

# **UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé**

**FACULTE de Médecine**

**Inserm U850 « Pharmacologie des immunosuppresseurs et transplantation rénale »**

**Thèse N° [   ]**

## **Document de THESE**

**Pour obtenir le grade de**

## **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline / Spécialité : *Pharmacologie***

**Présentée et soutenue par**

**Khaled BENKALI**

**Le 29 Octobre 2008**

**Etudes pharmacocinétique et pharmacogénétique du tacrolimus et mise au point d'une technique de recherche de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic précoce du dysfonctionnement du greffon rénal**

**Thèse dirigée par Dr. Annick Rousseau et Pr. Pierre Marquet**

### **JURY :**

#### **Rapporteurs**

**Pr. Michel SEVE, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Grenoble)**

**Dr. Saik URIEN, Directeur de recherche (Inserm Paris)**

#### **Examineurs**

**Dr. Annick ROUSSEAU, Maître de conférences (Université de Limoges)**

**Pr. Louis N. GASTINEL, Professeur (Université de Limoges)**

#### **Membres invités**

**Pr. Pierre MARQUET, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Limoges)**

**Pr. Marie ESSIG, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU Limoges)**

## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier très chaleureusement : Monsieur le Professeur Pierre Marquet de m'avoir accueilli au sein de l'unité Inserm U850. Je vous remercie pour votre confiance, votre rigueur, votre aide pertinente et précieuse tout au long de ce travail de thèse ; Madame Annick Rousseau, je vous remercie pour votre patience, votre aide, votre gentillesse et votre disponibilité ; Professeur Louis Gastinel, merci Louis pour ta grande disponibilité, ton aide et ta très bonne humeur.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre pour m'avoir accueilli au sein du service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance et m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions.

Monsieur le Professeur Michel SEVE, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. C'est un grand honneur de vous compter parmi les membres du jury.

Monsieur Saik URIEN, merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse en acceptant d'être rapporteur et de l'honneur que vous me faites en participant à ce jury.

Professeur Marie Essig, j'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez voulu accorder à ce travail en acceptant de le juger et je suis honoré par votre présence dans mon jury.

Je remercie Monsieur le Professeur Yannick Le Meur et Monsieur Jean-Phillippe Rérolle pour leurs contributions dans ce travail de thèse, qui est fruit d'une collaboration étroite entre le service de Néphrologie et celui de Pharmacologie Toxicologie.

Je tiens à remercier très chaleureusement toutes les personnes qui m'ont beaucoup aidé pour la rédaction de cette thèse : Aurélie Prémaud, Nicolas Picard, Koukeb Rouguieg et Patricia Festa, merci à vous tous pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide précieuse.

Je remercie aussi très chaleureusement Nassim Djebli pour son aide en début de ma thèse et par la suite pour son amitié, ses conseils et son soutien.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe U850 pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur, Olivier Gensburger, Jean-Hervé Comte, Virginie de Merindol, Anne-Laure Gagez, Gyasi Johnson, Franck Saint-Marcoux, François Ludovic Sauvage.

Je remercie tout le personnel du service de Pharmacologie, Toxicologie et de Pharmacovigilance du CHU de Limoges, plus particulièrement, les attachés de recherche clinique Hélène Roussel et Fabrice Beavogui, merci pour votre aide, votre patience et votre disponibilité ; les techniciens Jean-Louis Dupuy, Franck Giraudie, et Karine Delaune, je vous remercie pour votre aide et vos conseils.

Je remercie très chaleureusement tous mes amis et proches qui m'ont aidé, entouré et encouragé : Karim, Lotfi, Lamine, Amine Mex, Amine Chaarare, Anne, Fella et Rouji.

Je remercie aussi très chaleureusement les personnes sans qui rien n'aurait été possible, mes parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans tous mes projets, ainsi que mon frère Djamel Edinne, et mes petites sœurs Zahida et Hakima.

## TABLE DES MATIERES

<b>I. Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>II. Etat de l'art / revue de littérature.....</b>	<b>13</b>
II.1 Généralités sur la transplantation rénale .....	13
II.1.1 Historique de la transplantation rénale.....	13
II.1.2 Le rejet de greffe .....	14
II.1.3 La néphropathie chronique du greffon.....	15
II.1.4 Traitement immunosuppresseur en transplantation rénale.....	16
II.2 Généralités sur les analyses pharmacocinétiques de populations et sur les méthodes d'estimation Bayésienne .....	20
II.2.1 Principes et objectifs de l'analyse pharmacocinétique de population.....	20
II.2.2 Méthodologie NONMEM <sup>®</sup> , (NONLinear Mixed Effect Model: modèles non linéaires à effets mixtes) :.....	21
II.2.3 Estimation Bayésienne .....	23
II.3 Généralités sur le tacrolimus .....	24
II.3.1 Mécanisme d'action, indications thérapeutiques et toxicité du tacrolimus.....	24
II.3.2 Pharmacocinétique du tacrolimus .....	25
II.3.3 Etude des sources de la variabilité pharmacocinétique du tacrolimus .....	26
II.3.4 Suivi thérapeutique pharmacologique du tacrolimus .....	40
II.4 Recherche de biomarqueurs par approche protéomique .....	43
II.4.1 Généralités.....	43
II.4.2 Recherche de biomarqueurs : « concepts et définitions » .....	44
II.4.3 Sources de variabilité en recherche de biomarqueurs .....	47
II.4.4 Techniques utilisées pour l'étude des mélanges protéiques complexes.....	48
II.4.5 La protéomique urinaire .....	55
<b>III. Travaux personnels concernant le tacrolimus.....</b>	<b>62</b>
III.1 Influence du polymorphisme du gène <i>hPXR NR1I2</i> sur la pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients transplantés rénaux (article 1) .....	64
III.2 Analyse pharmacocinétique de population du tacrolimus et estimation Bayésienne chez des patients transplantés rénaux (article 2) .....	94
III.3 Discussion .....	127
<b>IV. Travaux personnels concernant la recherche de biomarqueurs .....</b>	<b>130</b>
IV.1 Mise au point et étude de faisabilité de la recherche de biomarqueurs urinaires en utilisant la technique Nano-LC-MALDI-TOF/TOF (article 3) :.....	130
IV.2 Sources de variabilité dans la recherche de biomarqueurs urinaires chez les patients transplantés rénaux .....	157
IV.2.1 Matériel et méthodes .....	157
IV.2.2 Résultats .....	161
IV.3 Discussion .....	170
<b>V. Discussion générale.....</b>	<b>174</b>
<b>VI. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>177</b>
<b>VII. Bibliographie.....</b>	<b>179</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

2DE : électrophorèse bidimensionnelle

AUC : aire sous la courbe

C0 : concentration sanguine résiduelle

CL/F : clairance apparente

CE : électrophorèse capillaire

CV% : coefficient de variation

CYP : cytochrome P450

ESI : « Electro Spray Ionisation », ionisation par électrospray

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HLA : « Human Leucocyte Antigen », antigène des leucocytes humains

IL-2 : interleukine 2

IL-2R : récepteur de l'interleukine 2

LC : chromatographie liquide

MALDI : Matrix Laser Desorption Ionisation, désorption-ionisation laser assistée par matrice

MS : spectrométrie de masse

MSMS : spectrométrie de masse en tandem

NONMEM: « Nonlinear Mixed Effect Model », modèle non linéaires à effets mixtes

OATP: « Organic Anion Transporting Polypeptide »

PCR: « Polymerase chain reaction », réaction de polymérisation en chaîne

PCA : « Principle Component Analysis », analyse en composante principale

PCA-DA: « Principle Component Analysis-Discriminant Analysis » analyse en composante principale-analyse discriminante

P-gp : P-glycoprotéine

PKpop : pharmacocinétique de population

PXR: « Pregnane X Receptor »

SELDI: « Surface Enhanced Laser Desorption ionisation », désorption-ionisation laser activée par une surface

SNP : « Single Nucleotide Polymorphism », mutation ponctuelle

STP : suivi thérapeutique pharmacologique

TOF : « Time Of Flight », temps de vol

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Survie du greffon rénal selon la période de la greffe.....	14
<b>Figure 2.</b> Structure chimique du tacrolimus. ....	24
<b>Figure 3.</b> Principales conséquences du polymorphisme génétique sur la pharmacocinétique du tacrolimus.....	28
<b>Figure 4.</b> Régulation transcriptionnelle par le PXR des protéines impliquées dans la pharmacocinétique du tacrolimus.....	33
<b>Figure 5.</b> Procédure de découverte des biomarqueurs.....	46
<b>Figure 6.</b> Principe de fonctionnement du MALDI-TOF .....	52
<b>Figure 7.</b> Schéma expérimental pour la quantification des sources de variabilité intervenant dans la recherche de biomarqueurs urinaires. ....	161
<b>Figure 8.</b> Chromatogrammes LC-MALDI reconstruits, typiques du peptidome de chaque groupe de patients transplantés obtenus après alignement, filtration et normalisation de l'intensité.....	162
<b>Figure 9.</b> Analyses PCA réalisées sur les données LC-MALDI obtenues chez les 11 patients transplantés rénaux. ....	164
<b>Figure 10.</b> Analyses PCA-DA réalisées sur les données LC-MALDI obtenues chez les 11 patients transplantés rénaux. ....	166

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Les différents variants alléliques du PXR et leurs effets .....	35
<b>Tableau 2.</b> Avantages et inconvénients des différentes techniques analytiques utilisées en protéomique.....	54
<b>Tableau 3.</b> Biomarqueurs potentiels sélectionnés en transplantation rénale.....	60
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques démographiques et score de Banff 97 des patients transplantés rénaux.....	159
<b>Tableau 5.</b> Sources de variabilité entre les échantillons urinaires .....	163
<b>Tableau 6.</b> Rang des 20 ions les plus discriminants sélectionnés par la PCA-DA dans le fichier complet de données et dans les trois sous-groupes contenant chacun 66% des données (validation croisée).....	168
<b>Tableau 7.</b> Séquences peptidiques des ions les plus discriminants sélectionnées par les scores de la PCA-DA .....	169

## Résumé

Le suivi régulier et non invasif de l'état du greffon et l'individualisation des traitements immunosuppresseurs peuvent améliorer à long terme la réussite de la greffe rénale. Dans cette optique, les objectifs principaux des études menées au cours de ce travail de thèse étaient : (i) l'étude de l'influence du polymorphisme du gène *hPXR NR1I2* codant pour le pregnane X receptor (PXR) qui régule l'expression de protéines impliquées dans la pharmacocinétique du tacrolimus, (ii) l'analyse pharmacocinétique de population du tacrolimus chez des patients adultes transplantés rénaux et le développement d'un estimateur Bayésien adapté à l'estimation des paramètres pharmacocinétiques individuels à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins, (iii) la mise au point de techniques de recherche de biomarqueurs de dysfonction du greffon rénal par l'analyse Nano-LC-MALDI-TOF/TOF du peptidome urinaire.

Une forte influence d'une mutation ponctuelle (-25385C>T) du gène *hPXR NR1I2* a été montrée sur la pharmacocinétique du tacrolimus. L'élimination du tacrolimus était significativement diminuée chez les patients porteurs de l'allèle muté, ce qui pourrait favoriser la toxicité du tacrolimus chez ces patients ou l'inefficacité thérapeutique dans les premiers jours de traitement chez les homozygotes sauvages. L'approche pharmacocinétique de population (NONMEM) a mis en évidence une relation entre l'hématocrite, le polymorphisme du gène *hPXR NR1I2* et la clairance du tacrolimus. Ce modèle de population a servi de base au développement d'un estimateur Bayésien capable d'estimer avec précision les indices d'exposition, au moyen de trois prélèvements sanguins (0, 1h, et 3h après administration du tacrolimus).

La mise au point d'une technique de recherche de biomarqueurs urinaires a permis de quantifier les sources de variabilité qui peuvent interférer avec la découverte de biomarqueurs urinaires, avant de vérifier le pouvoir discriminant de cette méthode chez des patients transplantés rénaux présentant ou non des signes histologiques de néphropathie chronique.

Au total, ces travaux apportent, d'une part, des connaissances pharmacogénétiques d'aide à l'individualisation de la première dose de tacrolimus et à la détection des patients potentiellement à risque de toxicité et d'autre part, des outils pharmacocinétiques d'individualisation de posologie en cours de traitement et analytiques de recherche de biomarqueurs urinaires d'atteinte du greffon.

**Mots clés :** transplantation rénale, tacrolimus, *NR1I2*, pharmacocinétique, peptidomique, MALDI-TOF/TOF.



## Abstract

To improve renal transplant recipients' outcomes, non-invasive monitoring of the graft status and dose adjustment of immunosuppressive drugs might be helpful. The aims of the studies carried out during this thesis were: (i) to study the influence of *hPXR NR1I2* polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics, as Pregnane X receptor (PXR) is a nuclear receptor which regulates the expression of proteins involved in tacrolimus metabolism and disposition; (ii) to characterize the population pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients and develop a bayesian estimator for individual AUC prediction; and (iii) to develop a reliable nano-LC-MALDI-TOF/TOF method for peptide biomarker discovery in urine, for the non invasive diagnosis of renal allograft dysfunction.

A significant impact of the -25385C>T single nucleotide polymorphism of *hPXR NR1I2* on tacrolimus elimination was found. Tacrolimus apparent clearance was significantly lower in mutated patients, which could lead to higher toxicity in these patients and/or therapeutic inefficiency in homozygous wild type patients during the first days following drug administration. The population pharmacokinetic analysis showed a significant influence of hematocrit level and *hPXR NR1I2* polymorphisms on tacrolimus clearance. A reliable Bayesian estimator, able to predict tacrolimus exposure indices using only three whole blood concentrations (0, 1 and 3 hours post-dose), was developed.

A nano-LC-MALDI-TOF/TOF technique was developed and validated for the discovery of peptide biomarkers in urine. The robustness of this technique was demonstrated by correct group allocation when urines from transplant patients with and without chronic nephropathy were compared.

Overall, this program resulted in pharmacogenetic knowledge that might be useful for tacrolimus first dose individualization and for detecting patients with higher toxicity risks, a pharmacokinetic tool for tacrolimus dose adjustment during therapy, and an analytical tool for biomarker discovery which might lead to the non-invasive diagnosis of renal allograft dysfunction.

**Keywords:** renal transplantation, tacrolimus, *NR1I2*, pharmacokinetics, peptidomics, MALDI-TOF/TOF

# I. INTRODUCTION

Durant la dernière décennie, les taux de réussite de la greffe rénale ont été largement améliorés. Le taux de survie des greffons dépasse les 95% à un an après la greffe. Malheureusement, à long terme, ce succès n'est pas permanent car le taux de survie des greffons n'est que de 70% (10 ans après greffe). Les principales causes de la perte du greffon sont la survenue d'épisodes répétés de rejets aigus et de néphrotoxicités médicamenteuses dues aux immunosuppresseurs utilisés (Nankivell, et al., 2003 ; Nickerson, et al., 1999). En effet, un traitement immunosuppresseur inadapté peut conduire à une perte du greffon, soit par la sous-immunosuppression, soit par l'altération du greffon lui-même (néphrotoxicité du traitement).

L'amélioration du devenir des patients transplantés peut se faire par le diagnostic précoce du rejet de greffe et/ou de la néphrotoxicité médicamenteuse et par l'optimisation de l'efficacité des traitements immunosuppresseurs.

A ce jour, le moyen le plus fiable pour rendre compte de l'état du greffon est la biopsie rénale. Toutefois, cet acte est invasif et non dénué de risques (hémorragies, infections...). La biopsie rénale ne peut être utilisée de manière systématique. De plus, la fréquence des complications due à la toxicité des traitements immunosuppresseurs utilisés est très importante.

La découverte de nouveaux traitements immunosuppresseurs plus efficaces et moins toxiques serait le moyen idéal pour palier ces difficultés. Malheureusement, cet objectif n'est pas atteint. L'amélioration du devenir des patients transplantés dans un futur proche se fera principalement par l'optimisation des traitements immunosuppresseurs dont on dispose actuellement (utilisation de doses efficaces et non toxiques). Deux axes de recherche peuvent être explorés pour atteindre cet objectif « les traitements immunosuppresseurs » et « le suivi régulier et non invasif de l'état du greffon » :

- Amélioration des traitements immunosuppresseurs : chaque patient doit recevoir une posologie optimale du médicament immunosuppresseur prescrit ; il est donc nécessaire de connaître la pharmacocinétique des médicaments immunosuppresseurs (l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination de ces molécules) et

d'identifier les sources de la variabilité interindividuelle. Cette connaissance peut permettre l'individualisation du traitement de façon très précoce (traitements sur-mesure). Le suivi thérapeutique pharmacologique consiste à maintenir l'exposition du médicament dans un intervalle de concentrations prédéfinies (cibles thérapeutiques). Toutefois, l'exposition est mesurée dans le sang et non pas au niveau du site d'action (greffon et système immunitaire). L'efficacité de cette approche dépend de la pertinence clinique de la cible de concentration utilisée.

- Suivi régulier et non invasif de l'état du greffon : l'objectif de ces recherches est de permettre un diagnostic précoce des dysfonctionnements du greffon. L'identification de marqueurs des atteintes du greffon permettrait, d'une manière indirecte et précoce, de connaître l'efficacité ou la toxicité des traitements immunosuppresseurs au niveau du site d'action, en d'autres termes, de réaliser « un suivi pharmacodynamique ».

Les deux axes combinés apportent un diagnostic spécifique et précoce permettant l'adaptation du traitement immunosuppresseur afin d'améliorer la survie du greffon.

Dans cette optique, les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour buts :

- Le développement d'estimateurs Bayesiens, basé sur un modèle de pharmacocinétique de population, pour l'adaptation de posologie du tacrolimus, l'un des immunosuppresseurs le plus couramment utilisé en transplantation rénale. L'approche de pharmacocinétique de population permet de chercher, identifier et quantifier les différents facteurs expliquant la variabilité pharmacocinétique. Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de l'influence sur la pharmacocinétique du tacrolimus du polymorphisme génétique du gène *NR1I2* codant pour un récepteur nucléaire appelé le « Pregnan X Receptor » (PXR). Ce dernier joue un rôle important dans la régulation de l'expression des cytochromes P450 et de la P-glycoprotéine (principales protéines impliquées dans le métabolisme et le transport du tacrolimus).
- La mise au point d'une technique LC-MS dédiée à la recherche de biomarqueurs urinaires spécifiques du diagnostic précoce du dysfonctionnement rénal. Au cours de ce travail, on s'est attaché dans un premier temps, à vérifier la validité des techniques développées. Par la suite, à l'identification et à la quantification des sources de variabilité pouvant interférer avec la découverte de biomarqueurs urinaires

spécifiques. A cet effet, deux études pilotes ont été menées : la première a été réalisée sur des urines de volontaires sains contenant des marqueurs peptidiques artificiels ; la deuxième étude a été réalisée chez des patients transplantés rénaux ayant ou non des signes histologiques de néphropathie chronique.

## **II. ETAT DE L'ART / REVUE DE LITTERATURE**

### **II.1 Généralités sur la transplantation rénale**

#### **II.1.1 Historique de la transplantation rénale**

La transplantation rénale est, de loin, la plus fréquente des greffes d'organes : elle représentait environ 50 % des transplantations en France en 2006. Elle est réalisée chez les personnes en insuffisance rénale terminale (souvent consécutive à des néphropathies vasculaires, glomérulonéphrites chroniques, polykystose ou diabète). La transplantation rénale est souvent une alternative à la dialyse, devenue nécessaire pour maintenir l'équilibre physiologique de ces malades.

En France, on compte 5 000 nouveaux cas par an d'insuffisance rénale terminale. La transplantation rénale permet de retrouver une vie quasi-normale, sans régime diététique strict, ni limitation d'activité physique.

La transplantation rénale peut être réalisée soit à partir d'un donneur vivant, soit à partir d'un donneur en état de mort cérébrale. Un seul rein suffit à assurer la formation des urines.

La transplantation d'organe doit son succès à la compréhension des phénomènes immunologiques, l'inhibition du système immunitaire empêche le rejet de l'organe greffé. La première greffe rénale réussie a été réalisée entre deux jumeaux monozygotes en 1954. Par la suite, l'irradiation du système immunitaire a permis la réussite de certaines greffes, mais au prix d'une forte mortalité due principalement à l'aplasie médullaire. Les progrès réalisés dans le domaine de la chirurgie, des techniques de prélèvement d'organes, mais surtout la découverte de thérapeutiques immunosuppressives efficaces, ont rendu possible la transplantation d'organes entre des individus génétiquement différents.

Actuellement, grâce à l'arsenal thérapeutique immunosuppresseur disponible, le nombre de transplantations rénales réussies a fortement augmenté. Aujourd'hui, en France, la probabilité de survie du greffon est de 90 à 95% à un an post-greffe, et de 70 à 75% à cinq ans après greffe (Figure 1 : rapport 2007 de l'agence nationale de la biomédecine). Plusieurs études ont rapporté que la répétition d'épisodes de rejets aigus et de néphrotoxicités médicamenteuses

étaient les principales causes de la détérioration de la fonction rénale à long terme (Nickerson, et al., 1999).

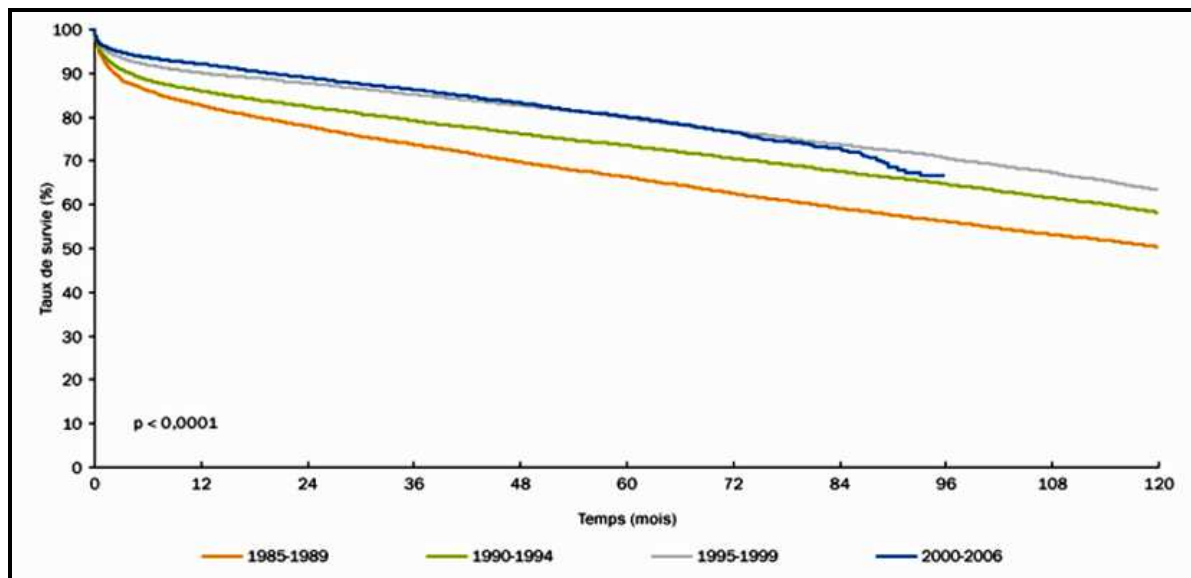


Figure 1. Survie du greffon rénal selon la période de la greffe. (Rapport de l'agence de la biomédecine 2007)

## II.1.2 Le rejet de greffe

Les rejets de greffes peuvent être classés en deux types selon leurs origines et leur ordre chronologique d'apparition. On distingue : les rejets suraigus précoces et les rejets aigus.

### II.1.2.1 Le rejet suraigu précoce

Le rejet suraigu précoce survient très rapidement après la greffe. Il est secondaire à la présence d'anticorps préformés cytotoxiques chez le receveur, anti-HLA de classe I (IgG) ou anti-ABO (anticorps du groupe sanguin IgM), dont seraient responsables par exemple les transfusions itératives, des grossesses, des pré-sensibilisations d'origine microbienne, ou des anticorps formés au cours d'une première transplantation. Les anticorps se fixent sur la surface endothéliale des artéioles du greffon et activent le complément, ce qui conduit à de sérieuses lésions vasculaires, thromboses, oblitérations de la vascularisation du greffon. Histologiquement, il se caractérise dans un premier temps par une accumulation de cellules polynucléaires dans les capillaires glomérulaires et pré-tubulaires, puis dans un second temps apparaissent des dépôts de fibrine et des aspects de thromboses extensives et des nécroses corticales. Ce type de rejet est devenu exceptionnel aujourd'hui avec la pratique systématique du cross-match avant la transplantation. Le cross-match consiste à rechercher, juste avant la

greffe, la présence dans le sérum du receveur d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA (Human Leucocyte Antigen) du greffon.

### **II.1.2.2 Le rejet aigu**

Le rejet aigu survient quelques jours à quelques mois après la greffe. C'est un désordre inflammatoire systémique, dont plusieurs symptômes sont dus à la libération des cytokines. L'expression de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'INF- $\gamma$  augmente le développement d'un infiltrat interstitiel typique. Quatre-vingt-dix pourcent des rejets aigus sont à médiation cellulaire et peuvent être traités facilement, en revanche, les rejets aigus à médiation humorale (rejets où les anticorps anti-greffon sont prédominants) sont beaucoup plus difficiles à traiter. Dans les rejets à médiation cellulaire, les lymphocytes CD8<sup>+</sup> interviennent pour détruire les cellules du greffon. Ces cellules contiennent des granules cytolytiques qui libèrent le granzyme et les perforines qui causent des dommages membranaires et induisent l'apoptose des cellules du greffon (Colvin, et al., 1997 ; Racusen, et al., 1999). En France, le pourcentage de rejet aigu cellulaire à moins d'un an après greffe était de 20% en 2006 (Hertig, et al., 2006).

### **II.1.3 La néphropathie chronique du greffon**

Les biopsies systématiques des greffons ont montré que beaucoup de patients n'ayant ni altération de la fonction rénale ni augmentation de la protéinurie, présentent des lésions histologiques latentes. Ces lésions sont appelées néphropathies chroniques du greffon. Les néphropathies chroniques sont caractérisées par un dysfonctionnement rénal progressif, accompagné de fibrose interstitielle chronique, d'atrophie tubulaire, d'occlusions vasculaires et de sclérose glomérulaire. Les néphropathies chroniques sont considérées maintenant comme étant les principales causes de l'échec de la transplantation rénale. Histologiquement, ces lésions peuvent être classées en deux catégories: les dommages tubulointerstitiels précoces qui peuvent être dus entre autres à des « facteurs immunologiques » et les dommages tardifs caractérisés par une hyalinose artériolaire progressive, une glomérulonéphrose ischémique et une fibrose interstitielle, ces derniers pouvant être associés à « la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine » (Nankivell, et al., 2003 ; Racusen, et al., 1999).

## **II.1.4 Traitement immunosuppresseur en transplantation rénale**

Après une allogreffe, un traitement immunosuppresseur devra être pris toute la vie pour éviter le rejet du rein greffé. Le rejet est un processus complexe dont la compréhension a permis le développement de plusieurs médicaments immunosuppresseurs. Dans un premier temps, l'antigène du donneur est présenté par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) du donneur ou du receveur aux lymphocytes T naïfs ou mémoire du receveur dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette présentation suppose l'interaction entre le récepteur T (TCR) et le peptide antigénique présenté par une molécule HLA (Signal 1) et l'interaction entre le domaine extracellulaire de CTLA4 du lymphocyte T (Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4) avec ses ligands CD80 et CD86 des CPAs (Signal 2). Ces deux signaux activent une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutira à l'expansion clonale du lymphocyte T et une différenciation en lymphocyte effecteur, qui regagne le rein et cherche à le détruire. La calcineurine qui active le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of T-cells), les voies des MAP-kinases et la voie du NFκB sont nécessaires à cette cascade de signalisation. La sécrétion puis la fixation de l'IL-2 (entre autres) sur le récepteur de l'IL-2 (IL-2R) induisent ensuite une cascade de signalisation (signal 3 : JAK3 kinase, PI3 kinase et mTOR ou mammalian target of rapamycin) qui conduit à la prolifération cellulaire qui requiert la synthèse des bases puriques (régulée par l'inosine monophosphate déshydrogénase) et pyrimidiques (Hertig, et al., 2006 ; Halloran, 2004).

Actuellement, il existe plusieurs molécules pouvant inhiber plusieurs de ces étapes (d'où leurs propriétés immunomodulatrices).

Dans une thérapie immunosuppressive on distingue les traitements d'induction et les traitements d'entretien.

