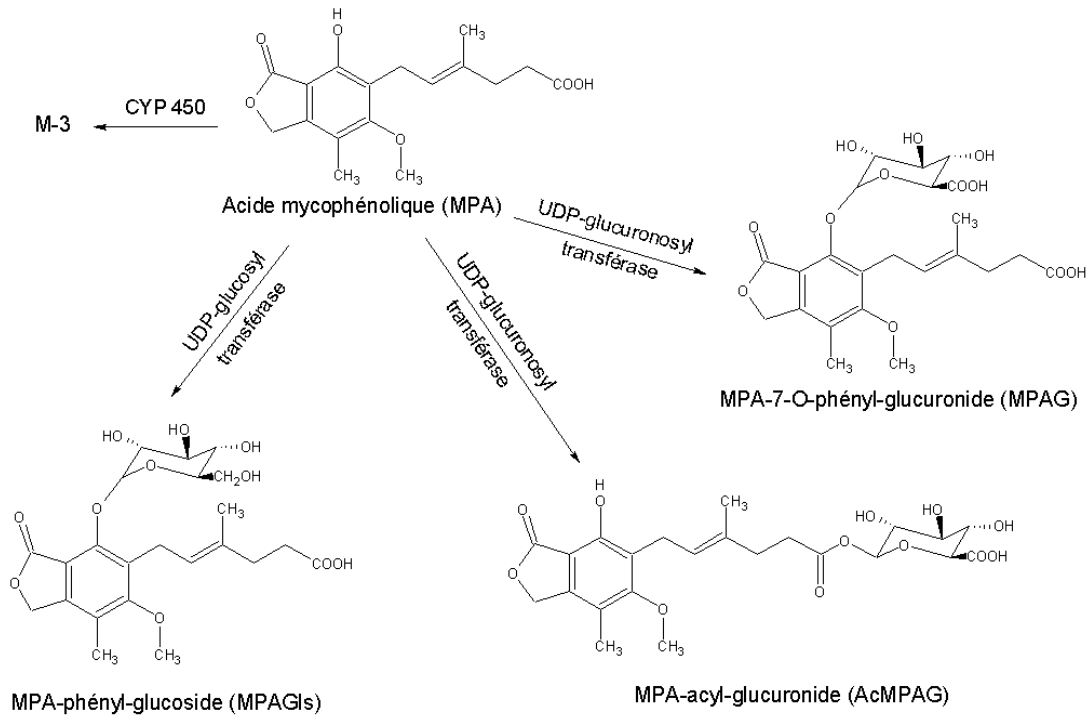


Figure I-2 : métabolisme de l'acide mycophénolique

Deux équipes ont mis en évidence une activité métabolique rénale supérieure à l'activité hépatique pour la transformation du MPA en MPAG (Zucker et col., 1999; Vietri et col., 2000). L'étude de Shipkova et col. utilisant des microsomes humains hépatiques, rénaux, et intestinaux suggère la présence d'UGT en plus grande quantité et avec une affinité plus importante pour le MPA au niveau rénal pour la formation de MPAG et de MPAGls. La production de l'AcMPAG serait majoritairement hépatique (Shipkova et col., 2001a).

L'existence d'un métabolisme intestinal est également probable car le MPAG, le MPAGls et l'AcMPAG ont été retrouvés à partir d'un modèle *ex-vivo* d'étude de la biotransformation intestinale (Braun et col., 2000). Mais les valeurs faibles de Cl_{int} observées avec des microsomes intestinaux suggèrent une faible contribution *in vivo*.

Finalement, Bowalgaha et Miners ont retrouvé des clairances microsomales hépatiques, rénales et intestinales de production du MPAG comparables aux études précédentes, mais concluent à un rôle majoritaire du foie dans la clairance systémique du MPA, du fait des rapports massiques entre les organes (Bowalgaha et Miners, 2001).

Les études de formation du MPAG utilisant des isoformes d'UGT recombinantes ont abouti à des résultats contradictoires. Les travaux de Mackenzie (Mojarrabi et Mackenzie, 1997; Mackenzie, 2000) sont en faveur d'une activité importante des UGT 1A10 et 1A8 (exprimées seulement au niveau digestif). Les UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6 seraient inactives et l'activité de l'UGT 1A9 n'était pas clairement établie. Pour Shipkova et col. les UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7 et 2B15 seraient capables de former l'AMPG, les UGT 1A7 et 2B4 étant les plus actives (Shipkova et col., 2001a).

Récemment Bernard et Guillemette ont conclu à un rôle majoritaire des UGT 1A9 et 1A8 dans la formation du MPAG et ont pu mettre en évidence *in vitro* un effet de la mutation de ces deux isoformes sur les activités observées (Bernard et Guillemette, 2004).

Concernant l'AcMPAG, une seule équipe a cherché à identifier les UGT responsables de sa formation et a évoqué la possibilité que les mêmes isoformes interviennent pour les 2 glucuronides (UGT 1A7 > 1A9 > 1A8 > 1A10) (Basu et col., 2004). Cependant la méthodologie utilisée, basée sur la chromatographie planaire, ne permet pas de garantir la fiabilité des résultats.

I-2. METABOLISME DES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE

I-2-1. Métabolisme de la ciclosporine

Après administration orale, environ 90 % de la dose de ciclosporine est excrétée dans la bile sous forme de métabolites et très accessoirement sous forme inchangée (1%). 6% est éliminée par voie urinaire (0.1 % de façon inchangée, le reste sous forme de métabolites) (Kelly et Kahan, 2002).

Au moins 30 métabolites, produits par hydroxylation, déméthylation ou cyclisation de la ciclosporine, ont été décrits (Christians et Sewing, 1993). La nomenclature des métabolites se compose de 2 lettres (A pour ciclosporine A suivie de M pour métabolite) et d'un ou de deux chiffres situant le ou les acides aminés modifiés pour les hydroxylés. Pour les métabolites déméthylés ou cyclisés, un « n » ou un « c » est ajouté. Les métabolites AM9, AM1 et AM4n sont les métabolites prédominants. AM1 et AM9 sont actifs mais ils ne contribueraient qu'à 10 à 20 % de l'activité immunosuppressive de la ciclosporine.

Ce sont les enzymes du CYP 3A (3A4 et 3A5) qui sont responsables de la formation des métabolites principaux de la ciclosporine (AM1, AM9, AM4n (Kronbach et col., 1988). D'autres CYP seraient impliqués mais dans des voies secondaires et assez minoritaires (Christians et Sewing, 1995).

Les CYP 3A sont présents au niveau hépatique et intestinal. Mais le CYP 3A5 n'est exprimé que chez 10 à 30 % des caucasiens en raison d'une mutation génétique (Kuehl et col., 2001). Lorsqu'il est exprimé, il représenterait jusqu'à 50 % des CYP 3A hépatiques et intestinaux totaux (Lin et col., 2002). L'effet de la mutation sur la biodisponibilité de la ciclosporine est controversé mais ne semble pas majeur (Anglicheau et col., 2004; Haufroid et col., 2004; Hesselink et col., 2004), peut être en raison de la régiosélectivité particulière du CYP 3A5 qui ne produit *in vitro* que le métabolite AM9 (Dai et col., 2004).

Plusieurs études s'accordent pour dire que le CYP 3A5 est exprimé au niveau rénal et pas le CYP3A4 (Schuetz et col., 1992; Haehner et col., 1996; Dai et col., 2004). Une de ces études (Dai et col., 2004) retrouvait *in vitro* un effet net de la mutation CYP 3A5*3 sur le métabolisme microsomal rénal de la ciclosporine alors qu'il était non significatif pour le

métabolisme hépatique. Ces données n'ont pas encore été confirmées *in vivo* mais les variations d'exposition intra-rénale à la ciclosporine liées à cette isoforme pourraient être un élément important dans la néphrotoxicité de cette molécule.

Enfin, les résultats d'une étude *in vitro* laissent penser que la ciclosporine est glucuroconjugée par l'UGT 2B7 au niveau hépatique et intestinal (Strassburg et col., 2000). En effet, deux métabolites glucuroconjugés avaient été précédemment décrits (Christians et Sewing, 1993). Cette voie est probablement très minoritaire mais pourrait néanmoins être impliquée dans des interactions métaboliques.

I-2-2. Métabolisme du tacrolimus

Le tacrolimus est très largement métabolisé puisqu'à peine 0,5 % de la dose administré par voie orale se retrouve dans les urines ou les fèces sous forme inchangée (Moller et col., 1999). Ce métabolisme est hépatique mais aussi intestinal (Venkataramanan et col., 1995).

Au moins 15 métabolites de première ou de seconde générations produits essentiellement par O-déméthylation et hydroxylation ont été identifiés. Parmi eux le 13-O-déméthyl-tacrolimus est le métabolite majoritaire, retrouvé au niveau sanguin (Venkataramanan et col., 1995) et produit *in vitro* à partir d'incubations microsomales (Vincent et col., 1992).

Seul le 31-O-déméthyl-tacrolimus présente *in vitro* une activité immunosuppressive comparable à celle du tacrolimus. Les autres métabolites ont une activité négligeable (Iwasaki et col., 1993). Le 31-O-déméthyl-tacrolimus étant un métabolite sanguin minoritaire, il est raisonnable de penser que les métabolites ne participent que très accessoirement à l'activité thérapeutique (Christians et col., 2002).

Ce sont principalement les CYP 3A qui métabolisent le tacrolimus, mais les études réalisées *in vitro* laissent penser que d'autres CYP pourraient intervenir, probablement de façon minoritaire (Sattler et col., 1992; Vincent et col., 1992; Venkataramanan et col., 1995).

Une étude récente comparant *in vitro* les activités des CYP 3A4 et 3A5 et étudiant celles d'une banque de microsomes hépatiques humains immunoquantifiés, a mis en évidence une activité de formation du 13-O-déméthyl-tacrolimus supérieure pour le CYP 3A5 que pour le CYP 3A4 avec une contribution de cette isoforme à la déméthylation du tacrolimus

variant de 1,5 à 40 % selon les individus (Kamdem et col., 2005). Ceci explique les différences d'exposition au tacrolimus en fonction du statut génétique 3A5 observées par de nombreuses équipes (Haufroid et col., 2004; Tsuchiya et col., 2004; Macphee et col., 2005).

Le rôle du métabolisme de phase II dans l'élimination du tacrolimus est parfois évoqué. Une étude d'échantillons humains de bile avec ou sans hydrolyse des glucuro-conjugués a permis de démontrer, de façon indirecte, l'existence de glucuroconjugués du tacrolimus (Firdaous et col., 1997). De même Strassburg et col. ont détecté *in vitro* une activité de glucuroconjugaison hépatique et intestinale attribuable à l'UGT 2B7 à partir de préparations microsomales hépatiques et gastro-intestinales et d'UGT recombinantes (Strassburg et col., 2000). La technique analytique, peu spécifique (utilisation d'acide UDP-glucuronique marqué au ¹⁴C et chromatographie planaire), n'a pas permis l'identification formelle des métabolites.

I-3. METABOLISME DES INHIBITEURS DE LA m-TOR

I-3-1. Métabolisme du sirolimus

Le sirolimus est métabolisé par les enzymes du CYP 3A (Sattler et col., 1992) au niveau hépatique et intestinal (Christians et col., 1992) en une dizaine de métabolites (Gallant-Haidner et col., 2000). Le CYP 2C8 serait également impliqué dans la formation de certains métabolites (Jacobsen et col., 2001). Les métabolites formellement identifiés à partir d'incubations en présence de microsomes hépatiques humains incluent le 39- et le 41-O-déméthyl-sirolimus, le 16-, le 12- et le 34-hydroxy-sirolimus (Christians et col., 1992; Streit et col., 1996a). La somme des concentrations des métabolites détectés dans le sang de patients transplantés rénaux, au tau résiduel, représente environ 50 % de l'ensemble des dérivés du sirolimus (Streit et col., 1996b) avec majoritairement un hydroxy-sirolimus et un déméthyl-sirolimus.

Pour les métabolites qui ont été étudiés, l'activité immunosuppressive est faible, n'excédant pas 10 % de celle du produit parent (Christians et col., 1992).

Le polymorphisme des enzymes du CYP 3A (CYP3A5*3 et CYP 3A4*4B) contribue vraisemblablement aux variations de biodisponibilité du sirolimus (Anglicheau et col., 2005).

I-3-2. Métabolisme de l'évérolimus

L'évérolimus est un analogue structural du sirolimus. Les deux molécules ne diffèrent que par un groupement 2-hydroxyéthyl. Leurs profils métaboliques sont donc similaires : les mêmes métabolites mono- ou di-hydroxylés, déméthylés ou encore formés par ouverture du cycle (Dannecker et col., 1998; Vidal et col., 1998) sont produits par les CYP3A4, 3A5 et 2C8 au niveau intestinal et hépatique. Comme pour le sirolimus, après administration orale d'une dose unique d'évérolimus, le principal métabolite est mono-hydroxylé. Il représente environ la moitié de l'AUC_{0-24h} d'évérolimus (Kirchner et col., 2000). Il est à noter que la transformation d'évérolimus en sirolimus n'a été détectée qu'*in vitro* (Jacobsen et col., 2001). Si elle existe *in vivo*, elle est très certainement tout à fait accessoire. Il n'y a pas de donnée sur l'activité ou la toxicité des métabolites de l'évérolimus.

L'impact de la modification structurale sur le métabolisme de la molécule n'est pas clairement établi. Le groupement 2-hydroxyéthyl en position 40 semble diminuer *in vitro* la déméthylation en position 39, mais également plusieurs voies d'hydroxylation de la molécule, ce qui résulte en une clairance intrinsèque totale, calculée à partir de microsomes hépatiques humains, 2,7 fois plus faible pour l'évérolimus que pour le sirolimus (Jacobsen et col., 2001). Au contraire, Crowe et col. dans une étude réalisée *in situ* chez le rat, démontrait que le métabolisme intestinal de l'évérolimus était plus intense que celui du sirolimus mais compensé par une absorption plus rapide de la molécule (Crowe et col., 1999). Si le métabolisme contribue peut-être à la différence de biodisponibilité et de clairance des deux produits il est probable que d'autres facteurs interviennent, en particulier les phénomènes de transport ou encore le volume de distribution qui semble plus important pour l'évérolimus (Crowe et col., 1999).

A notre connaissance, il n'existe pas encore d'étude ayant évalué l'effet de la mutation du CYP 3A5 sur la biodisponibilité de l'évérolimus.

II. INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE IMMUNOSUPPRESSEURS

La thérapie immunosuppressive implique de façon quasi-systématique l'association de différents médicaments immunosuppresseurs. Des voies de métabolisme étant communes à certains d'entre eux, ces associations sont susceptibles d'engendrer des interactions pharmacocinétiques.

II-1. INTERACTIONS METABOLIQUES AVEC LE MYCOPHENOLATE MOFETIL

II-1-1. Interactions entre le mycophénolate et les inhibiteurs de la calcineurine

Deux études chez des patients transplantés rénaux ont mis en évidence que l'association du MMF au tacrolimus donnait lieu à des concentrations résiduelles et à des AUC de MPA plus fortes que son association à la ciclosporine (Zucker et col., 1997; Hubner et col., 1999). Zucker et col. a retrouvé une inhibition par le tacrolimus de la glucuroconjugaison du MPA par des UGT rénales humaines purifiées (Zucker et col., 1999). Cependant, les études de Vietri et col. et de Balogh et col., ne retrouvant pas cette interaction en utilisant des microsomes (Vietri et col., 2000) ou des microtranches hépatiques (Balogh et col., 2003), contredisent cette observation.

Plusieurs études cliniques, incluant un groupe « contrôle » de patients recevant du MMF sans ciclosporine ni tacrolimus suggèrent que seule la ciclosporine serait responsable d'une interaction avec le MMF, et non le tacrolimus : dans l'étude de Smak Greggor et col., l'arrêt de la ciclosporine au 6^{ème} mois post-transplantation chez 19 patients transplantés rénaux augmentait significativement les taux résiduels de MPA ($p=0,02$). A 9 mois post-transplantation, ces 19 patients avaient des taux résiduels de MPA plus élevé de moitié ($p<0,001$) par rapport à 19 autres patients n'ayant pas arrêté la ciclosporine (Smak Gregoor et col., 1999). L'étude de Pou et col. retrouvait des concentrations résiduelles de MPA plus

faibles chez des patients transplantés rénaux ou pulmonaires recevant du MMF en association à la ciclosporine et à la prednisone (n=117) que chez ceux recevant du MMF et de la prednisone (n=199) ou du MMF, du tacrolimus et de la prednisone (n=34) (Pou et col., 2001).

A l'inverse, l'étude de Filler et col., comparant 3 groupes d'enfants transplantés rénaux traités par l'association CsA/MMF/corticostéroïdes (n=15), tacrolimus/MMF/corticostéroïdes (n=14) ou MMF/corticostéroïdes (n=13), a décrit des AUC de MPA normalisées par la dose significativement supérieures chez les enfants sous tacrolimus comparées à celles observées chez les enfants sous CsA et chez les enfants ne recevant pas d'inhibiteur de la calcineurine (Filler et col., 2000). De plus, une étude incluant deux groupes de patients transplantés rénaux recevant MMF et prednisone en association au tacrolimus ou à la ciclosporine a décrit une corrélation négative entre les concentrations résiduelles de ciclosporine et de MPA, mais aussi une corrélation positive entre la dose de tacrolimus et les concentrations maximales de MPA (Kuriata-Kordek et col., 2003).

Bien que cette dernière étude vienne la contredire, l'hypothèse la plus souvent avancée est que la ciclosporine diminue l'élimination biliaire du MPAG, secondairement réabsorbé sous forme de MPA. Une étude réalisée chez le rat comparant les traitements MMF/ciclosporine, MMF/tacrolimus et MMF/placebo démontre d'ailleurs que la ciclosporine diminue les AUC de MPA, augmente celle de son métabolite MPAG et diminue l'occurrence des seconds pics de MPA attribuables au cycle entérohépatique (van Gelder et col., 2001).

En résumé, il semble que les différences d'exposition au MPA en fonction de l'inhibiteur de la calcineurine associé soient liées à l'effet de la ciclosporine sur le cycle entérohépatique du MPA. En revanche, il est difficile de savoir si le tacrolimus a lui aussi un effet sur l'exposition au MPA tant les études sont contradictoires. Enfin, des augmentations, non significatives, de l'exposition à la ciclosporine (Rial et col., 1998) ou au tacrolimus (Pirsch et col., 2000) ont également été observées lorsque le MMF leur est associé. L'interaction pourrait faire intervenir une inhibition du métabolisme du tacrolimus ou de la ciclosporine par le MPA, pistes apparemment non explorées.

II-1-2. Interaction entre le mycophénolate et les inhibiteurs de la m-TOR

L'association de sirolimus au MMF à la place de la ciclosporine semble être à l'origine d'une augmentation de l'exposition au MPA : les études récentes de Haggan et col. et de Büchler et col. ont mis en évidence des AUC et des concentrations résiduelles de MPA plus fortes chez les patients transplantés rénaux recevant du MMF en association au sirolimus que chez ceux recevant du MMF en association à la ciclosporine (Buchler et col., 2005; El Haggan et col., 2005). A notre connaissance, une éventuelle interaction métabolique pouvant expliquer ces constatations n'a pas été explorée (*in vivo* ou *in vitro*).

Enfin, Il n'y pas encore d'étude publiée qui se sont intéressé à l'interaction entre le MMF et l'évérolimus.

II-2. INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE LES INHIBITEURS DE LA CALCINEURINE ET CEUX DE LA m-TOR

Les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) sont classiquement utilisés en association au MMF. Mais le sirolimus peut remplacer le MMF ou la ciclosporine. L'évérolimus récemment mis le marché est utilisé en association à la ciclosporine mais n'a pas d'AMM avec le tacrolimus. Or les CYP 3A interviennent de façon quasi-exclusive dans le métabolisme de tous les inhibiteurs de la calcineurine et de la mTOR. Par conséquent, le risque d'interaction est réel. En raison d'affinités et de concentrations différentes au site enzymatique, les interactions ne concernent cependant pas toutes les associations.

II-2-1. Interaction entre le sirolimus ou l'évérolimus et la ciclosporine

Ce sont des études chez l'animal qui ont les premières mis en évidence l'interaction pharmacocinétique entre le sirolimus et la ciclosporine. La co-administration orale de sirolimus et de ciclosporine chez le rat augmentait la biodisponibilité du sirolimus de 2 à

11 fois et celle de la ciclosporine de 2 à 3 fois (Stepkowski et col., 1996). Chez des patients transplantés rénaux stables, la co-administration des deux produits par rapport à des administrations séparées de 4 heures augmentait de 45 % les AUC, de 49 % les taux résiduels et de 72 % les concentrations maximales de sirolimus, sans effet significatif sur l'exposition à la ciclosporine (Kaplan et col., 1998).

L'interaction implique probablement l'inhibition de la P-gp mais surtout celle du CYP 3A4 par la ciclosporine. C'est ce que démontrait Cummins et col., avec un modèle de cellules intestinales Caco-2 transfectées avec le CYP 3A4 permettant l'étude conjointe des phénomènes de transport et de métabolisme : l'absorption du sirolimus était augmentée de 6 fois par la ciclosporine alors qu'un inhibiteur de la P-gp (le GG918) ne l'augmentait que de 50 % (Cummins et col., 2004). De même, la co-administration orale de sirolimus et d'un inhibiteur de la P-gp à des rats n'engendrait pas de modifications de la pharmacocinétique du sirolimus alors que le kétoconazole, par inhibition des CYP 3A intestinaux, augmentait significativement les AUC et les concentrations maximales du sirolimus (Wacher et col., 2002).

