

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Biologie - Santé

Faculté de Médecine

INSERM UMR-S850

Thèse N°[312011]

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline/S spécialité : Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Jean Baptiste WOILLARD

Le 20 septembre 2011

Pharmacogénétique des immunosuppresseurs en transplantation rénale
: étude d'association entre polymorphismes et effets indésirables,
modélisation pharmacogénétique et
pharmacogénétique/pharmacocinétique

Thèse dirigée par le Professeur Annick ROUSSEAU et le Docteur Nicolas PICARD

JURY :

Rapporteurs

Pr Etienne CHATELUT, Professeur-Praticien Hospitalier (Université Paul Sabatier Toulouse)

Pr Vincent HAUFROID, Professeur-Praticien Hospitalier (Université catholique de Louvain)

Examineurs

Pr Nassim KAMAR, Professeur-Praticien Hospitalier (Université Paul Sabatier Toulouse)

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

Pr Annick ROUSSEAU, Professeur (Université de Limoges)

Dr Nicolas PICARD, Maître de Conférences-Praticien Hospitalier (Université de Limoges)

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Annick Rousseau et Monsieur le Docteur Nicolas Picard

Merci pour tout le travail réalisé ensemble, pour tout ce que vous m'avez enseigné, pour tous vos conseils. Ce fut un grand plaisir de travailler à vos côtés et une expérience extrêmement enrichissante.

A Monsieur le Professeur Etienne Chatelut

Merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être rapporteur et de l'honneur que vous me faites en participant à ce jury. Merci plus particulièrement pour m'avoir passé le virus de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la pharmacogénétique à travers vos brillants enseignements à la faculté de pharmacie de Toulouse.

A Monsieur le Professeur Vincent Haufroid

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

A Monsieur le Professeur Nassim Kamar

Je suis très sensible à votre présence dans ce jury de thèse. La collaboration sur certains des travaux de cette thèse a été un réel plaisir et je vous en remercie.

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet

Merci pour l'accueil dans l'équipe de recherche et dans le service, merci pour les conseils, les suggestions qui m'ont permis de progresser au cours de ce travail.

Thèse financé par la région Limousin.

A Marie Laurence, ma famille, mes amis, mes collègues

RESUME

De nombreuses études pharmacogénétiques (PG) ont été réalisées sur les immunosuppresseurs (IS). Cependant, beaucoup se sont intéressées à leur pharmacocinétique (PK) alors que le plus souvent le Suivi Thérapeutique Pharmacologique permet de compenser des différences d'exposition d'origine génétique. Peu d'études PG ont été réalisées sur les effets indésirables des IS, parfois indépendants des concentrations sanguines d'IS. Dans une première partie, après un bref rappel méthodologique, les résultats d'études d'association PG-effets indésirables des IS sont présentés. L'étude réalisée sur la perte du greffon rénal a permis de mettre en évidence l'effet majeur des polymorphismes de la P-glycoprotéine (P-gp) du donneur et laisse penser qu'une diminution d'activité de la P-gp pourrait aboutir à long terme à une majoration de la toxicité de la ciclosporine par accumulation intracellulaire. Le travail réalisé sur les effets indésirables digestifs du mycophénolate mofétil (MMF) a montré une diminution du risque de diarrhée chez les patients porteurs de l'allèle *UGT1A8*2* qui diminue l'activité cette enzyme intestinale. Enfin, l'étude des polymorphismes des principales protéines de la voie m-TOR fait ressortir une diminution de la concentration d'hémoglobine chez les patients porteurs d'un haplotype particulier de la m-TOR. Dans une deuxième partie, l'intégration de données génétiques aux outils d'individualisation thérapeutique a été étudiée avec un travail de modélisation de population de la PK de l'Advagraf® et du Prograf® confirmant le rôle du polymorphisme CYP3A5 sur la PK du tacrolimus et permettant le développement d'un estimateur bayésien intégrant ce polymorphisme.

Mots clés : pharmacogénétique, pharmacocinétique, immunosuppresseurs, ciclosporine, tacrolimus, MMF, sirolimus, études d'associations, effets indésirables.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 :	INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE 2 :	ASSOCIATION ENTRE POLYMORPHISMES ET EFFETS INDESIRABLES DES IMMUNOSUPPRESSEURS	14
I	DEFINITION ET METHODOLOGIE DES ETUDES D'ASSOCIATION EN PHARMACOGENETIQUE.....	14
I.1	<i>Principe général d'une étude d'association en pharmacogénétique</i>	<i>15</i>
I.1.(1)	Marqueurs génétiques étudiés.....	15
I.1.(2)	Choix des modèles génétiques	18
I.1.(3)	Nature des phénotypes étudiés et stratégie d'étude	19
I.1.(4)	Puissance et nombre de sujets nécessaires.....	21
I.1.(5)	Méthodes de sélection et de validation d'un marqueur génétique prédictif.....	21
II	ETAT DE L'ART ET REVUE DE LA LITTERATURE.....	25
II.1	<i>Principales protéines impliquées dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs et variabilité génétique.....</i>	<i>25</i>
II.1.(1)	CYP3A.....	30
II.1.(1)	UDP-Glucuronosyl-Transferases (UGTs)	32
II.1.(1)	P-glycoprotéine (P-gp)	35
II.1.(2)	Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2).....	38
II.1.(3)	Organic anion transporter peptides (OATP)	41
II.2	<i>Associations pharmacogénétique/pharmacocinétique/pharmacodynamie.....</i>	<i>43</i>
II.2.(1)	Acide mycophénolique	43
II.2.(2)	Inhibiteurs de la calcineurine (Ciclosporine A et Tacrolimus).....	51
II.2.(3)	Sirolimus	56
III	TRAVAUX PERSONNELS : ETUDES D'ASSOCIATIONS.....	60
CHAPITRE 3 :	MODELISATION PHARMACOGENETIQUE/PHARMACOCINETIQUE APPLIQUEE AUX MEDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS ADMINISTRES AUX TRANSPLANTES RENAUX	111
I	INTRODUCTION.....	111
II	DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PHARMACOGENETIQUE / PHARMACOCINETIQUE PAR LA METHODE DES MODELES NON LINEAIRES A EFFETS MIXTES.....	113
II.1	<i>Analyse des covariables génétiques.....</i>	<i>113</i>
II.1.(1)	Comparaison des modèles.....	115
II.2	<i>Modèle de mélange.....</i>	<i>115</i>
II.2.(1)	Introduction.....	115
II.2.(2)	Méthodologie	116
III	TRAVAUX PERSONNEL CONCERNANT LA MODELISATION PG/PK DU TACROLIMUS.....	117
CHAPITRE 4 :	DISCUSSION/CONCLUSION	131
CHAPITRE 5 :	BIBLIOGRAPHIE.....	136

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. INDIVIDUAL IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS AND SITES OF ACTION IN THE THREE-SIGNAL MODEL D'APRÈS DANESI ET COL., 2000, MOL MED TODAY ²³	11
FIGURE 2. PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME ET LE TRANSPORT DE LA CICLOSPORINE (CSA)	26
FIGURE 3. PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME ET LE TRANSPORT DU TACROLIMUS (TAC)	27
FIGURE 4. PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME ET LE TRANSPORT DU MYCOPHENOLATE MOFETIL (MMF)	28
FIGURE 5. PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME ET LE TRANSPORT DU SIROLIMUS (SRL).....	29
FIGURE 6. DIFFERENTS DOMAINES DE LA PROTEINE D'EFFLUX MDR1 (SNP NON SYNONYMES EN ROUGE ET SYNONYMES EN VERT, EXONS DANS LES CARRES NOIRS) (THE UCSF PHARMACOGENOMICS OF MEMBRANE TRANSPORTERS PROJECT DATABASE IS SUPPORTED BY NIH/NIGMS (U01 GM61390)).	36
FIGURE 7. DIFFERENTS DOMAINES DE LA PROTEINE D'EFFLUX MRP2 (SNP NON SYNONYMES EN ROUGE ET SYNONYMES EN VERT, EXONS DANS LES CARRES NOIRS). (THE UCSF PHARMACOGENOMICS OF MEMBRANE TRANSPORTERS PROJECT DATABASE IS SUPPORTED BY NIH/NIGMS (U01 GM61390)).	39

GLOSSAIRE

MMF : mycophénolate mofétil

m-TOR : mammalian target of rapamycin

P-gp : P-glycoprotéine

IL : interleukine

IMPDH : inosine mono phosphate déshydrogénase

MPA : acide mycophénolique

PK : pharmacocinétique

PD : pharmacodynamie

PG : pharmacogénétique

STP : suivi thérapeutique pharmacologique

CYP : cytochrome P-450

AUC : area under the curve

SNP : single nucleotid polymorphism

AcMPAG : acide mycophénolique-acyl-glucuronide

MPAG : acide mycophénolique hydroxy-beta-glucuronide

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Plus d'un demi-siècle s'est écoulé depuis la première transplantation d'organe en 1954. La transplantation rénale est devenue le traitement de choix pour des patients au stade terminal de maladies rénales ^{1,2} et ceci grâce à la découverte et au développement des médicaments immunosuppresseurs ^{3,4}. L'objectif principal de l'immunosuppression est de maintenir le greffon fonctionnel en ciblant l'activation des cellules T et la production de cytokines, l'expansion clonale, tout en limitant les risques de toxicité ⁵. Au cours des deux dernières décennies, différents protocoles thérapeutiques ont été évalués pour maximiser l'efficacité du traitement immunosuppresseur. Le traitement se déroule en trois phases. La première est une phase d'induction au cours de laquelle une puissante immunosuppression est instaurée ; elle démarre lors de l'opération (ou immédiatement après), c'est à dire lorsque le risque de rejet de l'allogreffe est le plus fort ⁵. Les médicaments utilisés en France pour cette phase sont en général une globuline antithymocyte (Thymoglobuline®) et un antagoniste du récepteur de l'IL2 (basiliximab, Simulect®) ³. De fortes doses de corticoïdes sont aussi utilisées au cours de la phase d'induction ⁵. Suit une phase d'entretien incluant généralement une combinaison de deux ou trois agents immunosuppresseurs choisis parmi les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus), les anti-métabolites (azathioprine et mycophénolate mofétil), les inhibiteurs de la m-TOR (sirolimus et évérolimus) et associant éventuellement des corticoïdes ³. La troisième phase est la phase de traitement d'éventuels rejets aigus par des corticoïdes à forte dose, une globuline antithymocyte et le rituximab pour les rejets médiés par les lymphocytes B ³. Nous nous intéresserons dans ce travail aux médicaments de la phase d'entretien et notamment à la ciclosporine, au tacrolimus, au sirolimus et au mycophénolate mofétil.