### **II.1.4.1 Traitement d'induction :**

Ce traitement n'est pas systématique, toutefois il est classique en France. Il consiste en l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux avant l'implantation du greffon, pour diminuer la réponse immune du receveur et le risque de rejet aigu, et accélérer la reprise de la fonction rénale. Deux types d'anticorps sont principalement utilisés :

- les anticorps polyclonaux « déplétants » de lapin ou de cheval dirigés contre les lymphocytes T (Thymoglobulines) (Peddi, et al., 2002).



- les anticorps monoclonaux « non déplétants » dirigés contre l'IL-2R (le basiliximab et le daclizumab) (Vincenti, et al., 1998).

#### II.1.4.2 Traitement d'entretien

Pour prévenir le rejet de greffe, un grand nombre de patients transplantés reçoivent aujourd'hui une trithérapie comportant des corticoïdes, un agent antiprolifératif lymphocytaire, et un inhibiteur de la calcineurine.

- **Les corticoïdes :** ils s'opposent à la transcription de gènes dont le promoteur est sensible au NFκB et augmentent aussi la synthèse de l'inhibiteur IκB (Karin, 1998), mais leur utilisation pendant de longues périodes provoque des complications métaboliques (diabète, ostéopénie fracturaire...) et infectieuses graves. Les corticoïdes sont utilisés principalement à fortes doses dans les premiers jours qui suivent la greffe. En France, chez la plupart des malades ce traitement est arrêté progressivement au bout de trois mois, cependant, certains patients (comme les enfants) sont maintenus sous traitement durant une longue période. Les corticoïdes sont aussi utilisés à fortes doses pour endiguer les rejets aigus. Les corticoïdes induisent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des xénobiotiques tels que les CYP3A et la P-glycoprotéine, par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires tels que le PXR, ce qui peut modifier la pharmacocinétique des autres médicaments co-administrés (Anglicheau, et al., 2003).

- **Les Agents antiprolifératifs :** le plus utilisé des agents antiprolifératifs est le mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept<sup>®</sup>), prodrogue de l'acide mycophénolique qui est un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH II), enzyme clé de la synthèse des purines. Le blocage de cette voie provoque une immunodéficiences sans altérer les autres organes, contrairement à la voie de recyclage des purines (Sollinger, 1995). Ses principaux effets secondaires sont des désordres gastro-intestinaux (diarrhées), et hématologiques (anémies, leucopénies). Les mécanismes d'apparition de ces effets secondaires sont encore mal connus. Récemment, un sel sodique du mycophénolate a été commercialisé (Myfortic<sup>®</sup>) ; il présente l'avantage d'être gastro-résistant ce qui pourrait diminuer l'incidence des effets indésirables digestifs (Afssaps, 2005).

Les inhibiteurs de la mTOR (mammalian target of rapamycin) : le sirolimus et l'everolimus se lient à la protéine FKBP12 et forment un complexe qui inhibe la TOR sans inhiber la voie de la calcineurine, et bloquent le signal 3 en évitant l'activation du cycle cellulaire par des récepteurs des cytokines (Calne, et al., 1989 ; Schuler, et al., 1997). Leurs principaux effets secondaires sont les hyperlipidémies et les thrombocytopénies.

L'azathioprine a été l'un des premiers immunosuppresseurs mis sur le marché. Il interfère avec la synthèse de l'ADN dans toutes les cellules en prolifération. Il est de moins en moins utilisé depuis l'introduction du MMF ; actuellement il est principalement réservé aux patientes qui désirent une grossesse (Elion, 1993).

- **Les Inhibiteurs de la calcineurine :** découverts il y a environ 30 ans, ils empêchent l'action de cette phosphatase, dont la cible est le facteur de transcription NFAT. Le NFAT est déphosphorylé par la calcineurine, lui permettant de gagner le noyau cellulaire où il stimule entre autres le promoteur du gène de l'IL-2, une cytokine qui joue un rôle important dans l'allo-réaction. La calcineurine est présente principalement au niveau des lymphocytes, ce qui confère à ces molécules un effet immunosuppresseur assez spécifique malgré l'ubiquité du NFAT (Clipstone et al., 1992). Les inhibiteurs de la calcineurine possèdent des effets secondaires graves dont le diabète, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, l'augmentation du risque de cancers, et surtout la néphrotoxicité. Les deux inhibiteurs les plus couramment utilisés sont la ciclosporine et le tacrolimus (FK 506). La ciclosporine forme avec la cyclophiline (protéine intracellulaire faisant partie de la famille des immunophilines) un complexe qui inhibe la voie de transduction calcium-calcineurine dépendante (Clipstone et al., 1992). Le tacrolimus se lie avec une autre immunophiline, la FK 506-binding protein 12 (FKBP12), pour former un complexe qui inhibe la voie des calcineurines avec une plus grande efficacité, c'est à dire à doses plus faibles que la ciclosporine (European FK506 Multicenter liver study, 1994). Chez les nouveaux patients transplantés, la tendance est à la prescription du tacrolimus.

- **Les nouvelles substances :**

- Le Belatacept (LEA29Y) est une protéine de fusion constituée de région constante d'IgG1 humaine (fragment Fc) et du domaine extracellulaire de CTLA4. Il peut se fixer sur les ligands CD80 et CD86 des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs), et empêcher ainsi leur interaction avec la protéine de reconnaissance CD28 du lymphocyte T (inhibition par compétition moléculaire). Une étude récente a montré que le belatacept serait aussi efficace que la ciclosporine dans la prévention du rejet aigu, et peut-être moins toxique (Vincenti, et al., 2005).

- L'alemtuzumab (anticorps monoclonal dirigé contre CD 52) diminue massivement les populations lymphocytaires. Il n'est pas encore indiqué en transplantation rénale (Knechtle, et al., 2003).

- Le FTY720 empêche la migration des lymphocytes hors du ganglion après reconnaissance de l'allo-antigène par modulation du trafic lymphocytaire, par sa fixation sur les récepteurs sphingosine-1-phosphate après sa phosphorylation (Chiba, et al., 2005).
- Les inhibiteurs des JAK kinases, en cours de développement : ils inhibent la transmission du signal, permettant la prolifération lymphocytaire (Deuse, et al., 2008).

## **II.2 Généralités sur les analyses pharmacocinétiques de populations et sur les méthodes d'estimation Bayésienne**

### **II.2.1 Principes et objectifs de l'analyse pharmacocinétique de population**

Les études de pharmacocinétique de population (PKpop) ont pour objectif d'estimer la distribution statistique des paramètres pharmacocinétiques (PK) d'un médicament dans une population de patients, de quantifier et d'identifier les sources de la variabilité pharmacocinétique. L'approche PKpop ne considère jamais un patient comme isolé mais comme un membre d'une sous-population particulière. Cette méthode permet d'analyser globalement un ensemble d'individus et peut être réalisée à partir d'un nombre limité de prélèvements par sujet, néanmoins l'ensemble des prélèvements doit décrire l'intégralité du profil des concentrations au cours du temps. Cet avantage offre la possibilité d'étudier la pharmacocinétique d'un médicament dans des populations autrefois exclues des essais cliniques pour des raisons éthiques (enfants, personnes âgées, malades dans un état critique).

L'analyse PKpop permet de prendre en compte et d'estimer plusieurs sources de variabilités :

- la variabilité interindividuelle (entre les individus) : chaque individu est différent, ses paramètres pharmacocinétiques lui sont spécifiques et différents de ceux de la population. Cette variabilité est due à des facteurs démographiques, génétiques, physiologiques et environnementaux. Ces facteurs sont introduits dans le modèle PKpop et sont appelés covariables ;
- la variabilité intraindividuelle ou inter-occasion (chez le même individu à différentes périodes de son traitement) : elle informe sur la variabilité des paramètres PK au cours du temps ;
- la variabilité résiduelle correspond à la part de variabilité non expliquée par le modèle. Elle peut être due aux erreurs de mesures des concentrations, des temps de prélèvements, et à l'inadéquation du modèle pour décrire l'évolution des concentrations. Elle permet de juger de la qualité d'un modèle pharmacocinétique.

Chacune de ces variabilités est décrite par un modèle statistique encore nommé modèle d'erreur.

Les principales méthodes utilisées en modélisation PKpop reposent sur le principe du maximum de vraisemblance : la meilleure estimation des paramètres est celle rendant maximale la probabilité du résultat observé. On distingue les approches paramétriques (qui présupposent une distribution normale ou Log-normale des paramètres PK dans la population : e.g. logiciel NONMEM, P-PHARM...) et non paramétriques (qui ne dépendent pas de l'hypothèse de la normalité des données : e.g. NPLM, NPEM, NPAG...).

## **II.2.2 Méthodologie NONMEM<sup>®</sup>, (NONLinear Mixed Effect Model: modèles non linéaires à effets mixtes) :**

Le logiciel NONMEM<sup>®</sup> (Beal et Sheiner, 1980) utilise la méthode statistique de modélisation non-linéaire à effets mixtes. Ce programme utilise une approche de population dite « en une étape » qui permet d'estimer directement les paramètres moyens (et leur variabilité) dans une population d'individus à partir des concentrations observées. Cette méthode est dite à effets mixtes car le processus d'estimation est basé sur la décomposition de chaque paramètre pharmacocinétique en une somme de deux termes: les effets fixes sont les propriétés observables (et prévisibles) des individus, par exemple si la clairance d'un médicament est proportionnelle au poids on peut alors simplifier l'expression de la clairance dans le modèle pharmacocinétique, dans ce cas le poids est un effet fixe ; les effets aléatoires ne peuvent pas être prédits à l'avance, en d'autres termes, c'est la variabilité biologique et la variabilité résiduelle (erreurs de mesures...). La variabilité biologique comprend la variabilité entre les individus et la variabilité inter-occasion.

Le logiciel NONMEM<sup>®</sup> propose plusieurs méthodes d'estimation. La méthode d'estimation FO (First Order) consiste en une linéarisation de premier ordre autour de la moyenne des paramètres (effets fixes), alors que la linéarisation dans la méthode FOCE (First Order Conditional Estimation) est effectuée autour des effets aléatoires (variabilités inter- et intra-individuelles). Cette approximation est plus précise, notamment quand les variabilités interindividuelles sont importantes, mais cette méthode demande des temps de calculs beaucoup plus longs.

NONMEM<sup>®</sup> estime l'ajustement entre les concentrations observées et les concentrations prédites, il estime aussi les différentes valeurs de paramètres PK de population, les variabilités interindividuelles de chaque paramètre et l'erreur résiduelle. La qualité de l'ajustement entre les concentrations prédites et les concentrations observées sur l'ensemble de la population est estimée par la valeur de la fonction objective (OBJ) qui est égale à  $-2 \cdot \log$  (vraisemblance), elle permet d'évaluer la justesse de l'estimation des paramètres PK par le modèle pharmacocinétique au sein de la population. En utilisant la même méthode d'estimation (FO ou FOCE), la valeur la plus faible de la fonction objective témoigne d'un meilleur ajustement. La qualité de l'ajustement du modèle est déterminée aussi par une faible erreur résiduelle du modèle et une bonne précision de l'estimation des paramètres PK.

Classiquement l'analyse PKpop est menée en quatre étapes :

- Construction du modèle structural : cette étape consiste à sélectionner un modèle PK permettant de décrire au mieux l'évolution des concentrations du médicament en fonction du temps. Selon les propriétés pharmacocinétiques des médicaments, différents modèles compartimentaux peuvent être appliqués pour décrire l'absorption, la distribution et l'élimination du médicament. Au cours de cette étape, on détermine aussi le modèle statistique adapté à la description de chaque variabilité : la variabilité inter- et intra individuelle de chaque paramètre pharmacocinétique et la variabilité résiduelle. Le choix du modèle se fait sur : des critères statistiques incluant la valeur de la fonction objective, la précision sur les paramètres estimés et la valeur de la variabilité résiduelle, ainsi que sur des critères graphiques par représentation des concentrations observées en fonction des concentrations prédites par le modèle et en fonction des concentrations individuelles prédites par estimation Bayésienne.
- Recherche des covariables pertinentes : cette étape consiste à déterminer les facteurs individuels (nommés covariables) qui influencent significativement chaque paramètre PK (et donc permettent d'expliquer une fraction significative de la variabilité inter-voire intra-individuelle du paramètre PK étudié) et à mettre en équation la relation entre les paramètres et ces covariables. Les covariables sont d'abord testées individuellement sur chaque paramètre PK. Puis, toutes les covariables significatives en analyse univariée sont intégrées simultanément dans un modèle intermédiaire.
- Elaboration du modèle final : la pertinence de chaque covariable est vérifiée par délétion indépendante à partir du modèle intermédiaire. Une covariable pourra être retenue dans le modèle final si, lorsqu'elle est enlevée du modèle intermédiaire, la

valeur de la fonction objective augmente significativement (de 6,64 points, test de Khi-deux  $p < 0,01$ )

- Validation externe et validation interne : la validation externe du modèle se fait en estimant les valeurs de concentrations et des paramètres PK individuels par méthode Bayésienne, dans un groupe de patients indépendants en utilisant comme information *a priori* le modèle de population. La validation interne peut être réalisée soit par Bootstrap qui est une méthode de ré-échantillonnage aléatoire ayant pour but de créer des populations virtuelles ayant des caractéristiques proches de la population de départ ; soit par validation croisée qui consiste à partitionner la population de départ en  $n$  sous groupes ; souvent  $n=4$  ou  $n=10$ , ainsi chaque sous groupe correspond à respectivement 25% et 10% des patients. Les paramètres de population sont estimés dans un ensemble de  $n-1$  sous-groupes et les paramètres PK individuels des patients du  $n$ ème groupe (c.à.d. dont les données patients ne sont pas prises en compte pour le calcul des paramètres de population) sont estimés par méthode Bayésienne à partir de ces paramètres de populations. Le principe de permutation circulaire est appliqué de façon à obtenir les paramètres individuels dans chacun des  $n$  sous groupes.

### II.2.3 Estimation Bayésienne

L'estimation Bayésienne est une méthode statistique basée sur l'expérience acquise dans une population. Elle permet de déterminer les paramètres PK et les meilleures doses d'un médicament à administrer à un patient sans avoir besoin d'un nombre élevé de concentration, ce qui rend cette méthode appropriée à l'adaptation de posologie en pratique clinique. La méthode Bayésienne conjugue une information de groupe (information *a priori* provenant de la population) et des informations individuelles (données de concentrations) apportées par l'expérience. L'information de groupe peut provenir soit d'un modèle PKpop, soit d'une étude pharmacocinétique en deux étapes. Dans cette dernière, on détermine les paramètres pharmacocinétiques chez chaque individu, puis on calcule les moyennes et les variabilités de ces paramètres. Cette approche nécessite de disposer d'un nombre important de prélèvements par patient (10 à 15 prélèvements).

## II.3 Généralités sur le tacrolimus

### II.3.1 Mécanisme d'action, indications thérapeutiques et toxicité du tacrolimus

Le tacrolimus (FK506) est un puissant immunosuppresseur, isolé d'un actinomycète le *Streptomyces tsukubaensis* de la région Tsukuba au Japon (Goto, et al., 1987). Son activité immunosuppressive est 100 fois plus puissante que celle de la ciclosporine (Pirsch, et al., 1997 ; European FK506 Multicenter liver study, 1994).

La masse moléculaire du tacrolimus est de 804 Da, il présente une structure cyclique à 23 éléments (Figure 2) (Tanaka, et al., 1987).

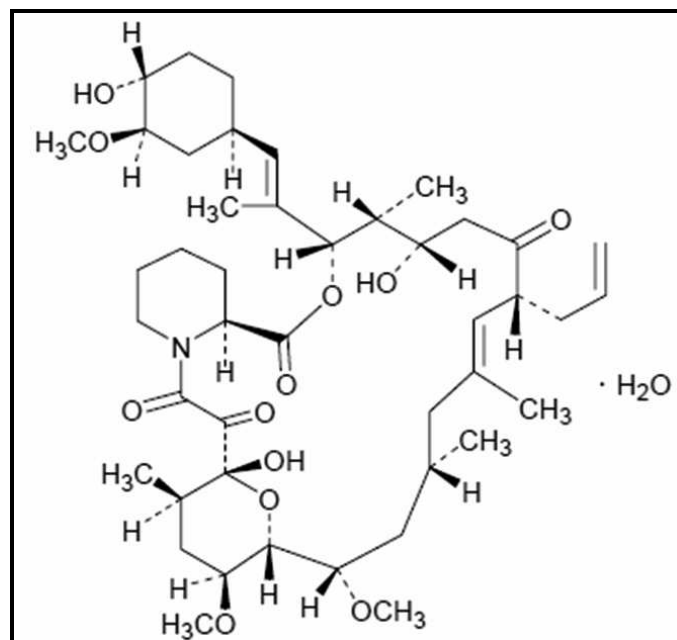


Figure 2. Structure chimique du tacrolimus.

Le tacrolimus est un inhibiteur relativement spécifique de la prolifération des lymphocytes T, il exerce son pouvoir immunosuppresseur en se liant à une immunophiline (FK-binding protein) et entraîne la formation d'un complexe à 5 molécules, comprenant : la FKPB, le tacrolimus, la calmoduline et les calcineurines (sous-unités A et B). Ce complexe provoque alors l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine (McKeon, 1991). Le transport des facteurs de transcription vers le noyau dépendant de leur déphosphorylation, leur inhibition conduit au blocage des fonctions effectrices des cellules T et de leur prolifération.



Cependant, le tacrolimus n'inhibe ni la prolifération secondaire des cellules T activées en réponse à l'IL-2, ni la présentation de l'antigène. Il est utilisé en greffe rénale en association avec le MMF et (éventuellement) les corticoïdes comme traitement d'entretien. Une nouvelle forme pharmaceutique à libération prolongée du tacrolimus (Advagraf<sup>®</sup>) vient d'obtenir son autorisation de mise sur le marché ; elle présente l'avantage de diminuer les fréquences d'administration (une fois par jour au lieu de deux fois par jour avec la forme classique), cependant, selon le résumé des caractéristiques du produit publié par l'European Medicine Agency, son efficacité reste comparable à celle de l'ancienne forme (First, 2008 ; European Medicine Agency, 2008).

Les effets secondaires les plus importants du tacrolimus sont :

- 1) une néphrotoxicité, qui peut provoquer une insuffisance rénale aiguë précoce et réversible ou une insuffisance rénale chronique progressive,
- 2) une neurotoxicité qui peut être sévère dans 5-8% des cas,
- 3) une hyperglycémie, chez 40% des patients traités par le tacrolimus qui peut aboutir à un diabète induit,
- 4) une hypertension artérielle chez 40% des patients traités,
- 5) des effets secondaires liés à son action (l'immunosuppression), principalement les infections.

De plus, le tacrolimus donne lieu à de nombreuses interactions médicamenteuses encore mal connues, notamment avec les inhibiteurs, les inducteurs et les substrats du système cytochrome P450 3A (CYP3A).

### **II.3.2 Pharmacocinétique du tacrolimus**

L'effet du premier passage hépatique et intestinal est très important sur le tacrolimus. D'un individu à un autre sa biodisponibilité varie de 14 à 32% (Venkataramanan, et al., 1995). Le tacrolimus est un substrat (et un inhibiteur) de la P-glycoprotéine (P-gp) (Saeki, et al., 1993) ; cette protéine transmembranaire agit comme une pompe expulsant certains médicaments du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Cette protéine se retrouve sur de nombreux tissus de l'organisme humain, notamment au niveau du pôle apical des entérocytes, ce qui pourrait constituer un facteur limitant de l'absorption du tacrolimus.

Le volume de distribution du tacrolimus est élevé (environ 1300 litres), à cause de la grande lipophilie de la molécule ; les concentrations dans le poumon, la rate, le cœur, le rein et le

pancréas après équilibre de distribution sont nettement supérieures aux concentrations plasmatiques, indiquant ainsi une grande affinité tissulaire (Peters, et al., 1993). Le tacrolimus se lie fortement aux globules rouges et aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine et l'alpha 1-glycoprotéine (Venkataramanan, et al., 1995). Des études pharmacocinétiques ont montré que le sang total est un meilleur échantillon que le plasma pour étudier la pharmacocinétique du tacrolimus (Physicians Desk Reference, 1996).

Une fois absorbé, le tacrolimus subit une O-déméthylation, une hydroxylation et / ou des réactions métaboliques oxydatives dans le foie et l'intestin. La déméthylation en 13-O-déméthyltacrolimus par le cytochrome CYP3A est la voie prédominante (Karanam, et al., 1994 ; Sattler, et al., 1992 ; Vincent, et al., 1992).

Le tacrolimus est quasi-entièrement métabolisé avant son élimination, qui se fait essentiellement par voie biliaire (Christians, et al., 1991), et minoritairement (moins de 2%) par voie rénale. La demi-vie d'élimination varie de 11,7 à 18,8 h (Venkataramanan, et al., 1991).

### **II.3.3 Etude des sources de la variabilité pharmacocinétique du tacrolimus**

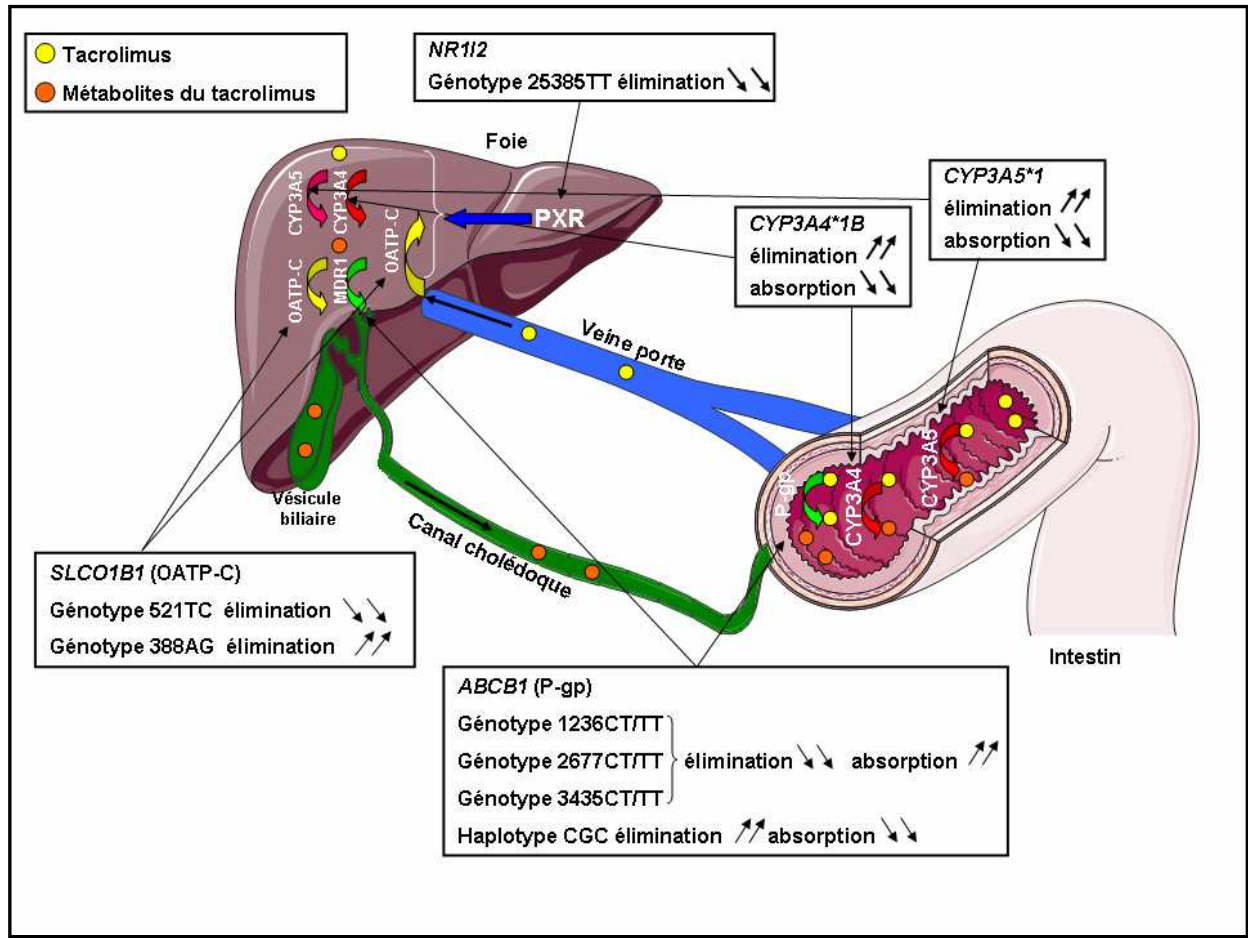
#### **II.3.3.1 Influence des polymorphismes des gènes codant pour les protéines impliquées dans la pharmacocinétique du tacrolimus**

La pharmacogénétique étudie l'influence des variations ponctuelles de la séquence d'ADN génomique sur la réponse à l'administration d'une molécule thérapeutique chez un individu. Les variations génétiques sont à l'origine d'une partie des variabilités interindividuelles physiologiques, pharmacocinétique et pharmacodynamique. L'étude de la pharmacogénétique ouvre de nouvelles voies dans la compréhension de cette variabilité. Ces connaissances aideront à prévoir les doses optimales pour chaque patient, et à identifier les patients susceptibles d'avoir des effets indésirables.

Les effets des principaux polymorphismes génétiques touchant des enzymes impliquées dans l'absorption, l'élimination et le métabolisme du tacrolimus ont été étudiés.

Le tacrolimus est métabolisé principalement par les enzymes du métabolisme de phase I (CYP3A4 et CYP3A5) (Sattler, et al., 1992). Il est aussi substrat de la P-gp (Saeki, et al., 1993) et des « Organics Anions Transporting Polypeptide » (notamment OATP-C :

transporteur exprimé dans l'hépatocyte) (Hagenbuch et al., 2003). L'expression et l'activité de ces protéines sont variables d'un individu à l'autre. De plus, elles sont soumises à une régulation transcriptionnelle importante par le biais de récepteurs nucléaires tels que le PXR (Lamba, et al., 2004), dont le polymorphisme génétique pourrait être à l'origine d'une partie de la variabilité interindividuelle (Lamba, et al., 2008 ; Zhang, et al., 2001). Un récapitulatif des principales conséquences des polymorphismes des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans la pharmacocinétique du tacrolimus est représenté dans la figure 3.



**Figure 3.** Principales conséquences du polymorphisme génétique sur la pharmacocinétique du tacrolimus

### II.3.3.1.1 Polymorphismes du CYP3A4 :

Le CYP3A4 est fortement exprimé au niveau de l'intestin grêle et du foie et de ce fait, il participe activement à la clairance orale du tacrolimus (Hebert, 1997; Lown, et al., 1997). Les polymorphismes du CYP3A4 sont peu fréquents dans la population (fréquence allélique <5% pour la plupart d'entre eux) et ils ont une faible incidence sur l'activité et/ou l'expression de l'enzyme. Le polymorphisme le plus fréquent est le SNP (Single Nucleotide Polymorphism) -392A>G au niveau du promoteur du gène, correspondant à l'allèle *CYP3A4\*1B*. Ce polymorphisme est présent dans 3,6 à 9,6% de la population caucasienne, 53 à 67% de la population africaine ou afro-américaine, et absent dans la population asiatique (Ball, et al., 1999 ; Garcia-Martin, et al., 2002 ; Hamzeiy, et al., 2002 ; Sata, et al., 2000 ; van Schaik, et al., 2000).

Certaines études ont montré un effet significatif du *CYP3A4\*1B* sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs. Hesselink et al. ont observé que les concentrations résiduelles (C<sub>0</sub>, obtenue par un prélèvement sanguin effectué juste avant la prise matinale) standardisées par la dose de tacrolimus (C<sub>0</sub>/dose) étaient significativement plus faibles chez les patients transplantés rénaux portant au moins un allèle *CYP3A4\*1B* par rapport aux patients portant le génotype sauvage *CYP3A4\*1A/\*1A* (Hesselink, et al., 2003). Cependant, cette étude n'a pas été confirmée sur d'autres populations. Par ailleurs, l'effet du *CYP3A4\*1B* pourrait être dû au déséquilibre de liaison existant entre le *CYP3A4\*1B* et le *CYP3A5\*3* (Kuehl, et al., 2001). Kuypers et al. ont observé que les AUC<sub>0-12h</sub> standardisées par la dose étaient plus faibles chez des patients transplantés rénaux avec le génotype *CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1* que chez les patients avec un génotype *CYP3A4\*1A/CYP3A5\*1* mais cette différence n'était pas statistiquement significative (Kuypers, et al., 2007).