L'évérolimus est également utilisé en association à la ciclosporine. Assez logiquement la même interaction a été constatée pour cette molécule. Au cours d'une étude à dose unique chez le volontaire sain, l'administration concomitante d'évérolimus et de ciclosporine sous forme de microémulsion (Neoral[®]) augmentait l'AUC d'évérolimus de 168 % (46 %-365%) comparativement à l'administration seule (Résumé des caractéristiques du produit, Laboratoire Novartis).

En revanche, comme pour le sirolimus, il ne semble pas y avoir d'interaction de l'évérolimus sur la ciclosporine : l'administration d'une dose unique d'évérolimus a 7 patients transplantés rénaux stables s'est montrée sans effet sur la pharmacocinétique de la ciclosporine (Kirchner et col., 2000). Le ratio des concentrations de la ciclosporine et des inhibiteurs de la mTOR au site enzymatique est au moins égal à 100 fois. Il explique sans doute l'unilatéralité de l'interaction métabolique.

II-2-2. Interactions entre le sirolimus et le tacrolimus

A l'inverse de la ciclosporine, les concentrations thérapeutiques de tacrolimus sont du même ordre que celles du sirolimus et par conséquent le ratio de leurs concentrations au site métabolique voisin de 1. De plus, Lecointre et col. ont évalué l'effet du tacrolimus sur l'activité métabolique *in vitro* des principaux CYP et démontré que seules des concentrations supra-thérapeutiques de tacrolimus (supérieures à 800 µg/l) pouvaient inhiber, et ce de façon modérée, les CYP 3A4 et 3A5 (Lecointre et col., 2002). Lampen et col. décrivait pourtant le tacrolimus comme un inhibiteur compétitif du métabolisme microsomal intestinal et hépatique du sirolimus, mais là encore, avec des valeurs de K_i (voisines de 20 mg/l) 1000 fois supérieures aux concentrations thérapeutiques de tacrolimus (n'excédant pas 20 µg/l) (Lampen et col., 1998). Il n'est donc pas étonnant de constater qu'au contraire de la ciclosporine, le tacrolimus n'affecte pas la pharmacocinétique du sirolimus (Undre, 2003).

De même, *In vivo*, le sirolimus ne semble pas inhiber le métabolisme du tacrolimus : l'administration simultanée des deux molécules à 25 patients transplantés rénaux ou hépatiques, au lieu d'une administration espacée de 4 heures ne modifiait pas la pharmacocinétique des médicaments (McAlister et col., 2002). Lampen et col. avaient pourtant démontré *in vitro* que le sirolimus pouvait inhiber de façon compétitive le métabolisme hépatique et intestinal du tacrolimus. Mais là encore les valeurs de K_i (supérieures à 30 mg/l) dépassaient très largement les concentrations thérapeutiques du sirolimus (Lampen et col., 1995).

II-2-3. Interactions métaboliques impliquant les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes font partie intégrante de la plupart des protocoles immunosuppresseurs. Ils sont connus pour être des inducteurs des CYP 3A, par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes, ou pregnane X receptor, (PXR). Il est admis que les corticoïdes diminuent l'exposition au tacrolimus par induction de son métabolisme (Christians et col., 2002; Undre, 2003).

Dans le cas de la ciclosporine, les corticoïdes ont été associés soit à des augmentations, soit à des diminutions d'exposition en fonction des doses administrées ou du délai entre la date de début des corticoïdes et le dosage. Les corticoïdes pourraient induire les CYP mais également inhiber le métabolisme de la ciclosporine. L'initiation de la corticothérapie ou les augmentations brutales de posologie, dans le traitement d'un épisode de rejet par exemple, auraient plutôt un effet inhibiteur, progressivement compensé par l'effet inducteur (Campana et col., 1996).

Cattaneo et col. ont également démontré que les corticoïdes avaient un effet sur la pharmacocinétique du MPA (Cattaneo et col., 2002) : l'étude réalisée chez 26 patients transplantés rénaux recevant du MMF, ciclosporine, et méthylprednisolone, mettait en évidence que l'exposition au MPA (AUC et C_{max} rapportés à la dose) était inférieure dans le premier mois suivant la transplantation par rapport à une période tardive où les doses de corticoïdes sont diminuées (6 mois post-greffe). La clairance apparente était significativement supérieure et les taux résiduels de MPAG supérieurs à ceux observés dans la période tardive. A partir de 6 mois la diminution des doses de méthylprednisolone jusqu'à l'arrêt, était associée à une baisse progressive de la clairance apparente et des concentrations résiduelles de MPAG. L'exposition au MPA augmentait progressivement. A la fin du suivi (21 mois post-greffe), ces patients avaient des valeurs de clairance apparente et de concentrations résiduelles de MPAG significativement inférieures, et des C_{max} et AUC de MPA significativement supérieurs à celles d'un groupe contrôle de 12 patients pour lesquels la corticothérapie avait été maintenue. Les corticoïdes diminueraient donc l'exposition au MPA par induction de la formation de son métabolite glucuroconjugué (MPAG). Leur effet sur le métabolite actif et potentiellement toxique (AcMPAG) n'a pas été étudié.

PARTIE 3 :

TRAVAUX PERSONNELS

I. INTRODUCTION

La première étape de ce travail a été de confirmer l'identité des métabolites et des isoformes enzymatiques participant au métabolisme du MPA.

La connaissance de l'identité des isoformes enzymatiques impliquées dans le métabolisme du MPA offre en effet une perspective intéressante : rechercher si le polymorphisme génétique de ces isoformes influence le métabolisme du MPA. Il s'agit d'explorer les causes possibles de variabilité de la pharmacocinétique du MPA, ainsi que de rechercher une prédisposition à la survenue d'effets indésirables du MPA. Dans ce but, une étude préliminaire, de type pharmacogénétique-pharmacocinétique a été réalisée chez des patients transplantés rénaux.

Toujours dans l'optique de rechercher les facteurs à prendre en compte dans le STP du MMF, nous avons ensuite étudié *in vitro* et *in vivo* les interactions métaboliques pouvant intervenir entre le MPA et les autres médicaments immunosuppresseurs, pour l'ensemble des voies enzymatiques caractérisées à la première étape. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le paragraphe III.

Enfin, il nous est apparu intéressant d'étudier l'influence de la ciclosporine sur le métabolisme du sirolimus par les CYP 3A4 et 3A5. En effet, l'activité du CYP 3A5, enzyme soumise à une forte régulation génétique, est aujourd'hui reconnue comme un facteur important dans le métabolisme et la biodisponibilité des immunosuppresseurs (tacrolimus, sirolimus). Ce travail fait l'objet du paragraphe III-3. La prise en compte du statut génétique des individus pour ce cytochrome offre beaucoup d'espoir pour leur STP (Anglicheau et col., 2005), mais l'étude clinique actuellement menée en ce sens au laboratoire est hors du champ de ce travail de thèse.

Les voies de métabolisme des immunosuppresseurs et les interactions médicamenteuses qui y sont associées ne représentent qu'une partie des facteurs de variabilité de leur pharmacocinétique. Les protéines de transport impliquées dans les phases d'absorption, d'élimination ou de recirculation entérohépatique (MDR1 et MRP2 en particulier) ont une place essentielle dans la pharmacocinétique de ces molécules. L'étude de l'influence des polymorphismes génétiques de ces transporteurs et des interactions médicamenteuses les

concernant sont en cours dans l'équipe. Ces études ne faisaient pas partie des objectifs fixés dans le cadre de cette thèse et ne correspondent pas à un travail personnel de l'auteur. Les résultats qui en découlent ne sont donc pas présentés.

II. ETUDE DE METABOLISME *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU MYCOPHENOLATE MOFETIL

II-1. IDENTIFICATION DES METABOLITES ET DES VOIES METABOLIQUES DU MPA

Ce chapitre présente les résultats des travaux d'identification des métabolites du MPA et des isoformes enzymatiques impliquées dans leur formation. Ce travail avait été initié dans le cadre de notre DEA (pharmacologie expérimentale et clinique, Faculté de Médecine, Paris Sud). Nous avons confirmé l'identité des métabolites de phase II du MPA et identifié un métabolite de phase I. Nous avons également fait l'hypothèse que les deux glucuroconjugués du MPA étaient produits par des isoformes enzymatiques différentes à partir d'incubations avec des microsomes de rats induits par le phénobarbital ou le 3-méthylcholanthrène.

Ces travaux ont été complétés dans le cadre de cette thèse. Les isoformes enzymatiques impliquées dans le métabolisme de phase I et de phase II du MPA ont été formellement identifiées par utilisation de différentes méthodes complémentaires (utilisation d'isoformes recombinantes, inhibition chimique sélective). L'activité de différents organes (reins, foie, intestin) pour la production des métabolites conjugués a été comparée *in vitro* grâce à des microsomes humains préparés au laboratoire. Enfin, l'exposition aux différents métabolites a été évaluée chez des patients transplantés rénaux. Ces travaux ont donné lieu à deux publications.

- Le premier article : « **Characterization of a phase I metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5** », publié dans la revue *Therapeutic Drug Monitoring* (Picard et col., 2004) concerne l'étude *in vitro* et *in vivo* du métabolisme de phase I du MPA. Ce travail nous a permis d'identifier un métabolite déméthylé du MPA ainsi que deux métabolites secondaires glucuroconjugués, aussi bien après production par des microsomes humains que dans l'urine de patients transplantés rénaux traités par MMF. Nous avons également estimé les concentrations sanguines du métabolite de phase I ainsi que

leur évolution avec le délai post-transplantation, chez 5 patients transplantés rénaux. Les CYP 3A et 2C8 ont été identifiés comme les principales isoformes responsables de la formation de ce métabolite. Cet article comporte également les résultats d'une étude succincte de l'effet du MPA sur le métabolisme du tacrolimus ou de la ciclosporine, détaillée au chapitre *III-1-2* (page 95).

- Le second article : « **Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism** », publié dans la revue *Drug Metabolism and Disposition* (Picard et col., 2005c) présente la caractérisation formelle, *in vitro* et *in vivo* (dans le sang et l'urine de 14 transplantés rénaux) des métabolites de phase II du MPA, ainsi que l'étude *in vitro* des voies métaboliques impliquées. Il s'agissait de la première étude démontrant que des isoformes différentes étaient impliquées dans la formation du métabolite inactif (MPAG) et du métabolite actif et probablement toxique (AcMPAG). Nous avons démontré que le MPAG était principalement produit au niveau rénal et hépatique par l'UGT 1A9. La production intestinale de ce métabolite, assez faible, peut être attribuée aux UGT 1A8, 1A7 et 1A10. L'AcMPAG est un métabolite essentiellement hépatique, produit par l'UGT 2B7.

En réponse à un article paru plus récemment et apportant des résultats contradictoires aux nôtres en ce qui concerne l'identité des isoformes produisant l'AcMPAG nous avons, dans une lettre à l'éditeur de *Drug Metabolism and Disposition* (Picard et Marquet, 2004), souligné l'importance d'utiliser une méthode d'identification et de dosage sensible et spécifique pour l'étude de la glucuroconjugaison du MPA. En effet, la méthode analytique utilisée par les auteurs (basée sur l'utilisation de la chromatographie planaire) était loin d'avoir la spécificité et la sensibilité requises pour comparer les activités de formation de l'AcMPAG et du MPAG, deux métabolites dont les structures ne diffèrent que par la position du groupe conjugué et dont les Cl_{int} de formation *in vitro* peuvent varier d'un facteur 100.

ARTICLE 1 :Identification d'un métabolite de phase I de l'acide mycophénolique produit par les CYP3A4/5

Picard N, Cresteil T, Prémaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 600-608.

Abstract: To characterize a phase 1 metabolite of mycophenolic acid (MPA) and the human cytochrome P450 isoform(s) (CYP) involved in its formation. MPA metabolites were investigated in blood and urine samples from transplant patients under mycophenolate mofetil therapy (n = 5) as well as with in vitro incubation of MPA with human liver microsomes. The CYP isoforms involved in the oxidative metabolism were investigated in vitro on human liver microsomes with isoform-specific inhibitors as well as in human embryonic kidney cell lines expressing recombinant human CYPs. The analytic methods used were based on LC-MS/MS. A 6-O-desmethyl-MPA (DM-MPA) metabolite and 2 related glucuronides were identified in patients' blood and urine. Human liver microsomes produced DM-MPA with an apparent $K_m = 0.83 \pm 0.06$ mmol/L and $V_{max} = 5.57 \pm 0.29$ pmol/mg/min. The CYP3A inhibitor ketoconazole was found to inhibit DM-MPA formation by 50.3% with respect to the control, and trimethoprim (CYP2C8 inhibitor) reduced it by 30.1%. However, DM-MPA was produced only by the transfected cell lines expressing CYP3A4 and, to a lesser extent, CYP3A5. In vitro, MPA at concentrations above the plasma therapeutic range was found to decrease the metabolism of tacrolimus, suggesting a possible competition for CYP3A. No effect of MPA at therapeutic or higher level was found on cyclosporin metabolism. The phase 1 metabolite of MPA previously known as M-3 was identified as 6-O-desmethyl-MPA and is produced by CYP3A4/5 and probably CYP2C8. MPA might compete with other drugs on CYP3A because of its high therapeutic concentrations, although this was not the case for cyclosporin and to only a small extent for tacrolimus.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15570183

ARTICLE 2 : identification des isoformes d'UDP-glucuronosyltransferase impliquées dans le métabolisme de phase II de l'acide mycophénolique

Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 139-146.

Abstract: Mycophenolic acid (MPA), the active metabolite of the immunosuppressant mycophenolate mofetil is primarily metabolized by glucuronidation. The nature of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) involved in this pathway is still debated. The present study aimed at identifying unambiguously the UGT isoforms involved in the production of MPA-phenyl-glucuronide (MPAG) and MPA-acylglucuronide (AcMPAG). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method allowing the identification and determination of the metabolites of mycophenolic acid was developed. The metabolites were characterized in urine and plasma samples from renal transplant patients under mycophenolate mofetil therapy and in vitro after incubation of mycophenolic acid with human liver (HLM), kidney (HKM), or intestinal microsomes (HIM). The UGT isoforms involved in MPAG or AcMPAG production were investigated using induced rat liver microsomes, heterologously expressed UGT (Supersomes), and chemical-selective inhibition of HLM, HKM, and HIM. The three microsomal preparations produced MPAG, AcMPAG, and two mycophenolate glucosides. Among the 10 UGT isoforms tested, UGT 1A9 was the most efficient for MPAG synthesis with a $K(m)$ of 0.16 mM, close to that observed for HLM (0.18 mM). According to the chemical inhibition experiments, UGT 1A9 is apparently responsible for 55%, 75%, and 50% of MPAG production by the liver, kidney, and intestinal mucosa, respectively. Although UGT 2B7 was the only isoform producing AcMPAG in a significant amount, the selective inhibitor azidothymidine only moderately reduced this production (approximately -25%). In conclusion, UGT 1A9 and 2B7 were clearly identified as the main UGT isoforms involved in mycophenolic acid glucuronidation, presumably due to their high hepatic and renal expression.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15470161

LETTRE A L'EDITEUR

Etude *in vitro* de la glucuroconjugaison de l'acide mycophénolique

Picard N, Marquet P. *In vitro* study of mycophenolic acid glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 1524.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15550725

II-2. INFLUENCE DU POLYMORPHISME DES UGT 1A9 ET 2B7 SUR LE METABOLISME DU MPA CHEZ DES PATIENTS TRANPLANTES RENAU

La glucuroconjugaison est une étape essentielle dans la pharmacocinétique du MPA : nous rapportons dans l'article précédent (Picard et col., 2005c) des AUC_{0-12h} de MPAG 24 fois supérieures en moyenne à celles du MPA. Par ailleurs, le MPAG est à l'origine du cycle entérohépatique du MPA. Enfin, le MPA et le MPAG se fixent sur les mêmes sites cationiques de l'albumine plasmatique (Nowak et Shaw, 1995) et pourraient être activement excrétés par les mêmes transporteurs au niveau des tubules rénaux proximaux. Par conséquent des variations, même minimales, de cette voie de métabolisme sont susceptibles d'entraîner une variation substantielle des concentrations circulantes de MPA et pourraient expliquer en partie la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique de cette molécule.

Bernard et Guillemette ont étudié l'influence de plusieurs mutations de l'*UGT 1A8* (*2 ; *3) et de l'*UGT 1A9* (*2 ; *3) sur la formation du MPAG à partir de cellules transfectées (HEK293). La mutation de l'UGT intestinale 1A8 (*3) diminuait fortement son activité catalytique de synthèse du MPAG et l'affinité de l'UGT 1A9 pour le MPA était altérée par la mutation T98C (*UGT1A9*3*) (Bernard et Guillemette, 2004). Ceci nous semblait une base solide pour envisager la recherche clinique de l'effet de la mutation l'UGT 1A9 (*3) sur le métabolisme du MPA.

L'AcMPAG est un métabolite important du MPA pour d'autres raisons : il est actif et pourrait être responsable de certains effets secondaires du MMF. Le rôle quasi exclusif de l'UGT 2B7 dans sa formation apparaît comme un facteur prédisposant à une large variabilité de l'exposition à ce métabolite. Le gène de cette UGT est en effet muté chez 50 % des caucasiens (Holthe et col., 2003) et certaines des mutations décrites ont été associées à une activité réduite de 6-glucuroconjugaison de la morphine (Sawyer et col., 2003).

Ce paragraphe présente les résultats préliminaires de l'étude de l'influence du polymorphisme des UGT 1A9 et 2B7 sur la formation des métabolites glucuroconjugués du MPA. Ces résultats ont fait l'objet de deux communications récentes, lors d'un congrès national (Picard et col., 2005b) et d'un congrès international (Djebli et col., 2005).

II-2-1. Matériel et méthodes

II-2-1-1. Patients et pharmacocinétique

Cette étude a été réalisée chez 33 patients transplantés rénaux inclus dans deux essais cliniques multicentriques dont le CHU de Limoges était promoteur.

19 patients recevaient un traitement immunosuppresseur associant de la ciclosporine (Néoral[®]), du MMF (Cellcept[®]) et des corticoïdes (Solupred[®]). 14 patients étaient traités par une quadruple immunothérapie incluant : du sirolimus, du MMF, des corticoïdes et une induction par un sérum anti-lymphocytaire pendant les 5 premiers jours suivant la greffe.

Pour l'ensemble des patients, le MMF était prescrit à la dose initiale de 2g/jour, qui pouvait par la suite être adaptée sur des critères cliniques en fonction du rapport efficacité/tolérance. Les doses de ciclosporine ou de sirolimus étaient adaptées pour chaque patient en fonction des valeurs de concentration résiduelle. Les corticostéroïdes étaient administrés selon un schéma standardisé identique pour l'ensemble des patients.

Des cinétiques complètes ont été réalisées 1 et 2 semaines, et 1 et 3 mois après le début du traitement. A chaque fois, 10 prélèvements ont été effectués juste avant la prise (C₀) et 20 min, 40 min (30 min pour les patients sous sirolimus), 1h, 1h30, 2h, 4h, 6h et 9h après la prise du médicament.

Ces deux essais avaient reçu l'agrément du CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale) du Limousin. Tous les patients ont été inclus après avoir reçu la lettre d'information au patient et donné leur consentement éclairé par écrit. L'étude pharmacogénétique ayant débuté en cours d'essai, un amendement au protocole ainsi qu'un nouvel examen par le CCPPRB a été réalisé.

II-2-1-2. Dosages du MPA et de ses métabolites

Le MPA et ses métabolites ont été dosés par LC-MS/MS à l'aide des méthodes décrites dans l'article précédent (Picard et col., 2005c).

II-2-1-3. Génotypage

Après extraction d'ADN génomique à partir du sang total des patients, les génotypes de l'*UGT 2B7* (C816T et G-840A) et de l'*UGT 1A9*3* (T98C) ont été déterminés par PCR en temps réel. L'appareil était un ABI Prism 7000 SDS (Applied-Biosystems, Courtaboeuf, France) utilisant la technologie TAQMAN basée sur l'activité 5'exonucléasique de la Taq polymérase. Le couple d'amorces (délimitant la séquence d'ADN à amplifier), ainsi que les deux sondes fluorescentes (une sonde spécifique et marquée par un fluorochrome différent pour chaque allèle) ont été conçus à l'aide du logiciel Primer Express™ 2.0 (Applied-Biosystems), puis obtenus auprès d'Applied-Biosystems. Après hybridation des amorces et des sondes, la Taq polymérase libère et active le fluorochrome pendant la phase d'élongation. Au terme de 40 cycles d'amplification, le génotype de l'échantillon est déterminé par une lecture en point final de la fluorescence.

II-2-1-4. Analyse de la distribution allélique

Il a été vérifié que la distribution des allèles des *UGT 2B7* (G-840A) et *1A9*3* dans le groupe de patients étudié suivait l'équilibre théorique de Hardy-Weinberg :

- soit p la fréquence observée de l'allèle sauvage (somme de la fréquence des individus sauvages et de la moitié de celle des hétérozygotes),
- et q la fréquence observée de l'allèle muté (somme de la fréquence des individus mutés et de la moitié de celle des hétérozygotes).
- $p+q = 1$ et par conséquent $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ où p^2 représente la fréquence calculée des sauvages, $2pq$ la fréquence calculée des hétérozygotes et q^2 celle des mutés.

Les fréquences observées et calculées ont été comparées par un test du Chi² avec un niveau de significativité fixé à 5 %.

II-2-1-5. Calcul et analyse statistique

Les patients ont été classés en 3 groupes (homozygote sauvage, hétérozygote ou homozygote muté) selon leur statut génétique pour l'UGT 2B7 et 2 groupes (sauvage et muté) pour l'UGT 1A9.

Dans chacun des groupes ont été calculées les valeurs moyennes d'AUC et d'AUC/dose pour le MPA, l'AcMPAG et le MPAG, ainsi que les rapport métaboliques d'AUC (MPAG/MPA et AcMPAG/MPA), d'une part pour chaque période post-transplantation, d'autre part sur l'ensemble des 3 premiers mois post-greffe.