La ciclosporine a été découverte par Borel des laboratoires Sandoz à partir du champignon *Tylopocladium Inflatum*. Dès 1978, son efficacité a été démontrée pour inhiber le rejet du greffon rénal provenant de donneurs incompatibles ⁶ et pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte après une transplantation de moelle dans le cas des leucémies aiguës ⁷. Quand une cellule T reconnaît un antigène étranger grâce à son récepteur spécifique, il se

produit une cascade d'évènements intracellulaires incluant notamment une élévation des niveaux de calcium et une activation de la calmoduline. La calmoduline interagit avec la cyclophiline A pour réguler l'activité de la calcineurine, une protéine de la superfamille des phosphatases sérine/thréonine. La calcineurine catalyse la déphosphorylation du NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) ce qui lui permet de transloquer dans le noyau et d'activer l'expression des gènes de cytokines comme l'IL2 et l'IL4 responsables d'une réaction immunologique. Kronke *et al* ont montré que la ciclosporine bloque l'expression du gène de l'IL2 dans les lymphocytes T activés ⁸. La ciclosporine exerce son action immunosuppressive en se liant à la cyclophiline A pour former un complexe inhibiteur qui bloque l'activité phosphatase de la calcineurine ⁹.

Le macrolide immunosuppresseur FK506 (tacrolimus) est un second inhibiteur de la calcineurine puissant et sélectif découvert en 1984¹⁰. Il a été isolé du champignon *Streptomyces tsukubaensis*. Son mécanisme d'action est proche de la ciclosporine. Des données expérimentales ont d'abord été publiées en 1987 et les essais cliniques ont commencé 2 ans plus tard à Pittsburgh. L'utilisation du tacrolimus pour la prévention du rejet en transplantation hépatique a été autorisée aux USA en 1994 et en France en 1995. Trois ans plus tard, il était autorisé en prévention du rejet en transplantation rénale. Bien que la structure moléculaire du tacrolimus soit différente de celle de la ciclosporine, leurs propriétés immunosuppressives sont similaires ¹¹. Le tacrolimus exerce son action immunosuppressive en se liant à une protéine intra-cellulaire (*FK506-binding protein* : FKBP-12) pour former un complexe inhibiteur qui bloque l'activité phosphatase de la calcineurine. Il s'en suit un blocage en chaîne de la voie de la calcineurine ayant pour conséquence une inhibition de la translocation du facteur NFAT empêchant ainsi la transcription des gènes produisant les cytokines et donc inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Le sirolimus connu auparavant sous le nom de Rapamycine, est un antibiotique macrocyclique triène produit par un actinomycète (*Streptomyces hygroscopicus*). Il a été isolé à partir d'échantillons de sol recueillis sur l'Ile de Pâque dans la région Via Atari de Rapa nui ce qui a donné le nom de Rapamycine. Le sirolimus a été mis sur le marché en 1999 aux USA et en 2001 en Europe comme médicament immunosuppresseur destiné à prévenir le rejet en transplantation rénale. Il forme un complexe avec la protéine FKBP12 (immunophiline intracellulaire) et ce complexe va ensuite se lier à un domaine de la *mammalian target of rapamycin* (m-TOR) ce qui va interférer avec la transmission du signal de la m-TOR à ses effecteurs ¹². La m-TOR est une protéine kinase qui contrôle la phosphorylation des protéines

régulant la traduction d'ARNm importants pour la progression du cycle cellulaire ¹³. Le mécanisme exact de blocage de la signalisation m-TOR par le complexe sirolimus-FKBP12 n'est pas élucidé mais il pourrait faire intervenir une déstabilisation de l'interaction entre la protéine m-TOR et protéine de régulation associée à la m-TOR (Raptor) ¹⁴. Le résultat de cette interaction est un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et donc une inhibition de la prolifération des lymphocytes T stimulés par IL2 et de l'expansion clonale ¹³. L'évérolimus, un autre inhibiteur plus récent de la m-TOR utilisé en transplantation ne sera pas étudié dans ce travail.

Le mycophénolate mofétil (MMF) a été le produit d'un programme de développement mené par Nelson, Allison et Eugui des laboratoires ROCHE ¹⁵⁻¹⁷. Leurs observations les ont menés au postulat que la prolifération clonale des lymphocytes en réponse à un antigène était largement dépendante de la voie de synthèse *de novo* des bases puriques ¹⁸. Le MMF est administré par voie orale, absorbé et transformé par des carboxyestérases en acide mycophénolique, la substance active, qui inhibe l'inosine monophosphate déshydrogénase de type 2, une enzyme clé de la synthèse des purines. Il s'en suit une inhibition de la synthèse du guanosine-monophosphate à partir de l'inosine monophosphate qui est une étape critique et limitante de la voie de synthèse des purines dans les lymphocytes B et T ¹⁹. Le MMF a été mis sur le marché en 1995 aux USA et en 1996 en France après les résultats de trois essais internationaux multicentriques ²⁰⁻²². Le mode d'action des différents immunosuppresseurs est résumé dans la figure 1.

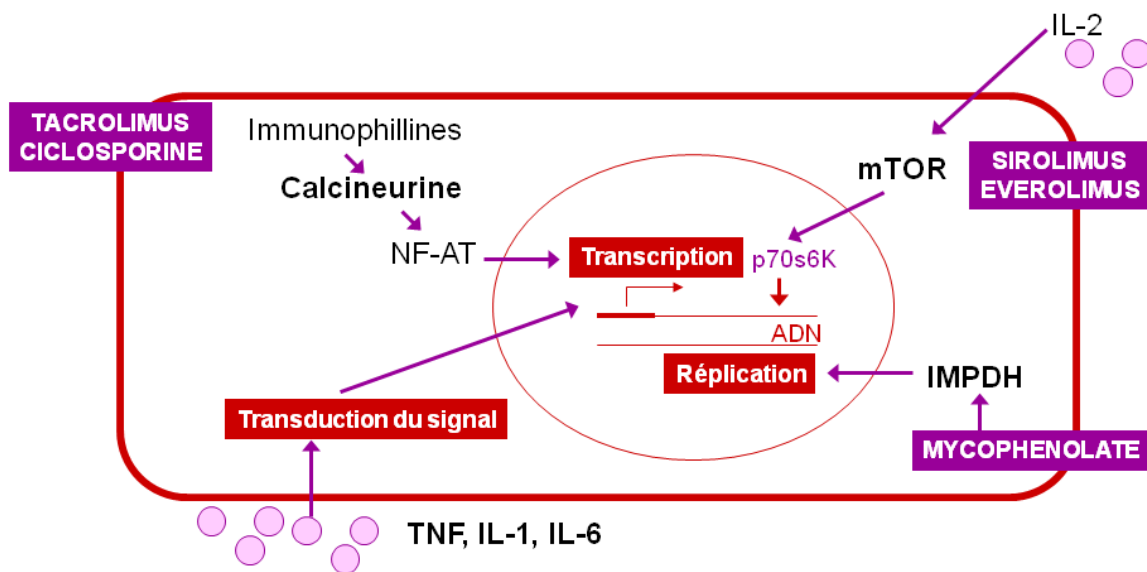


Figure 1. Individual Immunosuppressive Drugs and Sites of Action in the Three-Signal Model d'après Danesi et col., 2000, Mol Med today ²³

Les médicaments immunosuppresseurs sont caractérisés par une variabilité interindividuelle importante d'efficacité et d'effets indésirables. Ces variabilités phénotypiques dépendent des variabilités pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques qui peuvent être partiellement expliquées par la pharmacogénétique. Ces médicaments, du fait de cette forte variabilité et d'un faible index thérapeutique, sont soumis à un Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP). Celui-ci est obligatoire pour la ciclosporine, le tacrolimus et le sirolimus, comme mentionné dans leurs résumés des caractéristiques du produit. Le STP conduit à administrer à chaque patient une posologie individualisée calculée sur la base de concentrations sanguines pour atteindre une exposition cible au médicament. Le patient risque en effet, en cas de sous-exposition, la survenue d'épisode de rejet par inefficacité (augmentant le risque de perte du greffon) et, en cas de surexposition, des infections et des syndromes lymphoprolifératifs mais

aussi d'autres effets indésirables. Comme tous les médicaments faisant l'objet d'un STP, les immunosuppresseurs répondent aux critères suivants :

- mauvaise relation dose/effet mais corrélation entre les concentrations sanguines et les effets pharmacologiques (thérapeutique ou toxique)
- faible index thérapeutique
- variabilité pharmacocinétique inter-individuelle très importante
- pas de mesure directe de l'effet permettant d'adapter le traitement
- existence de méthodes analytiques permettant un dosage dans les milieux biologiques

Dans la première partie de ce document, après un rappel sur la méthodologie des études d'associations, nous nous intéresserons aux principales protéines impliquées dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs, nous détaillerons leurs propriétés, leurs rôles dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs et leur variabilité d'origine pharmacogénétique. Nous présenterons ensuite un exposé de l'état de l'art, incluant pour chaque immunosuppresseur étudié, les principales associations entre pharmacogénétique et pharmacocinétique décrites dans la littérature. Nous présenterons ensuite les principaux effets indésirables et les associations pharmacogénétique/effets indésirables décrits. Nous exposerons ensuite nos travaux personnels dans ce domaine, pour lesquels les objectifs étaient de rechercher par des études d'associations la relation entre les polymorphismes :

- des protéines des voies de métabolisme et de transport de la ciclosporine et la perte du greffon en transplantation rénale en prenant en compte le génome du donneur ;
- des protéines des voies de métabolisme et de transport du MMF et ses effets indésirables digestifs ;
- des protéines cibles du sirolimus et de ses effets indésirables.

Dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux méthodes d'intégration des polymorphismes génétiques dans la modélisation pharmacocinétique de population des immunosuppresseurs en greffe rénale. Nous ferons un rappel du principe de la pharmacocinétique de population, du test des covariables génétiques et de la notion de pluri-modalité d'une distribution et détaillerons nos travaux personnels dans ce domaine dont le but

était d'étudier l'effet d'un polymorphisme du CYP3A5 impliqué dans le métabolisme du tacrolimus sur la pharmacocinétique de ce médicament.

Enfin dans une discussion globale, nous présenterons l'apport de nos résultats aux connaissances actuelles et les perspectives dans le domaine.

CHAPITRE 2 : ASSOCIATION ENTRE POLYMORPHISMES ET EFFETS INDESIRABLES DES IMMUNOSUPPRESSEURS

Nous aborderons dans cette partie d'abord des définitions et la méthodologie générale des études d'associations puis nous nous intéresserons ensuite aux associations pharmacogénétiques décrites dans la littérature concernant les effets indésirables des immunosuppresseurs.

I Définition et méthodologie des études d'association en pharmacogénétique

La pharmacogénétique est l'étude de l'influence des variations de la séquence d'ADN sur la réponse au médicament (efficacité ou toxicité). La pharmacogénétique s'intéresse aux polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme, des protéines de transport ou des récepteurs contrôlant l'expression de ces systèmes enzymatiques ou de transport (associés à une variabilité pharmacocinétique). Elle s'intéresse par ailleurs aux cibles ou récepteurs des médicaments (variabilité pharmacodynamique).

L'objectif ultime de la pharmacogénétique est de mettre au point des tests de dépistage génétique permettant d'identifier les sujets répondeurs et non répondeurs à un médicament donné, les sujets à risque de survenue d'un événement indésirable pour un médicament donné et éventuellement de sélectionner le médicament ou la dose la plus adaptée à chaque individu.

I.1 Principe général d'une étude d'association en pharmacogénétique

Le but des études d'associations est d'étudier les relations entre une variable de réponse (phénotype d'efficacité ou de toxicité) et un ou des polymorphismes génétiques (ou single nucleotid polymorphisms : SNP).

Il existe deux types d'approches pour les études d'association en pharmacogénétique :

- les approches gène(s) candidat(s) pour lesquelles, il existe une hypothèse mécanistique impliquant le(s) gène(s) étudié(s) dans le phénotype d'intérêt. Le nombre de SNPs étudié sera limité et il pourra être intéressant de réaliser, si les SNPs sont en déséquilibre de liaison entre eux, une étude par haplotype.
- Les approches pan-génomiques ou GWAS (Genome Wide Association Study) pour lesquelles des puces à ADN seront utilisées. Ces études s'intéressent à la variabilité de l'intégralité du génome, sans hypothèse biologique. Le grand nombre de polymorphismes testés implique de disposer d'un nombre de sujets suffisant pour garantir une puissance statistique correcte.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux études d'associations par approche gène candidat. Dans cette approche, le choix des SNPs est basé sur une hypothèse biologique et guidé par la fréquence allélique des SNPs d'intérêt ainsi que par le modèle génétique utilisé. En effet, la puissance et le nombre de sujets nécessaire dépendent de l'effet attendu, de la fréquence du polymorphisme étudié ainsi que du modèle génétique utilisé. Nous définirons dans la partie suivante les haplotypes, les différentes méthodes utilisées pour la détermination des haplotypes puis les modèles génétiques.

I.1.(1) Marqueurs génétiques étudiés

I.1.1.(a) Polymorphismes génétiques isolés

Les substitutions de paire de bases, présentes avec une fréquence >1% dans la population sont appelées SNP. La fréquence dans le génome humain est approximativement de un SNP tous les 100 paires de bases en fonction de la région du gène. Ces SNPs sont des marqueurs du génome intéressants pour détecter des différences phénotypiques, cependant, il existe plus de 10 millions de SNPs dans le génome humain.

Les SNPs des régions codantes peuvent être différenciés en

- non synonyme si le SNP résulte en une substitution d'acide aminé
- synonyme si la base substituée ne modifie pas l'acide aminé encodé.

Des SNPs non synonymes résultent en une substitution d'un nucléotide qui peut changer l'acide aminé, celui-ci pouvant modifier la structure de la protéine, la stabilité de celle-ci, l'affinité du substrat ou introduire un codon stop ayant pour conséquence l'obtention d'une protéine tronquée qui aura généralement perdu ses propriétés fonctionnelles. Les SNPs synonymes ne changent pas l'acide aminé du codon mais peuvent avoir des conséquences fonctionnelles (stabilité du transcrit, épissage). Les SNPs non codants peuvent se situer au niveau du promoteur, en zone intronique ou au niveau des autres régions régulatrices, pouvant affecter la liaison des facteurs de transcription, les enhancers (ce sont des séquences régulatrices activatrices de la transcription), la stabilité du transcrit ou l'épissage.

I.1.1.(b) Haplotype

Les haplotypes sont constitués de SNPs en déséquilibre de liaison entre eux c'est à dire qu'ils sont associés de façon non aléatoire. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les haplotypes les plus probables pour chaque individu. Ces méthodes sont décrites ci-dessous.

I.1.1.b.(i) Détermination des haplotypes

Lorsque le génotype d'un individu diploïde est déterminé, le résultat va se présenter sous la forme d'une liste de génotypes pour chaque locus étudié. Considérons par exemple le cas de 3 loci dialléliques ; les génotypes de quatre sujets peuvent être, par exemple, AA bb CC, Aa BB cc, aa Bb Cc et Aa Bb Cc. Les haplotypes des deux premiers individus peuvent être déterminés intuitivement sans erreur : l'individu 1 possède deux copies de l'haplotype AbC et l'individu 2 a les deux haplotypes ABc et aBc. Il n'y a donc aucune incertitude si l'individu ne possède pas plus qu'un loci hétérozygote. Dans tous les autres cas, les haplotypes ne peuvent pas être déterminés intuitivement. En effet, l'individu 3 peut avoir les combinaisons d'haplotypes aBC/abc ou aBc/abC et le nombre de combinaison va augmenter exponentiellement avec le nombre de loci hétérozygotes. L'individu 4 pourra avoir les combinaisons haplotypiques suivantes : ABC/abc, ABc/abC, aBc/AbC ou aBC/Abc. Il existe plusieurs possibilités pour déterminer les haplotypes à partir des génotypes ; cela revient à s'intéresser aux génotypes des parents. Si les génotypes des parents sont connus, les

haplotypes de la descendance peuvent en général être déterminés. Si les parents de l'individu 3 ont pour génotype Aa Bb Cc et Aa Bb cc, alors l'haplotype de l'individu 3 sera aBC/abc. Cependant, si les génotypes des parents sont Aa Bb Cc et Aa Bb cc, alors on ne peut pas déduire l'haplotype facilement. Une autre solution pour trouver l'haplotype d'un individu est d'utiliser des méthodes qui permettent d'amplifier séparément chaque chromosome permettant une détermination directe de la séquence de l'haplotype²⁴. Bien que ces méthodes existent, elles sont trop lentes et trop coûteuses pour pouvoir être utilisées à grande échelle. Des méthodes de statistique, aujourd'hui largement utilisées, ont été développées. L'idée de base est que les individus homozygotes pour tous les loci ou hétérozygotes pour un seul loci donnent une information sur la fréquence des haplotypes et cette information va être utilisée pour déterminer la séquence des haplotypes des autres individus de la population. De nombreuses méthodes ont été développées parmi lesquelles celles basées sur le maximum de vraisemblance²⁵, le principe de parcimonie²⁴, la théorie combinatoire²⁶ et la distribution *a priori* dérivée de la théorie de la coalescence²⁷. Cette dernière méthode est la base du logiciel PHASE qui donne à l'heure actuelle les meilleurs résultats dans des études de simulation²⁸. Ces techniques permettent aussi de déterminer, pour un individu donné, l'haplotype le plus probable quand il y a des données manquantes²⁹.