### II.3.3.1.2 Polymorphismes du CYP3A5 :

Le plus fréquent et le plus étudié des polymorphismes du CYP3A5 est la mutation correspondante à l'allèle *CYP3A5\*3*. Il s'agit d'une substitution d'une base adénosine par une base guanine en position 6986 au niveau de l'intron 3 du gène *CYP3A5* (6986A>G), aboutissant ainsi à une erreur d'épissage de l'ARNm transcrit, à l'origine de la production d'une protéine tronquée inactive de 102 acides aminés (Kuehl, et al., 2001). Seuls les individus porteurs d'au moins un allèle sauvage *CYP3A5\*1* expriment la protéine CYP3A5 à

des concentrations significatifs (Hustert, et al., 2001 ; Kuehl, et al., 2001). Environ 10% de la population caucasienne exprime le CYP3A5, 33% de la population japonaise, et entre 50 à 70% de la population africaine ou afro-américaine.

L'implication du polymorphisme 6986A>G dans la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du tacrolimus a été suggérée par MacPhee et al. en 2002 (Macphee, et al., 2002). Des études réalisées chez des patients transplantés rénaux traités par le tacrolimus ont mis en évidence : une clairance de 25 à 40% supérieure, et des C<sub>0</sub>/dose 3 fois moins élevés chez les expresseurs du CYP3A5 par rapport aux patients non expresseurs porteurs de l'allèle CYP3A5\*3 (MacPhee, et al., 2005 ; Zhao, et al., 2005).

Les patients porteurs de l'allèle CYP3A5\*1 (expresseurs du CYP3A5) requièrent des doses plus importantes de tacrolimus pour atteindre les cibles thérapeutiques recommandées, par rapport aux patients homozygotes porteurs de l'allèle CYP3A5\*3 (les faibles expresseurs du CYP3A5) (MacPhee, et al., 2005 ; Haufroid, et al., 2004 ; Roy, et al., 2006). D'autres études sur de plus petites populations de patients transplantés rénaux ont confirmé ces observations (Haufroid, et al., 2006; Tsuchiya, et al., 2004). Le même effet du polymorphisme 6986A>G a été retrouvé chez des transplantés cardiaques pédiatriques (Zheng, et al., 2003), chez des patients adultes transplantés pulmonaires (Zheng, et al., 2004), et aussi chez des patients transplantés hépatiques à partir de donneur vivant (Goto, et al., 2004 ; Uesugi, et al., 2006). Dans cette dernière étude, il était démontré que l'influence du génotype du donneur est également très importante. Les patients recevant un foie d'un donneur porteur du génotype CYP3A5\*1/\*1 ont tendance à avoir des C<sub>0</sub>/dose plus faibles, et requièrent des doses supérieures de tacrolimus par rapport aux patients bénéficiant de foies porteurs du génotype CYP3A5\*3/\*3 (Goto, et al., 2004 ; Elens, et al., 2007).

Bien que l'effet du polymorphisme 6986A>G sur la pharmacocinétique du tacrolimus ait été rapporté dans plusieurs études, l'intérêt du génotypage du CYP3A5 pour le STP du tacrolimus n'est pas démontré (Thummel, 2004). Les cibles thérapeutiques du tacrolimus sont atteintes en utilisant le suivi thérapeutique chez tous les patients quelque soit leur génotype. Il existe un chevauchement important des valeurs de C<sub>0</sub>/dose pour les patients des différents génotypes, et la connaissance de ce génotype ne suffit pas à déterminer la dose optimale pour chaque patient. Kuypers et al. ont montré, dans le cadre d'une étude prospective, que l'utilisation du C<sub>0</sub> pour l'ajustement de la posologie permettait d'avoir des C<sub>0</sub> et des AUC<sub>0-12h</sub> similaires à partir du 7<sup>ème</sup> jour et jusqu'à 5 ans après transplantation chez les patients expresseurs et non-expresseurs du CYP3A5. Une autre étude a rapporté les

mêmes observations chez des patients transplantés rénaux dont les doses de tacrolimus étaient ajustées selon le C<sub>0</sub>. Les C<sub>0</sub> étaient similaires chez les patients expresseurs et non expresseurs du CYP3A5. Cependant, les patients non expresseurs du CYP3A5 avaient tendance à être plus exposés au tacrolimus, ceci se traduisant par une AUC<sub>0-12h</sub> 30% plus élevée que chez les patients non-expressseurs un an après la greffe (Renders, et al., 2007).

Il est probable que l'impact de ce polymorphisme est plus important dans la ou les premières semaines post-greffe ; les expresseurs du CYP3A5 ont des concentrations sanguines plus faibles et ils pourraient être enclins à avoir des rejets plus fréquents et plus précoces (Macphee, 2004). Une étude sur un grand nombre de patients est en cours pour déterminer l'intérêt de l'adaptation de posologie en fonction de l'allèle *CYP3A5\*1* en période très précoce (avant le 6<sup>ème</sup> jour après greffe). Dans cette étude les patients sont répartis en deux groupes : dans le premier les patients reçoivent une dose classique de tacrolimus, et dans le deuxième les patients reçoivent des doses adaptées selon l'allèle du *CYP3A5* (*CYP3A5\*1/CYP3A5\*3*) (étude TACTIQUE, Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT00552201).

### II.3.3.1.3 Polymorphismes de la P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (P-gp) est un membre de la famille des transporteurs membranaires ABC (ATP-Binding Cassette) codée par le gène *ABCB1*, anciennement appelée MDR1 (pour Multi-Drug Resistance). La P-gp est ubiquitaire, elle est exprimée au niveau de la partie apicale des hépatocytes, des entérocytes, des cellules rénales, musculaires, testiculaires, placentaires et au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Borst, et al., 1993 ; Kusuhara, et al., 1998 ; Tanigawara, 2000 ; Thiebaut, et al., 1987). Le tacrolimus est un substrat de la P-gp (Saeki, et al., 1993) et l'influence du gène *ABCB1* sur la pharmacocinétique de ce médicament a été largement étudiée.

Il y a plus de 50 SNPs connus pour le gène *ABCB1* (Kroetz, et al., 2003 ; Kim, et al., 2001). Les trois SNPs les plus étudiés sont : le 1236C>T dans l'exon 12, le 2677G>(A,T) dans l'exon 21 et le SNP 3435C>T dans l'exon 26. Ces SNPs sont en fort déséquilibre de liaison, leurs effets sur l'expression et/ou l'activité de la P-gp sont controversés. Par ailleurs, le SNP -129T>C dans la région du promoteur provoque une baisse significative de l'expression de la P-gp et pourrait donc avoir un effet important sur la pharmacocinétique des xénobiotiques substrats de la P-gp (Marzolini, et al., 2004).

Certaines études ont trouvé un impact significatif des SNPs du gène *ABCB1* sur la variabilité de la pharmacocinétique du tacrolimus, mais beaucoup d'autres n'ont pas trouvé

d'association. Zheng et al. ont observé que les C0/dose étaient significativement supérieures chez les patients porteurs des mutations 2677T ou 3435T par rapport aux patients homozygotes sauvages (respectivement, 2677GG et 3435CC) dans des populations de patients pédiatriques transplantés cardiaques, et chez des patients adultes transplantés pulmonaires (Zheng, et al., 2003 ; Zheng, et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés chez des patients transplantés rénaux adultes (Li, et al., 2006 ; Anglicheau, et al., 2003). Anglicheau et al. ont montré que les C0/dose étaient plus élevées chez les patients porteurs de la mutation 1236T, mais ce dernier résultat n'a pas été confirmé dans d'autres études.

A ce jour, aucune relation n'a été retrouvée entre la pharmacocinétique du tacrolimus et le SNP -129T>C du promoteur du gène *ABCB1*.

Plusieurs SNPs du gène *ABCB1* sont en déséquilibre de liaison (association fréquente entre plusieurs allèles correspondant à des locus distincts d'un même chromosome). L'analyse des haplotypes prend en compte la combinaison de plusieurs de ces SNPs, ce qui permet d'étudier des sous-groupes déterminés par plusieurs SNPs associés. Trois études ont montré une relation entre les haplotypes de *ABCB1* et les C0/dose de tacrolimus : deux d'entre elles ont rapporté que les patients avec l'haplotype sauvage (C-G-C) des exons 12, 21 et 26 nécessitaient des doses plus élevées de tacrolimus et avaient des C0/dose inférieurs par rapport aux patients porteurs de l'haplotype muté (T-T/A-T) (Fredericks, et al., 2006 ; Anglicheau, et al., 2003). Cependant, dans l'étude de Fredericks et al., la différence n'était plus significative lorsque les patients étaient secondairement classés en fonction de leur statut exprimeur ou non-exprimeur pour le CYP3A5.

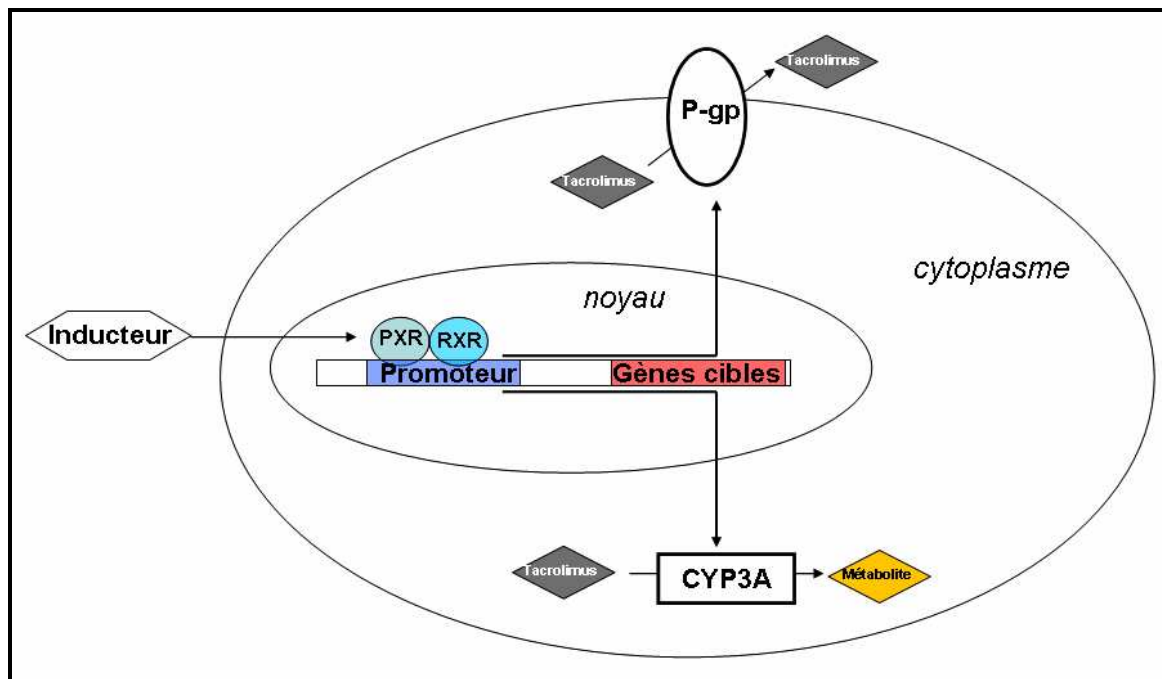
Plusieurs autres études n'ont pas retrouvé d'influence des haplotypes de MDR1 (exons 12, 21, et 26) sur la pharmacocinétique du tacrolimus (Haufroid, et al., 2004 ; Haufroid, et al., 2006 ; Mai, et al., 2004 ; Mourad, et al., 2005).

#### **II.3.3.1.4 Polymorphismes du PXR**

Le pregnane X receptor (hPXR, *NR1I2*) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires (Bertilsson, et al., 1998). Ce facteur de transcription ligand-dépendant joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la détoxification et/ou la pharmacocinétique des xénobiotiques (CYP3A, P-gp notamment) (Dussault, et al., 2001 ; Kast, et al., 2002) et certains transporteurs de la famille des « solute carrier » (SLC) (Staudinger, et al., 2001). Le PXR active la transcription de ces gènes en réponse à plusieurs substances endogènes ou xénobiotiques (glucocorticoïdes, antibiotiques



macrolides...) (Bertilsson, et al., 1998 ; Moore et al., 2000 ; Pascussi, et al., 2001). L'activation de *CYP3A4* et de la *ABCB1* conduit à une clairance plus importante des substrats co-administrés avec ces inducteurs (Figure 4) (Borcherding, et al., 1992 ; Greiner, et al., 1999 ; Westphal, et al., 2000). C'est le cas de la rifampicine administrée chez des patients transplantés rénaux atteints de tuberculose : l'induction enzymatique des CYP3A conduit à la diminution des concentrations sanguines du tacrolimus, nécessitant une augmentation des doses de tacrolimus de 50% (Lopez-Montes, et al., 2004).



**Figure 4. Régulation transcriptionnelle par le PXR des protéines impliquées dans la pharmacocinétique du tacrolimus.**

Les polymorphismes des CYP3A et de la P-gp ont de faibles fréquences (chez les caucasiens : environ 10% pour le 6986A>G du *CYP3A5* ; de 3,6 à 9,6% pour le -392A>G du *CYP3A4* ; environ 50% pour le 3435C>T d'*ABCB1*). Ces polymorphismes à eux seuls ne peuvent pas expliquer entièrement la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du tacrolimus. Cependant, une variabilité de l'expression de ces protéines existe entre les individus. Plusieurs équipes ont mis en évidence la grande variabilité dans l'induction hépatique et intestinale de l'expression du CYP3A4 et de la P-gp (Lown, et al., 1997 ; Watkins, et al., 1989). Cette variabilité d'induction pourrait être due au polymorphisme génétique du PXR (Lown, et al., 1997).

Les différents variants du *PXR* ainsi que leurs effets et leurs conséquences fonctionnelles sont résumés dans le tableau 1 (page 35).

En séquençant le gène *NR1I2* Zhang et al. ont identifié 38 SNPs, dont six sont situés dans la région codante. Lamba et al., ont pu identifier 89 SNPs au niveau du promoteur et de l'intron 1 de *NR1I2*. Les études fonctionnelles ont montré que plusieurs SNPs de *NR1I2* étaient associés à une altération de la régulation de ces gènes (*CYP3A*, *ABCB1*). Zhang et al. ont montré au moyen du test respiratoire à l'érythromycine utilisé après induction par la rifampicine, une augmentation du métabolisme de l'érythromycine chez les patients mutés -25385C>T. Les auteurs ont également montré : que les SNPs 7635A>G et 8055C>T étaient associés à une expression intestinale plus importante du CYP3A4 après induction par la rifampicine et que les SNPs -25564G>A et 24756G>A altéraient la séquence du site de liaison des facteurs de transcription potentiels au niveau du promoteur du *PXR*. Les SNPs 11156A>C et 11193T>C sont associés à une baisse significative de l'expression de la P-gp au niveau de l'intestin (Zhang, et al., 2001). Le SNP 106G>A qui conduit à une substitution d'acide aminé (G36R), a été associé à une activité transcriptionnelle plus importante après induction à la corticostérone (Hustert, et al., 2001). Plusieurs autres SNPs de *PXR* (-25913T>C, -6994C>T, -14042C>A, -601A>G et -4356T>C) étaient aussi associés à des variations phénotypiques du CYP3A4. Les patients porteurs du SNP -25385C>T avaient des concentrations d'ARNm de *PXR* moins importants que les patients porteurs de l'allèle sauvage. Les patients porteurs des variants alléliques mutés du *PXR* avaient une expression altérée des cibles hépatiques du *PXR* comparés à ceux porteurs des allèles sauvages (Lamba, et al., 2008). A ce jour, deux études seulement se sont intéressées à l'influence du polymorphisme du *PXR* sur la pharmacocinétique du tacrolimus : deux SNPs de la région 3'UTR et un SNP de l'intron 1 ont été étudiés (11156A>C, 11193T>C et 7635A>G, respectivement) mais aucun effet significatif n'a été observé (Elens, et al., 2007 ; Miura, et al., 2008).

**Tableau 1. Les différents variants alléliques du *PXR* et leurs effets**

Position nucléotidique <sup>(a)</sup>	Numéro rs (HAPMAP)	Région	Effet	Conséquences fonctionnelles	Fréquences alléliques <sup>(b)</sup>	Références
-25913T>C	rs1523130	Promoteur	Perte des sites STAT1, 3,6, et NFAT chez les porteurs de l'allèle T	Métabolisme de la 6β- testostérone (hydroxylation dans l'hépatocyte) après induction avec la rifampicine: l'activité du CYP3A4 est plus importante chez les femmes TT que chez les CC ; concentrations hépatiques de l'ARNm du CYP3A4 plus importants chez les patients CC (dans un sous-groupe de patients hétérozygotes pour le SNP -6994CT de <i>NR1I2</i> )	0,27	(Lamba, et al., 2008)
-25564G>A		Promoteur	SNP présent dans les sites HSTF et COMP1		0,01	(Zhang, et al., 2001)
-25385C>T	rs3814055	Promoteur	SNP présent dans les sites NF-kB, et ISGF-3	Induction métabolique par la rifampicine plus importante chez les TT que chez les CC ; Concentrations hépatiques d'ARNm du <i>PXR</i> plus faibles chez les patients mutés de sexe masculin	0,39	(Zhang, et al., 2001) (Lamba, et al., 2008)
-24756G>A	rs1523128	Promoteur	SNP présent dans les sites C/EBP et HNF1		0,01	(Zhang, et al., 2001)
-14042C>A		Intron 1b	SNP présent dans le site DR3	Concentrations d'ARNm hépatiques du CYP3A4 plus faibles chez les AC que chez les CC (dans un sous-groupe de patients hétérozygotes du SNP -25913TC de <i>NR1I2</i> )	0,29	(Lamba, et al., 2008)
-6994C>T	rs2472677	Intron 1b	SNP présent dans le site HNF3β	Métabolisme de la 6β- testostérone (hydroxylation dans l'hépatocyte) après induction avec la rifampicine: l'activité du CYP3A4 est plus faible chez les CC que chez les patients CT, et TT ; concentrations hépatiques d'ARNm du <i>PXR</i> plus importants chez les patients CT et TT que chez les CC (dans	0,38	(Lamba, et al., 2008)

				un sous-groupe de patients hétérozygotes du SNP -25913TC de <i>NR1I2</i> )		
-601A>G	rs67855049	Intron 1b	Perte du site HNF4 chez les porteurs de l'allèle G	Expression hépatique plus faible du CYP3A4 et du <i>PXR</i> chez les patients AG et GG. Concentrations d'ARNm d' <i>ABCB1</i> hépatique plus faible chez les patients mutés	0,36	(Lamba, et al., 2008)
106G>A		Exon 2	Inversion d'acide aminé G36R dans le DBD (DNA binding domain)	Activité transcriptionnelle plus importante après induction par la corticostérone.	0,03	(Hustert, et al., 2001)
7635A>G	rs67855049	Intron 5		Concentrations d'ARNm du <i>CYP3A4</i> intestinal plus important après induction par la rifampicine chez les patients GG que chez les patients AA.	0,35	(Zhang, et al., 2001)
8055C>T	rs2276707	Intron 6		Concentrations d'ARNm du <i>CYP3A4</i> intestinal plus important après induction de la rifampicine chez les patients mutés TT et TC que chez les patients CC.	0,15	(Zhang, et al., 2001)
11156A>C	rs3814057	3'-UTR		Concentrations d'ARNm d' <i>ABCB1</i> intestinal plus important chez les patients AA que chez les patients AC	0,16	(Zhang, et al., 2001)
11193T>C		3'-UTR		Concentrations d'ARNm de d' <i>ABCB1</i> intestinal plus important chez les patients TT que chez les patients TC	0,16	(Zhang, et al., 2001)

### II.3.3.1.5 Polymorphisme des OATP

L'Organic Anion Transporting Polypeptide-C (OATP-C) (codé par le gène *SLCO1B1*) est un transporteur présent dans l'hépatocyte. Il facilite le transport de plusieurs composés de la veine porte vers l'intérieur de l'hépatocyte ainsi que l'excrétion biliaire de certains xénobiotiques tel que la pravastatine (Hagenbuch et al., 2003). Le tacrolimus a été identifié comme inhibiteur de ce transporteur (Fehrenbach, et al., 2003). Trois SNPs (-11187G>A, 388A>G et le 521T>C) ont été identifiés comme étant associés à la variabilité interindividuelle de la distribution de la pravastatine (Niemi, et al., 2004). Le polymorphisme génétique de ce transporteur pourrait contribuer à expliquer une partie de la variabilité pharmacocinétique du tacrolimus. Elens et al. ont étudié l'effet de ces trois SNPs sur la pharmacocinétique du tacrolimus. Les concentrations sanguines résiduelles du tacrolimus après la première dose étaient significativement dépendantes des SNPs hétérozygotes 388A>G et 521T>C. Les concentrations sanguines étaient plus élevées chez les patients 521TC, alors que l'inverse était observé pour les patients 388AG. Par ailleurs, aucun effet sur la pharmacocinétique du tacrolimus n'a été observé pour le SNP -11187G>A (Elens, et al., 2007). D'autres membres de la famille OATP, exprimés au niveau hépatique (*SLCO1B3*) ou intestinal (*SLCO1A2*) pourraient participer à la pharmacocinétique du tacrolimus et mériteraient d'être étudiés sur le plan pharmacogénétique.

En résumé, plusieurs études sur l'impact des différents polymorphismes sur la pharmacocinétique du tacrolimus ont rapporté des résultats divergents. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ces discordances : (i) ces études sont réalisées sur des populations différentes ethniquement et génétiquement, avec l'influence d'un environnement différent pour chacune de ces populations ; (ii) ces études sont réalisées pour des greffes d'organes différentes, à différentes périodes post-transplantation, chez des patients utilisant des co-médications différentes ; (iii) différents critères de jugement sont utilisées pour étudier l'impact du polymorphisme génétique sur la pharmacocinétique (C<sub>0</sub> versus AUC, standardisés par la dose et par le poids du patient ou non), mais aussi différentes méthodes de dosage (HPLC-MS, dosage immunologique).

## **II.3.3.2 Etude des sources de variabilité pharmacocinétique du tacrolimus par approche de population (PKpop)**

### **II.3.3.2.1 Analyses PKpop du tacrolimus chez des patients transplantés rénaux**

Peu d'études PKpop du tacrolimus chez des patients transplantés rénaux ont été rapportées dans la littérature. La plupart de ces études ont été réalisées à partir des seules concentrations résiduelles du tacrolimus ce qui ne permet que l'estimation des paramètres pharmacocinétiques de la phase d'élimination, les paramètres de la phase d'absorption étant généralement fixés. Aucune de ces études n'a analysé l'influence des polymorphismes génétiques sur la pharmacocinétique du tacrolimus. Staatz et al., ont développé un modèle dans le logiciel NONMEM<sup>®</sup>. Ils disposaient de concentrations résiduelles de tacrolimus recueillies de 2 jours à 1475 jours (4 ans) post-greffe, chez 70 patients transplantés rénaux adultes. Le modèle pharmacocinétique structural retenu comprenait un compartiment avec une absorption et une élimination d'ordre 1. Cette étude a montré que la clairance apparente était 30% plus élevée chez les patients ayant des valeurs d'hématocrite anormalement faibles (la clairance apparente était de 32 L.h<sup>-1</sup> si l'hématocrite était inférieure à 33% et 24,2 L.h<sup>-1</sup> si elle était supérieure à cette valeur). De plus, les auteurs ont observé une diminution significative de la clairance apparente avec l'augmentation des concentrations d'ASAT (Alanine Amino Transférase, supérieure à 200 UI/L) et du nombre de jours post-greffe (la clairance apparente était de 32 L.h<sup>-1</sup> à 7 jours après greffe chez les patients avec des concentrations d'ASAT normaux, et de 24,2 L.h<sup>-1</sup> chez ceux ayant des concentrations d'ASAT élevés). Par conséquent, les patients ayant des concentrations d'ASAT élevés (fonction hépatique probablement diminuée) recevaient des doses de tacrolimus moins importantes par rapport aux patients ayant des concentrations d'ASAT normaux (environ 17% de moins), afin de maintenir les concentrations sanguines résiduelles dans la cible thérapeutique prédéfinie (10 ng/mL) (Staatz, et al., 2002).

Antignac et al., ont développé dans le logiciel NONMEM<sup>®</sup> un modèle PKpop à partir des concentrations résiduelles mesurées durant les deux premiers mois après greffe chez 89 patients adultes transplantés rénaux. Le modèle pharmacocinétique structural utilisé comprenait aussi un compartiment avec une absorption et une élimination d'ordre 1. Deux covariables ont été retenues : le délai post greffe, et les doses de corticoïdes co-administrés avec le tacrolimus. Ces auteurs ont observé une augmentation linéaire de la clairance

apparente avec le nombre de jours post greffe, jusqu'à atteindre un plateau d'équilibre (environ 8 jours après greffe). Les valeurs maximales de la clairance apparente étaient supérieures d'environ 50% aux valeurs observées 4 jours après greffe. D'autre part, des doses élevées de corticoïdes (i.e. dose de prédnisone >25mg) augmentaient fortement la clairance du tacrolimus (d'environ 80%) (Antignac, et al., 2007). Cette augmentation est le résultat de l'induction par les corticoïdes des enzymes impliquées dans la clairance du tacrolimus (Pascussi, et al., 2001).

#### **II.3.3.2.2 Analyses PKpop chez des patients transplantés hépatiques**

Plusieurs analyses PKpop ont été menées chez des patients transplantés hépatiques adultes et pédiatriques (Antignac, et al., 2005 ; Fukatsu, et al., 2001 ; Garcia Sanchez, et al., 2001 ; Sam, et al., 2000 ; Staatz, et al., 2001 ; Zahir, et al., 2005). Ces études étaient basées sur les concentrations résiduelles de tacrolimus et utilisaient à nouveau un modèle pharmacocinétique mono-compartimental avec une absorption et une élimination d'ordre 1. L'une des covariables majeures identifiées pour le tacrolimus chez les patients transplantés hépatiques était le délai post-greffe (Antignac, et al., 2005 ; Fukatsu, et al., 2001 ; Fukudo, et al., 2006). Les valeurs de la clairance apparente du tacrolimus augmentaient graduellement de 1,8% par jour après greffe pendant le premier mois post-greffe (Fukatsu, et al., 2001), ce qui correspond en moyenne au délai de la reprise de la fonction hépatique (Kawasaki, et al., 1992). Plusieurs études ont montré la nécessité d'augmenter les doses de tacrolimus pour maintenir des concentrations sanguines stables en fonction du délai post greffe (Hu, et al., 2000 ; Pou, et al., 1998). L'augmentation des concentrations sanguines d'albumine suite à la reprise de fonction du greffon hépatique est l'explication la plus probable de ce phénomène. En effet, cette protéine, synthétisée par le foie, fixe fortement le tacrolimus (Undre et al., 1998).

L'influence de divers polymorphismes génétiques sur la pharmacocinétique du tacrolimus a été étudiée par approche PKpop chez des patients transplantés hépatiques (Fukudo, et al., 2006 ; Li, et al., 2007). Li et al., ont étudié l'effet du polymorphisme de *ABCB1* (exon 21 et exon 26), de l'*IL10* (SNP -1082G>A) (polymorphisme génétique du receveur) et du *CYP3A5\*1* (polymorphisme génétique du receveur et du greffon) chez 73 patients transplantés hépatiques durant les six premiers mois après la greffe. La clairance apparente du tacrolimus a été estimée pour chaque groupe génotypique. Cette dernière était en moyenne plus élevée de 50% chez les patients expresseurs du *CYP3A5* (c.à.d. les patients porteurs du

variant allélique *CYP3A5\*1* ou ayant reçu un greffon hépatique porteur de ce variant allélique) (clairance apparente moyenne : 22 L.h<sup>-1</sup> versus 14 L.h<sup>-1</sup>). Il est à noter que les patients non expresseurs ayant reçu un greffon hépatique expresseur du *CYP3A5* ont les mêmes caractéristiques métaboliques que les patients expresseurs (Cf. chapitre II.3.3.1.2). Cette covariable génétique expliquerait environ 25% de la variabilité interindividuelle de la clairance apparente (cette variabilité était estimée à 30% après l'inclusion de la covariable génétique alors qu'elle était de 40% sans l'utilisation de cette dernière). En revanche, aucun effet n'a été observé pour les SNPs T2677C>(T,A) et C3435T d'*ABCB1*, et le SNP G1082A de l'*IL10* (Li, et al., 2007). Fukudo et al., ont confirmé l'influence du *CYP3A5\*1* porté par le greffon ou par les receveurs sur la clairance apparente du tacrolimus. Cette étude a été menée chez 65 patients transplantés hépatiques, durant les 50 premiers jours après greffe. La clairance apparente du tacrolimus était deux fois plus élevée chez les patients expresseurs du *CYP3A5* (IC95% 1,19-2,81 fois). Ils ont aussi étudié l'effet des concentrations de l'ARNm de MDR1 et du *CYP3A4* au niveau intestinal et au niveau du greffon hépatique sur la clairance apparente du tacrolimus. La prise en compte du polymorphisme génétique du *CYP3A5* et des concentrations d'ARNm de MDR1 comme covariables permettait d'expliquer 17% de la variabilité interindividuelle de la clairance apparente en l'abaissant de 58% à 48% (IC95% 37%-58%). Dans cette étude, aucune influence des concentrations l'ARNm du *CYP3A4* intestinal sur la clairance apparente du tacrolimus n'a été retrouvée (Fukudo, et al., 2006).