Les comparaisons statistiques entre groupes ont été effectuées par les tests non paramétriques de Kruskal et Wallis (3 groupes) ou de Mann et Whitney (2 groupes) avec un niveau de significativité fixé à 5%.

II-2-2. Résultats

D'importantes différences d'exposition des patients aux métabolites du MPA existent en fonction de l'immunosuppresseur associé au MMF (sirolimus ou ciclosporine). Ces différences seront abordées en détails au chapitre suivant. C'est pour cette raison que l'étude de l'influence du polymorphisme génétique des UGT sur le métabolisme du MPA a été réalisée dans deux groupes différents de patients, l'un recevant l'association MMF et sirolimus, l'autre recevant l'association MMF et ciclosporine.

Les statuts génétiques des individus pour les mutations C816T et G-840A de l'*UGT 2B7* étaient inversement associés : les patients mutés pour l'une des mutations étaient sauvages pour la seconde. Seul un patient homozygote muté C816T était hétérozygote pour la mutation G-840A. En conséquence, les résultats ci-dessous ne font apparaître que l'effet de la mutation G-840A (Figure II-1).

Dans le groupe de patients recevant du sirolimus (n=14), seuls 2 patients ne présentaient pas la mutation G-840T de l'*UGT 2B7*, 9 patients étaient hétérozygotes mutés et 3 patients homozygotes mutés (fréquence de la mutation allélique : 54 %). Dans le groupe de patients recevant de la ciclosporine (n=19), le gène était sauvage chez 4 patients, présentait un allèle muté pour 12 patients et les 2 pour 3 patients (fréquence de la mutation allélique : 53 %). La fréquence de la mutation allélique dans l'ensemble des deux groupes (n=33) était

de précisément 50 % avec une distribution des allèles conforme à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Les valeurs d'AUC_{0-9h} d'AcMPAG (brutes et normalisées par la dose de MMF) des patients recevant l'association MMF/sirolimus semblaient graduellement augmentées par la mutation G-840A de l'*UGT 2B7* (Figure II-1). Les ratios des AUC d'AcMPAG/MPA était en moyenne 2 et 2,6 fois plus importants chez les patients hétérozygotes (GA) ou homozygotes mutés (AA) que chez les patients homozygotes sauvages (GG) ($p=0,05$) pour l'*UGT 2B7* (Figure II-1).

Pour les patients recevant de la ciclosporine, la même tendance à une augmentation graduelle des AUC et AUC/dose d'AcMPAG sous l'effet de cette mutation était visible. Cependant l'effet sur le ratio d'AUC AcMPAG/MPA n'était plus significatif (Figure II-1).

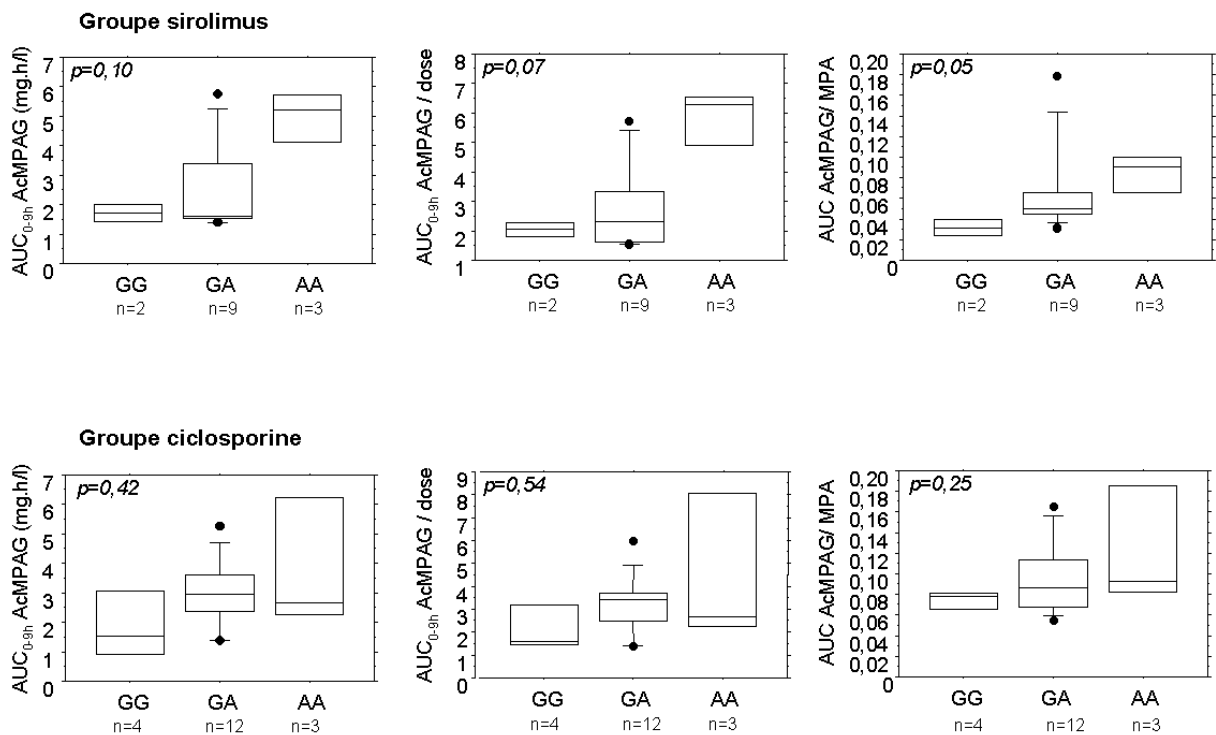


Figure II-1 : AUC_{0-9h} d'AcMPAG (brutes et pondérées par la dose de MMF) et ratio d'AUC AcMPAG/MPA en fonction du génotype de l'*UGT 2B7* (G-840A) chez des patients recevant MMF et sirolimus ou MMF et ciclosporine

Seuls 3 patients (2 recevant du sirolimus et 1 recevant de la ciclosporine) étaient hétérozygotes pour l'*UGT 1A9*3* et aucun n'était homozygote pour cette mutation (fréquence de mutation allélique : 4,5 %). Cette distribution était conforme à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Etant donné les faibles effectifs, aucune corrélation n'a pu être établie entre cette mutation et la formation du MPAG (Figure II-2), en terme d'AUC brutes, d'AUC/dose et de rapport d'AUC MPAG/MPA.

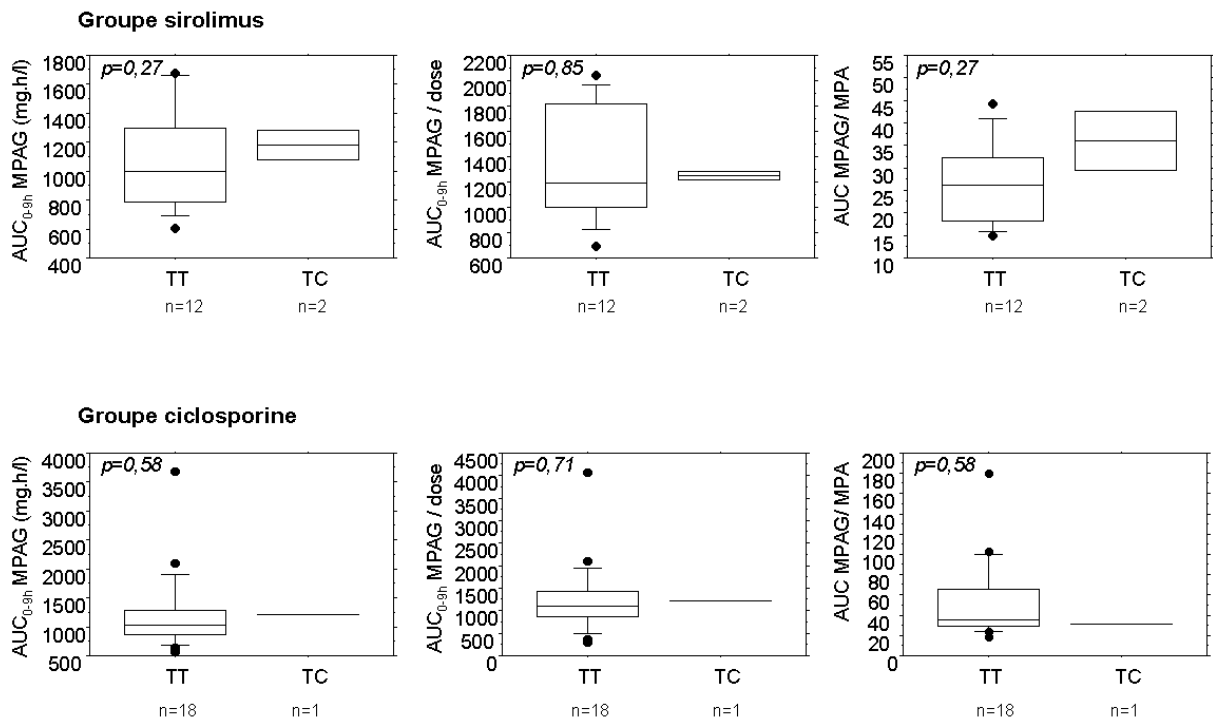


Figure II-2 AUC_{0-9h} de MPAG (brutes et pondérées par la dose de MMF) et ratio d'AUC MPAG/MPA en fonction du génotype de l'*UGT 1A9*3* chez des patients recevant MMF et sirolimus ou MMF et ciclosporine

Cette mutation ne semblait pas non plus associée à une différence des AUC ou AUC/dose du produit parent, le MPA.

II-2-3. Discussion et perspectives

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à l'heure actuelle à un effet de la mutation T98C de l'UGT 1A9 sur l'exposition des patients transplantés rénaux au MPA ou au MPAG. L'étude de Bernard et Guillemette avait démontré *in vitro* que cette mutation diminuait l'affinité de l'enzyme pour le MPA (Bernard et Guillemette, 2004). La même équipe avait observé que l'activité de glucuroconjugaison du propofol et du MPA était inférieure pour une préparation microsomale hétérozygote pour l'*UGT 1A9*3* par rapport à la moyenne des activités des autres préparations testées (n=47) (Girard et col., 2004). Même s'il était confirmé que cette mutation a un impact sur l'activité de glucuroconjugaison du MPA, elle est relativement rare (environ 3 % des caucasiens). Par conséquent, il est peu probable qu'elle explique à elle seule l'importante variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du MPA. D'autres mutations de l'*UGT 1A9*, en particulier au niveau de son promoteur, sont à l'origine d'une régulation génétique de son expression. Certaines d'entre elles ont été associées à des variations de l'activité de microsomes hépatiques humains pour la glucuroconjugaison du propofol et du MPA (Girard et col., 2004). La recherche de l'influence de ces mutations ou d'autres non encore identifiées, sur l'exposition au MPA *in vivo* feront l'objet de travaux ultérieurs.

En outre, même si l'activité de glucuroconjugaison des microsomes intestinaux semble assez réduite par rapport à l'activité de préparations rénales et hépatiques (Shipkova et col., 2001a; Picard et col., 2005c), il conviendra d'étudier le rôle du polymorphisme des UGT intestinales participant à la formation du MPAG (UGT 1A7 et 1A8) dans la variabilité de la pharmacocinétique du MPA. Ces UGT pourraient participer au métabolisme présystémique du MPA mais pourraient également limiter la circulation entéro-hépatique du MPA.

Bien qu'il soit nécessaire de le confirmer avec un effectif plus important de patients, la mutation G-840A de l'UGT 2B7 semble être à l'origine d'une variation de l'exposition à l'AcMPAG pour les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine. La même tendance est observée pour les patients sous ciclosporine, mais elle semble atténuée. La ciclosporine inhibe l'excrétion biliaire du MPAG et nous avons pu démontrer que cet effet concernait également l'AcMPAG (article 3, page 92). La ciclosporine introduit donc un

facteur supplémentaire de variabilité des concentrations d'AcMPAG qui pourrait masquer l'effet de la mutation de l'*UGT 2B7* sur l'exposition à ce métabolite.

La première mutation identifiée pour l'*UGT 2B7* concernait la région codante du gène l'enzyme (C816T) et avait été associée à une diminution de l'activité de glucuroconjugaison (en position 6) de la morphine (Sawyer et col., 2003). Holthe et col. ont mis en évidence 11 mutations supplémentaires de l'*UGT 2B7* dont la mutation G-840A. La comparaison du statut génétique des individus inclus dans notre travail pour les mutations C816T et G-840A laisse penser qu'elles sont associées par un déséquilibre de liaison comme c'est le cas pour d'autres mutations de ce gène. L'individualisation des groupes de mutations associées (haplotype) à partir de l'étude de quelques mutations pertinentes est en cours dans le laboratoire et devrait permettre d'étudier avec plus de précision l'effet du statut génétique de l'*UGT 2B7* sur la production de l'AcMPAG.

Enfin, une étude multicentrique en cours visant à évaluer l'intérêt du suivi thérapeutique du MMF en greffe rénale (étude APOMYGRE, Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2002), nous permettra d'obtenir à grande échelle (120 patients sont inclus) les données d'exposition à l'AcMPAG, le génotype de l'*UGT 2B7* ainsi que les événements indésirables survenus durant le traitement. Nous espérons que cette étude nous apportera plus d'informations sur l'influence du polymorphisme de l'*UGT 2B7* sur l'exposition à l'AcMPAG, et sur la susceptibilité individuelle aux effets secondaires dont il pourrait être responsable.

III. ETUDES DES INTERACTIONS METABOLIQUES ENTRE MEDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

III-1. ANTICALCINEURINES, SIROLIMUS, EVEROLIMUS ET METABOLISME DU MPA

III-1-1. Etude des interactions pharmacocinétiques *in vivo* entre le mycophénolate et la ciclosporine ou le sirolimus et des voies métaboliques potentiellement impliquées

Plusieurs études, décrites au paragraphe *II-1-1* de la partie précédente (page 70) (Zucker et col., 1997; Hubner et col., 1999; Smak Gregoor et col., 1999), se sont intéressées à la comparaison de l'exposition au MPA et éventuellement à son métabolite majoritaire MPAG, en fonction de l'inhibiteur de la calcineurine associé (ciclosporine ou tacrolimus).

Le sirolimus ayant une néphrotoxicité réduite, il est aujourd'hui proposé en association au MMF à la place de la ciclosporine. L'influence du sirolimus sur la pharmacocinétique du MPA n'a fait l'objet que de deux études récemment publiées, décrites au paragraphe *II-1-2* de la seconde partie (page 72) (Buchler et col., 2005; El Haggan et col., 2005).

Nous avons comparé l'exposition au MPA et à l'ensemble de ses métabolites conjugués chez des patients transplantés rénaux recevant du MMF et des corticostéroïdes en association soit à la ciclosporine (n=19), soit au sirolimus (n=12). Parallèlement, nous avons évalué *in vitro* l'influence du sirolimus, du tacrolimus, de la ciclosporine ou de l'évérolimus sur le métabolisme microsomal de phase II du MPA.

Ce travail a fait l'objet d'une publication : « **A comparison of the effect of cyclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients** » acceptée dans la revue *British Journal of Clinical Pharmacology*.

Il s'agissait de la première étude comparant en parallèle l'exposition au MPA et à ses métabolites en fonction du traitement associé (ciclosporine ou sirolimus). Nous avons mis en évidence des AUC de MPA augmentées pour les patients recevant du sirolimus par rapport à ceux recevant de la ciclosporine, une interaction dont l'importance semble justifier un ajustement des doses de MMF prescrites. Nous avons pu démontrer *in vitro* que ni le sirolimus, ni les autres immunosuppresseurs associés au MMF n'inhibaient le métabolisme de phase II du MPA et que par conséquent, le mécanisme de cette interaction impliquait vraisemblablement l'effet de la ciclosporine sur l'excrétion biliaire du MPAG, métabolite responsable du cycle entérohépatique du MPA. Pour la première fois il était ainsi démontré cliniquement que cet effet concerne l'ensemble des métabolites de phase II du MPA et en particulier l'AcMPAG, métabolite actif pouvant être responsable de certains effets secondaires du MMF et dont la concentration sanguine est diminuée sous sirolimus, ce qui pourrait être un argument en faveur de cette association thérapeutique.

ARTICLE 3 : comparaison de l'effet de la ciclosporine et du sirolimus sur la pharmacocinétique du mycophénolate chez des patients transplantés rénaux

Picard N, Prémaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Marquet P. A comparison of the effect of cyclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients. *Brit J Clin Pharmacol*, *sous-presse*.

Abstract:

Aim To compare the pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) when given with either cyclosporin or sirolimus, and investigate *in vitro* the potential effect of cyclosporin, sirolimus, tacrolimus and everolimus on MPA metabolism. **Methods** In renal transplant patients given mycophenolate mofetil in combination with cyclosporin (n=19) or sirolimus (n=12), concentration profiles of MPA, MPA-phenyl-glucuronide (MPAG), MPA-acyl-glucuronide (AcMPAG) and MPA-phenyl-glucoside (MPAGls) were determined at one month post-grafting and the corresponding areas under the curves (AUC_{0-9h}) calculated. The effect of the other immunosuppressive drugs on MPA glucuronidation and glycosylation was investigated *in vitro* using human liver microsomes. **Results** The mean MPA AUC_{0-9h} in the sirolimus group was 44.9 [95%CI: 34.7;55.1] vs 30.5 [95%CI: 25.4;35.6] mg.h/l in the cyclosporin group, corresponding to 1.5-fold higher dose-normalized values ([95%CI: 1.1;1.9]; $p<0.05$). In addition, the metabolite/MPA AUC_{0-9h} ratios were significantly higher in patients co-treated with cyclosporin than with sirolimus, with a difference of 1.8-fold ([95%CI: 1.3;2.3]; $P=0.0009$), 2.6-fold ([95%CI: 2.0;3.3]; $P<0.0001$) and 4.3-fold ([95%CI: 2.6;6.0]; $P=0.0016$) for MPAG, AcMPAG and MPAGls, respectively. *In vitro*, none of the immunosuppressive drugs tested inhibited MPA metabolism. **Conclusion** Patients taking mycophenolate mofetil and sirolimus experience a higher exposure to MPA and a lower exposure to MPA metabolites than those being treated mycophenolate mofetil and cyclosporin. This interaction is probably not caused by inhibition of MPA glucuronidation or glycosylation, but is more likely to be due to the influence of cyclosporin on the excretion of MPA metabolites into bile.

III-1-2. Tacrolimus et métabolisme du MPA

L'article précédent nous a permis de mettre en évidence une différence d'exposition au MPA et à ses métabolites en fonction de l'immunosuppresseur associé (sirolimus ou ciclosporine). Une différence du même ordre avait été précédemment rapportée lors de la comparaison des associations MMF/ciclosporine et MMF/tacrolimus (Zucker et col., 1997). Par ailleurs, les résultats de l'étude *in vitro* présentée dans l'article précédent confirment que ni le tacrolimus ni la ciclosporine ne sont des inhibiteurs du métabolisme de phase II du MPA.

Ce chapitre présente l'étude de la pharmacocinétique des métabolites du MPA chez des patients recevant du tacrolimus (n=10) en comparaison à celle des deux groupes de patients étudiés dans l'article précédent.

III-1-2-1. Méthode

III-1-2-1-1. Patients et prélèvements

L'étude de la pharmacocinétique du MPA et de ses métabolites a été réalisée chez 10 patients ayant reçu une greffe rénale et inclus dans un protocole de recherche biomédicale visant à étudier la pharmacocinétique croisée du tacrolimus et du mycophénolate (protocole PCCP). L'étude du métabolisme du MPA constitue un des objectifs secondaires de ce protocole. Cet essai multicentrique encore en cours, dont le CHU de Limoges est promoteur, a reçu l'agrément du CCPPRB (comité consultatif de protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale) du Limousin. Tous les patients ont été inclus dans l'étude après avoir reçu la lettre d'information au patient et donné leur consentement éclairé.

Les patients recevaient l'association MMF/tacrolimus/corticostéroïdes. La posologie quotidienne du MMF et du tacrolimus était répartie en deux prises égales espacées de 12 heures. Le MMF était prescrit à une dose fixe de 2 g/j, pouvant être par la suite adaptée pour chaque patient sur des critères cliniques de tolérance ou d'efficacité. Les doses de tacrolimus étaient ajustées de façon à maintenir sa concentration résiduelle dans une fourchette comprise entre 5 à 15 ng/ml.

Un mois après la transplantation, des échantillons sanguins ont été prélevés chez chaque patient, avant (C_0), 20, 40, 60, 90, 120 minutes, 3, 4, 6 et 9 heures après administration du MMF et du tacrolimus. Après centrifugation, un aliquot de plasma a été acidifié par addition de 10 μ l/ml d'acide phosphorique pour le dosage des métabolites du MPA.

III-1-2-1-2. Dosage du MPA et de ses métabolites

Le dosage plasmatique du MPA et de ses métabolites a été réalisé par LC-MS/MS (méthodes décrites dans l'article précédent).

Les AUC_{0-9h} du MPA et de ses métabolites ont été calculées par la méthode des trapèzes.

III-1-2-1-3. Etude statistique

Le poids, l'âge, les concentrations de créatinine sérique et les doses de prednisolone des 3 groupes de patients ont été comparés par le test non-paramétrique de Kruskal et Wallis, le sexe ratio et la distribution des doses de MMF par le test du Chi-2.

Les indices d'exposition normalisés au MPA et à ses métabolites (C_0 /dose, C_{max} /dose, AUC_{0-9h}/dose) ont été comparés entre les 3 groupes de patients (sous tacrolimus, ciclosporine ou sirolimus) par le test non-paramétrique de Mann et Whitney.

III-1-2-2. Résultats et discussion

Il n'y avait pas de différence significative de l'âge, du poids, de la fonction rénale, ou du sexe ratio entre les 3 groupes de patients. Les doses de prednisolone administrées ne différaient pas significativement pour les trois associations. (Tableau III-1).