I.1.1.b.(ii) Intérêt et limites de l'étude par haplotype

I.1.1.b.ii.1 Intérêts

- Un haplotype est défini par la combinaison d'allèles de deux ou plusieurs loci différents sur un même chromosome. Quand plusieurs polymorphismes sont en déséquilibre de liaison entre eux, les analyser indépendamment peut entraîner un biais de l'estimation de l'effet génétique car l'association entre un polymorphisme et un phénotype comprend l'effet de tous les polymorphismes en déséquilibre de liaison avec celui-ci et pas seulement l'effet d'un seul polymorphisme.
- L'effet d'un polymorphisme fonctionnel peut être masqué ou minoré s'il est étudié indépendamment des autres polymorphismes avec lesquels il est en déséquilibre de liaison. Cela explique que dans certaines situations, le polymorphisme fonctionnel n'est pas celui qui soit associé au phénotype en analyse univariée.
- Les haplotypes définissent une unité fonctionnelle dont l'effet ne pourrait pas être prédit par les différents polymorphismes qui le composent. L'analyse par haplotype

peut permettre l'identification d'interactions indétectables en prenant en compte les polymorphismes seuls dans l'analyse.

- De plus, l'analyse par haplotype conduit à une réduction importante du nombre de tests statistiques quand on étudie plusieurs SNPs en fort déséquilibre de liaison.

I.1.1.b.ii.2 Limite

D. Trégouet recommande de toujours commencer par une analyse prenant en compte chaque SNP³⁰. En effet, en présence d'un déséquilibre de liaison modéré ou faible, un polymorphisme fonctionnel peut être porté par plusieurs haplotypes dans lesquels son effet serait dilué. Il est donc important de réaliser d'abord une analyse univariée basée sur les SNPs pour détecter un effet qui aurait été « dilué » dans l'effet de l'haplotype.

I.1.(2) Choix des modèles génétiques

Il existe plusieurs types de modèles génétiques :

Soient un marqueur biallélique de type SNP et p_0 , p_1 et p_2 les proportions génotypiques du marqueur dans la population, déterminées à partir de ses proportions alléliques (p_a et $p_A = 1 - p_a$) :

$$p_0 = p_a^2$$

$$p_1 = 2p_a(1-p_a)$$

$$p_2 = p_A^2$$

Soient f_0 , f_1 et f_2 les pénétrances (c'est-à-dire les risques pour un individu de contracter la maladie (ou le phénotype) sachant qu'il possède tel ou tel génotype) associées aux génotypes aa , aA et AA respectivement. A partir des pénétrances, on peut définir n'importe quel mode de transmission de la maladie (ou du phénotype).

Si l'on considère A comme étant l'allèle de susceptibilité, on obtient les modèles suivants :

$$f_1 = f_0 \quad \text{et} \quad f_2 = f_0 + c \quad \text{définit le mode récessif (R).}$$

$$f_1 = f_0 + c \quad \text{et} \quad f_2 = f_1 + c = f_0 + 2c \quad \text{définit le mode additif (A).}$$

$$f_1 = f_0 \times c \quad \text{et} \quad f_2 = f_1 \times c = f_0 \times c^2 \quad \text{définit le mode multiplicatif (M).}$$

$$f_1 = f_0 + c \quad \text{et} \quad f_2 = f_1 \quad \text{définit le mode dominant (D).}$$

$$f_2 = f_0 \quad \text{et} \quad f_1 = f_0 + c \quad \text{définit le mode co-dominant (S).}$$

Le choix du modèle peut être déterminant pour démontrer un effet d'un génotype sur un phénotype dans une étude d'association. Ainsi Lettre *et al* ont montré par simulation de population que le modèle additif fréquemment utilisé par défaut ne permettait pas d'atteindre

une puissance suffisante (surtout si les effets récessifs sont importants) et conseille de tester les modèles dominants et récessifs ³¹.

I.1.(3) Nature des phénotypes étudiés et stratégie d'étude

Pour les études d'associations, les tests statistiques utilisés dépendront du type de phénotype étudié.

I.1.3.(a) Préambule : risque alpha et p de significativité

Les tests de signification sont utilisés pour déterminer si les différences observées entre les groupes sont plus importantes que si elles étaient dues au hasard. Pour des raisons assez arbitraires, une valeur de p inférieure à 0,05 est habituellement utilisée pour dire que le résultat n'est pas dû au hasard. Une valeur p de 0,05 signifie qu'il y a 5 pour cent de chance que l'on conclue que les deux groupes diffèrent alors qu'ils ne diffèrent pas réellement (appelée aussi risque de première espèce ou risque α). Ainsi, une faible valeur d' α conduit à une faible zone de rejet à tort. Il y a une différence entre le risque d'erreur de 1^{ère} espèce et le degré de signification statistique « p ». Le risque d'erreur est une caractéristique du test fixé *a priori* qui fixe le pourcentage de cas où on conclura au rejet de l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie contrairement au degré de signification qui est attaché à un échantillon, soumis à des fluctuations aléatoires et calculé *a posteriori*. Il mesure l'écart entre cet échantillon et l'hypothèse nulle. C'est une variable aléatoire comprise entre 0 et 1 qui va dépendre de nombreux facteurs tels que le choix du test et des conditions d'applications. La détermination de la valeur de p n'est pas suffisante pour juger de la réalité d'un effet. Aujourd'hui les statisticiens recommandent l'utilisation conjointe de l'intervalle de confiance plus aisé à interpréter (qui peut mieux rendre compte de l'importance de l'effet) et le calcul *a priori* de la puissance. De plus la valeur de p ne reflète pas directement l'importance de l'effet clinique : une différence entre les 2 groupes importante cliniquement mais sur peu de sujets pourra entraîner une valeur de $p > 0,05$ et à l'inverse une différence sans signification clinique mais mesurée sur beaucoup de sujet pourra donner une valeur de $p < 0,05$. Finalement, il convient d'analyser les résultats de deux points de vue : (i) statistique (qui vise à déclarer une différence statistiquement significative) et (ii) clinique (en analysant l'importance clinique de

la différence absolue observée). Ainsi le dogme de la significativité statistique peut être ne pas être pertinent pour la pratique médicale.

I.1.3.(b) Phénotype binaire

I.1.3.b.(i) Phénotype binaire indépendant du temps

Pour une étude gène candidat avec un phénotype binaire non dépendant du temps (exemple d'une étude randomisée, prospective, pour laquelle les patients ont été inclus « au même moment » et dont la durée de suivi est de 1 an), la régression logistique pourra être utilisée. Nous avons étudié avec ce type de modèle l'impact des polymorphismes de la voie de la m-TOR sur les effets indésirables cutanés, les œdèmes et les infections liées au sirolimus.

I.1.3.b.(ii) Phénotype binaire dépendant du temps

Dans une étude gène candidat avec un phénotype binaire dépendant du temps et une durée de suivi variable selon les patients, un modèle de survie tel que le modèle de Cox pourra être utilisé. Pour réaliser ce type d'étude d'association, il faudra utiliser des outils statistiques permettant de prendre en compte le modèle génétique. Nous avons étudié avec ce type de modèle l'impact des polymorphismes de protéines de métabolisme et de transport sur la perte du greffon liée à la ciclosporine et les diarrhées liées au MMF.

I.1.3.(c) Phénotypes continus

I.1.3.c.(i) Variable continue à un moment donnée

Pour une étude gène candidat avec un phénotype continu (exemple de l'AUC de ciclosporine), la régression linéaire multiple pourra être utilisée.

I.1.3.c(ii) Etudes longitudinales

La plupart du temps dans ce type d'étude, les données d'un phénotype continu sont mesurées à plusieurs moments dans le temps (exemple de la créatinine en $\mu\text{mol/L}$ mesurée lors de visite à 7j, 30j ,90j et 360j post transplantation). Il est intéressant dans ce cas de caractériser l'évolution du paramètre dans le temps et de rechercher l'effet de covariables génétiques sur cette évolution. Les modèles à effets mixtes sont adaptés à la modélisation des variables longitudinales (faisant l'objet de mesures répétées).

I.1.(4) Puissance et nombre de sujets nécessaires

Comme nous l'avons vu précédemment, le calcul de la puissance ou du nombre de sujets nécessaire dépend de l'effet attendu mais aussi de la fréquence du SNP ou de l'haplotype étudié. Plus un génotype sera fréquent, plus il sera rencontré dans un échantillon et plus le nombre de sujets à inclure pour montrer un effet de ce génotype sera faible. Des outils spécialisés permettent de réaliser le calcul du nombre de sujets nécessaire et/ou de la puissance du test tel que le package gap de R ou le programme en ligne Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>). Ces logiciels intègrent les particularités des analyses de génétique (choix du modèle génétique, fréquence des allèles).

I.1.(5) Méthodes de sélection et de validation d'un marqueur génétique prédictif

Dans les études d'associations, on étudie l'hypothèse d'indépendance (hypothèse nulle) pour montrer que l'existence d'un polymorphisme est associée à une augmentation de la fréquence observée de l'évènement. Pour conclure au rejet de l'hypothèse nulle et à l'existence d'une association entre un polymorphisme génétique et un phénotype, la méthodologie recommandée obéit à des règles clairement définies et standardisées.

I.1.5.(a) Analyses univariées et situation de comparaisons multiples

Lorsque des comparaisons impliquant les mêmes données sont réalisées, la probabilité qu'une comparaison indique une différence statistiquement significative augmente avec le nombre de comparaisons. Des corrections ont été proposées pour éviter l'inflation du risque alpha lorsque plusieurs comparaisons statistiques sont nécessaires. Ces corrections sont utiles par exemple dans le cas où l'effet de plusieurs SNPs est successivement testé, en analyse univariée, sur un même phénotype.