### **II.3.4 Suivi thérapeutique pharmacologique du tacrolimus**

Le tacrolimus se caractérise par une fenêtre thérapeutique étroite et une grande variabilité pharmacocinétique inter et intraindividuelle au cours du temps (Venkataramanan, et al., 1995), ce qui justifie son suivi thérapeutique pharmacologique (STP).

Le STP du tacrolimus basé sur la concentration sanguine résiduelle (C<sub>0</sub>) est rendu obligatoire dans le résumé des caractéristiques du produit. En greffe rénale, les concentrations résiduelles cibles proposées sont de 10 à 15 ng/mL durant les six premières semaines, puis de 5 à 10 ng/mL (Wallemacq, 2007). Cependant, plusieurs études ont montré les limites de cette stratégie en terme d'efficacité du traitement (Tada, et al., 2003 ; Wong, et al., 2000). L'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC) entre deux administrations est un meilleur reflet de l'exposition réelle du patient au médicament. Cet



indice d'exposition ne peut être utilisé pour un suivi régulier qu'en faisant appel à des stratégies de prélèvements limités pour l'estimation de l'AUC du tacrolimus, pour permettre l'adaptation de sa posologie. Cet objectif peut être atteint par le développement d'estimateurs Bayésiens. Peu d'études ont rapporté le développement de ces derniers pour le tacrolimus.

Saint-Marcoux et al. ont développé un estimateur Bayésien par approche Bayésienne itérative en deux étapes (IT2B) à partir de paramètres moyens obtenus chez 22 patients adultes transplantés pulmonaires (dont 11 étaient atteints de mucoviscidose) en période stable (de 3 mois à 116 mois après la greffe). Des profils pharmacocinétiques complets (0 - 12h) comprenant 12 mesures de concentrations sanguines de tacrolimus, avaient été analysés pour déterminer les paramètres moyens. Un modèle structural mono-compartmental avec deux entrées dans le compartiment central et une élimination d'ordre 1 avaient été retenus. La vitesse d'absorption de chaque fraction était décrite par une fonction de densité de probabilité d'une loi gamma. L'estimation Bayésienne des  $AUC_{0-12h}$  inter-dose était réalisée en prenant en compte ces paramètres moyens, la dose administrée le matin et trois prélèvements sanguins collectés à 0, 1h et 3h après l'administration du tacrolimus chez des patients non atteints de mucoviscidose. Cet estimateur était caractérisé par un biais moyen entre les  $AUC_{0-12h}$  réelles et estimées de -3,6% (étendue de -17,4 à 6,8%). Chez les patients atteints de mucoviscidose, les prélèvements réalisés à 0, 1,5h et 4h permettaient une meilleure estimation des  $AUC_{0-12h}$ , avec un biais moyen entre les  $AUC_{0-12h}$  réelles et estimées de -1,1% (de -18,6 à 6,8%) (Saint-Marcoux, et al., 2005). Ces estimateurs sont actuellement utilisés en pratique clinique au travers du site Web nommé ABIS : Adaptation Bayésienne des Immunosuppresseurs, hébergé sur le site internet du CHU de Limoges <https://pharmaco.chu-limoges.fr/abis.htm> (Saint-Marcoux, et al., 2007).

Scholten et al. ont mis au point un estimateur Bayésien pour l'adaptation de posologie du tacrolimus chez les patients transplantés rénaux. Cet estimateur a été développé à partir des profils pharmacocinétiques complets (de 0 à 12h) obtenus entre la deuxième et la sixième semaine après la greffe chez 17 patients adultes transplantés rénaux et un modèle PK<sub>pop</sub> (comportant deux compartiments, avec absorption d'ordre 1 et un temps de latence). Ce modèle a été validé chez 26 autres patients. L'estimateur Bayésien développé permettait l'estimation des  $AUC_{0-12h}$  à partir de 2 prélèvements : C<sub>0</sub> et un autre prélèvement entre 2h et 4h après la prise du tacrolimus ( $R^2=0,94$ , biais moyen=1,4%, et une précision de 7,6%). Cet estimateur a été utilisé avec succès pour le STP de 15 patients transplantés rénaux au cours

d'une étude prospective. À un an après greffe un seul patient a développé un rejet aigu, et aucun d'entre eux n'a montré de signe de toxicité (Scholten, et al., 2005).

## **II.4 Recherche de biomarqueurs par approche protéomique**

### **II.4.1 Généralités**

Les nouvelles sciences « omiques » (génomiques, protéomiques, métabolomiques...) visent d'une part, à identifier en globalité les différents constituants de l'être vivant et d'autre part, à mesurer et à comprendre leurs variations sous l'influence de modifications physiopathologiques ou environnementales.

Les puces à ADN ont rapidement permis d'étudier les variations du transcriptome ou les variations d'expression génique qui peuvent survenir au cours d'une pathologie. Cependant, de nombreux processus physiopathologiques ne se traduisent pas par la perturbation de la transcription et/ou de la traduction. Pour ces raisons, la protéomique qui consiste à étudier la composition et l'abondance des protéines, peut être considérée comme un moyen plus direct pour observer les variations phénotypiques. La protéomique peut être définie comme l'étude de la composition en protéines d'un organisme, permettant d'établir « un catalogue des protéines » et la détermination de leurs fonctions biologiques. Dans les années 70-80, l'étude des protéines était limitée aux protéines majoritaires connues, en raison des techniques d'analyses disponibles à cette époque (c.à.d. techniques immunologiques, techniques biochimiques de purification, techniques de séquençage par dégradation d'Edmann), qui ne permettaient pas une étude systématique de toutes les protéines.

Actuellement, le séquençage du génome humain et le développement des moyens bioinformatiques et technologiques permettant l'étude des mélanges protéiques complexes offrent de nouvelles perspectives de recherche.

Les protéines sur- ou sous- exprimées, les protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles ou dégradées de manière spécifique, sont considérées comme de potentiels « biomarqueurs » reflétant l'état physiopathologique de la cellule ou d'un organisme.

Le biomarqueur désigne dans sa définition générale tout indicateur biochimique (protéine, peptide, métabolite...) présent dans un organisme vivant durant un état physiopathologique donné et spécifique de cet état. Cet indicateur est utilisé à des fins de diagnostic et/ou de pronostic pour certaines pathologies. Actuellement, la médecine moderne

utilise les constantes biologiques (concentrations de glucose, pH sanguin...) comme biomarqueurs. Ces éléments abondants (et constants) permettent la détection et le suivi des désordres physiopathologiques « simples » de façon non spécifique. Pour des maladies plus complexes ou pour lesquelles les mécanismes physiopathologiques sont méconnus (tels que les cancers, le diabète ou le rejet de greffe en transplantation...), il est nécessaire de découvrir de « nouveaux biomarqueurs ». Ces outils de diagnostic et de suivi de thérapeutiques médicales, devraient permettre d'augmenter les chances de guérison et de survie des malades à moindre coût. Ces vingt dernières années, on a constaté l'émergence de plusieurs molécules considérées comme biomarqueurs, cependant, rares sont celles utilisées en clinique à grande échelle. Ces biomarqueurs ne sont toujours pas considérés comme un moyen fiable de diagnostic et de suivi car ils sont peu spécifiques et peu sensibles. C'est notamment le cas du « Prostate Specific Antigen » (PSA) : un tiers des patients atteints de cancer de la prostate peuvent avoir un résultat négatif avec ce test, si bien que la biopsie de la prostate reste toujours incontournable pour un diagnostic de certitude (Pfister and Basuyau, 2005;Albertsen, 2005). D'autres marqueurs sont actuellement utilisés en clinique, le CA-125, marqueur de cancers ovariens, et le CA15.3, marqueur de cancers du sein, mais leur dosage ne peut être utilisé que pour le suivi de l'efficacité des traitements anticancéreux et non comme un moyen de diagnostic (Jotti and Bombardieri, 1990 ; Sevinc, et al., 2003). Ces rares exemples montrent la nécessité de poursuivre les recherches, afin d'identifier des marqueurs plus sensibles et plus spécifiques.

## **II.4.2 Recherche de biomarqueurs : « concepts et définitions »**

Classiquement, un projet de recherche de biomarqueurs est constitué de trois étapes : la découverte, la validation et en dernier la confirmation (Figure 5, page 45).

- **La découverte** : elle se fait sur un nombre restreint de patients (10 à 50 patients) sous réserve d'avoir une classification des plus rigoureuses des groupes. En effet, le problème clinique, à savoir « existe-t-il des différences physiopathologiques décelables dans les fluides biologiques entre un groupe de patients atteints de la maladie et un groupe de patients non atteints » doit être posé clairement avant de commencer un projet de recherche de biomarqueurs. Les échantillons sains et les échantillons pathologiques doivent être bien

définis à l'avance et les échantillons provenant de patients dont le diagnostic n'est pas confirmé, ou présentant des particularités physiopathologiques doivent être exclus à ce stade du projet. La comparaison de l'abondance des analytes présents ou absents dans les groupes définis aboutira à la sélection du plus grand nombre possible d'analytes discriminatoires de ces différents groupes (30 - 50 analytes).

- **La validation** : elle se fait sur un nombre plus important de patients (100 à 1000 patients) et ne concerne que la quantification des marqueurs sélectionnés pendant l'étape de découverte. Leur présence dans un groupe de patients détermine « la spécificité » et leur abondance détermine « la sensibilité ». Au cours de cette étape, seuls les analytes ayant une très grande spécificité et une grande sensibilité sont retenus pour l'étape de confirmation (2 – 5 analytes). Le pouvoir discriminant d'un biomarqueur est alors défini par l'établissement de courbe « ROC » (Receiver Operating Characteristic, qui peut se traduire par courbe des caractéristiques d'efficacité). Cette courbe permet d'étudier la spécificité et la sensibilité des biomarqueurs à différents seuils de discrimination. Le seuil de discrimination dépend de la prévalence de la maladie dans la population générale. Le pourcentage de spécificité du marqueur doit être suffisamment grand (>95%) pour ne pas sélectionner un nombre important de faux positifs.

- **La confirmation** : elle se fait par la recherche des marqueurs sélectionnés au cours de l'étape précédente chez un grand nombre de patients (1000 à 1000000 patients). Contrairement aux deux phases précédentes, les méthodes analytiques utilisées doivent être faciles à réaliser, reproductibles et peu onéreuses pour qu'elles puissent être utilisées dans le plus grand nombre de centres d'investigation clinique, comme par exemple les techniques immunologiques, ou immuno-enzymatiques (utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les analytes sélectionnés).

La découverte et la validation de biomarqueurs ne sont pas des tâches aisées et impliquent certaines contraintes :

- **Contrainte humaine** : une des principales exigences pour mener à bien un tel projet est la mobilisation d'une équipe pluridisciplinaire (cliniciens spécialisés, biochimistes, informaticiens, statisticiens...) qui doit être parfaitement coordonnée.

- **Contrainte biologique** : elle est liée principalement au nombre, à la qualité et à la facilité d'obtention des échantillons biologiques. En effet, ces études nécessitent un nombre important d'échantillons qui doivent provenir de patients dont le diagnostic est précis et confirmé. De plus, la collecte et la conservation doivent être réalisées dans des conditions optimales afin de préserver la qualité des échantillons. Enfin, les échantillons les plus représentatifs de la maladie (biopsie d'organe, tissus cancéreux) ne sont pas toujours faciles à obtenir. Pour ces raisons, il faut opter pour des échantillons faciles à collecter, à conserver et à analyser (par exemple. sang, urine, salive...).
- **Contrainte matérielle ou technologique** : elle impose un choix stratégique de la technique analytique. Le coût des appareils et des réactifs, le temps de l'analyse, ainsi que la sensibilité et la fiabilité de chaque technique sont à prendre en considération.

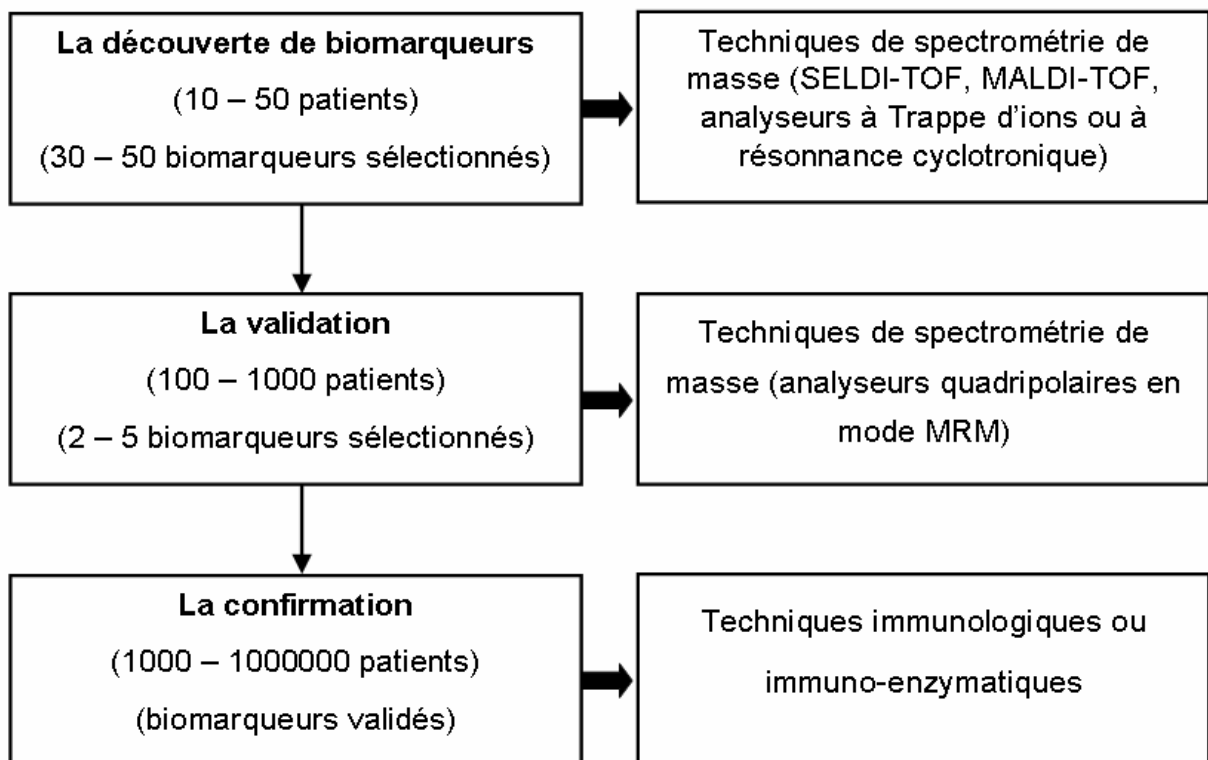


Figure 5. Procédure de découverte des biomarqueurs

## **II.4.3 Sources de variabilité en recherche de biomarqueurs**

La recherche de biomarqueurs consiste à étudier la variabilité pathologique significative de la composition des échantillons biologiques entre les patients. En s'additionnant à la variabilité pathologique, la variabilité physiologique inter- et intra-individuelle et la variabilité technique et analytique (reproductibilité des techniques analytiques) constituent des sources de variabilité « parasites » et représentent des facteurs d'erreur et de confusion qui rendent difficile l'interprétation des résultats.

### **II.4.3.1 Variabilité physiologique normale (non informative)**

Ce sont les variations normales de composition et d'abondance des protéomes entre les individus ou chez un même individu au cours du temps. Il est pratiquement impossible d'éliminer cette variabilité et de ce fait, il est indispensable de la prendre en compte au cours des analyses statistiques. Cette variabilité est due à la constitution génétique de chaque individu, de son environnement, de son âge, de son sexe...

Chez l'homme, cette variabilité ne peut être contrôlée, contrairement à l'utilisation de modèles animaux, mais elle peut être réduite par l'inclusion d'individus homogènes dans les groupes étudiés (âge, sexe, environnement...). De plus, le diagnostic doit être clair et bien établi, et dans un groupe ne doivent être inclus que les patients qui ne présentent pas d'autres pathologies associées. Ces différents facteurs doivent donc être considérés lors de l'établissement d'un plan d'expérience et ils prennent toute leur importance au cours de la première phase de découverte pour éviter de sélectionner des marqueurs spécifiques à des pathologies concomitantes.

### **II.4.3.2 Variabilité physiopathologique (informative) :**

C'est la variabilité d'abondance d'un ou de plusieurs analytes qui différencie les groupes d'individus sains et malades : dans l'idéal elle est plus importante que la variabilité biologique normale. Les éléments responsables de cette variabilité sont considérés comme biomarqueurs. L'origine des biomarqueurs est probablement liée aux changements biologiques qui surviennent au cours d'une pathologie donnée (modification du métabolisme, dérégulation des facteurs de transcription sensibles à l'environnement...). Ces changements se traduisent par des modifications qualitatives et/ou quantitatives du protéome. En général, il est plus facile d'observer les analytes modifiés que le mécanisme à l'origine de ces

modifications. Par exemple, une modification minimale des concentrations d'insuline sanguine est responsable de modifications métaboliques importantes qui peuvent être détectées facilement par le simple dosage de la glycémie, et non pas par le dosage de l'insuline ; le même principe est retenu pour la découverte de biomarqueurs. Seuls les éléments faciles à détecter sont étudiés.

Deux types de biomarqueurs peuvent donc être distingués : (i) les biomarqueurs de conséquence, qui sont liés au mauvais fonctionnement d'un organe (par exemple, l'altération du glomérule rénal entraîne le passage de plusieurs protéines sériques dans les urines), ils sont peu spécifiques et (ii) les biomarqueurs liés directement à la cause de la pathologie (l'altération du rein par un xénobiotique néphrotoxique peut par exemple provoquer la libération d'un composé spécifique).

### **II.4.3.3 La variabilité technique**

C'est la variabilité entre les différentes analyses réalisées sur un même échantillon (préparation, séparation chromatographique...). Cette variabilité doit être estimée et réduite au minimum. Des contrôles de qualité sont indispensables pour s'assurer de la fiabilité des résultats. Cette variabilité doit être inférieure à la variabilité biologique afin d'être en mesure de détecter la variabilité physiopathologique, et de ce fait, d'identifier les biomarqueurs potentiels.

## **II.4.4 Techniques utilisées pour l'étude des mélanges protéiques complexes**

Les fluides biologiques se caractérisent par une très grande complexité. En effet, ils contiennent des milliers de protéines (Anderson et al., 2002) qui peuvent porter différentes modifications post-traductionnelles mais aussi subir des dégradations protéolytiques en raison de la présence de nombreuses protéases dans les milieux biologiques. De plus, le protéome des fluides biologiques se caractérise par une très large gamme dynamique en masse de 1 à 1000 kDa ainsi que des différences de concentrations qui peuvent varier de la femtomole ( $10^{-15}$  mole) à la millimole ( $10^{-3}$  mole). En raison de cette complexité, l'analyse d'un protéome complet n'est pas possible et une simplification doit être envisagée. L'étude du protéome comprend deux étapes : le fractionnement des protéines ou des peptides et par la



suite leur analyse qualitative et quantitative. Le fractionnement des protéines ou des peptides se fait en général selon leurs propriétés physico-chimiques et a pour but la réduction relative de la complexité du mélange. Les techniques les plus utilisées pour le fractionnement du protéome sont : l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE), la chromatographie liquide haute performance (HPLC), et l'électrophorèse capillaire (CE). De plus, plusieurs techniques de séparation peuvent être combinées afin d'obtenir une meilleure séparation. Pour pouvoir étudier le contenu protéique de certains types d'échantillons (par exemple. sérum ou plasma), une déplétion des protéines majoritaires les plus communes est nécessaire.

En ce qui concerne l'analyse, elle se fait principalement par spectrométrie de masse. En effet, l'utilisation des techniques d'ionisation couplées à des analyseurs de masse de plus en plus résolutifs, sensibles et rapides rend possible l'analyse de quantités très faibles (quelques femtomoles) de protéines/peptides (Aebersold et Mann, 2003). Les caractéristiques des différentes techniques analytiques sont résumées dans le tableau 2 (page 53).

## **II.4.4.1 Techniques de fractionnement**

### **II.4.4.1.1 Électrophorèse bidimensionnelle (2DE)**

L'une des techniques à la fois les plus anciennes et les plus utilisées est l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) (O'Farrell, 1975). L'échantillon déposé sur gel d'acrylamide est séparé suivant une première dimension en fonction du point isoélectrique des protéines « Iso-électrofocalisation » (IEF), puis suivant une deuxième dimension en fonction de leur masse moléculaire « électrophorèse en condition dénaturante » (SDS-PAGE) (Kenrick et al, 1970). Les spots protéiques sont révélés sur le gel par différentes techniques de coloration plus ou moins sensibles. Les spots qui varient significativement en intensité d'une population d'échantillons par rapport à une autre sont alors analysés par spectrométrie de masse après digestion trypsique « en-gel ». Cette technique a été largement utilisée, mais, elle présente de nombreuses limites : les protéines peu abondantes ne sont pas détectées, les protéines hydrophobes et très basiques sont très mal séparées et elle ne permet pas l'étude des protéines et des peptides ayant une taille inférieure à 10 kDa (Gygi, et al., 2000). De plus, le temps très long de réalisation et la difficulté de l'automatisation rendent l'utilisation de cette technique inadéquate pour la recherche de biomarqueurs sur un grand nombre d'échantillons.

#### **II.4.4.1.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

En protéomique, l'HPLC a pour objectif de concentrer et de séparer un mélange complexe de peptides. Plus le volume dans lequel est éluée la molécule est petit, plus la concentration de celle-ci est importante et meilleure est l'intensité du signal. En effet, la réponse de l'analyseur est en général dépendante de la concentration du produit analysé et non du débit utilisé. Actuellement, on utilise principalement des nano-HPLC en couplage direct ou indirect avec un spectromètre de masse pour pouvoir étudier les protéines/peptides les moins abondants. L'HPLC tend à remplacer l'approche en gel 2DE pour le fractionnement des mélanges protéiques complexes, car elle peut pallier certaines limitations de la 2DE : plusieurs colonnes chromatographiques peuvent être combinées en ligne pour obtenir une meilleure séparation des protéines en utilisant différentes propriétés physico-chimiques (la charge et l'hydrophobicité...). L'automatisation ainsi que le couplage direct avec des spectromètres de masse rendent possible l'étude d'un nombre important d'échantillons nécessaire pour la découverte et la validation de biomarqueurs, contrairement à la 2DE.

#### **II.4.4.1.3 L'électrophorèse capillaire (CE)**

L'électrophorèse capillaire sépare les analytes pendant leur migration en fonction de leur mobilité électrophorétique propre. Cette technique offre l'avantage d'une séparation rapide et reproductible des peptides, sans l'interférence d'un gradient qui pourrait changer les paramètres d'ionisation comme c'est le cas pour l'HPLC (Fliser, et al., 2005). Le couplage récent de cette technologie à la spectrométrie de masse a permis son utilisation pour de nombreuses recherches de biomarqueurs urinaires, avec des résultats très prometteurs (Decramer, et al., 2006 ; Theodorescu, et al., 2005 ; Wittke, et al., 2005).

### **II.4.4.2 Techniques d'analyse**

#### **II.4.4.2.1 ESI-MS (Electro Spray Ionisation-Mass Spectrometry)**

Le principe de cette technique consiste en la formation d'ions chargés (+/-) produits sous l'effet d'un champ électrique intense. Ce phénomène peut être décomposé en trois étapes distinctes : en premier, la production de gouttelettes chargées de l'analyte en solution par l'application d'une tension sur un capillaire métallique, suivie d'une fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de plus en plus petites par explosions coulombiennes jusqu'à atteindre

un rayon critique appelé rayon de Rayleigh. Enfin, l'émission d'ions désolvatés en phase gazeuse.

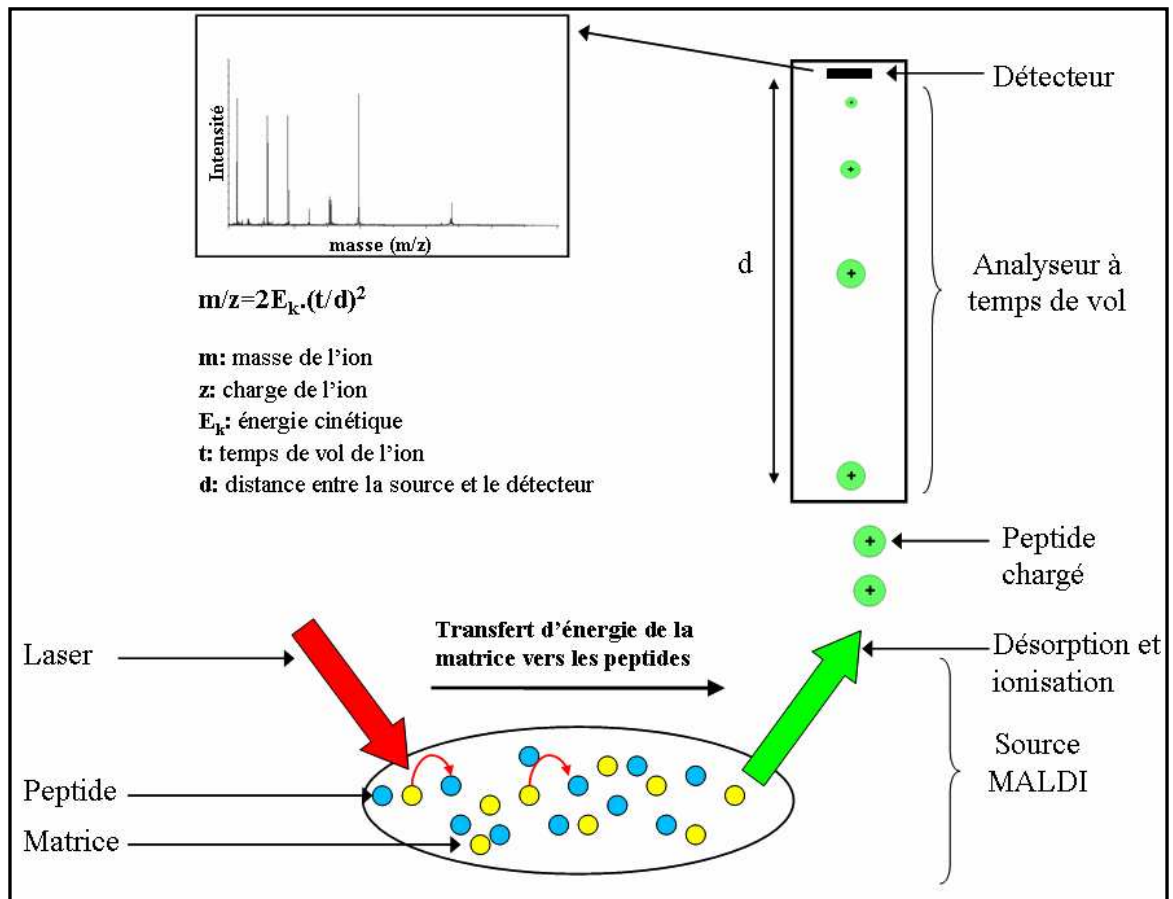
Le phénomène d'ionisation par électro-spray a été décrit par les travaux de Dole en 1968. Par la suite, dans les années 80, ce mode d'ionisation a été couplé à un analyseur de masse quadripolaire par le groupe de Fenn et Tannaka, ce qui leur vaudra le prix Nobel en 2002. Au cours de cette ionisation, les molécules non volatiles peuvent être ionisées et transmises en phase gazeuse sans fragmentation ni destruction. De ce fait, cette technique s'avère parfaitement compatible pour l'étude des molécules polaires et thermolabiles tels que les protéines et les peptides. Ce mode d'ionisation permet l'obtention d'ions multichargés  $(M+nH)^{n+}$  (où n est le nombre de charge et H la masse du proton), ce qui rend possible l'analyse des composés lourds et complexes avec une très bonne précision de mesure. Cette technique d'ionisation permet aussi de générer des ions en phase gazeuse à partir d'analytes qui se trouvent en solution à pression atmosphérique. Ce procédé a permis un couplage direct à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) (Whitehouse, et al., 1985). Cette source a été miniaturisée pour être utilisable en couplage direct avec des systèmes chromatographiques de type nano-débit (Wilm et Mann, 1996). Les sources nanospray sont particulièrement adaptées pour les études protéomiques, en raison de la sensibilité et de la précision en masse obtenues sur les spectromètres de masse qui en sont équipés.