Seuls deux patients, dans le groupe tacrolimus ont eu une réduction (de moitié) des doses journalières de MMF, en raison d'effets secondaires attribuables au traitement. La distribution des doses de MMF ne différait pas significativement entre les trois groupes (Tableau III-2 ; $p=0,4732$).

**Tableau III-1 : caractéristiques démographiques des patients, fonction rénale et dose de prednisolone.
Les valeurs médianes (minimum ; maximum) sont présentées**

	Immunosuppresseur associé au MMF			
	sirolimus	ciclosporine	tacrolimus	
	(n=12)	(n=19)	(n=10)	
<i>Age</i>	58 (20-68)	46 (20-66)	58 (31-65)	<i>p=0,1762</i>
<i>Sexe ratio (H/F)</i>	7/5	10/9	4/6	<i>p=0,6832</i>
<i>Poids (Kg)</i>	59 (41-90)	64 (43-87)	63 (53-74)*	<i>p=0,7884</i>
<i>Créatinine (µmol/l)</i>	131 (65-339)	124 (65-185)	135 (74-521)	<i>p=0,8279</i>
<i>Prednisolone dose (mg/j)</i>	25 (15-35)	20 (12,5-45)	22,5 (17,5-60)*	<i>p=0,2086</i>

* Le poids ainsi que la dose de prednisolone n'ont pas été obtenu pour 2 des 10 patients sous tacrolimus.

Tableau III-2 : Répartition des doses journalière de MMF

MMF (g/jour)	Nombre (pourcentage) de patients		
	groupe sirolimus (n=12)	groupe ciclosporine (n=19)	groupe tacrolimus (n=10)
2	9 (75%)	15 (79 %)	8 (80 %)
1,5	2 (17 %)	2 (11 %)	0 (0 %)
1	0 (0 %)	1 (5 %)	2 (20 %)
0,5	1 (8 %)	1 (5 %)	0 (0%)

Tableau III-3 : indices d'exposition au MPA et à ses métabolites rapportés à la dose de MMF (g) (Moyenne [IC 95 %])

		Immunosuppresseur associé				
		sirolimus	tacrolimus	p^a	ciclosporine	p^b
MPA	C_0 (mg/l)/dose	3,8 [2,1;5,5]	5,9 [4,3;7,5]	0,0750	1,5 [1,1;1,9]	<0,0001
	C_{max} (mg/l)/dose	12,8 [10,0;15,7]	17,1 [12,9;21,3]	0,1469	11,7 [8,1;15,2]	0,0493
	T_{max} (h)	0,9 [0,7;1,2]	1,1 [0,7;1,5]	0,4105	1,6 [0,7;2,5]	0,4105
	AUC_{0-9h} (mg.h/l)/dose	51,1 [39,8;62,3]	66,3 [48,5;84,0]	0,1135	34,0 [28,1;39,9]	0,0008
MPAG	C_0 (mg/l)/dose	88,2 [57,8;118,5]	102,1 [82,6;121,6]	0,1356	101,7 [78,2;125,2]	0,5716
	C_{max} (mg/l)/dose	137,5 [102,6;172,3]	154,4 [124,8;184,0]	0,1264	164,5 [130,6;198,3]	0,9608
	T_{max} (h)	2,1 [1,5;2,8]	3,3 [1,7;5,0]	0,6338	3,0 [2,3;3,7]	0,6338
	AUC_{0-9h} (mg.h/l)/dose	980,0 [689,5;1270,5]	1079,8 [883,7;1276,0]	0,1356	1200,4 [933,8;1466,9]	0,8248
AcMPAG	C_0 (mg/l)/dose	0,2 [0,1;0,2]	0,3 [0,2;0,4]	0,0207	0,2 [0,1;0,2]	0,0159
	C_{max} (mg/l)/dose	0,4 [0,3;0,6]	0,8 [0,5;1,0]	0,0174	0,7 [0,5;0,9]	0,6461
	T_{max} (h)	1,7 [1,2;2,2]	1,3 [0,7;1,9]	0,0161	2,2 [1,6;2,8]	0,0922
	AUC_{0-9h} (mg.h/l)/dose	2,0 [1,2;2,7]	3,8 [2,5;5,1]	0,0176	3,3 [2,5;4,2]	0,4913
MPAGls	C_0 (mg/l)/dose	0,1 [0,0;0,1]	0,2 [0,1;0,3]	0,0397	0,1 [0,1;0,1]	0,0533
	C_{max} (mg/l)/dose	0,3 [0,1;0,4]	0,6 [0,2;1,1]	0,0647	0,7 [0,5;1,0]	0,3833
	T_{max} (h)	1,7 [1,5;1,9]	1,9 [1,3;2,4]	0,1028	2,2 [1,7;2,6]	0,9422
	AUC_{0-9h} (mg.h/l)/dose	1,1 [0,7;1,5]	2,4 [1,0;3,8]	0,0349	3,0 [2,1;3,8]	0,2329

(a) : comparaison des groupes sirolimus et tacrolimus ; (b) : comparaison des groupes ciclosporine et tacrolimus (Test non paramétrique de Mann et Whitney)

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent des $AUC_{0-9h}/dose$ de MPA 1,5 fois plus élevées [IC 95% : 1,1 ; 1,9] pour les patients recevant le MMF en association au sirolimus par rapport à la ciclosporine ($p=0,0066$). Nous avons pu démontrer que cette interaction n'était pas liée à une inhibition de la glucuroconjugaison du MPA par le sirolimus mais vraisemblablement à un effet de la ciclosporine qui inhiberait l'excrétion biliaire du MPAG, à l'origine du cycle entérohépatique du MPA.

De façon similaire, nous retrouvons pour les patients sous tacrolimus, des $AUC_{0-9h}/dose$ de MPA 1,9 fois plus fortes [IC 95% : 1,5 ; 2,4] que pour ceux sous ciclosporine ($p=0,0008$) avec des valeurs de $C_0/dose$ et de $C_{max}/dose$ également significativement plus élevées ($p<0,0001$ et $p=0,0493$) (Tableau III-3).

Il avait été préalablement rapporté que l'association du tacrolimus au MPA à la place de la ciclosporine conduisait à des AUC et C_0 de MPA plus élevés (Zucker et col., 1997; Hubner et col., 1999). Là encore, l'effet de la ciclosporine sur la recirculation du MPA pourrait expliquer à lui seul cette différence. Nous retrouvons d'ailleurs des concentrations moyennes de MPA entre 4 et 9 heures nettement augmentées pour les patients sous tacrolimus par rapport à ceux sous ciclosporine, ce qui illustre bien l'effet de la ciclosporine sur le cycle entérohépatique du MPA (Figure III-1).

De plus, les rapports des AUC_{0-9h} des métabolites et du MPA (rapports métaboliques) étaient significativement plus faibles dans le groupe tacrolimus que dans le groupe ciclosporine (Figure III-2), une différence similaire à celle observée lors de la comparaison des groupes sirolimus et ciclosporine.

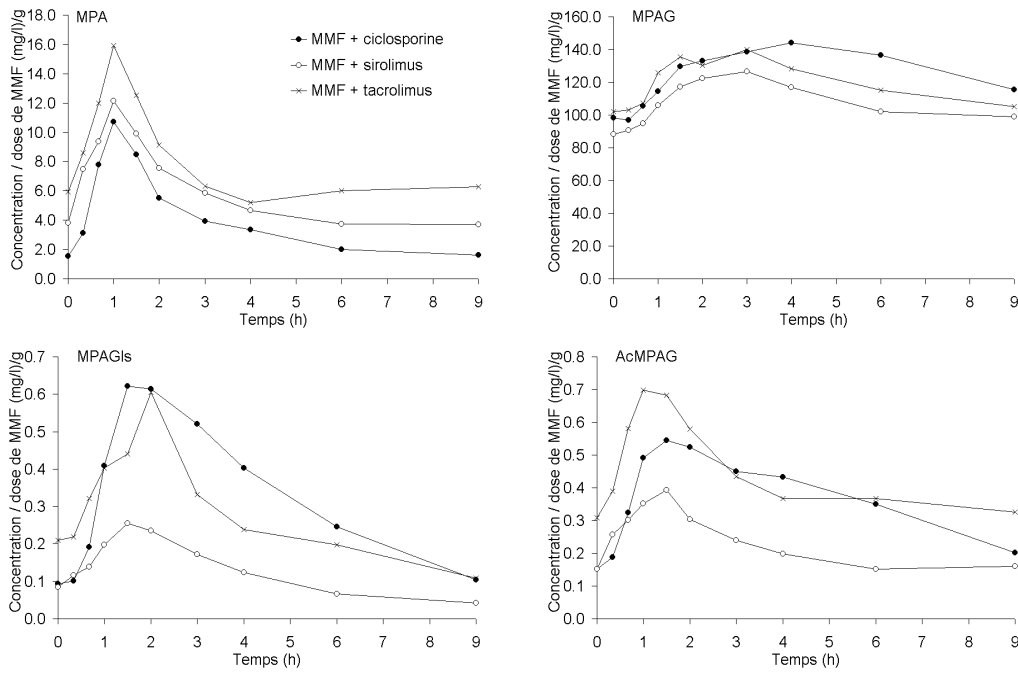


Figure III-1 : courbes de concentrations moyennes en fonction du temps de MPA, MPAG, AcMPAG et MPAGls rapportées à la dose de MMF pour les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine (cercle plein), au sirolimus (cercle vide) ou au tacrolimus (croix)

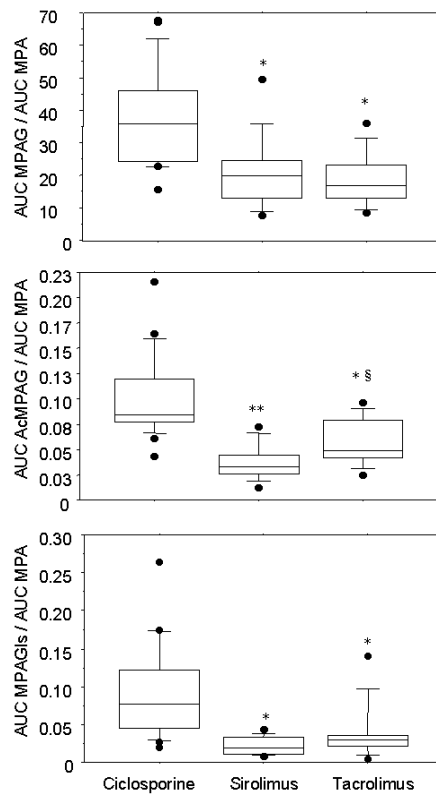


Figure III-2 : comparaison des ratios métaboliques (AUC_{0-9h} métabolite/ AUC_{0-9h} MPA) entre les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine, au sirolimus ou au tacrolimus. () Différences par rapport aux patients recevant de la ciclosporine (* $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$). (§) Différences par rapport aux patients recevant du sirolimus ($p = 0,0409$)**

Si la ciclosporine est effectivement la seule impliquée dans l'interaction alors il ne devrait pas y avoir de différence entre les associations MMF/tacrolimus et MMF/sirolimus (c'est l'hypothèse généralement admise à l'heure actuelle). Or, la différence d'exposition au MPA des patients recevant de la ciclosporine semble plus prononcée avec ceux recevant du tacrolimus qu'avec ceux recevant du sirolimus: à chaque temps de prélèvement, les concentrations moyennes de MPA rapportées à la dose de MMF des patients sous tacrolimus sont non seulement supérieures à celles des patients sous ciclosporine mais également à celles des patients sous sirolimus (Figure III-1).

Les $AUC_{0-9h}/dose$ de MPA des patients sous tacrolimus étaient en moyenne 1,4 fois plus élevées [IC 95% : 0,8 ; 2,1] que celles des patients sous sirolimus (Figure III-3). Cette différence n'est pourtant pas significative ($p=0,1135$), ce qui peut être attribuée à un effectif encore trop faible de patients (l'étude PCCP nous permettra d'atteindre à terme un effectif de 25 patients sous tacrolimus).

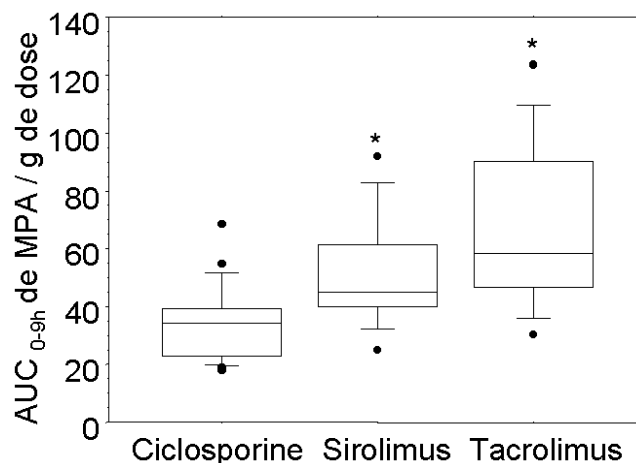


Figure III-3 : AUC_{0-9h} de MPA rapportées à la dose de MMF pour des patients co-traités avec de la ciclosporine (n=19), du sirolimus (n=12) ou du tacrolimus (n=10). (*) différences par rapport aux patients recevant de la ciclosporine ($p<0,005$)

En effet, Il existe également une différence d'exposition aux métabolites du MPA qui laisse penser que la pharmacocinétique du MPA est réellement différente sous tacrolimus et sous sirolimus : pour chaque point de la cinétique, les concentrations moyennes des métabolites (MPAG, AcMPAG et MPAGls) rapportées à la dose de MMF étaient plus élevées pour les patients recevant du tacrolimus que pour ceux recevant du sirolimus (Figure III-1), avec en conséquence des $AUC_{0-9h}/dose$ plus élevées (différences significatives pour l'AcMPAG ($p=0,0176$) et le MPAGls ($p=0,0349$)).

Un effet inhibiteur potentiel du tacrolimus sur la protéine de transport hépato-biliaire MRP2 pourrait expliquer l'augmentation des AUC de métabolites mais est tout à fait incompatible avec une exposition augmentée au MPA et à l'existence de forts rebonds de concentration (par rapport aux patients sous ciclosporine ou sous sirolimus) vraisemblablement dus au cycle entérohépatique. Il avait d'ailleurs été démontré chez le rat que, pour des concentrations thérapeutiques, le tacrolimus n'avait pas d'effet sur l'excrétion biliaire du MPAG (Kobayashi et col., 2004).

D'autres auteurs avaient émis l'hypothèse que le tacrolimus pourrait inhiber la formation du MPAG (Zucker et col., 1999). Un tel effet pourrait expliquer l'augmentation de l'exposition au MPA mais devrait être associé à une diminution du ratio MPAG/MPA, ce qui n'est pas le cas ici (Figure III-2). Seul le ratio AcMPAG/MPA est plus élevée pour les patients sous tacrolimus que pour ceux sous sirolimus ($p=0,0409$), mais ce résultat reste à confirmer avec un plus large effectif de patients. De plus, nous n'avons pas retrouvé d'effet du tacrolimus sur la glucuroconjugaison *in vitro* du MPA (article 3, page 92).

Dans la mesure où les patients recevant du tacrolimus présentent une exposition augmentée à la fois pour le MPA et pour ses métabolites, nous pensons que c'est vraisemblablement l'absorption du MPA qui est facilitée par le tacrolimus. Une étude comparant le transport du MPA au travers d'une couche de cellules MDCK (Madin-Darby Kidney Cells) transfectées ou non avec la P-glycoprotéine (MDR1), a démontré que le MPA était substrat de MDR1 et que la ciclosporine ou de façon plus modérée, le tacrolimus, pouvaient inhiber ce transport (Sawamoto et col., 2001). Si l'absorption du MPA est effectivement régulée par la P-glycoprotéine (P-gp) intestinale, son inhibition par le tacrolimus pourrait expliquer l'exposition augmentée au MPA et secondairement à ses métabolites, par rapport aux patients recevant du sirolimus. Cependant, si la ciclosporine est également un inhibiteur du transport du MPA par MDR1, il est étonnant de ne pas retrouver des concentrations voisines, voire plus fortes de MPA sous ciclosporine que sous tacrolimus, au moins dans la première heure suivant la prise (avant que l'effet d'inhibition du cycle entérohépatique de la ciclosporine ne se répercute sur les concentrations circulantes de MPA).

Nous évoquons dans la seconde partie de cette thèse (paragraphe II-1-1, page 70), la controverse existante concernant les interactions entre ciclosporine, tacrolimus et MPA. Alors que la plupart des auteurs s'accordent à dire que les différences d'exposition au MPA observées sous tacrolimus ou ciclosporine sont expliquées par la ciclosporine,

d'autres supposent que le tacrolimus a un effet additionnel (Filler et col., 2000; Kuriata-Kordek et col., 2003). Les résultats présentés dans le cadre de cette thèse laissent penser que le tacrolimus a effectivement un effet sur la pharmacocinétique du MPA. Le développement de modèles cellulaires d'absorption *in vitro* en cours dans l'équipe, devrait nous permettre de vérifier cette hypothèse et nous l'espérons, d'élucider le mécanisme de cette interaction.

III-2. MPA ET METABOLISME DES ANTICALCINEURINES

III-2-1. Contexte, résultats préliminaires et objectifs

Des études avaient mis en évidence des augmentations, non significatives, de l'exposition au tacrolimus (Pirsch et col., 2000) ou à la ciclosporine (Rial et col., 1998) lorsque le MMF leur était associé.

L'identification d'une voie de métabolisme de phase I pour le MMF dans le cadre de nos travaux offre un mécanisme potentiel à une telle interaction : le MPA, substrat des CYP 3A, pourrait être un inhibiteur du métabolisme de la ciclosporine ou du tacrolimus, qui fait intervenir les mêmes isoformes.

Nous avons recherché *in vitro* l'influence du MPA sur le métabolisme du tacrolimus et de la ciclosporine à partir d'incubations en présence de microsomes hépatiques humains. Ce travail a été publié avec les résultats d'identification du métabolite de phase I du MPA (article 1, page 81) : aucun effet du MPA (0,01-0,5 mM) n'a été retrouvé sur le métabolisme de la ciclosporine (500 nM). En revanche, la co-incubation de MPA (0,1 ou 0,5 mM) avec le tacrolimus (100 nM) augmentait la quantité de tacrolimus non métabolisé au bout de 30 minutes. Cette apparente inhibition du métabolisme du tacrolimus n'a pas été retrouvée avec des concentrations plus faibles de MPA (0,01 mM).

Le métabolite de phase I du MPA est produit par les CYP 3A avec une faible affinité, mais le rapport des concentrations de MPA et de tacrolimus incubées (compris entre 1000/1 et 5000/1), voisin de celui existant entre les concentrations sanguines des deux molécules (environ 1000/1) pourrait expliquer l'interaction observée. L'écart entre les concentrations sanguines de MPA et de ciclosporine, plus faible (environ 100/1) ne donnerait donc pas lieu à une telle interaction. Comme nous l'évoquons dans la discussion de l'article, le MPA est cependant nettement moins lipophile que le tacrolimus, il est donc probable que le ratio intra-hépatocytaire des concentrations de MPA et de tacrolimus soit plus faible que celui des concentrations sanguines. Néanmoins, nous avons souhaité étudier plus précisément l'effet potentiel du MPA sur le métabolisme *in vitro* du tacrolimus.

Ce chapitre présente l'étude de l'effet du MPA sur le métabolisme du tacrolimus par des microsomes hépatiques humains ou par les CYP 3A4 et 3A5 recombinants. L'interaction a également été recherchée *in vivo* chez des patients transplantés rénaux recevant l'association MMF/corticoïde/tacrolimus.

III-2-2. Matériel et méthode

III-2-2-1. Réactifs et microsomes

Le MPA et le NADPH ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), le tacrolimus chez Fujisawa (Osaka, Japon). Les microsomes hépatiques humains utilisés étaient un mélange de 48 préparations individuelles formulé par BD Biosciences GENTEST (Woburg, MA, USA). Cette préparation a une activité enzymatique représentative de l'activité moyenne dans la population. Des microsomes préparés à partir de cellules d'insectes surexprimant les CYP 3A4 et 3A5 (Supersomes®) ont été obtenus chez le même fournisseur. Aucune des 2 préparations ne surexprimait le cytochrome B5. Les autres réactifs utilisés, décrits dans les articles 1 et 2, étaient de la qualité requise pour ce type de travail.

III-2-2-2. Protocole expérimental

Dans des incubations préliminaires, il a été vérifié que le NADPH et les microsomes étaient indispensables à la disparition *in vitro* du tacrolimus. Les incubations ont été réalisées dans un tampon Tris 0,1 M pH 7,4 avec 10 mM de MgCl₂. Le tacrolimus ou le mélange tacrolimus/MPA ont été préparés dans un mélange acétonitrile/tampon d'incubation (50/50). Le volume final d'acétonitrile, identique dans l'ensemble des incubations, était de 1,25 %. Les incubations ont été réalisées dans un bain agité thermostaté à 37 °C. Après 5 minutes de pré-incubation du ou des substrats et des microsomes (0.1 mg/ml) ou des CYP (20 pmole/ml), la réaction a été initiée par l'ajout du NADPH (2 mM). Pour la mesure de la demi-vie métabolique du tacrolimus *in vitro*, des aliquots (50 µl) ont été prélevés dans l'incubation (600 µl) à 0, 2, 5, 10, 15 et 20 minutes et ajoutés à 50 µl d'acétonitrile glacial pour arrêter la réaction. Comme requis pour cette méthode, la concentration de tacrolimus incubée (100 ng/ml) était nettement inférieure au

K_m de déméthylation du tacrolimus (6504 ± 3328 ng/ml) rapporté dans la littérature (Sattler et col., 1992), la déméthylation étant la principale voie de métabolisme du tacrolimus.

Toutes les expériences ont été réalisées en duplicates ou en triplicates pour celles utilisant les enzymes recombinantes.