La méthode la plus simple est celle de Bonferroni, encore appelée méthode de Bonferroni-Holm. Elle consiste à corriger le niveau de significativité par le nombre de tests réalisés : pour 5 comparaisons, la correction de Bonferroni indiquera que le test est significatif à 5% si dans l'analyse univariée, un degré de significativité inférieur à $0,05/5$ (soit 0,01) est obtenu. Typiquement cette correction s'applique dans les études GWAS, pour lesquelles l'ensemble des SNPs du génome est successivement étudié en analyse univariée.

I.1.5.(b) Analyse multivariée

En cas d'analyse multivariée, la première étape consiste à sélectionner les variables pertinentes pouvant influencer le phénotype d'intérêt. Cette étape inclut un test des variables d'intérêt en analyse univariée, en retenant un niveau de significativité compris entre 0,1 et 0,2. Un modèle intermédiaire comprenant toutes les variables sélectionnées en analyse univariée est construit. L'analyse multivariée consistera ensuite en une sélection des variables d'intérêt, à partir du modèle intermédiaire, qui pourra être basée sur une procédure pas à pas ascendante ou descendante. En pratique, la variable la moins significative est exclue du modèle intermédiaire et l'on compare les modèles emboîtés (avec et sans la variable) par le test du maximum de vraisemblance ou la comparaison des critères d'Akaike ou de Schwartz. On recommence cette opération jusqu'à ne garder que les variables influençant significativement le phénotype. Le modèle ainsi développé sera celui qui décrit le mieux les données. Cependant, on attend du modèle qu'il soit utilisable dans une autre population que celle qui a servi à développer le modèle.

I.1.5.(c) Validation des modèles

Il existe deux types de validation :

- La validation interne :

Les procédures de validation croisée les plus utilisées reposent sur des techniques de ré-échantillonnage telles que le ré-échantillonnage aléatoire par groupes ou par sorties individuelles (méthode de Jackknife) et le bootstrap.

- Méthode de ré-échantillonnage par groupe : le modèle est défini sur une partie des individus étudiés (exemple les 2/3 ou les 3/4 voire n-1 dans le cas de la méthode de jackknife) et il est testé sur les individus exclus ; cette procédure est répétée en excluant à chaque itération un nouveau groupe ou un nouvel individu. L'effet observé dans le groupe de développement du modèle devra être retrouvé dans le groupe de validation.
 - Méthode par «bootstrap » : elle consiste à ré-échantillonner un grand nombre de fois l'échantillon initial qui a été réellement prélevé dans la population, l'inférence statistique étant basée sur les résultats des échantillons ainsi obtenus. La technique de bootstrap est itérative. La première étape consiste à tirer aléatoirement avec remise n-1 individus parmi les n formant l'échantillon initial. A chaque tirage, chaque individu possède une même probabilité de figurer dans l'échantillon de bootstrap égale à 1/n. La seconde étape consiste à calculer la moyenne empirique sur l'échantillon de bootstrap. Ces deux étapes sont ensuite répétées un grand nombre de fois, typiquement 500 ou 1000. Les 500 moyennes empiriques fournissent alors une approximation de la distribution de la vraie moyenne, dont la valeur estimée correspond à la moyenne empirique des 500 moyennes issues des échantillons de bootstrap. L'estimateur ainsi obtenu est alors plus robuste que la moyenne empirique sur l'échantillon initial. Les distributions statistiques des paramètres estimés dans le modèle initial et dans les échantillons bootstrapés (donc 500 jeux de valeurs) sont comparées.
- La validation externe

La validation externe est plus robuste. Il s'agit d'utiliser un deuxième échantillon de données, indépendantes de l'échantillon qui a servi à la construction du modèle, et de comparer les valeurs prédites par le modèle et les valeurs observées. On peut utiliser pour cela le test de Homer Lemeshow qui évalue la « calibration du modèle ». Il

compare les effectifs de malades et non malades prédits aux effectifs observés dans chaque groupe. Il consiste donc à regrouper les observations en un petit nombre de groupes de mêmes effectifs (ex.10) à partir de la distribution du risque prédit par le modèle logistique pour chaque sujet. On compare ensuite le nombre de cas et non cas observés et prédits au sein de chaque groupe à l'aide d'un chi deux. Plus le degré de signification du test est faible, plus l'écart entre les fréquences prédites et observées est important et donc moins bon est le modèle. Les courbes ROC (Receiver Operating Characteristics) peuvent aussi être utilisées : la probabilité $p(x)$ de la maladie est prédite, à partir du modèle, pour chaque observation. Une valeur seuil (S) arbitraire entre 0 et 1 est fixée. Chaque observation est classée « malade » ou « non malade » en fonction de la valeur de $p(x)$ par rapport à S . On calcule ainsi la sensibilité et la spécificité associée à cette valeur de S . On recommence pour toutes les valeurs possibles de S entre 0 et 1 et on trace la sensibilité en fonction de 1-spécificité. Ainsi, un modèle présentant une AUC supérieure à 0,75 est considéré comme bien discriminant.

II Etat de l'art et revue de la littérature

Nous ferons d'abord un rappel des principales protéines impliquées dans le métabolisme et le transport transmembranaire des immunosuppresseurs, puis nous nous intéresserons à leur variabilité génétique. Nous aborderons ensuite les relations décrites dans la littérature entre ces polymorphismes et d'une part la pharmacocinétique de ces médicaments (PG/PK) et d'autre part après avoir fait un rappel sur les effets indésirables de ces médicaments, les relations PG/PD.

II.1 Principales protéines impliquées dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs et variabilité génétique

Un nombre limité de protéines de transport ou de métabolisme jouent un rôle clé dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs. Nous aborderons dans ce chapitre les cytochromes P450 3A (enzymes de métabolisme de phase 1), les UGTs (enzymes de métabolisme de phase 2) et enfin les transporteurs avec la P-glycoprotéine (transporteur d'efflux), la protéine MRP2 (transporteur d'efflux), les OATPs (transporteurs d'influx). Nous aborderons pour chaque protéine leurs caractéristiques générales, leurs rôles dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs et leur variabilité d'origine pharmacogénétique.

Les schémas ci-dessous décrivent de façon synthétique les principales protéines impliquées dans le métabolisme et le transport transmembranaire des immunosuppresseurs.

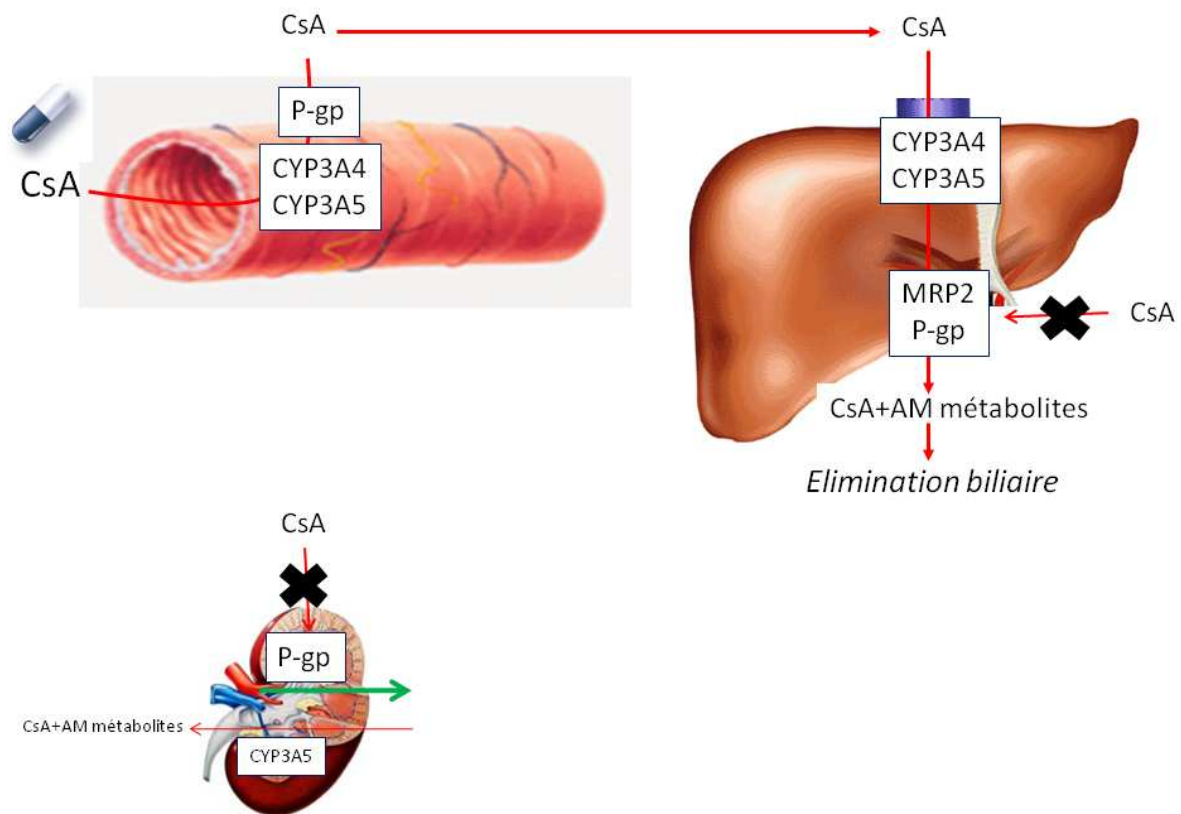


Figure 2. Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport de la ciclosporine (csA)