La source ESI peut être couplée à plusieurs types d'analyseurs de masse tels que les analyseurs quadripolaires, à temps de vol (TOF), de type trappe d'ions (IT), à résonance cyclotronique (ICR).

#### **II.4.4.2.2 MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight)**

La technique MALDI consiste à irradier avec un laser UV un dépôt cristallin d'une matrice organique co-cristallisant avec l'analyte. L'excitation de la matrice par le laser génère des ions moléculaires (Karas et Hillenkamp, 1988). Cette source est couplée en général à des analyseurs de masse de type temps de vol (TOF) (Olthoff, et al., 1988). Le principe de base du TOF consiste à mesurer le temps que mettent les ions à parcourir la distance du tube de vol après avoir été accélérés par un champ électrique. Cet analyseur fonctionne comme un chronomètre très précis mesurant le temps de vol des différents ions ; plus la masse des ions est petite plus court sera leur temps de vol (Figure 6). Les MALDI-TOF ont été largement utilisés pour l'analyse des protéines et des peptides extraits des gels de la 2DE. Actuellement,

l'automatisation de la collecte des fractions de l'élution chromatographique autorise l'utilisation de cette technologie en couplage indirect (Off-Line), d'où l'émergence d'analyse de type LC-MALDI. De plus, les appareils de la nouvelle génération de type MALDI-TOF/TOF sont équipés d'une cellule de collision, qui permet la fragmentation des peptides et des protéines (analyse MS/MS) pour leur identification structurale.



**Figure 6.** Principe de fonctionnement du MALDI-TOF

#### II.4.4.2.3 SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization)

Le SELDI-TOF est une variante très proche du MALDI-TOF ; la divergence porte entre autres sur la surface sur laquelle les échantillons sont déposés avant d'être analysés. L'échantillon biologique est déposé sur une puce constituée d'une surface chromatographique active. Elle a pour but de simplifier les différents mélanges protéiques en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Carlson, et al., 2005). Après lavage et ajout de matrice, les protéines et les peptides fixés sont analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Cette technique a été largement utilisée dans des projets de recherche de biomarqueurs en raison de sa facilité d'utilisation (Clarke, et al., 2003 ; Vlahou, et al., 2001 ; Petricoin, et al., 2002). Cependant, cette technologie se caractérise par un manque de résolution et de précision dans la mesure des masses et de ce fait, ces projets n'ont pas abouti à l'identification de marqueurs spécifiques.

#### **II.4.4.2.4 Le microarray des protéines**

Cette technique n'utilise pas la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines. Elle est analogue aux « puces à ADN ». Sur un support solide, différents greffages peuvent être utilisés pour fixer les protéines, soit de façon non spécifique selon leurs propriétés physico-chimiques, soit de façon spécifique en utilisant des anticorps ou des aptamères (oligonucléotides). La détection ou l'identification des protéines et des peptides se fait alors par des interactions spécifiques (récepteur-ligand, protéine-protéine, protéine-ADN, enzyme-substrat, ou par des anticorps). Cette technique est utilisée principalement pour la détection de variations particulières comme l'état de phosphorylation des protéines et les cascades de signalisation (Espina, et al., 2003 ; Templin, et al., 2003).

**Tableau 2.** Avantages et inconvénients des différentes techniques analytiques utilisées en protéomique.

<b>Technique analytique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Technique de fractionnement ou séparation des analytes</b>		
2DE	Adaptée aux protéines ; bonne résolution ; récupération des protéines possible après séparation	Temps de réalisation long ; nécessite une grande quantité de protéine ; compétences techniques requises ; mauvaise séparation des protéines ayant des pI extrêmes ; n'est pas adaptée aux petites molécules (peptides) ; difficilement automatisable ; difficile à reproduire.
HPLC	Bonne résolution; possibilité de combiner plusieurs colonnes ; adaptée aux peptides et aux protéines ; plusieurs types de colonnes de séparation disponibles ; reproductible ; automatisable ; peut être couplée à plusieurs types de détecteurs.	Perte d'échantillon à l'injection (peut être évitée avec certains types d'injections) ; nécessite une grande quantité de protéine (sauf nano-HPLC) ; les séparations sont longues.
CE	Bonne résolution ; nécessite une petite quantité d'échantillon ; adaptée aux peptides et aux protéines; reproductible ; le gradient n'interfère pas avec l'ionisation des analytes (en analyse MS) ; automatisable ; peut être couplée en ligne avec des spectromètres de masse.	On ne peut pas récupérer l'échantillon après analyse.
Puce SELDI	Rapide ; reproductible ; plusieurs types de séparations disponibles; nécessite une petite quantité d'échantillon.	Adaptée pour une capacité limitée en protéines et peptides.
<b>Technique d'analyse</b>		
Coloration des gels	Sensible; plusieurs types de colorations existent; simple ; coût faible ; possibilité de récupérer les échantillons.	Quantification difficile ; mauvaise reproductibilité ; peu d'informations structurales et physico-chimiques.
ESI-MS	Sensible ; identification possible ; reproductible ; information structurale et nature physico-chimique ; couplage direct avec HPLC et CE ; quantification relative et absolue.	On ne peut pas récupérer l'échantillon ; résolution dépend du type d'analyseur; gamme dynamique limitée ; coût de l'appareil ; résolution en masse limitée (sauf FT-ICR)
MALDI-MS	Sensible ; couplage indirect permettant la ré-analyse ou l'analyse ciblée; bonne résolution ; information structurale et nature physico-chimique, très large gamme dynamique.	Interférence de la matrice; le découplage augmente le temps d'analyse; mauvaise fragmentation pour certains types d'analytes; coût de l'appareil ; mauvaise reproductibilité ; quantification difficile
Interaction biologique (anticorps)	Sensible; reproductible; possibilité de quantification; coût ; peut être utilisée dans tous les laboratoires	Nécessité d'avoir les anticorps adaptés; réaction croisée (spécificité; interaction); ne peut pas identifier les protéines modifiées; analyse ciblée seulement

## **II.4.5 La protéomique urinaire**

### **II.4.5.1 Le protéome urinaire normal**

Le protéome urinaire est constitué de 30% de protéines sériques et de 70% de protéines provenant du tractus urinaire (principalement du rein) (Pieper, et al., 2004 ; Thongboonkerd, et al., 2002). Une dizaine de protéines seulement représentent plus de 99% de la quantité totale des protéines urinaires. De ce fait, moins de 1% de la quantité totale des protéines urinaires est considérée comme source potentielle de biomarqueurs. Il y a donc, comme pour le sérum, à la fois une gamme dynamique très grande et un déséquilibre important de composition.

Plusieurs équipes ont tenté d'établir la liste exhaustive des protéines constituant le protéome urinaire normal, au moyen des différentes techniques existantes : la 2DE (Lafitte, et al., 2002 ; Pieper, et al., 2004 ; Thongboonkerd, et al., 2002 ; Oh, et al., 2004), la LC-MS (Davis, et al., 2001 ; Spahr, et al., 2001), le SELDI-TOF MS (Schaub, et al., 2004) et la CE-MS (Wittke, et al., 2003). Ces études ont toutes montré la grande variabilité intra- et inter-individuelle du protéome urinaire. De plus, les résultats étaient différents selon les techniques d'analyse utilisées, le mode de prélèvement et le mode de conservation des urines. L'étude la plus récente montrait plus de 1500 protéines présentes dans les urines, avec une large proportion de protéines membranaires (Adachi, et al., 2006).

Ces études se sont intéressées à l'analyse des protéines intactes présentes dans l'urine. Cependant plusieurs protéases ont été identifiées dans les urines (Pieper, et al., 2004), ce qui peut suggérer l'existence dans ce milieu de peptides natifs, générés par l'activité protéolytique de ces protéases. De ce fait, le terme peptidomique a été introduit en l'an 2000 (Schulz-Knappe, et al., 2005). Ces protéases peuvent être libérées des cellules subissant des modifications physiopathologies ou des agressions externes et la spécificité de clivage de chaque protéase peut être à l'origine de fragments peptidiques spécifiques d'une atteinte tissulaire particulière. Jurgens et al. ont étudié le peptidome urinaire chez des individus sains et ont pu identifier plus de 180 peptides provenant de 69 protéines différentes (Jurgens, et al., 2005). Actuellement, plusieurs études de recherche de biomarqueurs ont été menées sur le peptidome urinaire et plusieurs marqueurs potentiels ont été identifiés pour des maladies telles que l'obstruction urétéropelvienne chez les nouveaux nés, la néphropathie diabétique,

le cancer de la vessie ... (Decramer, et al., 2006 ; Rossing, et al., 2005 ; Theodorescu, et al., 2006).

#### **II.4.5.2 Recherche de biomarqueurs urinaires pour le suivi non invasif de l'état du greffon rénal**

Il est vraisemblable que les désordres physiopathologiques au niveau du rein se traduisent par des changements de composition du protéome et du peptidome urinaires. De ce fait, les urines constituent une source potentielle de biomarqueurs pouvant servir pour le suivi et le diagnostic non invasifs des maladies rénales et uro-génitales.

Aujourd'hui en transplantation rénale, la concentration de créatinine sérique est le marqueur sérique le plus utilisé pour le suivi de l'état de la fonction rénale. Quand son augmentation dépasse 10 à 20% par rapport aux valeurs antérieures des valeurs normales, beaucoup de centres de transplantation réalisent une biopsie rénale pour déterminer les causes du dysfonctionnement du rein. Cependant, plusieurs études ont montré les limites de cette stratégie ; 3 à 45% des patients transplantés stables étudiés au cours de protocoles de biopsies systématiques présentaient des rejets infra-cliniques (Gloor, et al., 2002 ; Nankivell, et al., 2004), considérés comme prédictifs de la dégradation des greffons à long terme (Moreso, et al., 2006 ; Nickerson, et al., 1999). De plus, les concentrations de créatinine ne permettent pas toujours de déceler les néphropathies chroniques du greffon (Nankivell, et al., 2003).

Le greffon rénal peut subir différents types d'agressions, d'origine immunitaire (rejet) et d'origine non immunitaire (toxicité due aux immunosuppresseurs, infections virales, hypertension...). Indépendamment de l'étiologie, tous ces processus conduisent à l'atteinte du greffon, mais la nature du tissu lésé est différente d'un processus à un autre (tubulaire, glomérulaire ou vasculaire). Le suivi régulier du greffon doit impérativement prendre en compte l'hétérogénéité de ces atteintes. Différentes tentatives de découverte de biomarqueurs ont été menées. La plupart d'entre elles se sont intéressées au dosage et à la détection des éléments intervenant dans la réaction immunitaire ou inflammatoire. Les biomarqueurs potentiels du dysfonctionnement du greffon rénal sont résumés dans le tableau 3 (page 59).



#### **II.4.5.2.1 Suivi immunitaire non invasif**

Il consiste en l'étude des différents facteurs impliqués dans la réaction immunitaire : cellules, ARNm et protéines présentes dans le sang ou les urines (Hernandez-Fuentes, et al., 2003). La détection et la quantification de certains éléments présents dans les urines montraient des différences significatives entre les groupes de patients présentant un rejet de greffe ou non (tableau 3). Les résultats les plus intéressants ont été obtenus par le suivi des ARNm de certains facteurs impliqués dans la réaction immunitaire. Les ARNm ont été isolés de cellules présentes dans les urines (Ding, et al., 2003 ; Muthukumar, et al., 2003). D'autres éléments tels que les antigènes de surface cellulaire (Roberti et al., 2001), les cytokines (Brown, et al., 2001 ; Sadeghi, et al., 2003) et les chémokines (Hauser, et al., 2005 ; Matz, et al., 2006), ont été largement étudiés aussi. Ces éléments sont impliqués dans la réaction inflammatoire et/ou immunitaire ; leur pouvoir prédictif du rejet ou de la toxicité aux immunosuppresseurs a été étudié et des résultats encourageants ont été publiés. Cependant, la difficulté de différencier les rejets et les infections reste la limite majeure de cette approche et à ce jour, aucun de ces éléments n'a pu être validé pour une utilisation clinique.

#### **II.4.5.2.2 Suivi non invasif de l'atteinte tissulaire**

Actuellement, les dysfonctionnements glomérulaires peuvent être décelés grâce au suivi des concentrations de créatinine sérique. En revanche, les atteintes tubulaires ne conduisent pas à l'élévation des concentrations de créatinine sérique. Cependant, plusieurs études ont montré que des atteintes tubulaires non traitées pouvaient aboutir à une atrophie tubulaire et à une fibrose interstitielle, qui sont les premiers signes de la néphropathie chronique (Nankivell, et al., 2003 ; Robertson, et al., 2004). Le mauvais pronostic à long terme des atteintes tubulaires a été démontré. Quelques marqueurs ont été associés au développement de la néphropathie chronique, comme l'augmentation des concentrations urinaires de la Retinol Binding Protein (RBP), et de l' $\alpha$ 1-microglobuline. A noter toutefois que la fonction rénale et la survie du greffon chez ces patients étaient très diminuées (Teppo, et al., 2004 ; Camara, et al., 2004). Ces dernières années, plusieurs biomarqueurs potentiels de l'insuffisance rénale ont été découverts. En particulier, un marqueur précoce de l'atteinte tubulaire liée à l'ischémie : il s'agit du neutrophile gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (Mishra, et al., 2003) ; les concentrations de ce marqueur ont été mesurés chez les patients transplantés, mais ils n'ont pas permis de différencier les patients transplantés faisant un rejet des patients stables (Schaub, et al., 2007).

### **II.4.5.2.3 Recherche de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic du rejet de greffe rénale par une approche protéomique**

Cinq études ont été rapportées dans la littérature concernant la recherche de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic du rejet de greffe par analyse protéomique. Quatre d'entre elles utilisaient le SELDI-TOF MS pour l'analyse du protéome urinaire.

Clarke et al. ont utilisé le SELDI-TOF-MS pour analyser les urines de 17 patients faisant un rejet (prouvé par biopsie rénale) et 15 patients transplantés stables. Ils ont détecté 45 pics de protéines pouvant différencier les deux groupes, mais deux marqueurs seulement (qui avaient des masses de 10 et de 3,4 kDa) étaient suffisants pour différencier les patients faisant un rejet avec une sensibilité de 83% et une spécificité de 100% (Clarke, et al., 2003).

Dans l'étude d'O'Riordan et al., les urines de 22 patients transplantés stables et de 23 patients faisant un rejet aigu (prouvé par biopsie rénale) ont été analysées par SELDI-TOF-MS. Les patients faisant un rejet pouvaient être identifiés par la présence de 4 à 7 peptides avec une sensibilité supérieure à 90 % et une spécificité de 80% (O'Riordan, et al., 2004).

Une troisième étude utilisant le SELDI-TOF-MS a été réalisée par Schaub et al., comparant les urines de 18 patients présentant un rejet aigu et celles de 22 patients transplantés stables. Des modifications significatives dans trois régions de pics de masse ont été observées chez les patients faisant un rejet (de 5270 à 5550 m/z, de 7050 à 7360 m/z, et de 10530 à 11000 m/z) (Schaub, et al., 2004). Ces pics ont pu être identifiés dans une seconde étude et correspondent à des formes clivées de la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m). Cependant, la protéase responsable de ce clivage n'a pas pu être identifiée (Schaub, et al., 2005). Récemment, la même équipe a mesuré les concentrations de marqueurs supposés spécifiques de l'atteinte du greffon rénal (les fragments spécifiques de la  $\beta$ 2m, la  $\beta$ 2m intacte, la RBP, le NGAL, et l' $\alpha$ -1 microglobuline) chez des patients transplantés rénaux au cours d'un essai clinique. Aucun de ces marqueurs, seul ou en combinaison, n'a été suffisamment sensible ou spécifique pour différencier les patients transplantés stables de ceux faisant un rejet. Les fragments de la  $\beta$ 2m ont été retrouvés dans les urines de tous les patients transplantés étudiés (stables ou faisant un rejet). Le clivage de cette protéine par des protéases est très dépendant du pH urinaire et de la température, autant de facteurs de variabilité qui rendent difficile la validation de ces marqueurs (Schaub, et al., 2007).

Reichelt et al. ont aussi utilisé un système SELDI-TOF-MS pour analyser des échantillons urinaires provenant de 23 patients transplantés dont 13 présentaient un rejet. Deux analytes, de masse respective 25,7 et 28,1 kDa, pouvaient différencier les deux groupes de patients avec une bonne spécificité (respectivement de 90% et 93%) et une bonne sensibilité (80% et 85%). Cependant, aucune validation n'a été faite dans cette étude (Reichelt, et al., 2006).

Wittke et al. ont utilisé la CE-MS pour établir un profil peptidique urinaire de patients transplantés avec rejet aigu (infra-clinique et clinique, n=19) et de patients transplantés stables (n=29) ; cinq peptides ont permis de différencier les deux groupes de patients étudiés, cependant, aucun de ces peptides n'a pu être identifié (Wittke, et al., 2005).

**Tableau 3.** Biomarqueurs potentiels sélectionnés en transplantation rénale

Biomarqueurs	Technique utilisée	Type d'échantillon	Pathologie explorée	Références
Ly T allo réactive	ELISPOT	Cellule mononucléaire du sang périphérique	Détection de cellule T activée du donneur Néphropathie chronique Prédiction de la fonction du greffon rénal à 6 et 12 mois après greffe	(Andree, et al., 2006 ; Augustine, et al., 2005 ; Hricik, et al., 2003 ; Nickel, et al., 2004 ; Poggio, et al., 2006)
Ly CD69 <sup>+</sup>	Cytométrie de flux	Cellule mononucléaire du sang périphérique	Prédiction des rejets (infra) cliniques	(Karpinski, et al., 2003)
Réactivité des Ly T CD4 <sup>+</sup>	activation des Ly T CD4 <sup>+</sup> par la phytohemagglutinine	Sang total	Etat de l'immunosuppression	(Kowalski, et al., 2006 ; Yussim, et al., 1994)
CD30 soluble	ELISA	Sérum	Survie du greffon Type et grade du rejet Prédiction des rejets précoces	(Matinlauri, et al., 2005 ; Rajakariar, et al., 2005)
Anticorps HLA	Cytométrie de flux, ELISA	Sérum	Prédiction du rejet précoce	(Gebel, et al., 2003 ; Hourmant, et al., 2005 ; Terasaki and Ozawa, 2005 ; Wahrmann, et al., 2005)
Myeloid Related Protein	ELISA	Sérum	Prédiction des rejets précoces	(Burkhardt, et al., 2001)
Cytokines	ELISA	Urine, plasma	Prédiction des rejets précoces Prédiction de l'insuffisance rénale à long terme	(Brown, et al., 2001 ; Sadeghi, et al., 2003)
ARNm de la perforine et du granzyme B	PCR	Urine, sang	Prédiction des rejets (précoces ou non)	(Li, et al., 2001 ; Simon, et al., 2003)
Chemokines (MIG, IP-10 et I-TAC)	ELISA	Urine	Prédiction des rejets suraigus précoces Dysfonctionnement du greffon	(Hauser, et al., 2005 ; Matz, et al., 2006)
Antigène de surface cellulaire urinaire	Cytométrie de flux	Urine	Prédiction de la résistance aux traitements stéroïdiens	(Roberti et al., 2001)
ARNm de la Serine-Protease Inhibitor-9	PCR	Urine	Prédiction du rejet, du grade histologique et du devenir du greffon	(Muthukumar, et al., 2003)

ARNm du CD103	PCR	Urine	Prédiction du rejet	(Ding, et al., 2003)
ARNm du FoxP3	PCR	Urine	Prédiction de l'évolution du rejet	(Muthukumar, et al., 2005)
ARNm du TGF beta 1	PCR	Urine	Prédiction des néphropathies chroniques	(Mas, et al., 2005)
$\alpha$ 1-microglobuline	ELISA	Urine	Néphropathie chronique Guérison des lésions après ischémie de reperfusion	(Teppo, et al., 2000 ; Teppo, et al., 2004)
Actine	ELISA	Urine	Guérison des lésions après ischémie de reperfusion	(Kwon, et al., 2003)
$\beta$ 2 microglobuline intacte	ELISA	Urine	Rejet de greffe, Néphrotoxicité de la ciclosporine	(Prischl, et al., 1989 ; Roxe, et al., 1981)
Retinol Binding Protein	ELISA	Urine	Néphropathie chronique	(Camara, et al., 2004)
Interleukine 18	ELISA	Urine	Prédiction de la reprise tardive de la fonction rénale, Nécrose tubulaire ischémique	(Parikh, et al., 2004 ; Parikh, et al., 2006)
NGAL	ELISA	Urine	Prédiction de la reprise tardive de la fonction rénale Nécrose tubulaire ischémique	(Parikh, et al., 2006; Mishra, et al., 2003)

### III. TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LE TACROLIMUS

Le but des travaux réalisés dans cette partie était d'identifier et de quantifier les sources de variabilité inter-patients de la PK du tacrolimus, en se focalisant en particulier sur l'influence du polymorphisme génétique du gène *hPXR NR1I2*. Les deux SNPs les plus fréquents dans la population caucasienne (7635A>G et -25385C>T) ont été étudiés. Différentes approches pharmacocinétiques ont été utilisées : (i) une approche non compartimentale qui a permis de comparer les indices d'exposition au tacrolimus entre les différents groupes génotypiques ; (ii) une approche pharmacocinétique compartimentale qui a permis d'estimer et de comparer les paramètres pharmacocinétiques individuels afin d'étudier l'impact de ce polymorphisme sur les processus d'absorption et d'élimination du tacrolimus ; (iii) une approche PKpop (en utilisant le logiciel NONMEM<sup>®</sup>) pour étudier et quantifier l'impact du génotype sélectionné sur la variabilité interindividuelle de la population étudiée.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un essai clinique multicentrique (protocole PCCP : *Prograf-Cellcept combined pharmacokinetics*, dont le promoteur était le CHU de Limoges), qui avait pour objectifs : (i) l'étude pharmacogénétique/pharmacocinétique du MMF (Cellcept<sup>®</sup>) et du tacrolimus (Prograf<sup>®</sup>), utilisés en association et par voie orale, chez des patients ayant reçu une greffe rénale ; (ii) la mise au point d'outils d'adaptation de posologies de ces deux immunosuppresseurs.

Les données ont été collectées chez 32 patients transplantés rénaux à 5 périodes après transplantation (7 jours, 14 jours, 1 mois, 3 mois, et 6 mois après la greffe). A chacune des visites, 12 prélèvements sanguins ont été réalisés. La dose initiale de tacrolimus était de 0,1 mg/kg/j. Ensuite, ces doses ont été adaptées pour chaque patient en fonction des concentrations de tacrolimus mesurées avant administration (C<sub>0</sub>), et si nécessaire, empiriquement en tenant en compte de l'efficacité et de la tolérance.

Le tacrolimus a été dosé par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les ADN des patients ont été génotypés par

PCR en temps réel (RQ-PCR pour real time quantitative polymerase chain reaction) pour les SNP suivants *CYP3A5\*3*, *CYP3A4\*1B*, et le *hPXR NR1I2* (-25385C>T et 7635A>G).

**III.1 Influence du polymorphisme du gène *hPXR NR1I2* sur  
la pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients  
transplantés rénaux (article 1)**



## **Article 1**

**Qualitative and quantitative influence of the *NR1I2* (Pregnane-X-Receptor) -25385C>T genetic polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients.**

**Qualitative and quantitative influence of the *NR1I2* (Pregnane-X-Receptor) -25385C>T genetic polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients.**

K Benkali<sup>1</sup>, N Picard<sup>1</sup>, A Rousseau<sup>1,2</sup>, JP Rérolle<sup>3</sup>, O Toupance<sup>4</sup>, G Hoizey<sup>5</sup>, F Villemain<sup>6</sup>,

P Marquet<sup>1</sup>, Y Le Meur<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>INSERM U850, France; Univ. Limoges, France; CHU Limoges, France

<sup>2</sup> Univ. Limoges, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Biophysics, France

<sup>3</sup> CHU Limoges, Department of Nephrology-Transplantation, France

<sup>4</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Reims, France

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, University Hospital, Reims, France

<sup>6</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Angers, France

<sup>7</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Brest, France

Running head: Effect of *NR1I2* polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics

Correspondence to:

Prof. Pierre MARQUET

INSERM U850

Limoges University

Faculty of Medicine

2 rue du Dr. Marcland

87025 Limoges cedex

Tel. +33 555 05 64 18

Fax. +33 555 05 61 62

E-mail. [pierre.marquet@unilim.fr](mailto:pierre.marquet@unilim.fr)

## **Abstract**

**Introduction** The pregnane X receptor (PXR/ *NR1I2* gene) regulates the expression of P-glycoprotein and the cytochrome P450 3A. It also mediates the inductive effect of steroid therapy on these proteins. The aim of this study was to evaluate qualitatively and quantitatively the contribution of *NR1I2* polymorphisms to the pharmacokinetic (PK) variability of tacrolimus, a P-gp and CYP3A substrate.

**Methods** The effect of the most frequent polymorphisms (i.e., -25385C>T (rs3814055) and 7635A>G (rs67855049) SNPs) of *NR1I2* on tacrolimus pharmacokinetics was investigated in renal transplant patients non expressers of CYP3A5 (i.e. homozygous carriers of the *CYP3A5*\*3 allele) and homozygous wild-type for the *CYP3A4* A-392G SNP. The genotypic effect was investigated using compartmental and non-compartmental pharmacokinetic analysis.

**Results** At three early post-transplantation periods (up to 1 month), tacrolimus AUC<sub>0-12</sub> and whole blood trough concentration, normalized by the dose or not, significantly differed depending on the number of mutated alleles for the *NR1I2* -25385C>T SNP (CC: n=10, CT: n=17, TT: n=4),  $p < 0.05$ . Compartmental analysis confirmed and evaluated quantitatively the effect of this SNP on tacrolimus apparent clearance (CL/F= 25±8, 17±4, and 10±4 for in the CC, CT, and TT groups, respectively).

**Conclusion** The *NR1I2* -25385C>T SNP significantly influences tacrolimus elimination. Owing to the high allelic frequency of this SNP this finding may be of clinical relevance.

**Key words** *NR1I2*, tacrolimus, renal transplantation, pharmacokinetics.

## **III.2 Analyse pharmacocinétique de population du tacrolimus et estimation Bayésienne chez des patients transplantés rénaux (article 2)**

## **Article 2**

**Tacrolimus population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis and Bayesian estimation in renal transplant recipients.**

**(Soumis à Clinical pharmacokinetics)**

**Tacrolimus population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis and Bayesian estimation in renal transplant recipients.**

K Benkali<sup>1</sup>, A Prémaud<sup>1</sup>, N Picard<sup>1</sup>, JP Rérolle<sup>2</sup>, O Toupance<sup>3</sup>, G Hoizey<sup>4</sup>, F Villemain<sup>5</sup>,  
Y Le Meur<sup>6</sup>, P Marquet<sup>1</sup>, A Rousseau<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>INSERM U850, France; Univ. Limoges, France; CHU Limoges, France

<sup>2</sup>CHU Limoges, Department of Nephrology-Transplantation, France

<sup>3</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Reims, France

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, University Hospital, Reims, France

<sup>5</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Angers, France

<sup>6</sup>Department of Nephrology-Transplantation, University Hospital, Brest, France

<sup>7</sup>Univ. Limoges, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Biophysics, France

Correspondence to:

Dr. Annick Rousseau  
INSERM U850  
Limoges University  
Faculty of Medicine  
2 rue du Dr. Marcland  
87025 Limoges cedex France  
Tel. 0033555435846  
Fax. 0033555435936  
E-mail. annick.rousseau@unilim.fr

## **Abstract**

**Introduction.** The aims of this study were: (i) to investigate the population pharmacokinetics (popPK) of tacrolimus in renal transplant recipients, including the influence of biological and pharmacogenetic covariates; and (ii) to develop a Bayesian estimator able to reliably estimate the individual PK parameters and inter-dose area under the curve ( $AUC_{0-12}$ ) in renal transplant patients.

**Methods.** Full PK profiles were obtained from 32 renal transplant patients at weeks 1 and 2, months 1, 3 and 6 post-transplantation. The popPK analysis was performed using non-parametric mixed-effect modeling (NONMEM V computer program). Patients' genotypes were characterized by allelic discrimination for the *CYP3A5* A6986G (*CYP3A5\*3* allele), *CYP3A4* A-392G (*CYP3A4\*1B* allele), and *PXR* -25385C>T genes.