III-2-2-3. Etude *in vivo* de l'interaction MPA/tacrolimus

Les indices d'exposition au MPA et au tacrolimus administrés en association (AUC_{0-9h} , C_0 , C_{max} , doses) ont été obtenus chez les 10 premiers patients inclus dans le protocole PCCP, décrit au paragraphe III-1-2-1-1. Au total, 38 cinétiques de tacrolimus et de MPA ont été réalisées durant les 3 premiers mois post-transplantation (10 cinétiques à J7, 10 à J14, 10 à M1 et 8 à M3). La clairance apparente du MPA (CL/F) a été estimée par le rapport de la dose administrée sur l' AUC_{0-9h} (en l'absence d' AUC_{0-12h} pour l'ensemble des cinétiques). Une corrélation a été recherchée entre les AUC_{0-9h} ou le C_{max} de MPA d'une part, et la dose de tacrolimus d'autre part, ainsi qu'entre les AUC_{0-9h} , le C_{max} ou la dose de tacrolimus d'une part, et la clairance apparente du MPA d'autre part.

III-2-2-4. Méthodes analytiques

III-2-2-4-1. Dosage du tacrolimus

Le dosage du tacrolimus dans les incubations et dans les échantillons de patients a été réalisé grâce à une méthode LC-MS/MS utilisant un système d'extraction en ligne par chromatographie en flux turbulent HTLC 2300 (COHESIVE TECHNOLOGIES, UK).

Ce système est composé de deux pompes binaires et d'un système de vannes permettant de combiner l'extraction et la chromatographie du tacrolimus par basculement de colonnes. L'extraction est réalisée sur une colonne de grande granulométrie (50 μ m) Cyclone® (0,5x50 mm, D.I.) avec une phase mobile constituée de deux solutions : une solution d'acétate d'ammonium dans l'eau à 20 mM, tamponnée par de l'ammoniaque à 1/1000 et une solution constituée d'un mélange acétone/acétonitrile/isopropanol (50/30/20 ; v/v/v). Le débit total lors de cette phase d'extraction est de 1,25 ml/min.

La chromatographie est réalisée sur une colonne en phase inverse XTerra® MS C18, 3,5 μ m (2,1 x 20 mm, D.I.) placée dans un four à 65°C, avec une phase mobile constituée de

deux solutions : une solution aqueuse contenant 1% d'acide formique et une solution d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique. Le débit est de 0,2 ml/min.

Le système de détection utilisé est un spectromètre de masse en tandem TSQ Quantum Discovery (Thermo-Electron) avec une source électrospray fonctionnant en mode d'ionisation positif. Le dosage a été réalisé en mode de suivi des transitions (MRM) du tacrolimus (m/z 821→768, m/z 821→786 et m/z 821→718) et du désméthoxyiroliimus (étalon interne ; m/z 901→834).

L'analyse des échantillons sanguins a été réalisée à partir d'un protocole validé, utilisé en routine hospitalière pour le dosage du tacrolimus dans le sang total et soumis à un contrôle de qualité externe périodique.

Ce protocole a été adapté au milieu d'incubation : les gammes d'étalonnage, entre 1 et 100 ng/ml de tacrolimus, étaient préparées dans un mélange acétonitrile/tampon d'incubation (50/50 ; v/v). Un volume de 150 μ l d'une solution de méthanol/sulfate de zinc aqueux (70/30 ; v/v) et de 50 μ l d'étalon interne à 100 ng/ml étaient ajoutés à 100 μ l d'incubation ou d'étalon. Après agitation et centrifugation, 50 μ l étaient injectés dans le système COHESIVE.

III-2-2-4-2. Dosage du MPA

Le dosage plasmatique du MPA a été réalisé par LC-MS/MS selon la méthode précédemment publiée (Premaud et col., 2004) et décrite dans les paragraphes précédents.

III-2-2-5. Calculs et interprétation

Les clairances intrinsèques de métabolisme du tacrolimus ont été estimées à partir de l'évolution de la quantité de tacrolimus métabolisée en fonction du temps par la méthode de la demi-vie *in vitro* décrite au paragraphe IV-1-5. La demi-vie de disparition du tacrolimus *in vitro* (avec ou sans MPA) a été calculée selon l'équation 15 (page 43).

La Cl_{int} a été estimée selon l'équation 16 (page 43).

Les concentrations de MPA responsables de 50 % de l'effet inhibiteur maximum ont été obtenues à partir de l'équation de la droite de régression linéaire du pourcentage d'inhibition de la Cl_{int} en fonction du logarithme des concentrations de MPA.

III-2-3. Résultats

III-2-3-1. Effet *in vitro* du MPA sur le métabolisme du tacrolimus par des microsomes humains et les CYP 3A4 et 3A5

Le MPA est à l'origine d'une inhibition dose-dépendante du métabolisme du tacrolimus par les microsomes hépatiques humains (Figure III-4). L'inhibition maximale de la Cl_{int} du tacrolimus estimée par la méthode de la demi-vie, était de 81 % (valeurs individuelles : 76%; 87 %). La concentration de MPA responsable de 50 % de l'inhibition maximale (CI_{50}) a été estimée à 16 mg/l (Figure III-5).

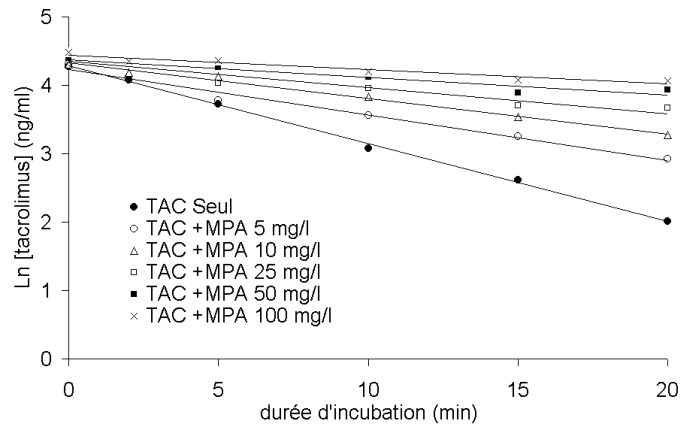


Figure III-4 : métabolisme hépatique microsomal du tacrolimus en fonction du temps en présence de concentrations croissantes de MPA.

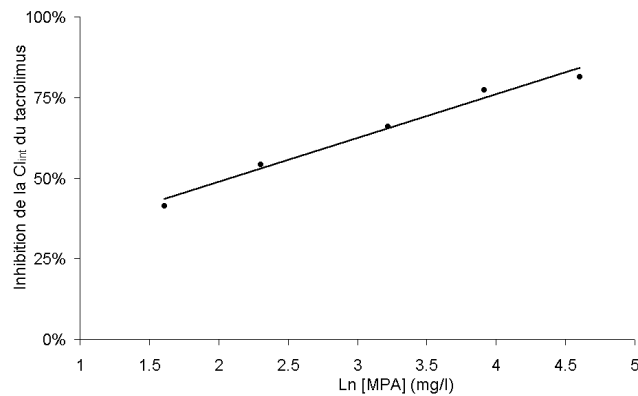


Figure III-5 : inhibition par le MPA de la clairance intrinsèque de métabolisme du tacrolimus. Chaque point représente la moyenne des Cl_{int} estimées à partir de deux incubations différentes par la méthode de la demi-vie *in vitro*.

Lors des expériences d'incubation avec des enzymes recombinantes, la Cl_{int} de métabolisme du tacrolimus, estimée par la même méthode, était 2,5 fois plus importante pour le CYP 3A5 que pour le CYP 3A4 (3,3 vs 8,5 μ l/pmole de CYP/min).

L'ajout de 10 mg/l de MPA à l'incubation inhibait les Cl_{int} de 47 ± 6 % pour le CYP 3A4 et de 8 ± 12 % pour le CYP 3A5 (n=3 ; Figure III-6). Pour la même concentration de MPA l'inhibition obtenue avec des microsomes humains était de 54 % (51 % ; 61 %) (Figure III-5).

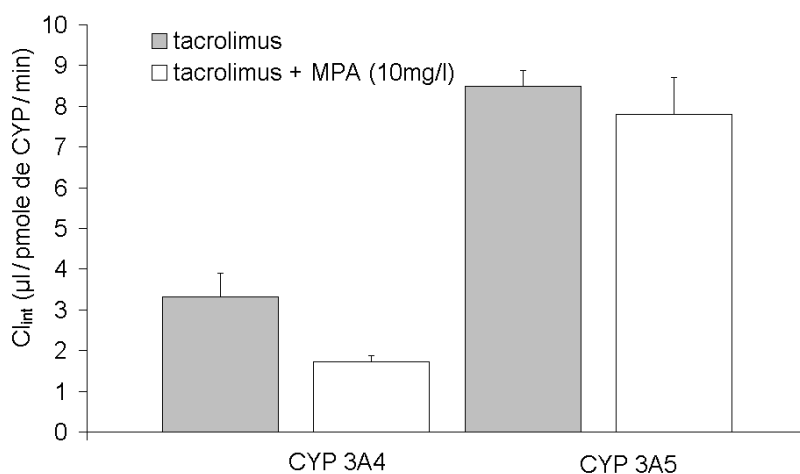


Figure III-6 : métabolisme du tacrolimus par les CYP 3A4 et 3A5 et influence du MPA (10 mg/l).
Les valeurs de Cl_{int} ont été estimées à partir de la méthode de la demi-vie *in vitro* et sont les moyennes de trois incubations différentes.

III-2-3-2. Relation entre l'exposition au MPA et celle au tacrolimus

La posologie initiale de MMF (2 g/j) avait été réduite à 1 g/j pour 6 des 38 cinétiques (à M1 pour un patient, à M3 pour deux patients, et dès J14 et jusqu'à M3 pour un patient) et à 1,5 g/j pour 2 d'entre elles (à M3). Cependant, ces modifications ne semblaient pas associées à une réduction des doses de tacrolimus : il n'y avait pas de différence significative entre les posologies de tacrolimus des patients recevant 2 g/j de MMF et celles des patients dont la doses journalière avait été diminuée ($4,3 \pm 1,6$ mg vs $3,4 \pm 0,7$ mg ; $p=0,1226$).

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre les AUC_{0-9h} ou les C_{max} de MPA et les AUC_{0-9h} , C_0 ou C_{max} de tacrolimus. Il y avait une corrélation significative (faiblement)

positive, entre les doses de tacrolimus et les AUC_{0-9h} ($R^2=0,108$; $p=0,0436$), mais pas avec les C_{max} de MPA ($R^2=0,044$; $p=0,2057$) (Figure III-7).

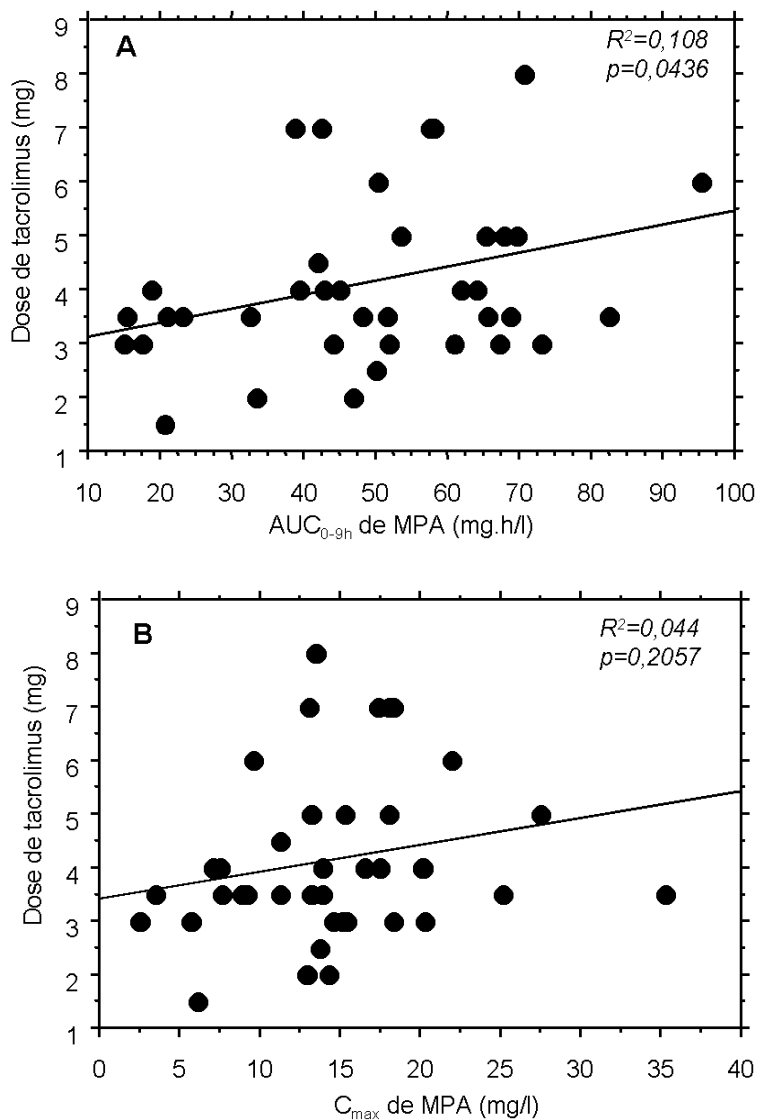


Figure III-7 : relations entre les doses de tacrolimus et les AUC (A) ou C_{max} de MPA (B), chez 10 patients transplantés rénaux (38 cinétiques) durant le premier mois post-tranplantation.

Il ne semblait pas y avoir d'effet de l'exposition au tacrolimus (AUC ou C_{max}) sur la clairance apparente du MPA (Figure III-8, A-B). Seules les doses de tacrolimus semblaient associées à une diminution des valeurs de clairance apparente de MPA (Figure III-8, C).

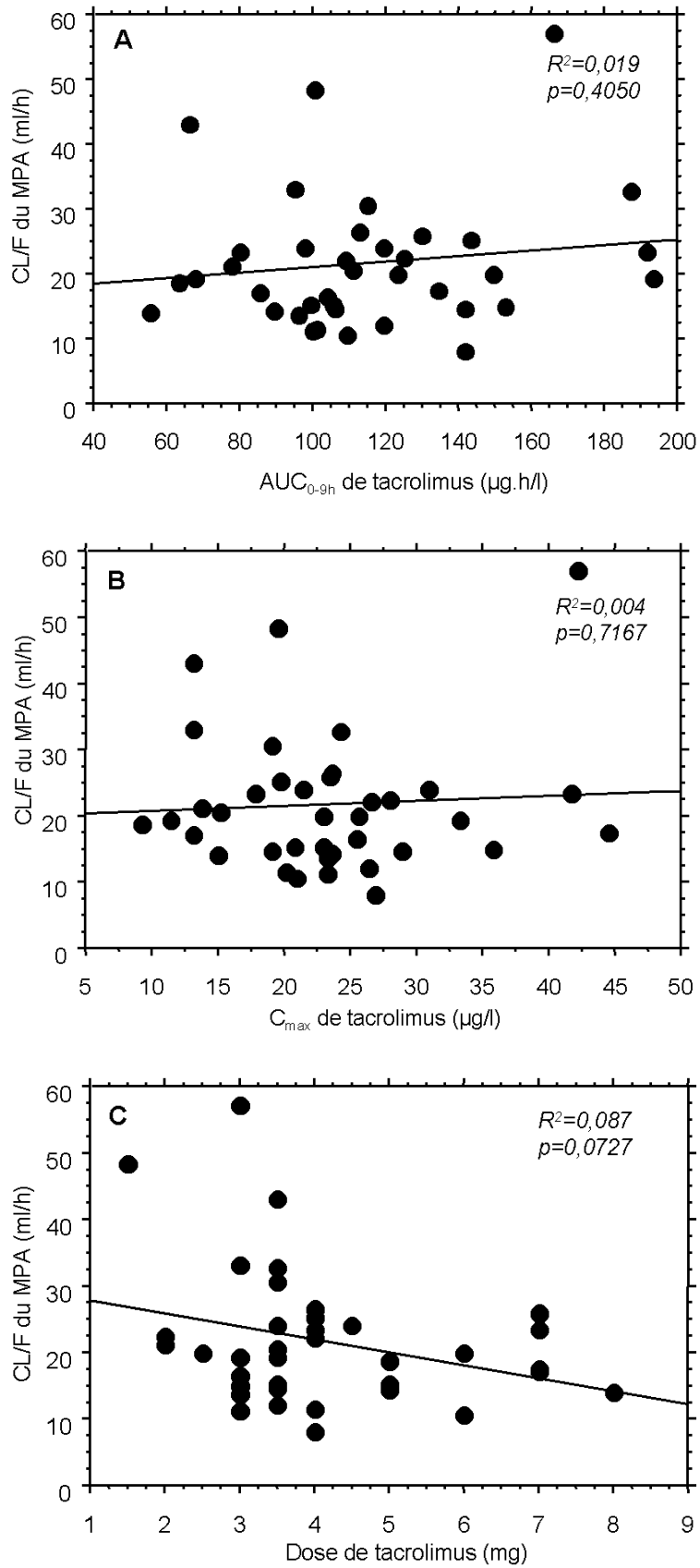


Figure III-8 : relations entre la clairance apparente du MPA et les AUC (A), C_{max} (B) ou doses de tacrolimus (C) obtenues chez 10 patients transplantés rénaux durant le premier mois post-tranplantation.

III-2-4. Discussion

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que le MPA inhibe le métabolisme du tacrolimus, avec une CI_{50} (16 mg/l) proche des concentrations plasmatiques maximales observées lors d'un traitement associant le MMF au tacrolimus (Tableau III-3 : moyenne des C_{max} 17,1 mg/l; $IC_{95\%}$: [12,9-21,3 mg/l]). Les concentrations de MPA utilisées dans l'incubation ont été choisies de façon à être compatibles avec les concentrations observées *in vivo* après métabolisme par glucuroconjugaison, et le ratio entre les concentrations incubées de tacrolimus et de MPA est du même ordre que celui existant entre les concentrations sanguines et plasmatiques de tacrolimus et de MPA. La différence de lipophilie importante entre le MPA et le tacrolimus pourrait malgré tout être à l'origine d'un ratio intra-hépatocytaire des concentrations de MPA et de tacrolimus plus faible que celui des concentrations sanguines.

Les avantages de la méthode de la demi-vie *in vitro* ont été évoqués dans la première partie de cette thèse. Cette méthode semble tout à fait indiquée à l'étude du tacrolimus qui présente de multiples métabolites, dépourvus d'activité immunosuppressive. Cependant le métabolisme oxydatif du MPA étant très faible, les microsomes sont probablement exposés à des concentrations quasiment constantes de MPA pendant toute la durée de l'incubation, alors que les concentrations de tacrolimus diminuent rapidement. Ceci pourrait contribuer à une surestimation de l'interaction. En revanche, dans le cas d'une étude des cinétiques de formation des métabolites en présence d'un inhibiteur, les concentrations croissantes du substrat diminueraient la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme, si celle-ci est réversible. Il est donc envisageable de compléter cette étude par le calcul de la constante d'inhibition de la formation du 13-O-déméthyl-tacrolimus, qui semble être un des métabolites majoritaires du tacrolimus.

Les CYP 3A4 et 3A5 sont les principales enzymes responsables du métabolisme du tacrolimus. Kamdem et col. retrouvaient une activité de formation du 13-O-désméthyl-tacrolimus (V_{max}/K_m) par le CYP 3A5 supérieure de 64 % à celle du CYP 3A4 (Kamdem et col., 2005). Nous retrouvons également une Cl_{int} de disparition du tacrolimus plus élevée avec CYP 3A5 qu'avec le CYP 3A4. La méthode utilisée ne nous permet pas de savoir si cette différence est liée à une affinité supérieure du CYP 3A5 pour le MPA par rapport au CYP 3A4 (K_m) ou à une différence d'activité (V_{max}) des 2 cytochromes (ce qui n'était pas

un objectif du travail). Les résultats de l'étude de Kamdem et col. sont en faveur d'une affinité similaire pour les 2 isoformes.

D'après nos résultats, le MPA inhiberait le métabolisme *in vitro* du tacrolimus essentiellement par inhibition du CYP 3A4. Nous retrouvons d'ailleurs un pourcentage d'inhibition comparable pour le CYP 3A4 et les microsomes hépatiques humains. Le MPA étant essentiellement un substrat du 3A4 (Picard et col., 2004), la très faible inhibition observée pour le CYP 3A5 est assez logique. Kamdem et col. retrouvaient une corrélation inverse ($r=0,90$, $p<0,0001$) entre la contribution du CYP 3A5 à la formation du 13-O-déméthyl-tacrolimus et la quantité de CYP 3A4 dans des microsomes humains (Kamdem et col., 2005) et concluaient que l'importance du CYP 3A5 dans la clairance du tacrolimus serait donc fonction de l'activité du CYP 3A4. Si tel est le cas, l'inhibition du CYP 3A4 par le MPA pourrait accentuer le rôle du CYP 3A5 dans le métabolisme du tacrolimus, un facteur important dans la biodisponibilité de la molécule. En effet, plusieurs publications récentes ont montré, chez des patients traités par tacrolimus et MPA, que la dose de tacrolimus nécessaire pour atteindre les cibles thérapeutiques (C_0 ou AUC_{0-12h}) était inférieures pour les patients exprimant le CYP 3A5 (Hesselink et col., 2003; Haufroid et col., 2004; Tsuchiya et col., 2004).

Nous avons recherché la pertinence clinique de cette interaction entre MPA et tacrolimus. Nous n'avons pas pu observer de relation entre l'exposition au MPA et celle au tacrolimus, ce qui n'est pas en faveur de l'existence *in vivo* de l'interaction métabolique observée *in vitro*.