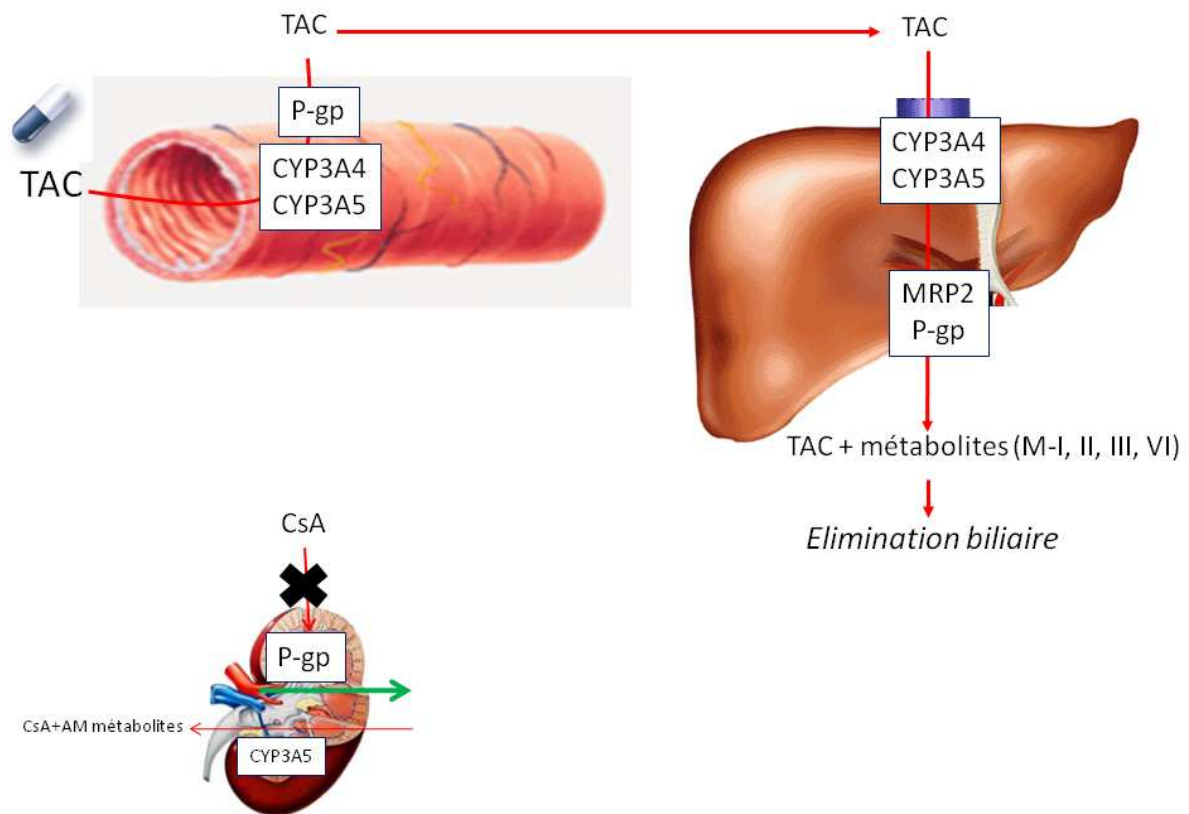


Figure 3. Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport du tacrolimus (TAC)

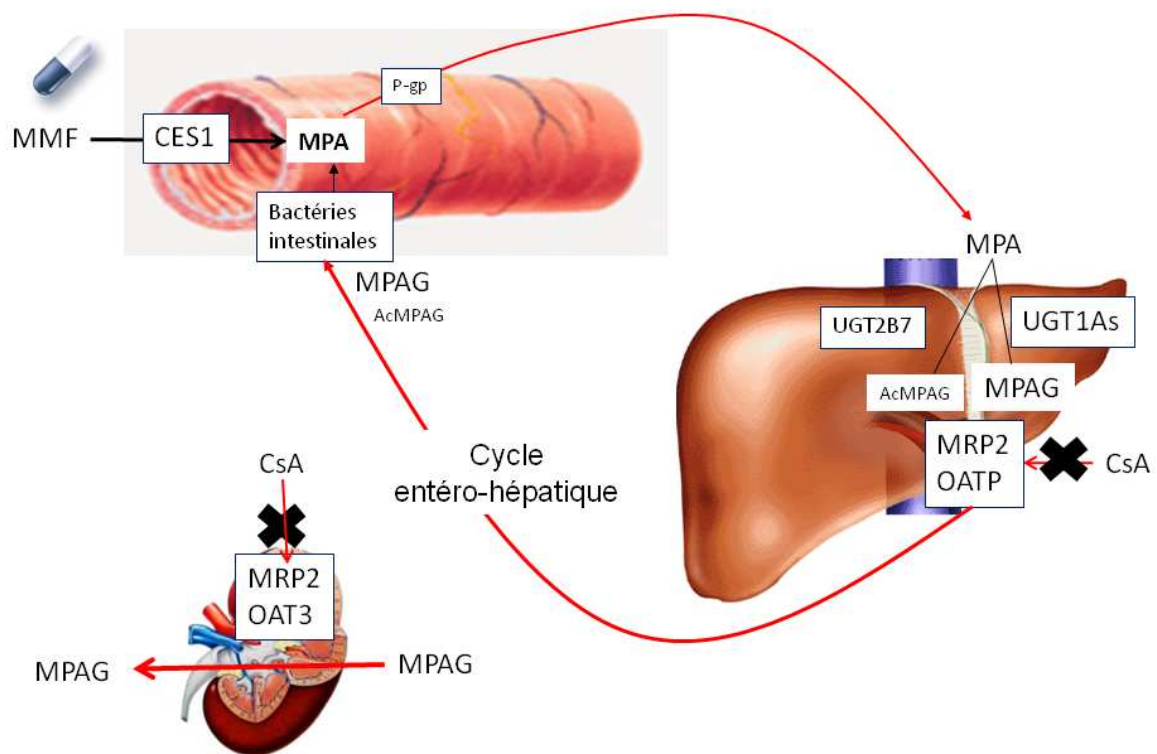


Figure 4. Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport du mycophénolate mofétil (MMF)

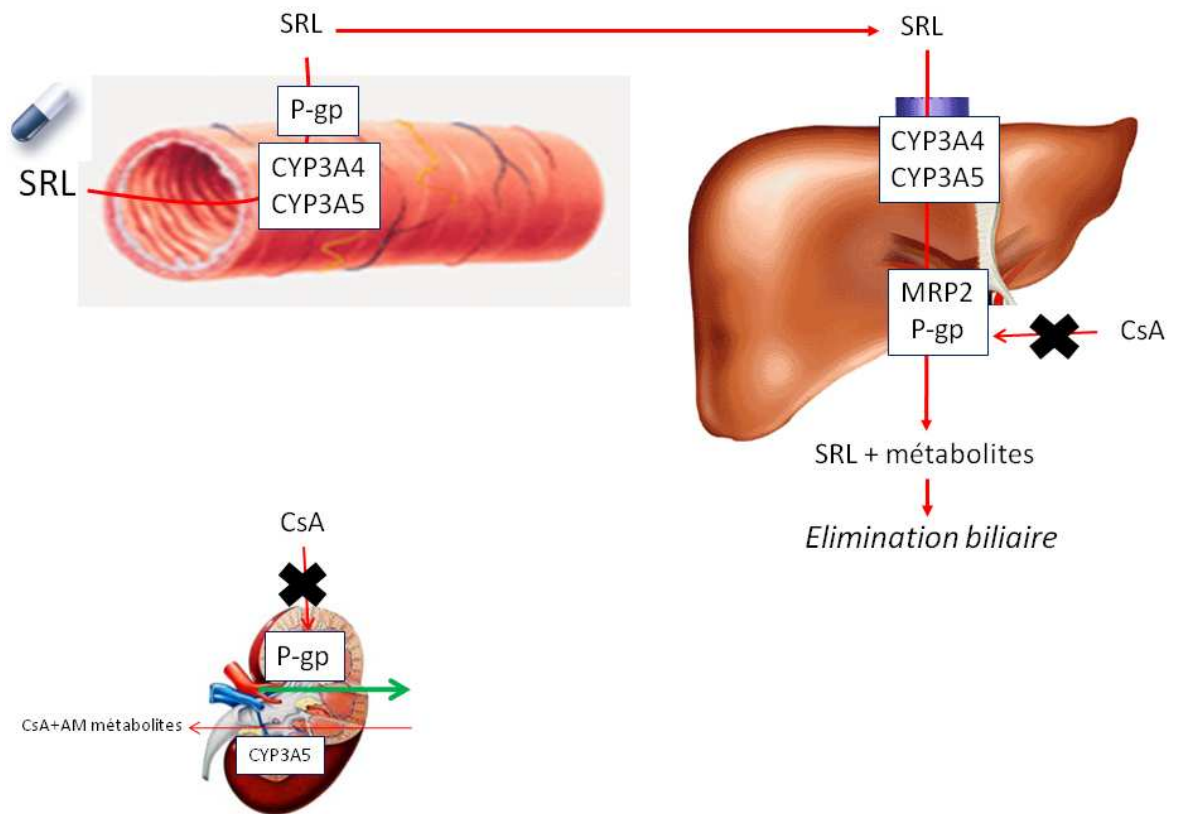


Figure 5. Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport du sirolimus (SRL)

II.1.(1) CYP3A

II.1.1.(a) Généralités

La famille des cytochromes P450 (P450) est composée de plus de 50 isoenzymes responsables du métabolisme oxydatif de nombreux composés endogènes et xénobiotiques ³². Les CYP3A, représentent 40% des P450 présents dans le foie humain ³³ et 82% de ceux présents au niveau intestinal. Ils sont responsables du métabolisme de plus de 50% des médicaments actuellement utilisés ³².