**Results.** Tacrolimus PK was well described by a two-compartment model combined with an Erlang distribution to describe the absorption phase, with low additive and proportional residual errors of 2 ng/mL and 6%, respectively. Both hematocrit value and *PXR* -25385C>T SNP were identified as significant covariates for tacrolimus apparent clearance (CL/F), which allowed improving prediction accuracy. Specifically, CL/F decreased gradually with the number of mutated alleles for the *PXR* -25385C>T SNP ( $36\pm 7$  L.h<sup>-1</sup>,  $18\pm 3$  L.h<sup>-1</sup>, and  $16\pm 3$  L.h<sup>-1</sup>, respectively) and was inversely proportional to hematocrit value. Maximum *a posteriori* Bayesian forecasting allowed accurate prediction of tacrolimus  $AUC_{0-12}$  using only three sampling times (0, 1, and 3 hours post-dose) in addition to the hematocrit value and *PXR* genotype, with a non significant bias of 4% (range: -16% to 53%) and good precision (RMSE=11%) beyond the first week post-transplantation.

**Conclusion.** PopPK analysis of tacrolimus in renal transplant recipients showed a significant influence of *PXR* -25385C>T SNP on apparent clearance, and led to the development of a Bayesian estimator compatible with clinical practice and able to accurately predict tacrolimus individual PK parameters and  $AUC_{0-12h}$ .

**Key-words:** Tacrolimus, transplantation, NR1I2, population pharmacokinetic-pharmacogenetic.



### III.3 Discussion

Les travaux réalisés dans cette partie de la thèse ont permis : (i) de mettre en évidence pour la première fois l'effet du polymorphisme du gène *hPXR NR1I2* sur la pharmacocinétique du tacrolimus et de comprendre les conséquences physiologiques de ce génotype sur la pharmacocinétique du tacrolimus ; (ii) d'estimer les paramètres pharmacocinétiques moyens du tacrolimus chez les patients transplantés rénaux et d'identifier des sources de variabilité interindividuelle (étude PKpop) ; (iii) de mettre au point un estimateur Bayésien pouvant estimer l' $AUC_{0-12h}$  du tacrolimus à partir de trois points de concentration et des covariables pertinentes.

Le récepteur nucléaire PXR joue un rôle important dans la régulation et l'expression des gènes impliqués dans la pharmacocinétique de nombreux médicaments en général, dont le tacrolimus. Le polymorphisme génétique du gène *NR1I2* pourrait expliquer une partie de la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique de ce dernier. Dans nos travaux, une influence significative d'un SNP situé en amont du site de début de transcription du gène (SNP-25385C>T) a été retrouvée sur la pharmacocinétique du tacrolimus. Les  $AUC_{0-12h}$  et les  $C_0$ , standardisés ou non par la dose ( $AUC/dose$  et  $C_0/dose$ ), étaient deux fois plus élevés chez les patients porteurs de la séquence mutée et plus particulièrement en période précoce (durant le premier mois après la greffe). L'effet de ce polymorphisme va dans le sens d'une surexposition pour les patients porteurs de la mutation (risque de toxicité), et d'une sous-exposition des patients homozygotes sauvages (risque de rejet) en période précoce.

En pratique clinique, le tacrolimus est souvent administré en combinaison avec les glucocorticoïdes, surtout pendant les 3 premiers mois qui suivent la greffe et chez certains patients pendant toute la vie. Les glucocorticoïdes sont connus pour activer la transcription des *CYP3A* et de la *P-gp* via le PXR (Pascussi, et al., 2001). Cette induction aboutit à une élimination plus importante du tacrolimus (Anglicheau, et al., 2003). Le polymorphisme du gène *NR1I2* est en grande partie responsable de la variation de l'induction des gènes soumis à sa régulation et de ce fait, des variations du métabolisme et de l'élimination. Lamba et al., ont récemment rapporté que les individus homozygotes sauvages pour le SNP -25385 (-25385CC) avaient des concentrations d'ARNm de PXR plus importants que les individus porteurs du génotype sauvage (Lamba, et al., 2008). La connaissance du génotype du *NR1I2*, plus

particulièrement pour le SNP -25385C>T, fréquemment muté chez les Caucasiens (40%, Zhang, et al., 2001) pourrait être utile pour le choix de la première dose de tacrolimus. Même si cela reste à démontrer, ceci pourrait permettre de diminuer le risque de rejet aigu (chez les patients homozygotes sauvages) ou de diminuer la toxicité due au tacrolimus en début de traitement (chez certains patients porteurs de l'allèle muté).

Les résultats de cette étude montrent l'importance que peut présenter la pharmacogénétique dans le choix des doses optimales pour chaque patient. En effet, des différences importantes de clairance apparente entre les patients des différents génotypes ont été observées (la clairance apparente des patients homozygotes mutés était environ 40% inférieure à celle des patients sauvages). Près d'1/6<sup>ème</sup> des patients pourraient alors être exposés à des doses trop élevées de tacrolimus dans les premiers jours qui suivent la greffe. L'importance de l'induction enzymatique liée aux traitements co-administrés (corticoïdes), incite également à être plus attentif aux doses utilisées pour ces derniers.

L'effet de ce génotype reste encore à valider dans une population indépendante ainsi que, si possible, sur des modèles *in vitro*. Dans une étude récente (de Jonge et al., 2008) réalisée chez 78 patients transplantés rénaux non exprimeurs du CYP3A5, suivis durant les cinq années suivant la greffe, des différences significatives de doses de tacrolimus (en mg/kg) ont été observées dans les groupes génotypiques du SNP -25385C>T. Les patients porteurs des allèles sauvages ou d'un seul allèle muté avaient des besoins de doses deux fois plus importantes par rapport aux patients porteurs de deux allèles mutés (pour atteindre une même valeur cible de C<sub>0</sub>). Toutefois, aucune différence significative n'avait été retrouvée entre les indices d'exposition (C<sub>0</sub> et AUC<sub>0-12h</sub> standardisés ou non par la dose) et les clairances apparentes des différents groupes génotypiques quelle que soit la période post-greffe. De plus, aucune influence de ce génotype sur la réponse clinique n'était retrouvée (rejet de greffe et toxicité) chez ces patients.

Ces deux études (la notre et celle de de Jonge et al.) ne permettent pas de conclure avec certitude l'effet de ce génotype. Sur la base des résultats obtenus dans notre étude, il est nécessaire d'inclure au moins 100 patients (environ 32 patients par groupe génotypique) pour valider ce résultat.

Par ailleurs, en raison du faible nombre de patients étudiés, les effets d'autres génotypes n'ont pas pu être étudiés, notamment le polymorphisme du gène *ABCB1*. Le déséquilibre de liaison est très important entre les SNPs les plus fréquents de ce gène (1236C>T, 2677G>T et 3435C>T (Kim, et al., 2001)), l'approche haplotypique semble être la plus appropriée pour

étudier l'influence du polymorphisme de la P-glycoprotéine. Or, elle nécessite un plus grand nombre de sujets que l'approche génotypique.

L'utilisation de l'approche PKpop comme outil d'étude des relations pharmacogénétique-pharmacocinétique pourrait devenir un outil de choix pour quantifier l'effet du polymorphisme génétique. Cependant, peu d'études ont rapporté l'utilisation de cette méthodologie dans cette application (Fukudo, et al., 2006 ; Li, et al., 2007 ; Djebli, et al., 2006). Dans notre étude, cet outil nous a permis de confirmer l'effet du SNP 25385C>T et de quantifier la clairance moyenne du tacrolimus dans chaque sous-groupe génotypique ( $CL/F_{CC} = 36 \pm 7 \text{ L.h}^{-1}$ ,  $CL/F_{CT} = 18 \pm 3 \text{ L.h}^{-1}$ ,  $CL/F_{TT} = 16 \pm 4 \text{ L.h}^{-1}$ ). De plus, l'analyse PKpop permet aussi d'étudier les autres facteurs de variabilité (biologiques et démographiques).

Ce modèle pharmacocinétique de population a servi de base au développement d'un estimateur Bayésien pouvant estimer avec précision les paramètres PK individuels et les indices d'exposition au tacrolimus ( $AUC_{0-12h}$ ), à partir de la deuxième semaine suivant la greffe. Le faible nombre de points nécessaires à cette estimation (trois concentrations sanguines collectées à 0, 1h et 3h après la prise du tacrolimus) rend cet outil compatible avec la pratique clinique. Son utilisation n'implique pas l'hospitalisation du patient et pourrait permettre de ce fait, un meilleur suivi des malades à moindre coût. Toutefois, l'estimateur Bayésien développé ne permet pas de prédire avec précision les  $AUC_{0-12h}$  en période très précoce (une semaine après transplantation). Ceci peut être dû à la grande variabilité interindividuelle durant les premiers jours qui suivent la transplantation.

Cet estimateur Bayésien est actuellement utilisé en clinique sur le site web ABIS (Adaptation Bayésienne des Immunosuppresseurs) pour l'adaptation de posologie du tacrolimus chez des patients transplantés rénaux.

## **IV. TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS**

### **IV.1 Mise au point et étude de faisabilité de la recherche de biomarqueurs urinaires en utilisant la technique Nano-LC-MALDI-TOF/TOF (article 3) :**

Le but du travail présenté dans cet article était de mettre au point et de valider les techniques utilisées pour la recherche de biomarqueurs urinaires.

La technique nano-LC-MALDI-TOF/(TOF) nécessite un temps d'analyse assez long. L'optimisation de cette technique était indispensable avant de l'utiliser sur un grand nombre d'échantillons. Pour cela, une étude de stabilité des fractions chromatographiques immobilisées sur les plaques MALDI a été réalisée, pour profiter du découplage entre la nano-LC et l'analyse MS, et entre l'analyse MS et MS/MS, et diminuer ainsi les temps d'analyse.

Par la suite, notre stratégie de recherche de biomarqueurs urinaires a été testée au cours d'une première expérience pilote qui a été réalisée sur des urines recueillies chez des volontaires sains contenant ou non des marqueurs peptidiques artificiels (volontairement incorporés).

## **Article 3**

# **A new strategy for faster urinary biomarkers identification by Nano-LC-MALDI-TOF/TOF mass spectrometry**

**(Accepté à BMC genomics)**

**A new strategy for faster urinary biomarkers identification by  
Nano-LC-MALDI-TOF/TOF mass spectrometry**

K. Benkali<sup>1</sup>, P. Marquet<sup>1</sup>, J.P. Rérolle<sup>2</sup>, Y. Le Meur<sup>1,3</sup>, L. N. Gastinel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U850, France; Univ. of Limoges, France; CHU Limoges, France

<sup>2</sup>Department of Nephrologie-Transplantation, University Hospital, Limoges, France

<sup>3</sup>Department of Nephrologie-Transplantation, University Hospital, Brest, France

Correspondence to:

Louis N. Gastinel  
INSERM U850  
Limoges University  
Faculty of Medicine  
2 rue du Dr. Marcland  
87025 Limoges cedex  
Tel. +33555435966  
Fax. +33555438490  
E-mail: louis.gastinel@unilim.fr

**Keywords:** Biomarkers, MALDI TOF/TOF, peptidomic, urine

**List of abbreviations:**

PCA: Principal component analysis, SPE: Solid phase extraction, TFA: Trifluoro acetic acid, FA: Formic acid, MALDI TOF/TOF: matrix assisted laser desorption ionization time of flight /time of flight.

**Abstract:**

**Background:** LC-MALDI-TOF/TOF analysis is a potent tool in biomarkers discovery characterized by its high sensitivity and high throughput capacity. However, methods based on MALDI-TOF/TOF for biomarkers discovery still need optimization, in particular to reduce analysis time and to evaluate their reproducibility for peak intensities measurement. The aims of this methodological study were: (i) to optimize and critically evaluate each step of urine biomarker discovery method based on Nano-LC coupled off-line to MALDI-TOF/TOF, taking full advantage of the dual decoupling between Nano-LC, MS and MS/MS to reduce the overall analysis time; (ii) to evaluate the quantitative performance and reproducibility of nano-LC-MALDI analysis in biomarker discovery; and (iii) to evaluate the robustness of biomarkers selection.

**Results:** A pool of urine sample spiked at increasing concentrations with a mixture of standard peptides was used as a specimen for biological samples with or without biomarkers. Extraction and nano-LC-MS variabilities were estimated by analyzing in triplicates and hexaplicates, respectively. The stability of chromatographic fractions immobilised with MALDI matrix on MALDI plates was evaluated by successive MS acquisitions after different storage times at different temperatures.

Low coefficient of variation (CV%: 10-22%) and high correlation ( $R^2 > 0.96$ ) values were obtained for the quantification of the spiked peptides, allowing quantification of these peptides in the low femtomole range, correct group discrimination and selection of “specific” markers using principal component analysis. Excellent peptide integrity and stable signal intensity were found when MALDI plates were stored for periods of up to 2 months at +4°C. This allowed storage of MALDI plates between LC separation and MS acquisition (first decoupling), and between MS and MSMS acquisitions while the selection of inter-group discriminative ions is done (second decoupling). Finally the recording of MSMS spectra to



obtain structural information was focused only on discriminative ions in order to minimize analysis time.

**Conclusion:** Contrary to other classical approaches with direct online coupling of chromatographic separation and on the flight MS and/or MSMS data acquisition for all detected analytes, our dual decoupling strategy allowed us to focus on the most discriminative analytes, giving us more time to acquire more replicates of the same urine samples thus increasing detection sensitivity and mass precision.

## **IV.2 Sources de variabilité dans la recherche de biomarqueurs urinaires chez les patients transplantés rénaux**

Les échecs relatifs rencontrés par les équipes ayant recherché des biomarqueurs urinaires spécifiques d'un état pathologique sont probablement dus aux grandes variabilités existantes dans les différentes étapes d'un projet biomarqueur. Le but de notre deuxième étude était de rechercher et de quantifier toutes les sources de variabilité pouvant être rencontrées au cours de la préparation, l'analyse et l'interprétation des données. Au cours de ce travail, la reproductibilité de chaque étape de notre stratégie a été évaluée afin d'identifier et de quantifier les sources de variabilités non informatives.

### **IV.2.1 Matériel et méthodes**

#### **IV.2.1.1 Patients et collectes des échantillons urinaires**

Cette étude a été réalisée sur des urines recueillies chez 11 patients transplantés rénaux présentant ou non des signes histologiques de néphropathie chronique déterminés par la biopsie du greffon rénal, ainsi que sur les échantillons urinaires de trois volontaires sains utilisés pour la première étude.

Les urines des patients transplantés ont été recueillies dans le cadre de deux protocoles cliniques et tous les patients ont signé un consentement écrit pour participer à ces études :

- Protocole OPERA (promoteur ROCHE SAS) : les prélèvements urinaires étaient collectés systématiquement à 3 mois et à 1 an post-greffe ou dans le cas d'une suspicion d'un rejet de greffe ;
- Protocole DIRI (promoteur CHU Limoges) dans lequel les urines sont collectées en cas de dégradation de la fonction rénale (constatée par l'augmentation de la créatininémie) plusieurs mois voire plusieurs années après la greffe.

Chez tous les patients, environ 40 ml d'urine ont été collectés quelques minutes avant de réaliser la biopsie rénale, selon la procédure décrite précédemment dans l'article 3. Le diagnostic histologique a été réalisé selon la classification internationale de Banff 97 (Racusen, et al., 1999). Sur les 11 patients, 4 avaient des signes de néphropathie chronique de grade 1 (CN1), 3 patients de grade 3 (CN3) et 4 autres patients n'avaient aucun signe histologique de rejet ou de néphropathie chronique (patients stables, ST). Les caractéristiques démographiques des patients transplantés et le diagnostic histologique de Banff sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Caractéristiques démographiques et score de Banff 97 des patients transplantés rénaux.

	Patients stables (n=4)	Néphropathie chronique grade 1 (n=4)	Néphropathie chronique grade 3 (n=3)
<b>Age (année, moyenne±SD)</b>	49±12.5	49.5±11.5	41±10.5
<b>Sexe (M/F)</b>	(2/2)	(2/2)	(1/2)
<b>Période post greffe (semaine, moyenne±SD)</b>	189±182	13±2	196±156
<b>Score de Banff, médiane (étendue)</b>			
<i>Infiltration par cellules interstitielles mononucléées « i »</i>	0	0	0 (0-1)
<i>Tubulite « t »</i>	0	0	0 (0-1)
<i>Glomerulite « g »</i>	0	0	0
<i>Artérite intinale « v »</i>	0	0	0
<i>Epaississement hyalin artériolaire « ah »</i>	0	1	1 (1-2)
<i>Glomerulopathie de l'allogreffe « cg »</i>	0	0	0
<i>Fibrose interstitielle « ci »</i>	0	1	3
<i>Atrophie tubulaire « ct »</i>	0	0 (0-1)	3
<i>Epaississement fibreux de l'intima « cv »</i>	0	0 (0-1)	1
<i>Augmentation du tissu mesangial « mm »</i>	0	0	0 (0-1)

#### IV.2.1.2 Analyse Nano-LC-MALDI-TOF/TOF

Cette analyse a été réalisée dans les conditions décrites précédemment (article 3). Chaque échantillon urinaire a été analysé en triplicata.

#### IV.2.1.3 Traitement et analyse des données

Le traitement des données issues de l'analyse nano-LC-MALDI et la classification des ions ont été réalisés selon la procédure décrite dans l'article 3.

#### **IV.2.1.4 Validation interne**

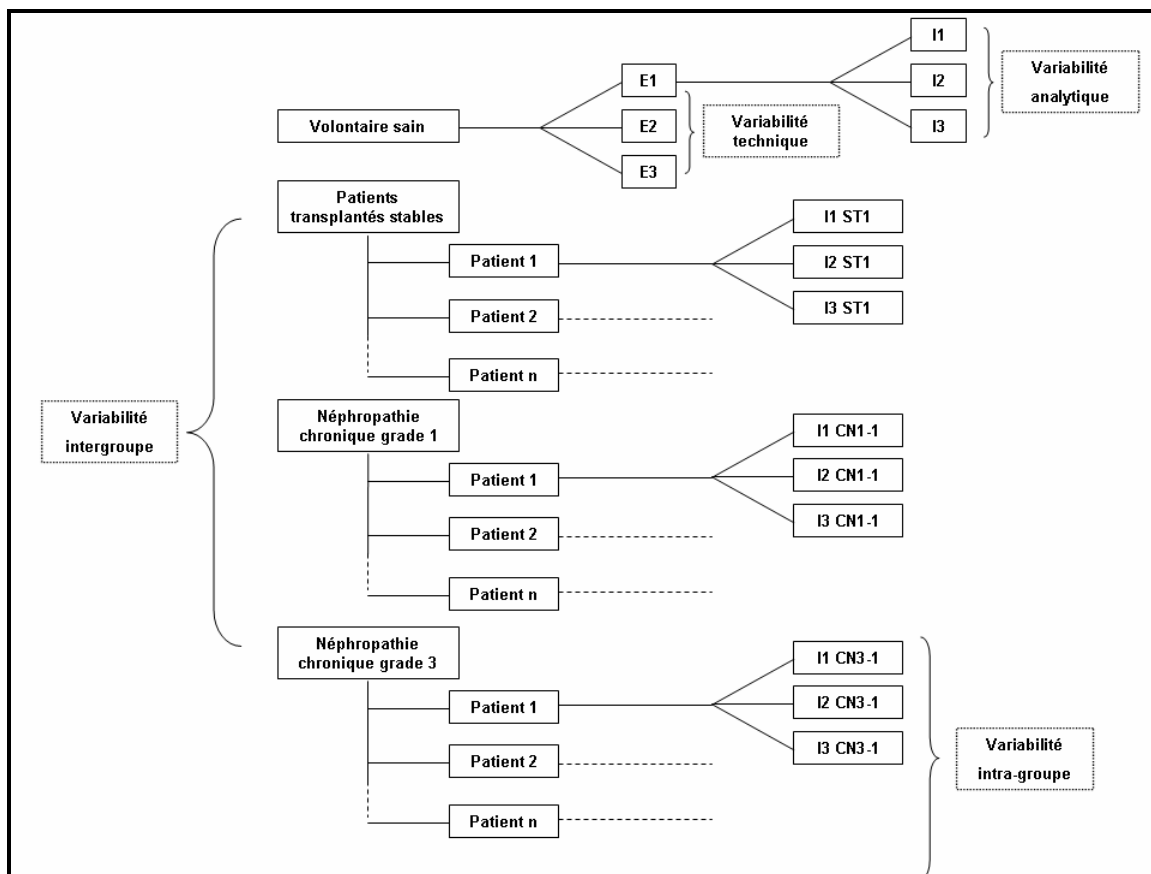
La validation interne a été effectuée pour vérifier la robustesse des résultats obtenus par les analyses multivariées (PCA et PCA-DA) selon la procédure de validation croisée (méthode Jackknife) (Efron et al., 1993).

Les données LC-MALDI des 11 patients ont été réparties au hasard dans trois sous-groupes contenant chacun 66% des données (deux analyses LC-MALDI du même échantillon de chaque patient). La classification des ions a été faite comme pour la totalité des données (article 3). Le pouvoir discriminant de chaque ion est obtenu par la somme des contributions des ions dans les trois premiers axes de PCA, puis comparé à ceux obtenus avec la totalité des données. Les ions qui apparaissent dans les 10 premières positions dans chaque sous-groupe sont considérés comme les ions discriminants les plus robustes.

En dernier, l'analyse MSMS pour l'identification des peptides discriminants a été réalisée exclusivement sur les ions discriminants sélectionnés, sur la même plaque MALDI utilisée pour l'analyse MS et conservée à -20°C (Cf. article 3).

#### **IV.2.1.5 Quantification des sources de variabilité:**

Les échantillons urinaires des patients transplantés ont été analysés en triplicata, les fractions issues des trois chromatogrammes ont pu être déposées sur la même plaque et conservées à +4°C. Le schéma expérimental pour l'estimation de chaque type de variabilité est représenté dans la figure 7. La variabilité totale englobe la somme des contributions de toutes les variabilités, c'est-à-dire la variabilité intergroupe (variabilité pathologique : néphropathie chronique), la variabilité intra-groupe (variabilité physiologique ou interindividuelle) et la variabilité technique et analytique (préparation d'échantillon et analyse LC-MALDI). La contribution des différentes sources de variabilité a été estimée sur la variance par le calcul des sommes des carrés (SS) et la moyenne des carrés (MS), déterminée par les triplicatas suivant le schéma expérimental de la figure 7.

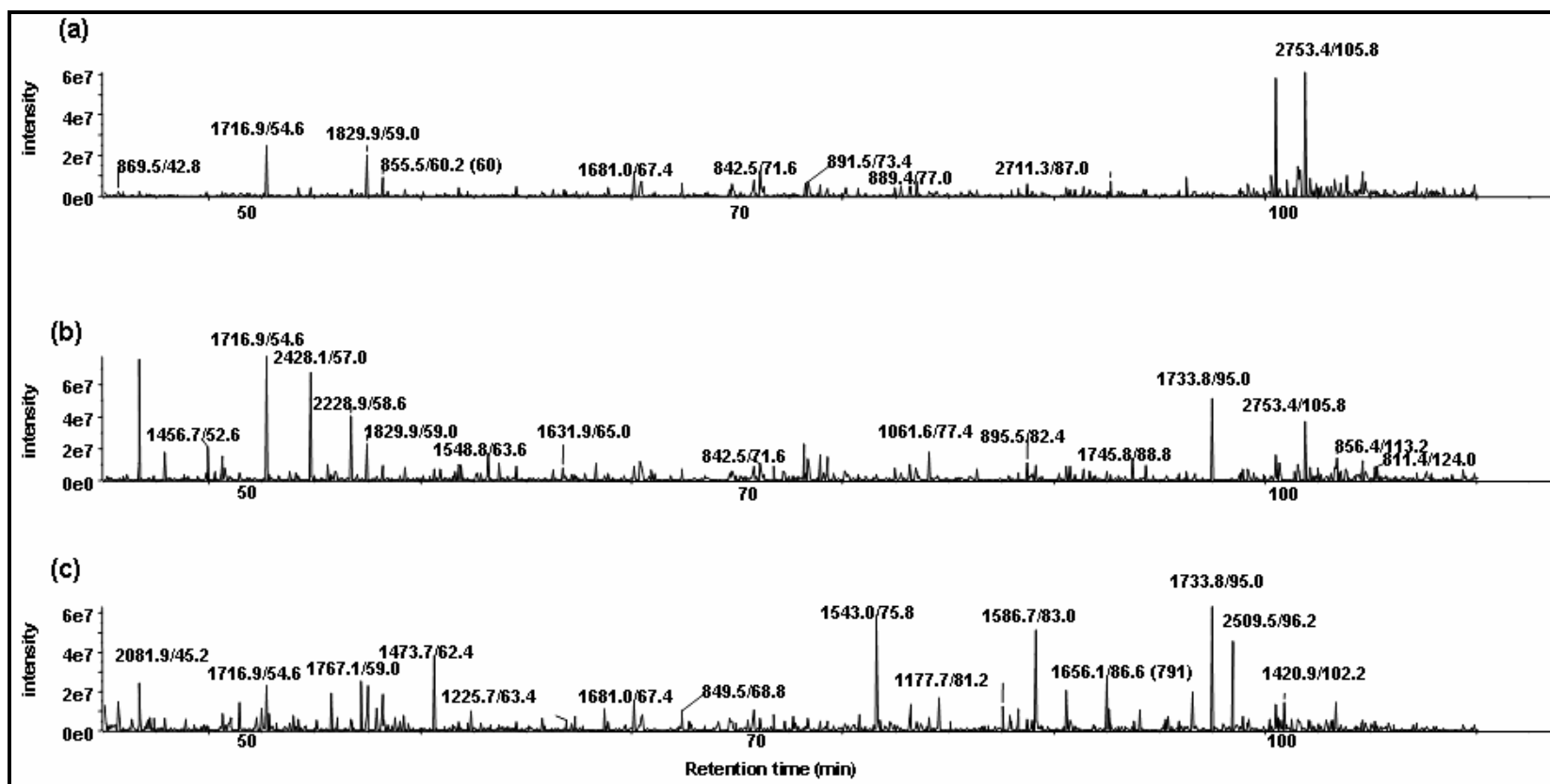


**Figure 7.** Schéma expérimental pour la quantification des sources de variabilité intervenant dans la recherche de biomarqueurs urinaires.

Les variabilités analytiques et techniques ont été estimées chez les volontaires sains (respectivement 3 et 9 mesures). L'estimation des variabilités intra- et inter-groupe a été réalisée chez les 11 patients transplantés rénaux (4 patients stables, 4 présentant une néphropathie chronique de grade 1 et 3 présentant une néphropathie de grade 3).

## IV.2.2 Résultats

Les chromatogrammes LC-MALDI des urines des patients ayant des signes histologiques de néphropathie chronique avaient des intensités supérieures à ceux des patients transplantés stables. Le nombre d'analytes communs était respectivement de 655, 1488 et 1320 dans les groupes ST, CN1 et CN3. Des exemples de chromatogrammes LC-MALDI reconstruits, représentatifs de chaque groupe de patients transplantés sont présentés dans la figure 8.



**Figure 8.** Chromatogrammes LC-MALDI reconstruits, typiques du peptidome de chaque groupe de patients transplantés obtenus après alignement, filtration et normalisation de l'intensité.

(a) Patients transplantés stables, (b) patients présentant une néphropathie chronique grade 1 et (c) patients présentant une néphropathie de grade 3. Vue limitée des m/z de 800-5000, entre les temps de rétention de 40-160 min. Les pics sont nommés selon leur m/z et leur temps de rétention (m/z / RT).

Après alignement, normalisation de l'intensité et élimination des ions de la matrice  $\alpha$ -CHCA, seuls 441 analytes communs présents dans les 31 répliques (deux ont été exclus pour des irrégularités de dépôt de la matrice et des fractions chromatographiques) ont été retenus pour l'analyse des données, ce qui représente 6% de la totalité des ions détectés chez les 11 patients transplantés rénaux (environ 7400 analytes).