En revanche les AUC de MPA augmentaient avec l'augmentation des doses de tacrolimus. Or, les doses de tacrolimus sont ajustées de façon à obtenir une concentration résiduelle dans la fourchette thérapeutique. En revanche le MMF est administré à dose fixe (d'ailleurs, dans cette étude, le clinicien n'avait pas connaissance des concentrations de MPA). Par conséquent, cette association ne peut pas être expliquée par des ajustements simultanés des doses de MMF et de tacrolimus. D'ailleurs, les patients avec une posologie réduite de MMF ne présentaient pas de réduction significative des doses de tacrolimus. Enfin, l'augmentation des doses de tacrolimus ne peut pas s'expliquer par un effet inhibiteur du MPA sur son métabolisme, qui impliquerait au contraire une diminution de dose pour maintenir une exposition constante au tacrolimus.

Il avait déjà été observé, chez des patients transplantés rénaux recevant du tacrolimus et du MMF (51 cinétiques), une corrélation positive entre les doses de tacrolimus et les concentrations à 40 minutes (C_{40} : $R^2=0,0576$; $p<0,05$), ou maximales (C_{max} : $R^2=0,0729$; $p<0,05$) de MPA (Kuriata-Kordek et col., 2003). A noter que les auteurs n'avaient pas mis non plus en évidence de relation entre les indices d'exposition au MPA et les concentrations sanguines de tacrolimus.

Nous évoquons dans la partie précédente l'hypothèse que le tacrolimus facilite l'absorption du MPA. Une telle interaction pourrait expliquer les résultats observés *in vivo* dans notre étude et celle de Kuriata-Kordek et col. (2003), l'augmentation des doses de tacrolimus augmentant l'inhibition de MDR1 (ou d'un autre transporteur) avec pour résultat l'augmentation de l'exposition au MPA. Ceci est compatible avec l'observation d'une diminution de la clairance apparente du MPA (inversement proportionnelle au facteur de biodisponibilité F) avec l'augmentation des doses de tacrolimus. Plus encore, il est intéressant de constater que seule les doses de tacrolimus ont un effet sur la clairance apparente du MPA et non son AUC ou sa C_{max} , pour lesquelles la tendance est même inverse. Cette observation accrédite l'hypothèse d'une interaction sur la phase d'absorption : c'est la quantité *in situ* et non l'exposition systémique au tacrolimus qui interviendrait.

A ce stade, ce travail suggère que la corrélation observée entre les doses de tacrolimus et l'exposition au MPA, déjà décrite par ailleurs (Kuriata-Kordek et col., 2003), est associée à une interaction qui concerne la phase d'absorption du MPA. La poursuite de l'étude PCCP devrait nous permettre de consolider ces résultats mais l'étude du mécanisme de cette interaction nécessitera l'utilisation de modèles *in vitro* d'absorption des médicaments (en cours de développement dans l'équipe). Si elle était confirmée sur de plus grands effectifs, cette interaction pourrait être un facteur supplémentaire à prendre en compte dans l'ajustement des doses de MMF.

III-3. INTERACTION METABOLIQUE DU SIROLIMUS AVEC LA CICLOSPORINE

III-3-1. Contexte et objectifs

Le sirolimus est métabolisé par les enzymes du CYP 3A et la contribution du CYP 3A5 semble être un facteur important dans la biodisponibilité de la molécule (Anglicheau et col., 2005).

Dans la seconde partie de cette thèse (paragraphe II-2-1, page 72) a été évoquée l'existence d'une interaction entre la ciclosporine et le sirolimus *in vivo*, la ciclosporine augmentant l'exposition au sirolimus. Les données de la littérature laissent penser que cette interaction résulte de l'inhibition de la P-gp intestinale, mais également de celle des CYP 3A. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude permettant de savoir si l'inhibition enzymatique concerne à la fois les CYP 3A4 et 3A5.

Nous avons comparé le métabolisme du sirolimus par les CYP 3A4 et 3A5 et étudié *in vitro* l'effet de la ciclosporine sur ces deux voies métaboliques. Ce travail nous a donné l'occasion de comparer deux approches méthodologiques : la première basée sur le suivi de la disparition du substrat (le sirolimus) et la seconde basée sur la production de deux de ses métabolites, choisis comme marqueurs.

III-3-2. Matériel et méthodes

III-3-2-1. Réactifs et préparations microsomales

Le NADPH a été acheté chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), le sirolimus (SIR) chez Wyeth Ayerst (Pearl River, NY, USA) et la ciclosporine A (CsA) chez Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland).

Les préparations microsomales étaient identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent (III-2-2-1, page 105) à savoir : une préparation de microsomes hépatiques humains et des Supersomes® surexprimant le CYP 3A4 ou le CYP 3A5 achetés chez BD

Biosciences GENTEST (Woburg, MA, USA). Les autres réactifs utilisés étaient de la qualité requise pour ce type d'expérience.

III-3-2-2. Protocole général d'incubation avec les microsomes

Des essais préliminaires ont été réalisés pour s'assurer de la stabilité du sirolimus dans les conditions d'incubation. Il a été vérifié que la disparition du sirolimus était seulement dépendante du couple NADPH / microsomes.

Dans les conditions standard d'incubation, le milieu réactionnel (200 μ l) était composé de tampon Tris (0,1 M, pH 7,4), de $MgCl_2$ (10 mM), de NADPH (2 mM), de microsomes (0,1 mg de protéine/ml) ou de Supersomes® (10-50 pmoles de CYP450/ml), et de SIR préparé dans un mélange acétonitrile/eau (50/50 ; v:v) (1,25 % d'acétonitrile au final). Les incubations ont été réalisées dans un bain agité thermostaté à 37°C. Le SIR et les microsomes étaient pré-incubés pendant 5 minutes avant que la réaction ne soit initiée par l'addition du NADPH. La réaction était arrêtée après 10 minutes par ajout de 200 μ l d'acétonitrile glacial.

Les cinétiques enzymatiques de formation des métabolites du sirolimus ont été réalisées par incubation de concentrations croissantes de sirolimus (100-15000 ng/ml) avec les microsomes hépatiques humains (0,1 mg/ml), le CYP 3A4 (10 pmol/ml) ou le CYP 3A5 (20 pmol/ml) recombinants. La durée d'incubation (10 minutes) ainsi que les concentrations en microsomes ou Supersomes® utilisées ont été choisies pour correspondre à une zone linéaire de production des métabolites et permettre leur quantification.

Dans les expériences de déplétion du substrat, le SIR (100 ng/ml) était incubé dans un volume total de 600 μ l et des aliquots (50 μ l) étaient prélevés à l'initiation de la réaction (T0) puis 2, 5, 10, 15, 20, 30 minutes après, et ajoutés à 50 μ l d'acétonitrile glacial pour arrêter la réaction. La concentration de microsomes hépatiques était identique à celle décrite dans le schéma général d'incubation (0,1 mg/ml). En revanche, les concentrations en CYP 3A4 (20 pmol/ml) et CYP 3A5 (50 pmol/ml) ont été augmentées pour pouvoir quantifier précisément la disparition du sirolimus dans les premières minutes de la réaction métabolique.

III-3-2-3. Inhibition des CYP 3A par la troléandomycine

L'effet de la troléandomycine (TAO), inhibiteur suicide des CYP 3A, a été évalué sur le métabolisme microsomal hépatique du sirolimus (100 ng/ml). L'inactivation enzymatique a été obtenue par pré-incubation des microsomes et du NADPH avec le TAO (1mM), à 37°C pendant 15 minutes. Le sirolimus ainsi qu'une nouvelle fraction de NADPH était ensuite ajoutée au volume réactionnel. Après 10 minutes l'incubation était arrêtée par 200 µl d'acétonitrile glacial. Les incubations incluaient un contrôle, réalisé dans les mêmes conditions mais où le TAO avait été remplacé par du tampon. Les concentrations de SIR et de ses métabolites dans les incubations avec TAO (n=3) ont été comparées à celles du contrôle, et le pourcentage moyen d'inhibition calculé.

III-3-2-4. Etude de l'interaction sirolimus/ciclosporine *in vitro*

L'effet de la ciclosporine sur le métabolisme du SIR par les microsomes hépatiques ou les CYP 3A4 et 3A5 a été recherché par incubation du mélange SIR/CsA préparé dans un mélange acétonitrile/eau (50/50 ; v:v).

L'effet de 10 concentrations croissantes de CsA (50 à 5000 ng/ml) sur la production des métabolites du SIR et sur sa consommation par des microsomes hépatiques a été évalué selon le schéma standard d'incubation décrit précédemment.

La concentration responsable de 50 % de l'inhibition maximale (CI_{50}) a été déterminée à partir de la droite de régression linéaire entre le logarithme des concentrations de CsA et le pourcentage d'inhibition de la consommation du sirolimus.

Secondairement, l'effet d'une concentration de ciclosporine (proche de la CI_{50}) a été évalué sur la Cl_{int} de disparition du SIR, estimée par la méthode de la demi-vie *in vitro* (schéma d'incubation décrit précédemment) pour des incubations avec les CYP 3A4 et 3A5 recombinants.

III-3-2-5. Méthodes analytiques

L'analyse des échantillons a été réalisée à l'aide d'une méthode LC-MS/MS utilisant le système d'extraction en ligne par chromatographie en flux turbulent. La préparation d'échantillon, l'appareillage ainsi que la méthode d'extraction et de chromatographie

étaient en tout point identiques à ce qui a été décrit pour le dosage du tacrolimus (paragraphe III-2-2-4-1, page 106).

III-3-2-5-1. Recherche des métabolites du sirolimus

Les métabolites potentiels du sirolimus ont été recherchés à partir d'incubations en présence de microsomes humains par utilisation du mode de balayage de m/z 800 à 1000 et du mode d'ions sélectionnés (SIM) sur la base des métabolites attendus (hydroxy-, dihydroxy-, trihydroxy-sirolimus, déméthyl-, didéméthyl-sirolimus, hydroxy-déméthyl-sirolimus). La nature des pics détectés a été confirmée par analyse des spectres de fragmentation MS/MS obtenus (mode « product ion scan »).

III-3-2-5-2. Dosage du sirolimus et de ses métabolites

Le SIR a été dosé dans les échantillons *in vitro* grâce à un protocole validé, utilisé en routine clinique pour le dosage du sirolimus dans le sang total et adapté au milieu d'incubation. Ce protocole est similaire à celui décrit dans le paragraphe III-2-2-4-1 (page 106) pour le dosage du tacrolimus. La quantification a été réalisée en mode de suivi des transitions (MRM) du SIR (m/z 931→864 et m/z 931→882,1) et du déméthoxysirolimus (étalon interne ; m/z 901→834).

Des transitions MRM correspondant à l'hydroxy-SIR (m/z 947→880, m/z 947→898) et au déméthyl-SIR (m/z 917→850, m/z 917→868) ont été ajoutées et ont permis l'étude spécifique de ces deux métabolites. En l'absence de produits purs disponibles, l'optimisation des paramètres spectrométriques pour ces deux métabolites n'a pas pu être effectuée et ce sont les paramètres optimisés pour les transitions équivalentes du SIR qui ont été appliqués. Pour la même raison, les concentrations des métabolites ont été estimées à partir de la droite d'étalonnage du SIR, et non pas mesurées exactement.

III-3-2-6. Analyse des résultats

Les paramètres des cinétiques de formation des métabolites du SIR (K_m et V_{max}) ont été estimés à partir des vitesses de réaction observées lors de l'incubation de concentrations croissantes de SIR. Les paramètres de l'équation de Michaelis-Menten ont été estimés par régression non-linéaire à l'aide du logiciel Winreg 3.1 (Dr Jean Debord, Service de Pharmacologie, CHU de Limoges).

La Cl_{int} de disparition du sirolimus a été estimée par la méthode de la demi-vie *in vitro* comme décrit au paragraphe III-2-2-5 (page 107).

III-3-3. Résultats

Plusieurs composés présentant des masses pouvant correspondre à des métabolites connus du sirolimus ont été détectés à partir de l'incubation du sirolimus en présence de microsomes hépatiques humains : un métabolite mono-hydroxylé, un di-hydroxylé et un tri-hydroxylé ainsi qu'un déméthylé, un di-déméthylé et un hydroxy-déméthylé. Les deux métabolites majoritaires correspondaient respectivement à une forme hydroxylée et à une forme déméthylée. Ils ont été choisis pour la suite de ce travail.

Les spectres de fragmentation ont confirmé qu'il s'agissait de métabolites du sirolimus : l'hydroxy-sirolimus (OH-SIR) et le déméthyl-sirolimus (DES-SIR) présentaient des fragments identiques à ceux du sirolimus avec une modification de masse caractéristique de la réaction métabolique (hydroxylation : +16 ; déméthylation : -14) (Figure III-9).

A partir de ces données de fragmentation, deux transitions MRM spécifiques pour chacun des métabolites, analogues à celles du sirolimus (m/z 947→880 et 947→898 pour l'OH-SIR et m/z 917→850 et 917→868 pour le DES-SIR) (Figure III-9), ont été choisies pour la méthode quantitative.

Dans les contrôles effectués sans microsomes d'une part et sans NADPH d'autre part, aucun métabolite n'a été retrouvé.

L'inactivation des CYP 3A par le TAO inhibait la formation des métabolites à $99,0 \pm 0,8$ % pour l'OH-SIR et $90,4 \pm 2,1$ % pour le DES-SIR.

Dans les mêmes conditions, le TAO inhibait la consommation du sirolimus par les microsomes humains à $85,1 \pm 17,5$ %. La disparition du sirolimus était donc bien le reflet du métabolisme par les CYP 3A.

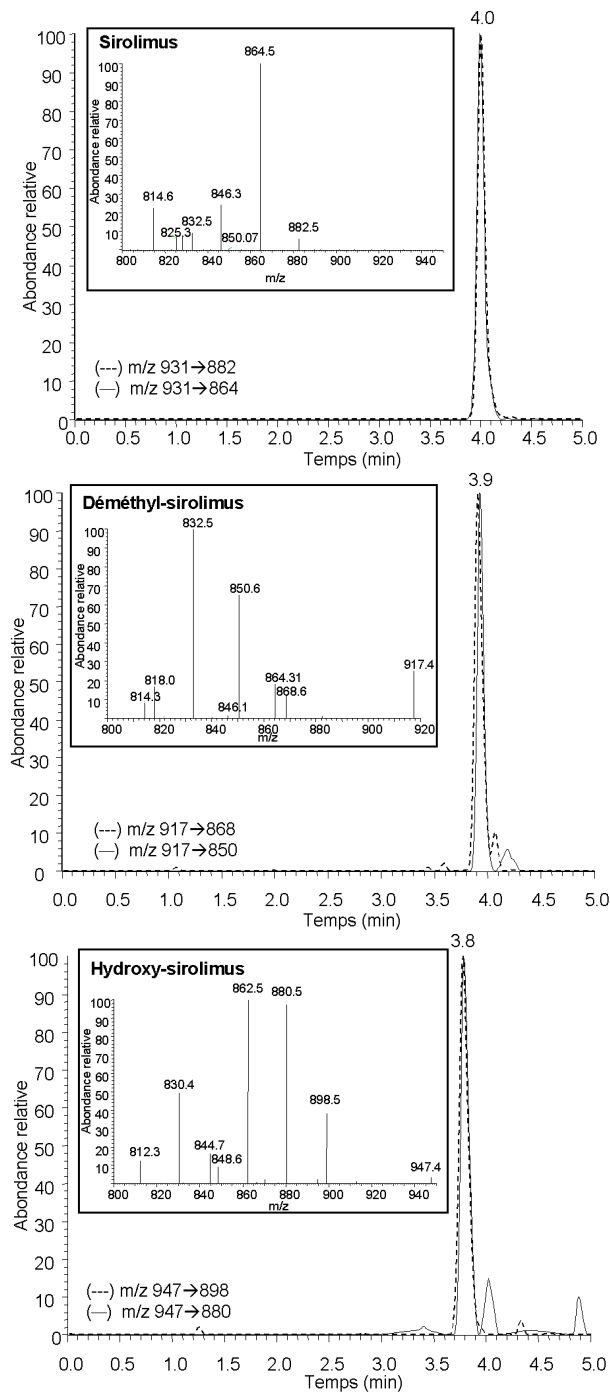


Figure III-9 : spectres de fragmentation MS/MS et chromatogrammes des transitions MRM du sirolimus et de ses métabolites hydroxylé (OH-SIR) et déméthylé (DES-SIR) produits par les microsomes humains.

Le DES-SIR était produit par les microsomes hépatiques avec une affinité (K_m) et une vitesse maximale (V_{max}) inférieures à celles de l'OH-SIR, donnant une Cl_{int} de formation de ce métabolite inférieure de moitié à celle de l'OH-SIR (Tableau III-4, Figure III-10).

La demi-vie de disparition du sirolimus *in vitro* était de 7,4 minutes (Figure III-10), ce qui permettait d'estimer la Cl_{int} du métabolisme microsomal hépatique à 924 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéine/min.

La somme des Cl_{int} de formation des métabolites OH-SIR et DES-SIR représentait donc environ 10 % de cette Cl_{int} globale (Tableau III-4 : 89,5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéine/min). A noter, toutefois que ces deux types de clairance n'ont pas été calculés de la même façon.

Tableau III-4 : paramètres cinétiques de la formation des métabolites du sirolimus par des microsomes hépatiques humains

	<i>OH-SIR</i>	<i>DES-SIR</i>
K_m (μM)	3,0	4,9
V_{max} (pmole/mg de protéine/min)	179,8	146,8
Cl_{int} ($\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéine/min)	59,8	29,7

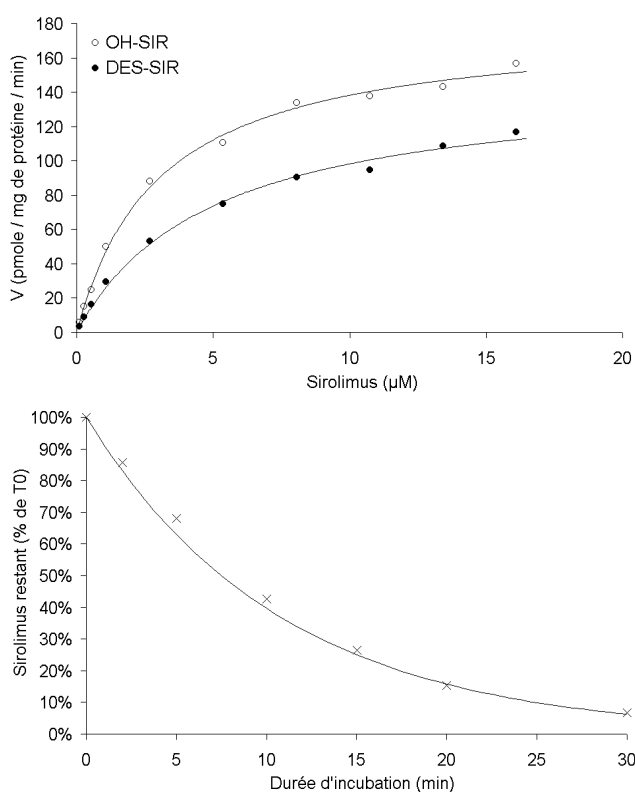


Figure III-10 : métabolisme microsomal hépatique du sirolimus : cinétiques enzymatiques de formation du métabolite hydroxylé (OH-SIR) et du métabolite déméthylé (DES-SIR) (HAUT) et cinétique de disparition du sirolimus en fonction de la durée d'incubation (BAS). Chaque point correspond à la moyenne de 2 incubations différentes.

La production du DES-SIR par les CYP 3A4 et 3A5 était linéaire jusqu'à la concentration maximale incubée de sirolimus. En conséquence, les paramètres de la cinétique de formation de ce métabolite n'ont pas été interprétés.

L'activité maximale d'hydroxylation du sirolimus par le CYP 3A4 était supérieure à celle du CYP 3A5. Malgré une affinité supérieure du CYP 3A5, la Cl_{int} de formation de l'OH-SIR était 2 fois plus élevée pour le CYP 3A4 que pour le CYP 3A5 (Tableau III-5).

Tableau III-5 : paramètres cinétiques de la formation de l'hydroxy-sirolimus (OH-SIR) par les CYP 3A4 et 3A5 recombinants

	OH-SIR	
	CYP 3A4	CYP 3A5
K_m (μM)	2,2	1,5
V_{max} (pmole/pmole de CYP/min)	0,53	0,16
Cl_{int} (μl /pmole de CYP/min)	0,24	0,11

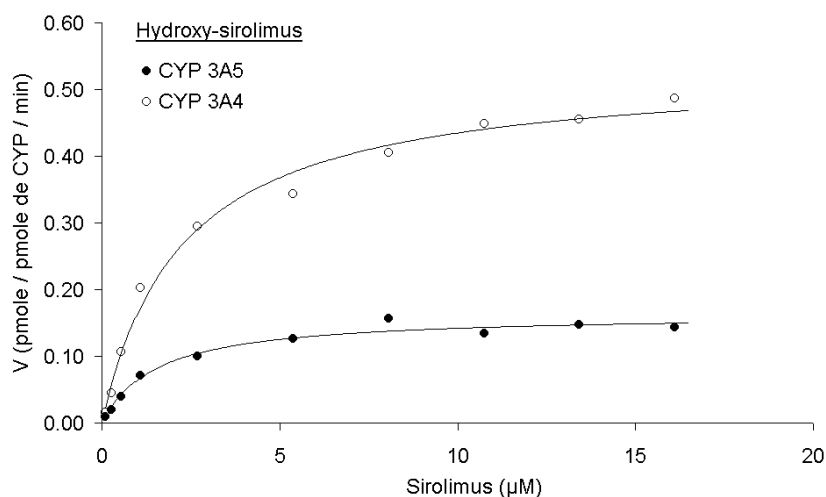


Figure III-11 : cinétiques enzymatiques de formation du métabolite hydroxylé du sirolimus (OH-SIR) par les CYP 3A4 et CYP3A5 recombinants. Chaque point correspond à la moyenne de 2 incubations différentes.