II.1.1.(b) Rôle dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Ce sont les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 qui sont responsable de la majeure partie du métabolisme de la ciclosporine, du tacrolimus ^{34,35} et du sirolimus ³⁶. En revanche, ils n'interviennent que très peu dans le métabolisme du MPA en produisant un métabolite mineur du MPA, le 6-O-desmethyl-MPA³⁷. Le CYP3A5 a la particularité de n'être exprimé que chez une partie des individus en raison d'un polymorphisme génétique qui sera évoqué dans le paragraphe suivant. Lorsqu'il est exprimé, il contribue à l'activité totale des CYP3As mais de façon variable suivant le tissu. Au niveau hépatique et intestinal, le CYP3A4 resterait l'isoenzyme la plus importante en termes d'expression et d'activité. Dans le rein, c'est l'isoenzyme CYP3A5 qui serait majoritaire ³⁸. Il existe une grande variabilité inter-individuelle dans l'activité des CYP3As intestinaux et hépatiques responsables de la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine ³⁹. Du fait de la prédominance d'expression du CYP3A5 dans les reins, des variations d'activité du CYP3A5 en fonction du génotype du donneur, pourraient influencer l'accumulation *in situ* de ciclosporine ou de tacrolimus, et donc la néphrotoxicité de ces médicaments. Un autre mécanisme pourrait passer par la présence de métabolites néphrotoxiques des inhibiteurs de la

calcineurine. Cependant, concernant la ciclosporine, les travaux corroborant cette hypothèse sont anciens (Christian and sewing 1995). En revanche, Kupers et al ont observés dans un travail plus récent une néphrotoxicité du tacrolimus et font l'hypothèse que celle-ci est due aux métabolites du tacrolimus produits dans le greffon (kuypers et al 2007).

II.1.1.(c) Variabilité pharmacogénétique

II.1.1.c.(i) CYP3A4

Au moins 28 SNPs ont été identifiés à ce jour. Aucun SNP connu n'est associé à une perte totale d'expression ou de fonction de l'enzyme. Cependant, certains SNPs sont susceptibles d'être associés à la variabilité inter-individuelle de la capacité métabolique du CYP3A4. Le SNP le plus étudié est une substitution de A vers G en position -392 de la région promotrice du gène CYP3A4 caractéristique de l'allèle *CYP3A4*1B*⁴⁰. La conséquence fonctionnelle de ce SNP est controversée : une étude *in vitro* a montré que l'allèle *CYP3A4*1B* était associé à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du CYP3A4⁴¹ alors que d'autres n'ont pas observé d'effet sur l'activité catalytique de la protéine⁴². Les premières études *in vivo* n'ont pas observé d'effet fonctionnel du *CYP3A4*1B* sur le métabolisme de l'érythromycine, de la nifédipine ou du midazolam^{43,44}.

II.1.1.c.(ii) CYP3A5

Au moins 11 SNPs ont été identifiés à ce jour mais le SNP le plus étudié est une substitution de A vers G à la position 6986 de l'intron 3 du gène CYP3A5 appelé *CYP3A5*3*. Dans la population caucasienne, la particularité de ce SNP est que l'allèle sauvage est rencontré à une fréquence inférieure à celle de l'allèle variant (environ 15%). Ce SNP conduit à une enzyme tronquée du fait d'une cessation prématurée de la traduction⁴⁵. Les porteurs homozygotes et hétérozygotes de l'allèle sauvage *CYP3A5*1* produisent des niveaux normaux ou faiblement diminués d'ARNm CYP3A5 et expriment des taux sensiblement similaires de protéine fonctionnelle CYP3A5 (expresseurs du CYP3A5). En revanche, les porteurs homozygotes de l'allèle variant *CYP3A5*3* expriment des niveaux très faibles voire indétectables de protéine CYP3A5 fonctionnelle (non expresseurs du CYP3A5)^{45,46}. Ainsi, les personnes qui sont porteurs homozygotes ou hétérozygotes de l'allèle *CYP3A5*1* devraient en théorie avoir une plus forte clairance et une plus faible biodisponibilité orale des médicaments principalement métabolisés par le CYP3A5 et devraient donc montrer des signes d'inefficacité pour

l'administration d'une dose « standard ». Le fait d'être expresseur du CYP3A5 est fortement corrélé avec un métabolisme hépatique par le CYP3A5 important *in vitro* ^{45,47}.

II.1.(1) UDP-Glucuronosyl- Transférases (UGTs)

II.1.1.(a) Généralités

La glucuroconjugaison est une voie métabolique majeure pour des composés endogènes et exogènes. Cette réaction est catalysée par les uridine diphosphate-glucuronosyltransférases (UGT) qui appartiennent à la superfamille des glycosyltransférases ⁴⁸. Les UGTs catalysent le transfert d'un acide glucuronique sur de nombreux médicaments ou composés endogènes qui possèdent un groupement hydroxyle, carboxyle, amino ou sulfhydryle ⁴⁹. Ces substrats sont transformés ainsi en composés plus hydrophiles qui sont alors excrétés dans l'urine ou la bile ⁵⁰. De façon générale, les métabolites glucuroconjugés ont une activité biologique ou pharmacologique diminuée mais dans un certain nombre de cas, ils peuvent être plus actifs que les composés parents (exemple de la morphine-6-glucuronide) ou plus réactif (exemple des acyl-glucuronides) ⁵¹.

Deux sous-familles principales d'UGT ont été identifiées, les UGT1A et UGT2 (sous-divisées en UGT2A et UGT2B) ^{52,53}. La famille UGT1A est constituée de 9 protéines actives (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10), toutes codées par un unique locus d'un gène situé sur le chromosome 2q37.1 ⁵⁴. Les UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 et 1A9 sont exprimées préférentiellement dans le foie alors que les UGT1A5, 1A7, 1A8 et 1A10 ont une localisation presque exclusivement extra-hépatique ^{55,56}. Les protéines de la famille UGT2 sont codées par des gènes situés sur le chromosome 4 ⁴⁸. Les UGT2A (2A1, 2A2 et 2A3) sont principalement localisées au niveau des tissus olfactifs ⁵⁷ et ne participent pas au métabolisme des médicaments. La sous famille UGT2B comprend 7 protéines fonctionnelles (UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 et 2B28) ⁵⁶ parmi lesquelles de nombreuses sont exprimées dans le foie (2B4, 2B7, 2B10, 2B15, 2B17). Parmi ces enzymes, l'UGT2B7 a été la plus étudiée et semble avoir un rôle important dans l'élimination hépatique de nombreux médicaments ⁵⁸.

II.1.1.(b) Rôle dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Parmi les différentes isoformes impliquées dans la glucuroconjugaison du MPA, l'UGT1A9 est exprimée dans le rein, l'intestin, le foie, alors que les UGT1A7, 1A8 et 1A10 sont exclusivement intestinales⁵⁹. Des données *in vitro* laissent penser que l'UGT1A9 est la principale isoforme métabolisant le MPA avec une implication de 55%, 75% et 50% au niveau hépatique, rénale et intestinale respectivement⁵⁹. Une étude sur des microsomes humains a montré que la capacité de UGT1A8 à conjuguer le MPA était similaire à celle de l'UGT1A9 (au moins 30 fois supérieure à celle des autres UGT)⁶⁰. Toutefois, l'expression de cette enzyme est limitée au tractus gastro-intestinal, ce qui réduit son influence *in vivo* sur le métabolisme systémique du MPA. L'UGT2B7 est le principal isoforme responsable de la formation d'AcMPAG⁵⁹. L'expression des protéines UGT est corrélée à l'activité enzymatique et montre une importante variabilité interindividuelle. Ainsi, les SNPs dans les gènes codant pour les UGTs pourraient altérer l'activité de glucuronconjugaison. Cela pourrait alors modifier le rapport MPA/métabolites et le cycle entéro-hépatique du MPA (en modifiant le métabolisme du MPA dans le tractus gastro-intestinal) et influencer les différents phénotypes étudiés. Les résultats d'une étude *in vitro* suggèrent que l'UGT2B7 interviendrait dans la glucuroconjugaison hépatique de la ciclosporine et du tacrolimus⁶¹. Une étude plus récente sur des microsomes a montré que l'UGT1A4 était la principale isoforme impliquée dans la glucuroconjugaison du tacrolimus⁶². Cependant, cette voie de métabolisme semble être mineure par rapport aux CYP3A. Le sirolimus en revanche n'est pas métabolisé par les UGTs.

II.1.1.(c) Variabilité pharmacogénétique

De très nombreux polymorphismes ont été décrits pour les UGTs. La liste de ces polymorphismes, régulièrement mise à jour par un comité d'expert, est disponible en ligne à l'adresse : http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/. Nous aborderons dans ce paragraphe les principaux polymorphismes des UGT jouant un rôle dans le métabolisme du MPA.