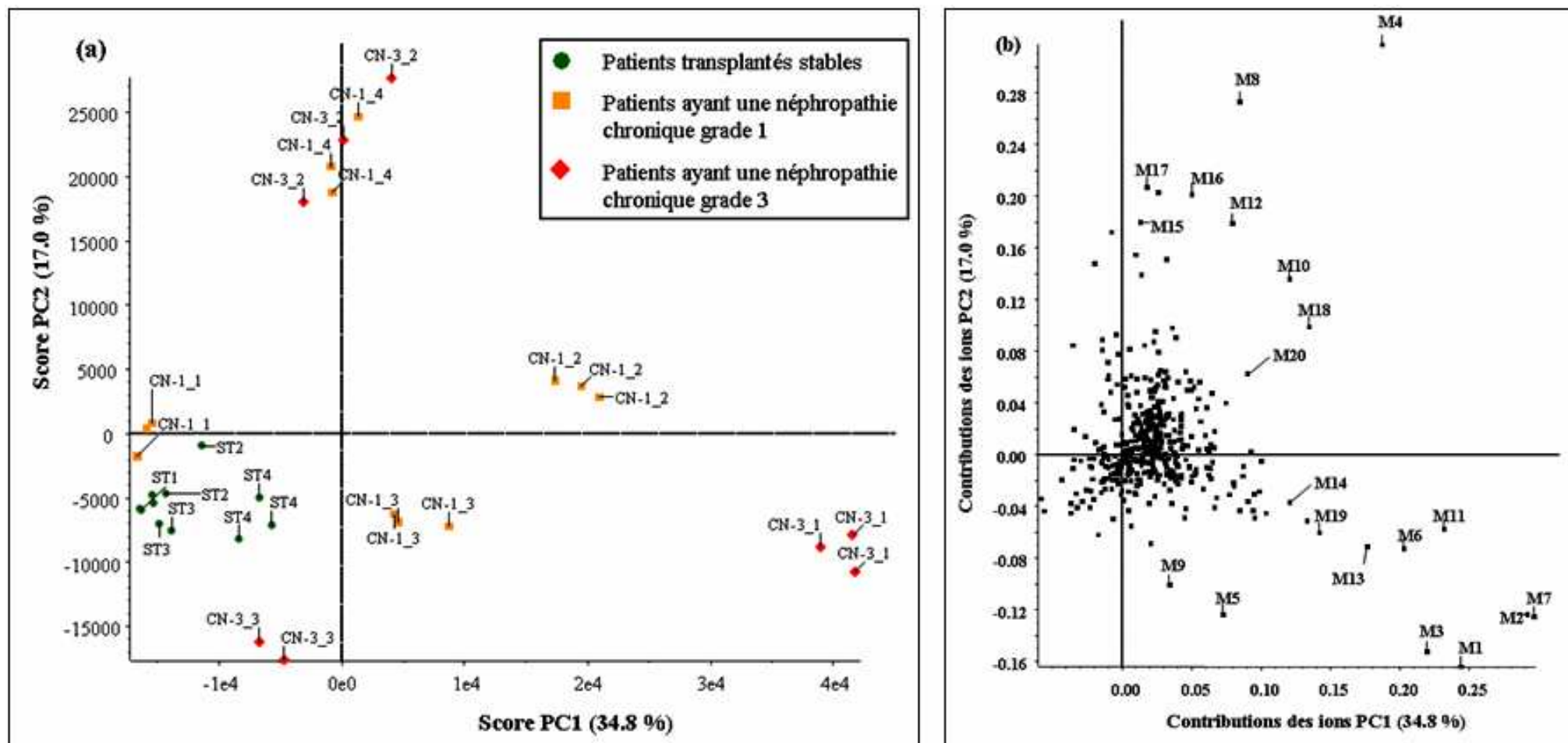
Pour éviter la sélection de marqueurs qui peuvent être des "faux positifs", les sources majeures de variabilité non informatives ont été recherchées et quantifiées. Leurs contributions dans la variabilité totale sont résumées dans le tableau 5.

**Tableau 5. Sources de variabilité entre les échantillons urinaires.** La somme des carrés (SS) et la moyenne des carrés (MS) ont été calculées selon le schéma expérimental présenté dans la Figure 7 (page 160).

Source de variabilité	Degré de liberté	SS	MS	% de contribution dans la variabilité totale
Analytique	2	$1,5 \cdot 10^{+10}$	$7,5 \cdot 10^{+9}$	0,04
Technique	8	$2,5 \cdot 10^{+10}$	$3,12 \cdot 10^{+9}$	0,01
Variabilité intra-groupe	10	$5 \cdot 10^{+13}$	$5 \cdot 10^{+12}$	24
Variabilité totale	30	$6,2 \cdot 10^{+14}$	$2,1 \cdot 10^{+13}$	100
SS Totale		$6,7 \cdot 10^{+14}$		

La variabilité analytique (analyse LC-MALDI) et technique (préparation d'échantillon) représentent respectivement environ 0,04 et 0,01% de la variabilité totale. Ces valeurs de variabilité (<0,1%) sont négligeables en comparaison de la variabilité totale ; alors que la variabilité intragroupe représente environ 24% de la variabilité totale. La variabilité pathologique est largement supérieure aux autres sources de variabilités (environ 76% de la variabilité totale). Ceci a permis la discrimination des patients ayant une néphropathie chronique des patients stables, en utilisant la PCA non dirigée (figure 9).



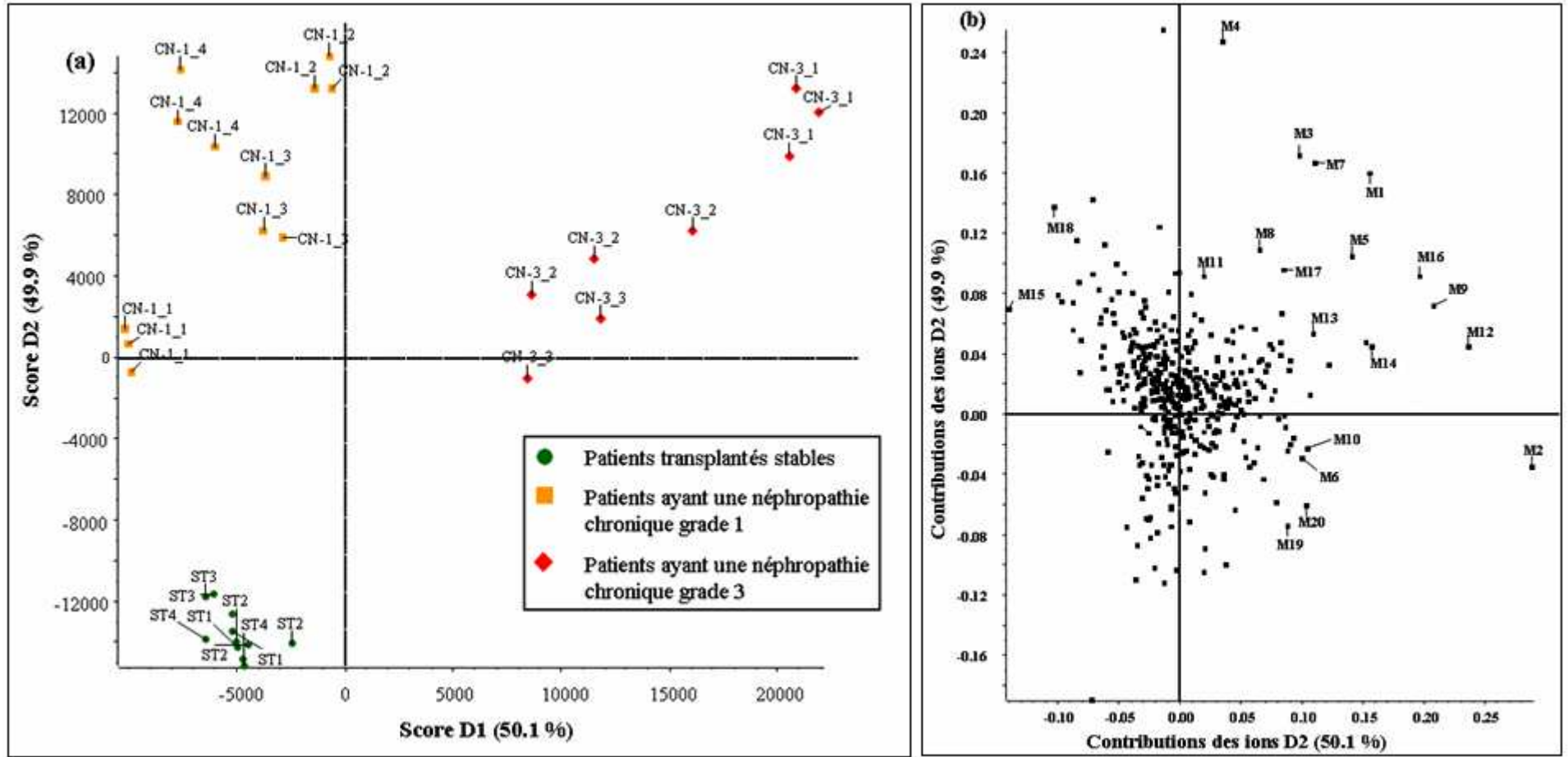


**Figure 9.** Analyses PCA réalisées sur les données LC-MALDI obtenues chez les 11 patients transplantés rénaux.

(a) Tracé des scores des composantes principales PC1 et PC2 des peptidomes urinaires. Patients stables (ST, n=4), patients avec une néphropathie chronique de grade 1 (CN-1, n=4) et patients avec une néphropathie chronique de grade 3 (CN-3, n=3), (b) tracé des contributions des ions pour les composantes PC1 et PC2.

En utilisant la PCA, les patients stables ont été groupés dans la même zone, alors que les patients ayant une néphropathie chronique sont dispersés. Les scores des composantes principales (PC) qui représentent le pourcentage de variance expliquée sont de 34,8%, 17% et 10% pour les trois premiers axes respectivement PC1, PC2 et PC3. À eux seuls, ces trois axes expliquent plus de 60% de la variance. De plus, pour tous les patients transplantés les triplicatas sont localisés dans la même zone, ce qui témoigne de la bonne reproductibilité de l'analyse LC-MALDI. Toutefois, un meilleur groupage des patients des trois groupes (ST, CN1 et CN3) est obtenu en utilisant la PCA-DA (analyse discriminante dirigée) (figure 6). Les scores des composantes D obtenus avec cette analyse sont très importants, 50% et 49,9% pour les composantes D1 et D2 (ces deux axes expliquent environ 100% de la variance totale).

L'axe D2 sépare les patients transplantés stables (ST) de ceux ayant une néphropathie chronique (CN1 et CN3), alors que l'axe D1 sépare les patients ayant une néphropathie chronique de grade 1 de ceux ayant un grade 3. Cependant seule la PCA-DA permet de différencier les patients ayant des signes histologiques de néphropathie chronique de différent grade (1 et 3) (Figure 10).



**Figure 10.** Analyses PCA-DA réalisées sur les données LC-MALDI obtenues chez les 11 patients transplantés rénaux.

(a) tracé des scores de l'analyse PCA-DA D1 et D2 et (b) tracé des contributions des ions pour l'analyse PCA-DA pour D1 et D2.

La validation croisée réalisée a montré la stabilité relative de la classification des ions les plus discriminants par rapport à leur classement en utilisant le fichier complet de données. Les ions classés dans les 5 premières positions restent parmi les 10 ions les plus discriminants après déletion d'un tiers des données (tableau 6). Quinze des vingt ions les plus discriminants ont pu être identifiés avec un score Mascot supérieur à 20. Pour la plupart, ils sont issus de protéines abondantes dans les urines telles que l'albumine ou l'uromoduline (tableau 7).

**Tableau 6.** Rang des 20 ions les plus discriminants sélectionnés par la PCA-DA dans le fichier complet de données et dans les trois sous-groupes contenant chacun 66% des données (validation croisée).

Ion ID	Ions Discriminants (m/z)	Temps de rétention (min)	Rang des ions dans le fichier complet	Rang des ions dans le sous-groupe A	Rang des ions dans le sous-groupe B	Rang des ions dans le sous-groupe C
M1	1716.90	54.60	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
M2	1109.61	72.00	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
M3	2228.91	58.60	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	11
M4	1733.8	95.00	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
M5	1829.93	59.00	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
M6	1303.63	53.00	<b>6</b>	13	12	<b>9</b>
M7	2081.87	45.20	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
M8	1586.70	83.00	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>
M9	1943.06	68.20	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
M10	1473.70	62.40	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	4
M11	1061.59	77.40	11	14	<b>10</b>	<b>10</b>
M12	1542.96	75.80	12	12	11	12
M13	1298.56	50.00	13	20	16	14
M14	1456.67	52.60	14	11	14	13
M15	1680.98	67.40	15	27	21	17
M16	1656.06	86.60	16	19	15	15
M17	1983.04	86.80	17	15	25	20
M18	2147.91	84.40	18	31	18	16
M19	1253.48	51.20	19	21	19	18
M20	1161.52	71.60	20	17	13	23

**Tableau 7.** Séquences peptidiques des ions les plus discriminants sélectionnées par les scores de la PCA-DA

Ions discriminants (m/z)	Temps de rétention (min)	Scores Mascot des ions	Séquence peptidique	Nom de la protéine	Numéro d'accension
1716.90	54.60	27	VRYTKKVPQVSTPTL	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1109.61	72.00	ND	ND	ND	ND
2228.91	58.60	23	DAHKSEVAHRFKDLGEENF	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1733.8	95.00	62	FRVVAQGVGIPEDSIF	AMBP protein precursor [Contains: Alpha-1-microglobulin (Protein HC)	AMBP_HUMAN
1829.93	59.00	49	LVRVYTKKVPQVSTPTL	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1303.63	53.00	42	YGRAPQLRETL	AMBP protein precursor [Contains: Alpha-1-microglobulin (Protein HC)	AMBP_HUMAN
2081.87	45.20	20	DAHKSEVAHRFKDLGEEN	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1586.70	83.00	70	RVVAQGVGIPEDSIF	AMBP protein precursor [Contains: Alpha-1-microglobulin (Protein HC)	AMBP_HUMAN
1943.06	68.20	ND	ND	ND	ND
1473.70	62.40	71	FRVVAQGVGIPEDS	AMBP protein precursor [Contains: Alpha-1-microglobulin (Protein HC)	AMBP_HUMAN
1061.59	77.40	44	FKAWAVARL	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1542.96	75.80	31	AWYQQKPGQAPRL	Ig kappa chain V-III region B6 - Homo sapiens (Human)	KV301_HUMAN
1298.56	50.00	52	TYVPKEFNAET	Serum albumin precursor - Homo sapiens (Human)	ALBU_HUMAN
1456.67	52.60	ND	ND	ND	ND
1680.98	67.40	29	VIDQSRVLNLGPITR	Uromodulin precursor (Tamm-Horsfall urinary glycoprotein) (THP) - Homo sapiens (Human)	UROM_HUMAN
1656.06	86.60	ND	ND	ND	ND
1983.04	86.80	21	LAFPGHVFSRSLPEVPET	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor (HSPG) (Perlecan)	PGBM_HUMAN
2147.91	84.40	37	AQVSVQPNFQQDKFLGRW	Prostaglandin-H2 D-isomerase precursor (EC 5.3.99.2) (Lipocalin-type prostaglandin-D synthase)	PTGDS_HUMAN
1253.48	51.20	ND	ND	ND	ND
1161.52	71.60	28	XPTTSTPGTSTV	Mucin-16 (Ovarian carcinoma antigen CA125)	MUC16_HUMAN

## IV.3 Discussion

Les travaux réalisés dans ces études ont permis d'une part la mise au point d'une technique d'analyse de la composition en peptides dans les urines pour la recherche de biomarqueurs où le temps d'analyse a été considérablement minimisé et d'autre part, la quantification des sources de variabilités rencontrées au cours de la recherche de biomarqueurs urinaires.

Ces dernières années, les spectromètres de masse MALDI-TOF/(TOF) ont été largement améliorés. Ils ont été adaptés pour des analyses à haut débit en utilisant un couplage indirect « Off-Line » à la séparation chromatographique, permettant ainsi l'analyse d'échantillons biologiques complexes (sang, urine, tissus...). Malgré cela, la communauté scientifique a été rapidement confrontée aux limites de cette technologie : le manque de reproductibilité inhérent aux variations de cristallisation de la matrice. A ce jour, les marqueurs identifiés par le biais de cette technologie (en particulier avec les SELDI-TOF) n'ont pas été validés. De plus, des marqueurs différents ont été sélectionnés pour les mêmes pathologies par différentes équipes.

Du fait de ces constatations, des études de faisabilité et de validation nous semblaient nécessaires, avant de commencer un projet de recherche de biomarqueurs de grande envergure pour le diagnostic du dysfonctionnement du greffon rénal.

Ce travail nous a permis de proposer une nouvelle méthodologie d'utilisation du MALDI-TOF ; jusqu'à présent, le découplage entre la LC et la MS était considéré comme un inconvénient. Cependant, nous avons pu montrer que les fractions chromatographiques recueillies sur des plaques MALDI pouvaient être conservées pendant une période suffisante (supérieure à 2 mois à +4°C). Cela permettait dans un premier temps le traitement des données MS, et la sélection des marqueurs d'intérêt et dans second temps l'identification de ces derniers (analyses MS/MS).

Cette approche permet un gain de temps considérable. En moyenne, une analyse MS/MS « complète » sur l'ensemble des ions dépasse dix heures, alors que l'analyse des marqueurs sélectionnés ne dure que 17 secondes par ion (en général, une vingtaine d'ions est sélectionnée au cours de l'étape de découverte de biomarqueurs).

Dans notre stratégie, nous avons fait le choix d'explorer seulement le peptidome urinaire. Nous avons constaté que les urines provenant des patients ayant des néphropathies chroniques avaient environ deux fois plus de peptides que celles des patients transplantés stables. Ceci est probablement dû à une activité protéasique plus importante. Des protéases ont peut-être été libérées par les cellules rénales détruites par les agressions que peut subir le rein au cours des processus responsables de la néphropathie chronique.

Les protéines intactes représentent une source de complexité supplémentaire surtout après digestion trypsique, gênant ainsi la détection des peptides. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont montré, que l'utilisation de la trypsine dans l'étude du protéome urinaire gênait la détection des peptides natifs dans les urines, par exemple les fragments de la  $\beta$ 2-microglobuline (Benkali, et al., 2007). Le protéome urinaire est constitué à 99% de protéines majoritaires (protéines sériques, rénales et protéines provenant du tractus urogénital) (Thonkebokred 2004 ; Georgio 2001). L'analyse du sérum ou du plasma nécessite la déplétion de ces protéines (Ahmed 2003 ; Fountoulakis 2004). De même, il serait peut être judicieux d'utiliser la déplétion des protéines urinaires majoritaires pour faciliter la détection des protéines et des peptides les moins abondants. Dans nos travaux, on s'est focalisé sur l'étude du peptidome urinaire, cependant, les marqueurs les plus discriminants des groupes étaient pour la plupart des fragments de protéines urinaires abondantes (albumine, uromoduline...). A ce stade de l'étude, nous n'étions pas en mesure de déterminer la spécificité de ces marqueurs. Ces résultats montrent de façon originale la prédominance des peptides qui proviennent des protéines urinaires majoritaires. La présence de ces marqueurs discriminants est probablement secondaire à l'altération du rein qui laisserait passer ces protéines en plus grandes quantités chez les patients souffrant de néphropathie chronique. Il est possible que ces marqueurs puissent discriminer d'autres pathologies rénales caractérisées par des lésions similaires à celles des néphropathies chroniques de l'allogreffe.

Dans l'étude pilote réalisée sur les patients transplantés rénaux, nous avons pu différencier les patients transplantés stables de ceux ayant des signes histologiques de néphropathie chronique en utilisant l'analyse en composante principale (PCA) non dirigée. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de faire la distinction entre les patients ayant une néphropathie chronique de grade 1 de ceux ayant un grade 3 par l'analyse du peptidome urinaire. Ces résultats confirment l'existence d'une variabilité biologique interindividuelle importante dans la composition du peptidome urinaire (dans notre analyse, elle représentait environ 24% de la variabilité totale), notamment chez les patients ayant une néphropathie chronique. Cette variabilité pourrait être due aux origines diverses de la néphropathie chronique



(néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine, rejet immunologique, infections virales...)  
(Solez, et al., 1993).

La revue de littérature et les résultats des travaux exposés montrent les limites actuelles des approches protéomiques utilisées. De plus, plusieurs études ont été confrontées à l'échec de la validation sur des groupes de patients indépendants. Cet échec est probablement dû au manque de fiabilité des approches protéomiques « classiques », en raison de la démarche utilisée (recherche aveugle et systématique) et de la complexité du protéome urinaire et de ses variabilités (intraindividuelle entre autre).

Cette recherche globale ne permet que l'étude des protéines majoritaires (biomarqueurs de conséquences). Des approches plus rationnelles et ciblées doivent être envisagées afin d'identifier des marqueurs plus spécifiques de lésions rénales. Cela implique en premier lieu une bonne connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie étudiée.

Récemment, de nouvelles méthodologies de recherche de biomarqueurs ont été proposées. Ces approches privilégient l'utilisation de modèles simples, comme les modèles cellulaires (étude du sécrétome) (Hathout, 2007) ou l'étude directe des tissus cibles par imagerie MS. Les modèles cellulaires sont difficilement réalisables pour des systèmes complexes tels que le rein, mais cette approche a un grand intérêt dans la recherche de biomarqueurs pour les cancers (culture cellulaire de lignées cancéreuses).

L'imagerie MS consiste à visualiser la composition moléculaire d'un tissu directement par spectrométrie de masse (MALDI-MS), en d'autres termes à réaliser « une image moléculaire » et à visualiser ainsi une échelle jusque là inexplorée par les études histologiques microscopiques. Cette technique devrait permettre la détection (et plus difficilement l'identification) des biomarqueurs directement dans les tissus étudiés (Brunelle et Laprevote, 2007).

Dans la même logique, l'Histomique semble être une approche très prometteuse pour la découverte de nouveaux biomarqueurs. Elle consiste en l'immunisation d'animaux (rats, souris, lapins) avec des urines provenant de patients atteints de la pathologie rénale étudiée. Les anticorps produits sont utilisés pour un criblage histologique des tissus rénaux. Ainsi, des marqueurs pour chaque partie du rein peuvent être identifiés. Actuellement la société Biotrin commercialise différents tests (immuno-enzymatique) de détection des atteintes rénales (Shaw, 2007). Ces tests ont été développés grâce à cette technique et plusieurs marqueurs ont été identifiés tels que : l' $\alpha$  glutathion S-transférase, marqueur spécifique de l'atteinte du tubule rénal proximal ; la Y1B glutathion S-transférase pour l'atteinte du tubule rénal distal ;

le Renal Papillary Antigen 1 marqueur de l'atteinte du tube collecteur ; le Renal Papillary Antigen 2 de l'atteinte de l'anse de Henlé ; la Clusterin (Apolipoprotéine J) comme marqueur global de l'agression du rein (toxicité médicamenteuse...).

## V. DISCUSSION GENERALE

La finalité de ce travail de thèse était de savoir : « comment pouvons-nous faire mieux avec les moyens dont nous disposons actuellement pour améliorer le devenir des patients transplantés rénaux ? »

Pour répondre à cette question, deux axes différents mais complémentaires ont été explorés : le diagnostic précoce et non invasif du dysfonctionnement du greffon, et la meilleure utilisation des traitements immunosuppresseurs.

La prise en charge rapide des événements altérant le greffon (rénal ou autre), permet sa préservation à long terme. Toutefois, cette intervention implique des conduites à tenir, qui sont différentes et contradictoires. En cas de rejet de greffe, il faut augmenter les doses ou changer les traitements immunosuppresseurs. En revanche, en cas de toxicité, particulièrement les toxicités rénales des inhibiteurs de calcineurine, il est impératif de diminuer les doses des immunosuppresseurs. Le choix de la marche à suivre implique obligatoirement la connaissance presque en temps réel de l'état du greffon. Actuellement, seules les biopsies des greffons permettent de fournir un diagnostic fiable (à condition que ce dernier soit réalisé et validé par plusieurs experts). L'émergence de moyens non invasifs pour le suivi de l'état du greffon est certainement l'outil idéal pour améliorer le devenir des patients transplantés.

D'autre part, l'utilisation de traitements immunosuppresseurs efficaces et non toxiques reste nécessaire à la préservation du greffon à long terme. Pour la plupart de ces traitements le suivi thérapeutique pharmacologique est obligatoire (tacrolimus et ciclosporine) ou au moins recommandé (MMF et sirolimus). Ces molécules se caractérisent par une grande variabilité inter- et intra-patients. Cependant, la recherche des facteurs responsables de cette variabilité sera sans doute d'une grande aide pour l'individualisation des posologies.

Outre les facteurs biologiques et démographiques, le polymorphisme génétique constitue l'une des sources les plus importantes de la variabilité pharmacocinétique inter-patients. Plusieurs études avaient montré l'inégalité des patients face à la toxicité ou à l'efficacité des traitements.

Le polymorphisme génétique des récepteurs nucléaires tels que le PXR pourrait représenter une part importante de la variabilité pharmacocinétique de nombreux médicaments. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans la pharmacocinétique de la majorité des médicaments (50% des molécules sont métabolisées par les CYPs). L'importance de la contribution du polymorphisme du PXR est peut être due à l'induction enzymatique provoquée par les traitements associés chez chaque patient (glucocorticoïdes, statines, inhibiteur des anti-protéases d'HIV...). Le polymorphisme des gènes codant pour les récepteurs nucléaires peut être responsable de variations interindividuelles de cette induction. L'étude de la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique pour ces gènes pourrait être d'un grand intérêt pour améliorer l'efficacité et la tolérance de nombreux médicaments.

Les études pharmacogénétiques constitueront sans doute dans un avenir proche un préalable à la commercialisation d'un grand nombre de médicaments, au même titre que les études de toxicité ou de pharmacocinétique. Ceci sera à l'origine de l'émergence d'une thérapeutique sur mesure pour chaque patient « le bon traitement, à la bonne dose pour le bon patient et en présence de diagnostic de certitude », lui assurant un traitement efficace, moins toxique et à moindre coût. Le suivi thérapeutique pharmacologique et les biomarqueurs servant pour le diagnostic constituent les outils pour atteindre cet objectif. Cela permettra, d'éviter les conséquences dramatiques de la mauvaise utilisation de ces traitements et entraînera inexorablement l'augmentation des dépenses de santé (frais d'hospitalisation, examens complémentaires, traitements correcteurs...).

Comme pour la transplantation rénale, les axes étudiés au cours de cette thèse pourraient présenter un grand intérêt pour l'amélioration de la survie et de la qualité de vie des patients atteints de pathologies silencieuses tels que le diabète, l'hypertension artérielle, les cancers... Ces maladies sont considérées comme des problèmes majeurs de santé publique et peuvent entraîner des séquelles graves et irréversibles. Le diagnostic précoce et les traitements adaptés sont les clés pour la réussite des traitements de ces maladies. Ces outils permettront d'éviter les effets indésirables graves ou la résistance aux traitements comme

c'est le cas par exemple pour les cellules cancéreuses. Le suivi thérapeutique permettra une bonne couverture thérapeutique, quant aux biomarqueurs, ils permettent de poser un diagnostic et de prédire un pronostic, mais aussi, ils peuvent servir comme outils pour : le suivi de l'évolution de la pathologie et de l'efficacité des traitements « en temps réel ». Des exemples intéressants des applications innovantes des biomarqueurs peuvent être évoqués : (i) l'utilisation de profils peptidiques urinaires pour la prise de décision pour une intervention chirurgicale pour corriger une malformation congénitale « l'obstruction de la jonction urtéro-pelvique chez les nouveaux-nés ». L'utilisation de cette démarche non-invasive permet de prédire l'évolution de cette malformation et la nécessité ou non d'une correction chirurgicale de façon très précoce (Decramer, et al., 2006) ; (ii) l'utilisation des biomarqueurs pour l'évaluation de l'effet réno-protecteur du Candesartan (antihypertenseur) chez les patients atteints de néphropathie diabétique, à l'aide d'un profil peptidique spécifique, Rossing et al. ont pu détecter de façon non invasive la dégradation de la fonction rénale chez ces patients (Rossing, et al., 2005).

## VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse, dont les objectifs principaux étaient d'étudier la pharmacocinétique du tacrolimus et de mettre au point une technique pour la recherche de biomarqueurs urinaires, ont permis :

- Une meilleure connaissance de la pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients transplantés rénaux. Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois l'effet du polymorphisme du *hPXR NR1I2* -25385C>T sur l'élimination du tacrolimus. Si ce résultat était confirmé, la connaissance de ce génotype pourrait aider à l'individualisation de la première dose du tacrolimus et la détection des patients potentiellement à risque de toxicité. L'influence de ce génotype devra être confirmée, d'une part sur des populations indépendantes, et d'autre part, par des études *in vitro* sur des cellules transfectées avec le gène muté. Cette étude pourra préciser les conséquences phénotypiques de cette mutation.
- Le développement d'un estimateur Bayésien pouvant prédire avec précision l' $AUC_{0-12h}$  du tacrolimus chez les patients transplantés rénaux, à partir de trois prélèvements sanguins. Cet outil pharmacocinétique compatible avec des pratiques cliniques de routine, permet l'individualisation de la posologie en cours de traitement.
- La mise au point d'une technique Nano-LC-MALDI-TOF/TOF pour la recherche de biomarqueurs urinaires d'atteinte du greffon. La reproductibilité ainsi que le pouvoir discriminant de cette technique ont été vérifiés. Nous avons aussi proposé une nouvelle façon d'utiliser le MALDI-TOF/(TOF). Le découplage entre les différentes étapes permet un gain de temps, nécessaire pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

Cette approche sera appliquée aux patients transplantés rénaux pour lesquels un diagnostic histologique de certitude est disponible. Les échantillons seront répartis dans différents groupes selon l'état histologique du greffon (rejets aigus infra cliniques, rejets aigus, néphrotoxicité due aux immunosuppresseurs et néphropathies chroniques). Cette étude se déroulera en deux phases : i) une première de découverte, où la méthodologie développée sera appliquée ; ii) une deuxième de validation sera menée sur un plus grand

nombre d'échantillons urinaires, en se focalisant uniquement sur les marqueurs sélectionnés au cours de la première étape. L'étape de validation sera réalisée en utilisant un autre type de spectromètre de masse (ESI-MS/MS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Au cours de la validation, on s'intéressera à la quantification relative, voire absolue, de l'abondance des marqueurs sélectionnés au cours de l'étape de recherche, dans les échantillons urinaires d'un groupe de patients indépendant. Dans cette optique, des travaux de mise au point sont en cours au sein de notre laboratoire.

## VII. BIBLIOGRAPHIE

Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV and Mann M (2006) The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* **7**:R80.

Aebersold R and Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**:198-207.

Afssaps. Résumé des caractéristiques du produit "Myfortic" - Rapport public d'évaluation. 2005.

Ref Type: Generic

Albertsen PC (2005) Is screening for prostate cancer with prostate specific antigen an appropriate public health measure? *Acta Oncol* **44**:255-264.

Anderson NL and Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**:845-867.

Andree H, Nickel P, Nasiadko C, Hammer MH, Schonemann C, Pruss A, Volk HD and Reinke P (2006) Identification of dialysis patients with panel-reactive memory T cells before kidney transplantation using an allogeneic cell bank. *J Am Soc Nephrol* **17**:573-580.

Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C and Thervet E (2003a) Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **18**:2409-2414.

Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C and Thervet E (2003b) Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* **14**:1889-1896.

Antignac M, Barrou B, Farinotti R, Lechat P and Urien S (2007) Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* **64**:750-757.

Antignac M, Hulot JS, Boleslawski E, Hannoun L, Touitou Y, Farinotti R, Lechat P and Urien S (2005) Population pharmacokinetics of tacrolimus in full liver transplant patients: modelling of the post-operative clearance. *Eur J Clin Pharmacol* **61**:409-416.

Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS and Hricik DE (2005) Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* **5**:1971-1975.



Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N and Hall J (1999) Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* **66**:288-294.

Beal SL and Sheiner LB (1980) The NONMEM system. *Amer Statist* **34**:118-119.

Benkali K, Marquet P, Le Meur Y and Gastinel LN. Preliminary evaluation of a nanoLC MALDI-Tof/Tof spectrometry method for the investigation of urine biomarkers of kidney allograft acute rejection. *Ther Drug Monit.* 29(4), 487. 2007.  
Ref Type: Abstract

Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P and Berkenstam A (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12208-12213.

Borcherding SM, Bastian TL, Self TH, Abou-Shala N, LeDuc BW and Lalonde RL (1992) Two- and four-day rifampin chemoprophylaxis regimens induce oxidative metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1553-1558.

Borst P, Schinkel AH, Smit JJ, Wagenaar E, Van Deemter L., Smith AJ, Eijdemans EW, Baas F and Zaman GJ (1993) Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol Ther* **60**:289-299.

Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Chadban SJ, Dowling J, Jose M, Metz CN, Bucala R and Atkins RC (2001a) Urine macrophage migration inhibitory factor concentrations as a diagnostic tool in human renal allograft rejection. *Transplantation* **71**:1777-1783.

Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Chadban SJ, Dowling J, Jose M, Metz CN, Bucala R and Atkins RC (2001b) Urine macrophage migration inhibitory factor concentrations as a diagnostic tool in human renal allograft rejection. *Transplantation* **71**:1777-1783.

Brunelle A and Laprevote O (2007) Recent advances in biological tissue imaging with Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry: polyatomic ion sources, sample preparation, and applications. *Curr Pharm Des* **13**:3335-3343.

Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA and Kunzendorf U (2001) An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **12**:1947-1957.

Calne RY, Collier DS, Lim S, Pollard SG, Samaan A, White DJ and Thiru S (1989) Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* **2**:227.

Camara NO, Silva MS, Nishida S, Pereira AB and Pacheco-Silva A (2004) Proximal tubular dysfunction is associated with chronic allograft nephropathy and decreased long-term renal-graft survival. *Transplantation* **78**:269-275.

Carlson SM, Najmi A, Whitin JC and Cohen HJ (2005) Improving feature detection and analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectra. *Proteomics* **5**:2778-2788.

- Chiba K, Hoshino Y, Ohtsuki M, Kataoka H, Maeda Y, Matsuyuki H, Sugahara K, Kiuchi M, Hirose R and Adachi K (2005) Immunosuppressive activity of FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor agonist: I. Prevention of allograft rejection in rats and dogs by FTY720 and FTY720-phosphate. *Transplant Proc* **37**:102-106.
- Christians U, Braun F, Kosian N, Schmidt M, Schiebel HM, Ernst L, Kruse C, Winkler M, Holze I, Linck A and . (1991) High performance liquid chromatography/mass spectrometry of FK 506 and its metabolites in blood, bile, and urine of liver grafted patients. *Transplant Proc* **23**:2741-2744.
- Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS and Molmenti EP (2003b) Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* **237**:660-664.
- Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS and Molmenti EP (2003a) Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* **237**:660-664.
- Clipstone NA and Crabtree GR (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**:695-697.
- Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, Carter S, Cavallo T, Haas M, Lindblad A, Manivel JC, Nast CC, Salomon D, Weaver C and Weiss M (1997) Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* **8**:1930-1941.
- Davis MT, Spahr CS, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, Mort J, Yu W, Luethy R and Patterson SD (2001) Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics* **1**:108-117.
- de Jonge H., M Naesens, D R Kuypers. The pregnane X receptor C-25385T single nucleotide polymorphism (SNP) does not affect tacrolimus pharmacokinetics in a large cohort of renal transplant recipients. *Ann transplant* **13** [Supplement 1], 33. 2008. Ref Type: Abstract
- Decramer S, Wittke S, Mischak H, Zurbig P, Walden M, Bouissou F, Bascands JL and Schanstra JP (2006) Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med* **12**:398-400.
- Deuse T, Velotta JB, Hoyt G, Govaert JA, Taylor V, Masuda E, Herlaar E, Park G, Carroll D, Pelletier MP, Robbins RC and Schrepfer S (2008) Novel immunosuppression: R348, a. *Transplantation* **85**:885-892.
- Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhanian D, Medeiros M, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma VK, Kapur S and Suthanthiran M (2003) CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* **75**:1307-1312.
- Djebli N, Rousseau A, Hoizey G, Rerolle JP, Toupance O, Le MY and Marquet P (2006) Sirolimus population pharmacokinetic/pharmacogenetic analysis and bayesian modelling in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* **45**:1135-1148.

- Dussault I, Lin M, Hollister K, Wang EH, Synold TW and Forman BM (2001) Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *J Biol Chem* **276**:33309-33312.
- Efron B and Tibshirani RJ (1993) *The Jackknife. In an introduction to the Bootstrap*. New York.
- Elens L, Capron A, Kerckhove VV, Lerut J, Mourad M, Lison D, Wallemacq P and Haufroid V (2007) 1199G>A and 2677G>T/A polymorphisms of ABCB1 independently affect tacrolimus concentration in hepatic tissue after liver transplantation. *Pharmacogenet Genomics* **17**:873-883.
- Elion GB (1993) The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* **685**:400-407.
- Espina V, Mehta AI, Winters ME, Calvert V, Wulfkühle J, Petricoin EF, III and Liotta LA (2003) Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics* **3**:2091-2100.
- European FK506 Multicenter liver study (1994) Randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* **13**:423-428.
- European Medicine Agency. Rapport européen public d'évaluation (EPAR) : Advagraf. (H-C-712). 2008.  
Ref Type: Generic
- Fehrenbach T, Cui Y, Faulstich H and Keppler D (2003) Characterization of the transport of the bicyclic peptide phalloidin by human hepatic transport proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**:415-420.
- First MR (2008) First clinical experience with the new once-daily formulation of tacrolimus. *Ther Drug Monit* **30**:159-166.
- Fliser D, Wittke S and Mischak H (2005) Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes. *Electrophoresis* **26**:2708-2716.
- Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW and MacPhee IA (2006) Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* **82**:705-708.
- Fukatsu S, Yano I, Igarashi T, Hashida T, Takayanagi K, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K, Tanaka K and Inui K (2001) Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* **57**:479-484.
- Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Egawa H, Uemoto S and Inui K (2006) Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* **80**:331-345.

- Garcia Sanchez MJ, Manzanares C, Santos-Buelga D, Blazquez A, Manzanares J, Urruzuno P and Medina E (2001) Covariate effects on the apparent clearance of tacrolimus in paediatric liver transplant patients undergoing conversion therapy. *Clin Pharmacokinet* **40**:63-71.
- Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, Garcia-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H and Agundez JA (2002) CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* **71**:196-204.
- Gebel HM, Bray RA and Nickerson P (2003) Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* **3**:1488-1500.
- Gloor JM, Cohen AJ, Lager DJ, Grande JP, Fidler ME, Velosa JA, Larson TS, Schwab TR, Griffin MD, Prieto M, Nyberg SL, Sterioff S, Kremers WK and Stegall MD (2002) Subclinical rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Transplantation* **73**:1965-1968.
- Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M, Tanaka K and Inui K (2004) CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* **14**:471-478.
- Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H and Imanaka H (1987) Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* **19**:4-8.
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O., Zundler J and Kroemer HK (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* **104**:147-153.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y and Aebersold R (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9390-9395.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**:1-18.
- Halloran PF (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* **351**:2715-2729.
- Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ and Goldfarb PS (2002) Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res* **500**:103-110.
- Hathout Y (2007) Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics* **4**:239-248.
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M., Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP and Wallemacq P (2004) The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* **14**:147-154.

Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M., Eddour DC, Malaise J, Lison D and Mourad M (2006) CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant* **6**:2706-2713.

Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, Gauer S, Sichler O, Scheuermann EH, Ackermann H, Pfeilschifter JM, Geiger H, Grone HJ and Radeke HH (2005) Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol* **16**:1849-1858.

Hebert MF (1997) Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **27**:201-214.

Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN and Lechler RI (2003) Immunologic monitoring. *Immunol Rev* **196**:247-264.

Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, Glotz D, Ancel PY, Rondeau E and Xu-Dubois YC (2006) Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant* **6**:2937-2946.

Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden I, van der Werf M., Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W and van Gelder T. (2003) Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* **74**:245-254.

Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, Dantal J, Giral M, Blancho G, Cantarovich D, Karam G, Follea G, Soulillou JP and Bignon JD (2005) Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* **16**:2804-2812.

Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, DeJelo C, Schulak JA and Heeger PS (2003) Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **3**:878-884.

Hu RH, Lee PH and Tsai MK (2000) Clinical influencing factors for daily dose, trough level, and relative clearance of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* **32**:1689-1692.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM and Wojnowski L (2001a) The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* **11**:773-779.

Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E, Eiselt R, Mueller R, Fuss C, Brehm I, Brinkmann U, Eichelbaum M, Wojnowski L and Burk O (2001b) Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **29**:1454-1459.

Josephson MA, Javadi B, Kadambi PV, Meehan SM and Williams JW (2006) Leflunomide in solid organ transplantation and polyoma virus infection. *Adv Exp Med Biol* **577**:255-265.

Jotti GS and Bombardieri E (1990) Circulating tumor markers in breast cancer (review). *Anticancer Res* **10**:253-258.

Jurgens M, Appel A, Heine G, Neitz S, Menzel C, Tammen H and Zucht HD (2005) Towards characterization of the human urinary peptidome. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**:757-765.

Karanam BV, Vincent SH, Newton DJ, Wang RW and Chiu SH (1994) FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **22**:811-814.

Karas M and Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**:2299-2301.

Karin M (1998) New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* **93**:487-490.

Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Pochinco D, Milley D and Nickerson P (2003) Heightened peripheral blood lymphocyte CD69 expression is neither sensitive nor specific as a noninvasive diagnostic test for renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **14**:226-233.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliwer S, Willson TM and Edwards PA (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**:2908-2915.

Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M and Kawarazaki H (1992) Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet* **339**:580-581.

Kenrick KG and Margolis J (1970) Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem* **33**:204-207.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR (2001) Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* **70**:189-199.

Knechtle SJ, Pirsch JD, Fechner H, Becker BN, Friedl A, Colvin RB, Lebeck LK, Chin LT, Becker YT, Odorico JS, D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Hamawy MM, Hu H, Bloom DD and Sollinger HW (2003) Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant* **3**:722-730.

Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, Burdick J, Elmagd KA, Zeevi A, Lopez-Cepero M, Daller JA, Gritsch HA, Reed EF, Jonsson J, Hawkins D and Britz JA (2006) Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* **82**:663-668.

Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM and Clark AG (2003) Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* **13**:481-494.

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 and Schuetz E (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* **27**:383-391.

Kusuhara H, Suzuki H and Sugiyama Y (1998) The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J Pharm Sci* **87**:1025-1040.

Kuypers DR, de Jonge H., Naesens M, Lerut E, Verbeke K and Vanrenterghem Y (2007) CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* **82**:711-725.

Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M and Kelly KJ (2003) Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am J Kidney Dis* **41**:1074-1087.

Lafitte D, Dussol B, Andersen S, Vazi A, Dupuy P, Jensen ON, Berland Y and Verdier JM (2002) Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin Biochem* **35**:581-589.

Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R and Schuetz E (2008) Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression. *Drug Metab Dispos* **36**:169-181.

Lamba V, Yasuda K, Lamba JK, Assem M, Davila J, Strom S and Schuetz EG (2004) PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:251-265.

Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE and Suthanthiran M (2001) Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* **344**:947-954.

Li D, Gui R, Li J, Huang Z and Nie X (2006) Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant patients is related to MDR1 gene C3435T polymorphisms. *Transplant Proc* **38**:2850-2852.

Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ and Zhang GL (2007) Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther* **32**:505-515.

Lopez-Montes A, Gallego E, Lopez E, Perez J, Lorenzo I, Llamas F, Serrano A, Andres E, Illescas L and Gomez C (2004) Treatment of tuberculosis with rifabutin in a renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis* **44**:e59-e63.

Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ and Watkins PB (1997) Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* **62**:248-260.

- MacPhee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L and Holt DW (2005) Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* **79**:499-502.
- Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L and Holt DW (2002) Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* **74**:1486-1489.
- Mai I, Perloff ES, Bauer S, Goldammer M, Johne A, Filler G, Budde K and Roots I (2004) MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* **58**:548-553.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T and Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **75**:13-33.
- Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek K, King A, Cotterell A, Ferreira-Gonzalez A, Rodgers C, Fisher RA and Posner M (2005) Study of mRNA growth factors in urinary cells of kidney transplant recipients as predictors of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* **80**:1686-1691.
- Matinlauri IH, Kyllonen LE, Salmela KT, Helin H, Pelzl S and Susal C (2005) Serum sCD30 in monitoring of alloresponse in well HLA-matched cadaveric kidney transplantations. *Transplantation* **80**:1809-1812.
- Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P and Kotsch K (2006b) Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* **69**:1683-1690.
- Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P and Kotsch K (2006a) Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* **69**:1683-1690.
- McKeon F (1991) When worlds collide: immunosuppressants meet protein phosphatases. *Cell* **66**:823-826.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J and Devarajan P (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**:2534-2543.
- Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Habuchi T and Suzuki T (2008) Influence of CYP3A5, ABCB1 and NR1I2 polymorphisms on prednisolone pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Steroids*.
- Moore JT and Kliever SA (2000) Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology* **153**:1-10.
- Moreso F, Ibernón M, Goma M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM and Seron D (2006) Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* **6**:747-752.



- Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van BC, Van Kerckhove V, De Meyer M., Malaise J, Eddour DC, Lison D, Squifflet JP and Haufroid V (2005) Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* **80**:977-984.
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE and Suthanthiran M (2005) Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* **353**:2342-2351.
- Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Volk HD, Reinke P, Kapur S and Suthanthiran M (2003) Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* **75**:1565-1570.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD and Chapman JR (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* **349**:2326-2333.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD and Chapman JR (2004) Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* **78**:242-249.
- Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, Tullius SG, Volk HD and Reinke P (2004) Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* **78**:1640-1646.
- Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P and Rush D (1999) Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* **10**:1801-1805.
- Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M and Kivistö KT (2004) High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* **14**:429-440.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-4021.
- O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, Butt K, Chander PM, Rahman S, Mya M, Hu R, Momin J, Eng EW, Hampel DJ, Hartman B, Kretzler M, Delaney V and Goligorsky MS (2004) Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **15**:3240-3248.
- Oh J, Pyo JH, Jo EH, Hwang SI, Kang SC, Jung JH, Park EK, Kim SY, Choi JY and Lim J (2004) Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* **4**:3485-3497.
- Olthoff JK, Lys IA and Cotter RJ (1988) A pulsed time-of-flight mass spectrometer for liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**:171-175.

- Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S and Edelstein CL (2004) Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* **43**:405-414.
- Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL and Devarajan P (2006) Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* **6**:1639-1645.
- Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001b) Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem* **268**:6346-6358.
- Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001a) Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem* **268**:6346-6358.
- Peddi VR, Bryant M, Roy-Chaudhury P, Woodle ES and First MR (2002) Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* **73**:1514-1518.
- Peters DH, Fitton A, Plosker GL and Faulds D (1993) Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* **46**:746-794.
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC and Liotta LA (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **359**:572-577.
- Pfister C and Basuyau JP (2005) Current usefulness of free/total PSA ratio in the diagnosis of prostate cancer at an early stage. *World J Urol* **23**:236-242.
- Physicians Desk Reference. Prograf. 50th ed. Montvale, 1042-1045. 1996. Medical Economics Company.  
Ref Type: Generic
- Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, Makusky AJ, Mondal M, Seonarain M, Field E, Schatz CR, Estock MA, Ahmed N, Anderson NG and Steiner S (2004) Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* **4**:1159-1174.
- Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F and Filo RS (1997) A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* **63**:977-983.
- Poggio ED, Clemente M, Hricik DE and Heeger PS (2006) Panel of reactive T cells as a measurement of primed cellular alloimmunity in kidney transplant candidates. *J Am Soc Nephrol* **17**:564-572.
- Pou L, Brunet M, Andres I, Rodamilans M, Lopez R and Corbella J (1998) Influence of posttransplant time on dose and concentration of tacrolimus in liver transplant patients. *Transpl Int* **11 Suppl 1**:S270-S271.

Prischl F, Gremmel F, Schwabe M, Schindler J, Balcke P, Kopsa H, Pinter G, Schwarzmeier J and Zazgornik J (1989) Beta-2-microglobulin for differentiation between ciclosporin A nephrotoxicity and graft rejection in renal transplant recipients. *Nephron* **51**:330-337.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y and . (1999b) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* **55**:713-723.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y and . (1999a) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* **55**:713-723.

Rajakariar R, Jivanji N, Varagunam M, Rafiq M, Gupta A, Sheaff M, Sinnott P and Yaqoob MM (2005) High pre-transplant soluble CD30 levels are predictive of the grade of rejection. *Am J Transplant* **5**:1922-1925.

Reichelt O, Muller J, von Eggeling F., Driesch D, Wunderlich H, Schubert J, Grone HJ, Stein G, Ott U and Junker K (2006) Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using ProteinChip Arrays (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). *Urology* **67**:472-475.

Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U and Cascorbi I (2007) CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* **81**:228-234.

Roberti I and Reisman L (2001) Serial evaluation of cell surface markers for immune activation after acute renal allograft rejection by urine flow cytometry--correlation with clinical outcome. *Transplantation* **71**:1317-1320.

Robertson H, Ali S, McDonnell BJ, Burt AD and Kirby JA (2004) Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J Am Soc Nephrol* **15**:390-397.

Rossing K, Mischak H, Parving HH, Christensen PK, Walden M, Hillmann M and Kaiser T (2005) Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int* **68**:193-205.

Roxe DM, Siddiqui F, Santhanam S, del GF and Wolf J (1981) Rationale and application of beta-2-microglobulin measurements to detect acute transplant rejection. *Nephron* **27**:260-264.

Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B and Roger M (2006) Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* **16**:659-665.

Sadeghi M, Daniel V, Weimer R, Wiesel M, Hergesell O and Opelz G (2003a) Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant* **17**:151-157.

Sadeghi M, Daniel V, Weimer R, Wiesel M, Hergesell O and Opelz G (2003b) Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant* **17**:151-157.

Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R and Komano T (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* **268**:6077-6080.

Saint-Marcoux F, Debord JHG and Tribut OCMSGMP. In the post-APOMYGRE era: ISBA, a free website for Bayesian dose adjustment of immunosuppressive drugs. IATDMCT, Nice, France 2007 21(Suppl. Jun 2007), 46. 2007.  
Ref Type: Abstract

Saint-Marcoux F, Knoop C, Debord J, Thiry P, Rousseau A, Estenne M and Marquet P (2005) Pharmacokinetic study of tacrolimus in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis lung transplant patients and design of Bayesian estimators using limited sampling strategies. *Clin Pharmacokinet* **44**:1317-1328.

Sam WJ, Aw M, Quak SH, Lim SM, Charles BG, Chan SY and Ho PC (2000) Population pharmacokinetics of tacrolimus in Asian paediatric liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* **50**:531-541.

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL and Gonzalez FJ (2000) CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* **67**:48-56.

Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U and Sewing KF (1992) Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* **20**:753-761.

Schaub S, Mayr M, Honger G, Bestland J, Steiger J, Regeniter A, Mihatsch MJ, Wilkins JA, Rush D and Nickerson P (2007) Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplantation* **84**:104-112.

Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J and Nickerson P (2004a) Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **15**:219-227.

Schaub S, Wilkins J, Weiler T, Sangster K, Rush D and Nickerson P (2004b) Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int* **65**:323-332.

Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhin O, Weiler T, Rush D and Nickerson P (2005) Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* **5**:729-738.

Scholten EM, Cremers SC, Schoemaker RC, Rowshani AT, van Kan EJ, den Hartigh J., Paul LC and de Fijter JW (2005) AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int* **67**:2440-2447.

Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG and Schreier MH (1997) SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* **64**:36-42.

Schulz-Knappe P, Schrader M and Zucht HD (2005) The peptidomics concept. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**:697-704.

Sevinc A, Camci C, Turk HM and Buyukberber S (2003) How to interpret serum CA 125 levels in patients with serosal involvement? A clinical dilemma. *Oncology* **65**:1-6.

Shaw M (2007) Clinical Biomarkers Forum: harnessing the potential of biomarkers from translational research throughout clinical trials. *Expert Rev Mol Diagn* **7**:759-760.

Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC and Susal C (2003) Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* **3**:1121-1127.

Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF and . (1993) International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* **44**:411-422.

Sollinger HW (1995) Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* **60**:225-232.

Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Beierle J, Mort J, Courchesne PL, Chen K, Wahl RC, Yu W, Luethy R and Patterson SD (2001) Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics* **1**:93-107.

Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG and Tett SE (2001) Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation* **72**:1056-1061.

Staatz CE, Willis C, Taylor PJ and Tett SE (2002) Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* **72**:660-669.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH and Kliewer SA (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3369-3374.

Tada H, Satoh S, Iinuma M, Shimoda N, Murakami M, Hayase Y, Kato T and Suzuki T (2003) Chronopharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: occurrence of acute rejection. *J Clin Pharmacol* **43**:859-865.

Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, Goto T and Okuhara M (1987) Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* **19**:11-16.

- Tanigawara Y (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* **22**:137-140.
- Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S and Joos TO (2003) Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* **3**:2155-2166.
- Teppo AM, Honkanen E, Ahonen J and Gronhagen-Riska C (2000) Changes of urinary alpha1-microglobulin in the assessment of prognosis in renal transplant recipients. *Transplantation* **70**:1154-1159.
- Teppo AM, Honkanen E, Finne P, Tornroth T and Gronhagen-Riska C (2004a) Increased urinary excretion of alpha1-microglobulin at 6 months after transplantation is associated with urinary excretion of transforming growth factor-beta1 and indicates poor long-term renal outcome. *Transplantation* **78**:719-724.
- Teppo AM, Honkanen E, Finne P, Tornroth T and Gronhagen-Riska C (2004b) Increased urinary excretion of alpha1-microglobulin at 6 months after transplantation is associated with urinary excretion of transforming growth factor-beta1 and indicates poor long-term renal outcome. *Transplantation* **78**:719-724.
- Terasaki PI and Ozawa M (2005) Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* **80**:1194-1197.
- Theodorescu D, Fliser D, Wittke S, Mischak H, Krebs R, Walden M, Ross M, Eltze E, Bettendorf O, Wulfing C and Semjonow A (2005) Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* **26**:2797-2808.
- Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, Mischak H and Frierson HF (2006) Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* **7**:230-240.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7735-7738.
- Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM and Klein JB (2002) Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* **62**:1461-1469.
- Thummel KE (2004) A genetic test for immunosuppressant dose selection? *Pharmacogenetics* **14**:145-146.
- Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T and Kato T (2004) Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* **78**:1182-1187.
- Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y and Inui K (2006) Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* **16**:119-127.

Undre NA and Schafer A (1998) Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. *Transplant Proc* **30**:1261-1263.

van Schaik RH, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN and Lindemans J (2000) CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* **46**:1834-1836.

Venkataramanan R, Jain A, Warty VS, Ilesiani M, Lever J, Krajak A, Flowers J, Mehta S, Zuckerman S and . (1991) Pharmacokinetics of FK 506 in transplant patients. *Transplant Proc* **23**:2736-2740.

Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G and Starzl T (1995) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* **29**:404-430.

Vincent SH, Karanam BV, Painter SK and Chiu SH (1992) 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* **294**:454-460.

Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, Neylan J, Wilkinson A, Ekberg H, Gaston R, Backman L and Burdick J (1998) Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* **338**:161-165.

Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanche G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K and Charpentier B (2005) Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* **353**:770-781.

Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S and Wright JG, Jr. (2001) Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* **158**:1491-1502.

Wahrman M, Exner M, Haidbauer B, Schillinger M, Regele H, Kormoczi G and Bohmig GA (2005) [C4d]FlowPRA screening--a specific assay for selective detection of complement-activating anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* **66**:526-534.

Wallemacq P. Current trends in transplantation tacrolimus therapy, drug monitoring and patient quality of life. IATDMCT, Nice, France 2007 . 2007. Ref Type: Abstract

Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA and Guzelian PS (1989) Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest* **83**:688-697.

Westphal K, Weinbrenner A, Giessmann T, Stuhr M, Franke G, Zschiesche M, Oertel R, Terhaag B, Kroemer HK and Siegmund W (2000) Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* **68**:6-12.

Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M and Fenn JB (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* **57**:675-679.

Wilm M and Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**:1-8.

Wittke S, Fliser D, Haubitz M, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, Hillmann M, Golovko I, Koester P, Haller H, Kaiser T, Mischak H and Weissinger EM (2003) Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *J Chromatogr A* **1013**:173-181.

Wittke S, Haubitz M, Walden M, Rohde F, Schwarz A, Mengel M, Mischak H, Haller H and Gwinner W (2005) Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **5**:2479-2488.

Wong KM, Shek CC, Chau KF and Li CS (2000) Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* **35**:660-666.

Yussim A, Sandbank J, Nakache R, Shaharabani E, Shmueli D, Lustig S, Bar-Nathan N, Geyer E, Sobolev V, Or H and . (1994) Detection of preservation-induced tubular damage by fine needle aspiration and tetrazolium-based quantitative cell viability assay. *Transplant Proc* **26**:2379-2381.

Zahir H, McLachlan AJ, Nelson A, McCaughan G, Gleeson M and Akhlaghi F (2005) Population pharmacokinetic estimation of tacrolimus apparent clearance in adult liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* **27**:422-430.

Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR, Jr., Schuetz EG and Boguski MS (2001) The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* **11**:555-572.

Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q and Wang W (2005) Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* **37**:178-181.

Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, Boyle G, Law Y, Miller S, Lamba J and Burckart GJ (2003) Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* **3**:477-483.

Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, Webber S, Ristich J, Dauber J, Iacono A, Grgurich W, Zaldonis D, McDade K, Zhang J and Burckart GJ (2004) Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* **44**:135-140.