La Cl_{int} de métabolisme du sirolimus par le CYP 3A4, estimée par la méthode de la demi-vie *in vitro*, était également supérieure à celle du CYP 3A5 (2,38 vs 0,67 μ l/pmole de CYP/min)

L'inhibition de la consommation du sirolimus par les microsomes n'était pas détectable pour des concentrations de ciclosporine inférieures à 500 ng/ml. Elle atteignait un maximum de 54 % (52 % ; 57 %) en présence d'une concentration de 5000 ng/ml de ciclosporine. La concentration responsable de 50 % de cette inhibition maximale était $CI_{50}=716$ (686 ; 742) ng/ml.

L'inhibition de la formation des deux métabolites n'était observée qu'à partir de 1000 ng/ml de ciclosporine, avec des pourcentages d'inhibition assez proches de ceux observés pour la consommation du sirolimus (Figure III-12). Les quantités de métabolites formées lors de ces incubations étant déjà relativement faibles en conditions normales, l'effet de la ciclosporine (mettant en jeu des différences de concentrations inférieures à 5 ng/ml entre l'incubation contrôle et les incubations avec la ciclosporine) a été difficile à estimer avec précision.

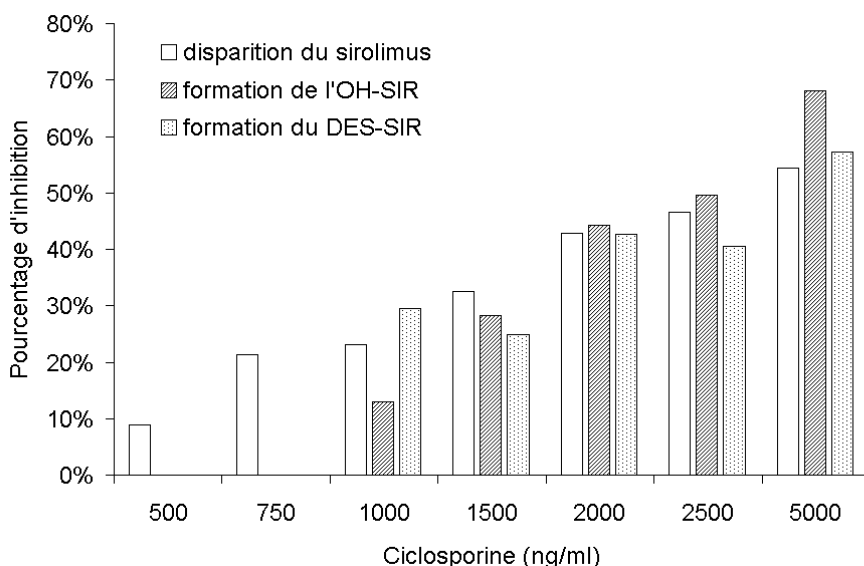


Figure III-12 : inhibition du métabolisme microsomal hépatique du sirolimus par des concentrations croissantes de ciclosporine. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à un contrôle sans ciclosporine. Les résultats sont la moyenne de deux séries d'incubations différentes.

La ciclosporine à 750 ng/ml (concentration proche de la CI_{50} microsomale) inhibait de 36 % le métabolisme du sirolimus par le CYP 3A4 recombinant, et seulement de 10 % l'activité du CYP 3A5 (Figure III-13). A noter que la même concentration de ciclosporine inhibait de 21 % la consommation du sirolimus par les microsomes humains.

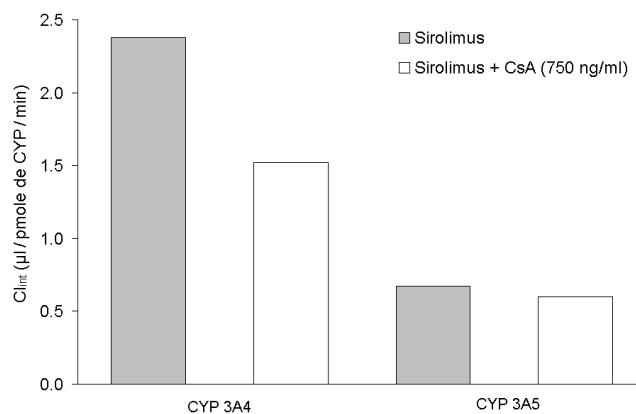


Figure III-13 : métabolisme du sirolimus par les CYP 3A4 et 3A5, et influence de la ciclosporine (750 ng/ml). Les Cl_{int} ont été estimées par la méthode de la demi-vie *in vitro* à partir de deux séries d'incubations différentes.

A cette concentration de sirolimus (100 ng/ml), la quantité de métabolites produits par les CYP 3A4 et 3A5 était faible et l'effet de la ciclosporine sur leur formation n'a pas pu être estimé avec précision.

III-3-4. Discussion et perspectives

A partir d'incubations en présence de microsomes hépatiques humains, nous avons pu détecter plusieurs métabolites connus du sirolimus (mono- ou pluri-hydroxylé, déméthylé ou didéméthylé ...). Cependant, l'étude du métabolisme du sirolimus a déjà fait l'objet de plusieurs publications (Lampen et col., 1995; Streit et col., 1996a) et notre objectif n'était pas de réaliser une nouvelle caractérisation des voies métaboliques de cette molécule. Nous souhaitons seulement disposer de quelques métabolites comme marqueurs pour la comparaison des activités des CYP 3A4 et 3A5 et l'étude de l'interaction avec la ciclosporine. Il est à noter que les deux métabolites produits de façon majoritaire *in vitro* et donc choisis dans ce travail sont de même nature que les deux métabolites majoritaires du sirolimus identifiés dans le sang de patients transplantés (Streit et col., 1996b). Les conditions d'incubation choisies nous semblent donc refléter de façon assez fidèle le

métabolisme *in vivo* du sirolimus. Malgré tout, ces métabolites n'ont pas d'intérêt dans le suivi thérapeutique du sirolimus et nous avons pu constater qu'ils n'expliquaient qu'une faible part de sa Cl_{int} de métabolisme par les microsomes *in vitro* (environ 10 %). Au contraire de l'étude de la production des métabolites, l'approche de la demi-vie métabolique *in vitro* permet une étude globale du métabolisme du sirolimus par le suivi de la quantité métabolisée en fonction du temps. *In vivo*, ce sont également les concentrations de sirolimus et ses variations sous l'influence d'un inhibiteur qui sont importantes pour le STP de la molécule. Nous avons donc choisi d'employer en parallèle et de comparer ces deux méthodes.

Les deux approches mettent en évidence une activité de métabolisme du sirolimus plus élevée pour le CYP 3A4 que pour le CYP 3A5 recombinants. C'est la différence de V_{max} qui est à l'origine de l'écart important entre les Cl_{int} de formation du métabolite hydroxylé du sirolimus. Cette même différence explique sans aucun doute les différences de Cl_{int} de disparition du sirolimus. Les différences d'affinité sont au contraire en faveur du CYP 3A5 (une information seulement accessible par l'étude des cinétiques de formation des métabolite). Les activités métaboliques des enzymes recombinantes peuvent différer de façon importante de celles observées avec les microsomes hépatiques ou encore *in vivo* et ce, dans des proportions variables d'une isoforme à l'autre. Dans la mesure où il n'existe pas (encore ?) de substrat spécifique du CYP 3A5, l'approche du facteur d'activité relative (RAF ; III-2-1-2-2 page 31), qui permet de compenser ces différences et d'extrapoler les résultats obtenus avec les enzymes recombinantes, est inapplicable. De plus, l'activité *in vivo* du CYP 3A5 est évidemment conditionnée par son polymorphisme génétique (pouvant réduire à zéro son expression). Dans ce cas précis, seule l'utilisation de microsomes hépatiques ou intestinaux humains génotypés (exprimant ou n'exprimant pas le CYP 3A5) pourrait réellement permettre de conclure sur le rôle respectif des CYP 3A4 et 3A5 dans le métabolisme du sirolimus. Un contrat de collaboration en cours avec une société française commercialisant des microsomes humains, devrait nous permettre dans les prochains mois d'obtenir ce type de préparation et de compléter les études déjà réalisées.

L'utilisation des enzymes recombinantes nous a cependant permis d'évaluer l'effet de la ciclosporine sur le métabolisme du sirolimus par les deux isoformes indépendamment. Il semble que la ciclosporine n'ait pas ou peu d'effet sur le métabolisme du sirolimus par le CYP 3A5. Cela reste à vérifier, mais ceci pourrait s'expliquer par une plus faible affinité

de la ciclosporine pour le CYP 3A5. Les études cliniques réalisées jusqu'à présent n'ont d'ailleurs pas pu mettre clairement en évidence une influence de l'expression du CYP 3A5 sur l'exposition à la ciclosporine (Hesselink et col., 2003; Anglicheau et col., 2004). En revanche, il a été démontré cliniquement que les patients exprimant le CYP 3A5 avait une biodisponibilité plus faible du sirolimus que ceux ne l'exprimant pas (Anglicheau et col., 2005). L'absence d'effet inhibiteur de la ciclosporine sur cette isoforme (alors qu'elle inhibe le CYP 3A4) pourrait majorer cette différence dans le cas de l'association ciclosporine/sirolimus. Ainsi, les patients n'exprimant pas le CYP 3A5 auraient une activité métabolique non seulement plus faible mais en partie inhibée, alors que les patients exprimant le CYP 3A5 conserveraient une activité métabolique importante, justifiant des doses majorées de sirolimus.

L'interaction métabolique entre la ciclosporine et le sirolimus était déjà connue (Wacher et col., 2002; Cummins et col., 2004) mais le rôle comparé des CYP 3A4 et 3A5 n'avait pas été étudié jusqu'à présent. S'il semble bien que les deux isoformes n'aient pas la même sensibilité à la ciclosporine, la détermination des constantes d'inhibition pour les deux isoformes ainsi que l'utilisation de microsomes humains génotypés seront nécessaires pour estimer avec plus de précision leur rôle respectif dans l'interaction *in vivo*.

Sur un plan méthodologique, les lacunes de la méthode de la demi-vie *in vitro* apparaissent très clairement : cette méthode ne permet pas d'obtenir d'information sur l'affinité enzymatique, ni sur la nature du mécanisme d'inhibition. Néanmoins, l'étude de la disparition du substrat peut être intéressante dans l'approche exploratoire *in vitro* d'une interaction médicamenteuse, car elle permet de se placer dans des conditions parfaitement extrapolables à la situation *in vivo*. De trop fortes concentrations de substrat (parfois nécessaires pour produire des quantités mesurables de métabolites) peuvent en effet solliciter *in vitro* des isoformes enzymatiques qui ne le sont pas *in vivo*. Nous avons pu vérifier que dans nos conditions expérimentales, seuls les CYP 3A participaient au métabolisme microsomal hépatique du sirolimus. Les incubations réalisées dans le cadre de ce travail aboutissaient à des concentrations de sirolimus post-incubation, très proches des concentrations sanguines observées chez des patients traités. Pour de telles concentrations, estimer la formation (très faible) des métabolites du sirolimus et l'effet d'un inhibiteur impliquait une sensibilité et une précision analytiques très importantes que même la LC-MS/MS ne nous permettait pas d'obtenir. Au-delà de cette approche exploratoire, il semble toutefois que la réalisation de cinétiques enzymatiques et l'étude conventionnelle du

mécanisme d'inhibition soient indispensables. Cela nécessite l'identification et le choix d'un métabolite pertinent, une tâche difficile lorsque plusieurs métabolites de première, de seconde et de troisième génération coexistent de façon minoritaire. La mise au point d'une méthode de dosage très sensible et très spécifique est également un impératif, une difficulté supplémentaire lorsque les molécules pures ne sont pas disponibles.

IV. CONCLUSION

A sa commercialisation en 1996, le MPA été décrit comme essentiellement métabolisé par glucuroconjugaison en un dérivé pharmacologiquement inactif : le MPAG. Quelques années plus tard, l'apparente simplicité de son métabolisme était remise en cause.

Dans le cadre de cette thèse nous avons identifié plusieurs métabolites, de phase I et de phase II du MPA, inconnus pour certains, et mis au point une méthode LC-MS/MS permettant leur dosage de façon sensible et spécifique lors des expériences *in vitro* mais également *in vivo* chez les patients transplantés.

In vitro, nous avons comparé l'activité de différents organes dans le métabolisme du MPA et mis en évidence une activité rénale de formation du MPAG (le métabolite majoritaire du MPA) pratiquement équivalente à l'activité hépatique, le métabolisme intestinal étant de moindre importance.

L'identification des enzymes participant à la glucuroconjugaison du MPA nous a permis de savoir que les deux métabolites principaux du MPA (MPAG et AcMPAG) n'étaient pas produits par les mêmes isoformes enzymatiques.

Ce travail a été le point de départ de l'étude de l'influence du polymorphisme génétique des UGT 1A9 (pour le MPAG) et 2B7 (pour l'AcMPAG) sur l'exposition des patients à ces métabolites. Nous avons montré que le polymorphisme l'UGT 2B7 pourrait être associé à des variations de concentrations sanguines d'AcMPAG, potentiellement toxique. En revanche, les mutations étudiées pour l'UGT1A9 ne semblaient pas avoir d'influence sur la production du MPAG. Ces études seront poursuivies afin d'évaluer les conséquences potentielles de facteurs génétiques sur la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique et donc de la réponse au MPA (dans le cas du MPAG) ou sur la susceptibilité individuelle aux effets secondaires (dans le cas de l'AcMPAG).

Nous avons vérifié *in vitro* qu'aucune des voies métaboliques de phase II du MPA n'était inhibée par les immunosuppresseurs qui lui sont habituellement associés.

En revanche, nous avons pu démontrer cliniquement que la ciclosporine augmentait l'exposition systémique à l'AcMPAG, probablement par inhibition de son élimination biliaire (ce qui diminue probablement l'exposition digestive des patients à ce métabolite).

Il avait été précédemment démontré chez le rat que l'inhibition de l'excrétion biliaire du MPAG par la ciclosporine diminuait l'exposition au MPA en limitant son cycle entéro-hépatique. Nous confirmons que la ciclosporine diminue l'exposition au MPA chez l'homme et suggérons que cette interaction explique à elle seule la différence d'exposition au MPA pour les patients recevant du MMF en association à la ciclosporine ou au sirolimus, le sirolimus n'ayant probablement pas ou peu d'effet sur la pharmacocinétique du MPA.

En revanche, nous émettons l'hypothèse que la différence d'exposition au MPA observée pour les associations MMF/ciclosporine et MMF/tacrolimus n'est qu'en partie liée à l'effet de la ciclosporine. En effet, le tacrolimus augmente la biodisponibilité apparente du MPA, probablement en favorisant son absorption digestive.

Réciproquement, nous avons observé que le MPA inhibe modérément le métabolisme du tacrolimus *in vitro*, mais la pertinence clinique de cette interaction n'a pas pu être établie.

Enfin, à partir de données expérimentales nous suggérons que l'interaction métabolique de la ciclosporine sur le sirolimus concerne essentiellement l'isoforme CYP 3A4 ce qui pourrait, dans le cas de cette association, majorer l'influence du génotype du CYP 3A5 pour les patients qui expriment la protéine et ainsi augmenter la différence d'exposition (déjà existante) avec ceux qui ne l'expriment pas.

DISCUSSION GENERALE

Le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) a pour objectif d'ajuster les doses de médicament à administrer à chaque patient individuellement, pour minimiser les effets secondaires et optimiser les effets thérapeutiques. Pour cela, la connaissance des facteurs à l'origine de la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique, qui est un des déterminants de la réponse au médicament, représente un atout majeur. Les études réalisées avant la commercialisation du médicament, à grande échelle et suivant des schémas standardisés (associations médicamenteuses, populations, etc.), ne représentent pas la totalité des conditions réelles d'utilisation du médicament et donnent une image trop homogène de sa pharmacocinétique. Dans de nombreux cas, les observations d'interactions médicamenteuses ou d'effets secondaires sont d'ailleurs réalisées après la mise sur le marché, en « phase IV ».

Cette thèse a été réalisée dans le cadre de l'équipe « Devenir et Effets des Xénobiotiques dans l'Organisme » (EA 3838), qui travaille depuis plusieurs années sur les immunosuppresseurs en greffe d'organes, une thérapeutique complexe reposant sur l'association de plusieurs molécules présentant une marge thérapeutique étroite et qui impose un ajustement strict des posologies à administrer. Conséquences de ces associations multiples, les interactions sont nombreuses et pourtant imparfaitement connues.

Dans le cadre de ce travail, l'exploitation de données cliniques nous a ainsi permis de mettre en évidence que le choix du médicament immunosuppresseur associé au MMF (ciclosporine, tacrolimus ou sirolimus), voire les doses administrées, étaient à l'origine de variations importantes de l'exposition au MPA, pouvant justifier une adaptation *a priori* des doses de MMF. Si cela n'est peut-être pas primordial à l'initiation du traitement (où le sous-dosage est le plus redouté), la diminution des doses de MMF lorsque la ciclosporine est remplacée par le sirolimus ou le tacrolimus, pour anticiper l'augmentation du cycle entérohépatique (inhibé sous ciclosporine) pourrait permettre de réduire les effets indésirables en cours de traitement. L'adaptation individuelle de posologie du MMF, sur la base des concentrations sanguines ou plutôt de l'AUC des concentrations en fonction du temps (indice d'exposition étudié ici) permettrait dans tous les cas de réajuster la dose à administrer *a posteriori*.

Alors que les interactions pharmacocinétiques les plus recherchées à l'heure actuelle sont de nature métabolique (induction ou inhibition des enzymes du métabolisme), nous avons pu constater dans le cas du mycophénolate que les transporteurs d'efflux (hépatobiliaires ou intestinaux) constituaient vraisemblablement, tout comme les enzymes du métabolisme, une cible importante des interactions médicamenteuses. Si les études de métabolisme *in vitro* nous ont permis dans certains cas d'exclure des hypothèses d'interactions métaboliques, l'orientation vers des modèles *in vitro* d'absorption ou, plus généralement de transport semble aujourd'hui nécessaire pour pouvoir étudier l'ensemble des interactions pouvant intervenir entre les médicaments immunosuppresseurs.

Au-delà des seuls phénomènes d'inhibition ou d'induction des enzymes du métabolisme (ou des transporteurs), la nature même des isoformes enzymatiques ainsi que leur niveau d'expression sont vraisemblablement des facteurs explicatifs d'une partie de la variabilité de pharmacocinétique des médicaments. Il y a plusieurs années la découverte fortuite de l'existence de duplications du gène du CYP 2D6 a permis d'expliquer des phénomènes de non-réponse ou de toxicité à certains médicaments. Aujourd'hui c'est le CYP 3A5, dont la participation au métabolisme avait été reléguée à l'exception et au détail, qui apparaît comme un élément majeur dans la biodisponibilité de certains médicaments. Les études *in vitro* de l'activité métabolique comparée des CYP 3A4 et 3A5 réalisées dans le cadre de cette thèse interviennent après la démonstration clinique du rôle majeur du CYP 3A5 dans la biodisponibilité du tacrolimus ou du sirolimus. Cependant, elles mettent en évidence tout l'intérêt que peut représenter ce type d'approche, conduite de façon exploratoire. Il n'est pas impossible que l'étude du rôle du CYP 3A5 (pour les substrats du CYP 3A4 en particulier) se généralise et soit intégrée dans les tests précédant le développement d'une nouvelle molécule. C'est le cas à l'heure actuelle pour le CYP 2D6, qui est considéré comme un obstacle majeur à la mise sur le marché d'un nouveau médicament candidat.

D'autres mutations génétiques, à l'effet moins marqué, pourraient participer à la variabilité inter-individuelle de pharmacocinétique et de réponse à certaines molécules. Dans le cas du mycophénolate, si les mutations de l'*UGT 1A9* (connues à l'heure actuelle) ne semblent pas pouvoir expliquer la variabilité observée, le rôle du polymorphisme des transporteurs hépatobiliaires du MPA (MRP2 en particulier), point de départ du cycle entérohépatique du MPA, offre des perspectives plus intéressantes. Ces nouveaux marqueurs pharmacogénétiques viendront sans doute à plus ou moins court terme s'ajouter aux

variables biochimiques, biométriques ou contextuelles utilisées par les modèles d'adaptation de posologie actuels.

Au-delà de la variabilité pharmacocinétique, un à l'efficacité thérapeutique est sans doute une mauvaise tolérance au traitement. Les effets secondaires peuvent non seulement conduire à l'interruption du traitement par le clinicien, mais également à des problèmes d'inobservance thérapeutique dont l'issue peut être dramatique. Dans le cas du MMF, une étude américaine et une étude européenne, ayant toutes deux suivi des patients traités pendant 3 ans, montrent une incidence des arrêts du traitement pour effets secondaires attribuables au MMF de 21 % et de 25 à 36 %, respectivement (European Mycophenolate Mofetil study Group, 1999 ; US renal transplant study group, 1999). S'il n'est pas formellement établi que l'acyl-glucuronide du MPA est à l'origine des effets secondaires digestifs ou hématologiques du MMF, c'est en tout cas ce qu'ont suggéré plusieurs auteurs (Wieland et col., 2000; Kuypers et col., 2003). Si tel était le cas, le polymorphisme de l'*UGT 2B7* ainsi que la nature de l'immunosuppresseur associé (inhibant ou non l'excrétion biliaire du métabolite) seraient autant de facteurs qui permettraient d'anticiper la survenue d'effets indésirables. Nous n'apportons pas de preuve allant dans ce sens, mais avons aujourd'hui les « outils » pour vérifier une telle hypothèse : une méthode de dosage plasmatique de l'AcMPAG et une technique de génotypage de l'*UGT 2B7*. Dans les prochains mois, l'étude multicentrique APOMYGRE (Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2002) nous permettra de rechercher si la survenue d'effets secondaires du traitement par MMF peut être associée à une exposition plus ou moins importante à ce métabolite et si le génotype de l'*UGT 2B7* peut en être un facteur prédictif.

L'utilisation des modèles d'étude du métabolisme *in vitro* des médicaments nous aura donc permis de répondre à un certain nombre de questions, d'élaborer ou d'étayer de nouvelles hypothèses qui seront par la suite vérifiées cliniquement. Notre expérience des études de métabolisme est encore limitée (leur mise en place correspond au début de ce travail de recherche), mais durant ces 3 années de thèse nous avons eu l'occasion de comparer différents modèles et approches méthodologiques. Beaucoup des travaux ont été réalisés, à titre préliminaire, avec des microsomes de rats. Nous avons pu constater, pour certaines molécules (le sirolimus en particulier), des différences notables d'activité nous faisant préférer par la suite l'utilisation systématique de microsomes humains. Concernant l'identification des isoformes enzymatiques, si le recul important qui existe pour les CYP facilite la tâche, c'est un travail plus complexe dans le cas des UGT : les enzymes

recombinantes sont un modèle très utile, mais à l'heure actuelle les méthodes d'extrapolation des résultats font défaut pour cette famille enzymatique. Il est probable que cette lacune sera compensée dans les années à venir. La mise sur le marché des UGT recombinantes devrait en effet accélérer l'identification de substrats et secondairement d'inhibiteurs spécifiques.

Nous avons également pu mesurer à quel point l'utilisation de techniques analytiques polyvalentes, sensibles et spécifiques était un atout dans ce type d'étude. La LC-MS/MS permet non seulement d'identifier et de doser des métabolites dont la production est faible mais également de se placer dans des conditions expérimentales plus facilement extrapolables à la situation *in vivo* (par réduction des concentrations de substrat incubé). Elle permet de réduire les coûts expérimentaux (par réduction des volumes réactionnels et des concentrations microsomales) et de diminuer les temps d'analyse. Ces avantages ont peu à peu été exploités pour améliorer les protocoles expérimentaux. Au final, environ 1500 incubations microsomales et au minimum 2500 dosages par LC-MS/MS (sans compter la mise au point et la validation des techniques) ont été réalisés dans le cadre de cette thèse, uniquement pour les données *in vitro*.

Ce travail nous a permis enfin d'appréhender l'intérêt de combiner des approches expérimentales et cliniques pour compenser les défauts ou les contraintes qu'elles présentent respectivement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C, Thervet E Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; **5**: 595-603.
- Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Buchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C, Marquet P CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 422-433.
- Balogh A, Merkel U, Muller D Can xipamide or tacrolimus inhibit the glucuronidation of mycophenolic acid in rat liver slices? *Exp Toxicol Pathol* 2003; **54**: 375-379.
- Basu NK, Kole L, Kubota S, Owens IS Human udp-glucuronosyltransferases show atypical metabolism of mycophenolic Acid and inhibition by curcumin. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 768-773.
- Benetton S, Kameoka J, Tan A, Wachs T, Craighead H, Henion JD Chip-based P450 drug metabolism coupled to electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Anal Chem* 2003; **75**: 6430-6436.
- Bernard O, Guillemette C The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 775-778.
- Billaud EM Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs. In: Marquet P., *Suivi Thérapeutique Pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments* Elsevier Ed., Paris, 2004:270-277.
- Billaud EM, Garaffo R, Royer-Morrot M-J Suivi thérapeutique du tacrolimus. In: Marquet P., *Suivi Thérapeutique Pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments* Elsevier Ed., Paris, 2004:270-277.
- Blum W, Aichholz R, Ramstein P, Kuhnol J, Bruggen J, O'Reilly T, Florsheimer A In vivo metabolism of epothilone B in tumor-bearing nude mice: identification of three new epothilone B metabolites by capillary high-pressure liquid chromatography/mass spectrometry/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; **15**: 41-49.

- Bowalgaha K, Miners JO The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **52**: 605-609.
- Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; **189**: 233-246.
- Braun F, Christians U, Laabs S, Elias K, Shipkova M, Schutz E, Ringe B An ex vivo model to study the intestinal biotransformation of immunosuppressives. *Transplant Proc* 2000; **32**: 2536.
- Buchler M, Lebranchu Y, Beneton M, Le Meur Y, Heng AE, Westeel PF, le Guellec C, Libert F, Hary L, Marquet P, Paintaud G Higher exposure to mycophenolic acid with sirolimus than with cyclosporine cotreatment. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**: 34-42.
- Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; **34**: 429-455.
- Busby WF, Jr., Ackermann JM, Crespi CL Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 246-249.
- Campana C, Regazzi MB, Buggia I, Molinaro M Clinically significant drug interactions with cyclosporin. An update. *Clin Pharmacokinet* 1996; **30**: 141-179.
- Carlile DJ, Hakooz N, Bayliss MK, Houston JB Microsomal prediction of in vivo clearance of CYP2C9 substrates in humans. *Br J Clin Pharmacol* 1999; **47**: 625-635.
- Castro-Perez J, Plumb R, Granger JH, Beattie I, Joncour K, Wright A Increasing throughput and information content for in vitro drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; **19**: 843-848.
- Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Gotti E, Remuzzi G Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int* 2002; **62**: 1060-1067.
- Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1998; **26**: 1-4.
- Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**: 813-851.

- Christians U, Sattler M, Schiebel HM, Kruse C, Radeke HH, Linck A, Sewing KF Isolation of two immunosuppressive metabolites after in vitro metabolism of rapamycin. *Drug Metab Dispos* 1992; **20**: 186-191.
- Christians U, Sewing KF Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther* 1993; **57**: 291-345.
- Christians U, Sewing KF Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity. *Clin Biochem* 1995; **28**: 547-559.
- Crespi CL, Miller VP The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future. *Pharmacol Ther* 1999; **84**: 121-131.
- Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 627-632.
- Cummins CL, Jacobsen W, Christians U, Benet LZ CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **308**: 143-155.
- Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, Kharasch ED, Thummel KE In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 1889-1902.
- Dannecker R, Vickers AE, Ubeaud G, Hauck C In vitro biotransformation of SDZ RAD: a new immunosuppressive macrolide in human liver microsomal preparations. *Transplant Proc* 1998; **30**: 2206.
- De Graaf IA, Van Meijeren CE, Pektas F, Koster HJ Comparison of in vitro preparations for semi-quantitative prediction of in vivo drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 1129-1136.
- Dehal SS, Gagne PV, Crespi CL, Patten CJ Effect of common organic solvents on human uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme activities. 2002.
- Djebli N, Picard N, Le Meur Y, Szlag J-C, Rousseau A, Marquet P Influence of *UGT 1A9**3 and *UGT2B7 (G-840A)* polymorphisms on MPAmetabolism in renal transplant recipients. 9th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. Louisville, USA, 23-28 avril 2005. Abstract in: *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 246.
- Donato MT, Castell JV Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**: 153-178.

- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y, Li AP Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 141-144.
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 282-288.
- Ekins S Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 1996; **28**: 591-623.
- Ekins S, Ring BJ, Binkley SN, Hall SD, Wrighton SA Autoactivation and activation of the cytochrome P450s. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; **36**: 642-651.
- El Haggan W, Ficheux M, Debruyne D, Rognant N, Lobbedez T, Allard C, Coquerel A, Ryckelynck JP, Hurault de Ligny B Pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplant patients receiving sirolimus versus cyclosporine. *Transplant Proc* 2005; **37**: 864-866.
- European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 1999; **68**: 391-396.
- Fernandez-Metzler CL, Owens KG, Baillie TA, King RC Rapid liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based screening procedures for studies on the biotransformation of drug candidates. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 32-40.
- Filler G, Zimmering M, Mai I Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil are influenced by concomitant immunosuppression. *Pediatr Nephrol* 2000; **14**: 100-104.
- Firdaous I, Verbeeck RK, Hassoun A, Langrehr JM, Wallemacq PE Excretion of tacrolimus glucuronides in human bile. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1997; **22**: 217-221.
- Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 2001; **33**: 273-297.
- Gallant-Haidner HL, Trepanier DJ, Freitag DG, Yatscoff RW Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 31-35.
- Girard H, Court MH, Bernard O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perused L, Guillemette C Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 501-515.

- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 15655-15660.
- Guengerich FP, Turvy CG Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **256**: 1189-1194.
- Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, Guyomard C Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact* 1999; **121**: 7-16.
- Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB, Hall SD Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 52-59.
- Hagenauer B, Salamon A, Thalhammer T, Kunert O, Haslinger E, Klingler P, Senderowicz AM, Sausville EA, Jager W In vitro glucuronidation of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol by rat and human liver microsomes: involvement of UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 1A9. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 407-414.
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 147-154.
- Hemeryck A, De Vriendt CA, Belpaire FM Metoprolol-paroxetine interaction in human liver microsomes: stereoselective aspects and prediction of the in vivo interaction. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 656-663.
- Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot RA Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 545-556.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **74**: 245-254.

- Hickman D, Wang JP, Wang Y, Unadkat JD Evaluation of the selectivity of In vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* 1998; **26**: 207-215.
- Holthe M, Rakvag TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J* 2003; **3**: 17-26.
- Houston JB Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 1469-1479.
- Houston JB, Carlile DJ Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab Rev* 1997; **29**: 891-922.
- Houston JB, Kenworthy KE In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**: 246-254.
- Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol* 1967; **35**: 675-684.
- Hubner GI, Eismann R, Sziegoleit W Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 1999; **21**: 536-539.
- Hutzler JM, Tracy TS Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 355-362.
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998a; **38**: 461-499.
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 1998b; **50**: 387-412.
- Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, Fujitsu T, Shimatani K, Sato A, Fujioka M Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 1993; **21**: 971-977.
- Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ, Christians U Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplant Proc* 2001; **33**: 514-515.

- Jones HM, Hallifax D, Houston JB Quantitative prediction of the in vivo inhibition of diazepam metabolism by omeprazole using rat liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 572-580.
- Jones HM, Houston JB Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 973-982.
- Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 756-762.
- Kamdern LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, Wojnowski L Contribution of CYP3A5 to the in Vitro Hepatic Clearance of Tacrolimus. *Clin Chem* 2005.
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Napoli KL, Kahan BD The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **63**: 48-53.
- Kelly P, Kahan BD Review: metabolism of immunosuppressant drugs. *Curr Drug Metab* 2002; **3**: 275-287.
- Kirchner GI, Winkler M, Mueller L, Vidal C, Jacobsen W, Franzke A, Wagner S, Blick S, Manns MP, Sewing KF Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *Br J Clin Pharmacol* 2000; **50**: 449-454.
- Klingenberg M Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958; **75**: 376-386.
- Kobayashi M, Saitoh H, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **309**: 1029-1035.
- Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom* 2003; **38**: 357-372.
- Kraemer T, Bickeboeller-Friedrich J, Maurer HH On the metabolism of the amphetamine-derived antispasmodic drug mebeverine: gas chromatography-mass spectrometry studies on rat liver microsomes and on human urine. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**: 339-347.

Kremers P Can drug-drug interactions be predicted from in vitro studies?

ScientificWorldJournal 2002; **2**: 751-766.

Kronbach T, Fischer V, Meyer UA Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 1988; **43**: 630-635.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383-391.

Kuriata-Kordek M, Boratynska M, Falkiewicz K, Porazko T, Urbaniak J, Wozniak M, Patrzalek D, Szyber P, Klinger M The influence of calcineurin inhibitors on mycophenolic acid pharmacokinetics. *Transplant Proc* 2003; **35**: 2369-2371.

Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Squifflet JP, Mourad M, Abramowicz D, Oellerich M, Armstrong V, Shipkova M, Daems J Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 609-622.

Lampen A, Christians U, Guengerich FP, Watkins PB, Kolars JC, Bader A, Gonschior AK, Dralle H, Hackbarth I, Sewing KF Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug Metab Dispos* 1995; **23**: 1315-1324.

Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **285**: 1104-1112.

Lecointre K, Furlan V, Taburet AM In vitro effects of tacrolimus on human cytochrome P450. *Fundam Clin Pharmacol* 2002; **16**: 455-460.

Levsen K, Schiebel HM, Behnke B, Dotzer R, Dreher W, Elend M, Thiele H Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *J Chromatogr A* 2005; **1067**: 55-72.

Lin JH, Lu AY Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998; **35**: 361-390.

- Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, Schuetz EG, Thummel KE
Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal
midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002; **62**: 162-172.
- Lu AY, Wang RW, Lin JH Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of
approaches used for P450 isoform identification. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 345-
350.
- Mackenzie PI Identification of uridine diphosphate glucuronosyltransferases involved in the
metabolism and clearance of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 10-13.
- Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L,
Holt DW Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-
normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians.
Transplantation 2005; **79**: 499-502.
- Marquet P Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à
la toxicologie. *Annales de Toxicologie Analytique* 2005; **17**: 5-12.
- Marquet P, Risco E, Le Guellec C, Billaud EM Suivi thérapeutique du mycophénolate
mofétil. In: Marquet P., *Suivi Thérapeutique Pharmacologique pour l'adaptation de
posologie des médicaments* Elsevier Ed., Paris, 2004:280-293.
- McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS A clinical
pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression
comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 346-
350.
- Mojarrabi B, Mackenzie PI The human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A10,
glucuronidates mycophenolic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 775-
778.
- Moller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, Schafer A, Undre NA
The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in
healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 633-636.
- Nowak I, Shaw LM Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization
and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem* 1995; **41**: 1011-1017.
- Obach RS Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal
intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific
binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 1350-1359.

- Obach RS, Baxter JG, Liston TE, Silber BM, Jones BC, MacIntyre F, Rance DJ, Wastall P
The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro
metabolism data. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **283**: 46-58.
- Omura T, Sato R A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962; **237**: 1375-1376.
- Picard N, Cresteil T, Djebli N, Marquet P In vitro metabolism study of buprenorphine:
evidence for new metabolic pathways. *Drug Metab Dispos* 2005a; **33**: 689-695.
- Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P Characterization of a phase I metabolite of
mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 600-608.
- Picard N, Djebli N, Szlag J-C, Le Meur Y, Rousseau A, Marquet P Polymorphism of UGT
1A9, UGT2B7 and MRP2 and plasma levels of MPA and metabolites in renal
transplant recipients: preliminary study. *9^{ème} congrès annuel de la Société Française de
Pharmacologie*. Bordeaux, France, 26-28 avril 2005. Abstract in: *Fundam Clin
Pharmacol*. 2005; **19**: 195.
- Picard N, Marquet P In vitro study of mycophenolic acid glucuronidation. *Drug Metab Dispos*
2004; **32**: 1524; author reply 1525.
- Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P Identification of the UDP-
glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism.
Drug Metab Dispos 2005c; **33**: 139-146.
- Pirsch J, Bekersky I, Vincenti F, Boswell G, Woodle ES, Alak A, Kruelle M, Fass N,
Facklam D, Mekki Q Coadministration of tacrolimus and mycophenolate mofetil in
stable kidney transplant patients: pharmacokinetics and tolerability. *J Clin Pharmacol*
2000; **40**: 527-532.
- Pou L, Brunet M, Cantarell C, Vidal E, Oppenheimer F, Monforte V, Vilardell J, Roman A,
Martorell J, Capdevila L Mycophenolic acid plasma concentrations: influence of
comedication. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 35-38.
- Prémaud A Pharmacocinétique et suivi thérapeutique pharmacologique du mycophénolate
mofétile dans le traitement anti-rejet de greffe. Thèse de doctorat d'Université.
Université de Limoges, 2004, 234
- Premaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Lachatre G, Marquet P Comparison of liquid
chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied
immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and
consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 609-619.
- Projean D, Baune B, Farinotti R, Flinois JP, Beaune P, Taburet AM, Ducharme J In vitro
metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the

- main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 748-754.
- Rommel RP, Burchell B Validation and use of cloned, expressed human drug-metabolizing enzymes in heterologous cells for analysis of drug metabolism and drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol* 1993; **46**: 559-566.
- Rial M, Guardia O, Greco G, Argento J, Casadei D Area under the curve of Neoral and chronic use of mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 1998; **30**: 1195-1196.
- Saint-Marcoux F Pharmacocinétique et suivi thérapeutique pharmacologique de la ciclosporine en transplantation d'organes solides. Thèse de doctorat d'Université. Université de Limoges, 2004,
- Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 1992; **20**: 753-761.
- Sawamoto T, Van Gelder T, Christians U, Okamura N, Jacobsen W, Benet L Membrane transport of mycophenolate mofetil and its active metabolite, mycophenolic acid in MDCK and MDR1-MDCK cell monolayers. *J Heart Lung Transplant* 2001; **20**: 234-235.
- Sawyer MB, Innocenti F, Das S, Cheng C, Ramirez J, Pantle-Fisher FH, Wright C, Badner J, Pei D, Boyett JM, Cook E, Jr., Ratain MJ A pharmacogenetic study of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 in patients receiving morphine. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**: 566-574.
- Schuetz EG, Schuetz JD, Grogan WM, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Raucy J, Guzelian P, Gionela K, Watlington CO Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1992; **294**: 206-214.
- Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, Niedmann PD, Weber L, Tonshoff B, Pethig K, Wahlers T, Braun F, Ringe B, Oellerich M Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: comparison of HPLC and immunoassay reveals new MPA metabolites. *Transplant Proc* 1998; **30**: 1185-1187.
- Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999; **45**: 419-422.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs,

- carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **270**: 414-423.
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schutz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1075-1082.
- Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Grone HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br J Pharmacol* 2001a; **132**: 1027-1034.
- Shipkova M, Wieland E, Schutz E, Wiese C, Niedmann PD, Oellerich M, Armstrong VW The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid inhibits the proliferation of human mononuclear leukocytes. *Transplant Proc* 2001b; **33**: 1080-1081.
- Sladek NE, Mannering GJ Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; **22**: 668-674.
- Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM, Weimar W Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**: 706-708.
- Soars MG, Ring BJ, Wrighton SA The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 762-767.
- Staack RF, Theobald DS, Paul LD, Springer D, Kraemer T, Maurer HH Identification of human cytochrome P450 2D6 as major enzyme involved in the O-demethylation of the designer drug p-methoxymethamphetamine. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 379-381.
- Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, Kahan BD Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996; **62**: 986-994.
- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36164-36171.

- Streit F, Christians U, Schiebel HM, Meyer A, Sewing KF Structural identification of three metabolites and a degradation product of the macrolide immunosuppressant sirolimus (rapamycin) by electrospray-MS/MS after incubation with human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1996a; **24**: 1272-1278.
- Streit F, Christians U, Schiebel HM, Napoli KL, Ernst L, Linck A, Kahan BD, Sewing KF Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem* 1996b; **42**: 1417-1425.
- Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst* 1982; **68**: 771-778.
- Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 1182-1187.
- US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999; **34**: 296-303.
- Undre NA Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18 Suppl 1**: i12-15.
- van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, Christians U, Morris RE Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 119-128.
- Venkatakrishnan K, Schmider J, Harmatz JS, Ehrenberg BL, von Moltke LL, Graf JA, Mertzanis P, Corbett KE, Rodriguez MC, Shader RI, Greenblatt DJ Relative contribution of CYP3A to amitriptyline clearance in humans: in vitro and in vivo studies. *J Clin Pharmacol* 2001a; **41**: 1043-1054.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ Application of the relative activity factor approach in scaling from heterologously expressed cytochromes p450 to human liver microsomes: studies on amitriptyline as a model substrate. *J Pharmacol Exp Ther* 2001b; **297**: 326-337.
- Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* 2001c; **41**: 1149-1179.

- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Obach RS, Greenblatt DJ Microsomal binding of amitriptyline: effect on estimation of enzyme kinetic parameters in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **293**: 343-350.
- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29**: 404-430.
- Vidal C, Kirchner GI, Sewing KF Structural elucidation by electrospray mass spectrometry: an approach to the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressant SDZ RAD. *J Am Soc Mass Spectrom* 1998; **9**: 1267-1274.
- Le dictionnaire Vidal 2005. Vidal Ed, Paris.
- Vietri M, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM Mycophenolic acid glucuronidation and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human liver and kidney. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; **56**: 659-664.
- Vincent SH, Karanam BV, Painter SK, Chiu SH In vitro metabolism of FK-506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as the major enzymes responsible for its metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1992; **294**: 454-460.
- Wacher VJ, Silverman JA, Wong S, Tran-Tau P, Chan AO, Chai A, Yu XQ, O'Mahony D, Ramtoola Z Sirolimus oral absorption in rats is increased by ketoconazole but is not affected by D-alpha-tocopheryl poly(ethylene glycol 1000) succinate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **303**: 308-313.
- White RE Short- and long-term projections about the use of drug metabolism in drug discovery and development. *Drug Metab Dispos* 1998; **26**: 1213-1216.
- Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, Schutz E, Niedmann PD, Armstrong VW, Oellerich M Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin Biochem* 2000; **33**: 107-113.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 1035-1042.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Campanale K, Jones DR, Hall SD, Wrighton SA Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 1266-1273.

- Wynalda MA, Wynalda KM, Amore BM, Fagerness PE, Wienkers LC Characterization of bropirimine O-glucuronidation in human liver microsomes. *Xenobiotica* 2003; **33**: 999-1011.
- Xia YQ, Miller JD, Bakhtiar R, Franklin RB, Liu DQ Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; **17**: 1137-1145.
- Zhang N, Fountain ST, Bi H, Rossi DT Quantification and rapid metabolite identification in drug discovery using API time-of-flight LC/MS. *Anal Chem* 2000; **72**: 800-806.
- Zucker K, Rosen A, Tsaroucha A, de Faria L, Roth D, Ciancio G, Esquenazi V, Burke G, Tzakis A, Miller J Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy, and analogous in vitro findings. *Transpl Immunol* 1997; **5**: 225-232.
- Zucker K, Tsaroucha A, Olson L, Esquenazi V, Tzakis A, Miller J Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther Drug Monit* 1999; **21**: 35-43.