Pour l'UGT1A9, au moins 11 SNPs ont été identifiés dans les régions promotrices et codantes du gène⁶³. Les deux SNPs du promoteur -275 T>A et -2152 C>T semblent avoir l'impact

fonctionnel le plus important. En effet, les porteurs homozygotes ou hétérozygotes de ces SNPs ont une expression protéique d'UGT1A9 et une activité de glucuroconjugaison du MPA et du propofol dans les microsomes hépatiques augmentées par rapport aux individus porteurs du génotype sauvage⁶³. Ces deux SNPs étant en fort déséquilibre de liaison, il est difficile de différencier leur contribution respective à cette différence d'expression et d'activité de glucuroconjugaison. Les SNPs de la région promotrice -440 C>T et -331 T>C, qui sont en déséquilibre de liaison complet, ont aussi un impact fonctionnel⁶³. Les porteurs de ces SNPs ont des niveaux de protéine hépatique et une activité de glucuronconjugaison plus importants que les individus porteurs du génotype sauvage⁶³. Une étude a montré une conséquence fonctionnelle du SNP 98 T>C résultant en un changement d'acide aminé et en une activité de glucuroconjugaison diminuée par rapport aux porteurs de la version sauvage⁶⁰. Cependant, du fait de la très faible fréquence de ce SNP (TT = 97%, TC=3%, CC=0%), il faudrait un nombre important de patients pour pouvoir l'étudier avec une puissance suffisante.

Au moins quatre polymorphismes ont été identifiés dans le gène UGT1A8 à ce jour⁶⁴. Le SNP 830G>A (*UGT1A8*3*), se traduisant par la substitution d'une cystéine par une tyrosine en position 277, a été associé à une diminution de la capacité métabolique de l'enzyme de près de 50% pour le métabolisme du MPA^{60,64}. En dépit de la forte conséquence fonctionnelle de ce SNP, il n'est que très rarement retrouvé dans la population. Le SNP 518C>G (*UGT1A8*2*) résulte en une substitution d'alanine en glycine à la position 173. Cependant, les données concernant la significativité fonctionnelle de ce SNP sont controversées. Bernard et al ont observé une diminution de la vitesse maximale de production d'AcMPAG à partir de MPA à l'aide d'un modèle cellulaire mais sans différence dans les paramètres cinétiques de l'enzyme pour la formation de MPAG⁶⁴. En revanche, deux autres études n'ont pas observé de contribution de l'UGT1A8 au métabolisme du MPA⁵⁹.

Au moins 12 SNPs ont été identifiés pour l'UGT2B7 à ce jour⁶⁵. L'UGT2B7 802C>T (*UGT2B7*2*) a été le plus étudié et résulte en une substitution d'une tyrosine par une histidine au niveau de l'acide aminé 268. Cependant, la conséquence fonctionnelle de ce SNP est controversée^{66,67} et une étude n'a pas mise en évidence d'effet de ce SNP sur l'activité catalytique du MPA *in vitro*⁶⁴. Six SNPs du promoteur fortement liés situés en position -1248, -1241, -1054, -842, -268 et 102 sont en déséquilibre de liaison inverse complet avec l'*UGT2B7*2*. Une étude réalisée dans notre unité avec des microsomes humains hépatiques a conclu à une production d'AcMPAG significativement plus élevée chez les porteurs du SNP -842G>A par rapport aux porteurs du génotype sauvage⁶⁵. Le SNP du promoteur -79G>A, en

déséquilibre de liaison complet avec le polymorphisme *UGT2B7*2* a été associé à une diminution de l'activité catalytique pour les porteurs de la version mutée ⁶⁸ ; cependant, une fois de plus, du fait du déséquilibre de liaison complet, il est difficile de déterminer le SNP responsable de cet effet.

II.1.(1) P-glycoprotéine (P-gp)

II.1.1.(a) Généralités

Cette protéine aussi connue sous le nom de MDR1 appartient à la super-famille des protéines ABC (*ATP Binding Cassette*). Elle est codée par le gène *ABCB1*. C'est un transporteur ATP-dépendant de 170kDa capable de transporter de nombreuses substances endogènes et exogènes de la cellule vers le milieu extra-cellulaire ⁶⁹. La figure 6 représente les différents domaines de cette protéine. Elle est exprimée dans différents tissus (intestin, foie, rein) où elle constitue un système de protection permettant de rejeter activement des xénobiotiques de la cellule vers la lumière intestinale, la bile ou l'urine. Dans le rein, la P-gp est exprimée au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales des tubules proximaux. Il semble que la P-gp rénale joue un rôle important dans l'élimination de toxines et de catabolites du métabolisme cellulaire.

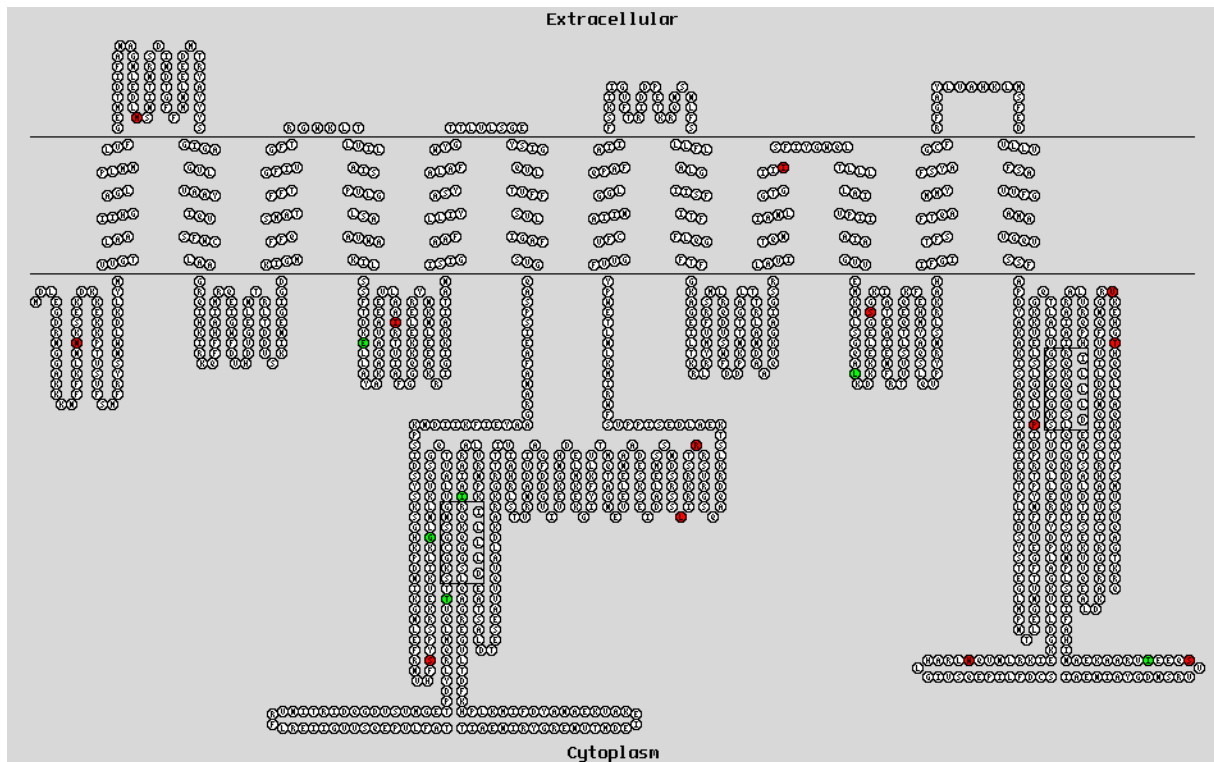


Figure 6. Différents domaines de la protéine d'efflux MDR1 (SNP non synonymes en rouge et synonymes en vert, exons dans les carrés noirs) (The UCSF Pharmacogenomics of Membrane Transporters project database is supported by NIH/NIGMS (U01 GM61390)).

II.1.1.(b) Rôle dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

La P-gp a été décrite comme intervenant dans la pharmacocinétique des inhibiteurs de la m-TOR et de la calcineurine. Une étude réalisée au sein de notre unité a montré, en particulier, que la P-gp limitait l'absorption intestinale des inhibiteurs de la m-TOR⁷⁰. D'autres études ont montré une limitation de l'absorption intestinale des inhibiteurs de la calcineurine^{71,72}. Un rôle potentiel dans la pharmacocinétique de l'acide mycophénolique a également été évoqué sur la base d'une étude conduite chez la souris. Cependant, bien que le MPA semble être substrat de la P-gp, on peut penser que son impact sur l'absorption intestinale du MPA est

probablement négligeable chez l'homme étant donné les doses habituellement administrées et les concentrations intestinales associées, très probablement saturantes ⁷³.

De part son importante expression au niveau rénal, la P-gp participe à l'élimination urinaire des inhibiteurs de la calcineurine et du sirolimus. On peut poser l'hypothèse qu'un défaut de régulation positive ou une faible expression constitutive pourrait mener à l'accumulation intra-rénale des inhibiteurs de la calcineurine et augmenter leur néphrotoxicité à long terme. En effet, des études expérimentales sur des modèles cellulaires ont montré que l'inhibition de la P-gp entraînait une accumulation intra-rénale de ciclosporine ⁷⁴. D'autre part, il a été montré chez le rat que le sirolimus potentialise les effets néphrotoxiques de la ciclosporine via une interaction pharmacocinétique qui entraîne une augmentation intra-rénale des concentrations de ciclosporine ⁷⁵. Il a été prouvé *in vitro* que cette interaction provenait de l'inhibition de la P-gp par le sirolimus ⁷⁴. On peut donc faire l'hypothèse que l'activité de la P-gp du greffon (sous le contrôle du génome du donneur mais aussi, pour une grande partie, sous le contrôle de l'environnement du receveur tels que la co-médication, l'alimentation), pourrait influencer la toxicité rénale de la ciclosporine et probablement celle du tacrolimus bien qu'il n'y ait pas à ce jour de données expérimentales.

II.1.1.(c) Variabilité pharmacogénétique

Le gène *ABCB1* est très polymorphe avec au moins 50 SNPs identifiés à ce jour. Aucun SNP du gène *ABCB1* ne résulte en une perte totale d'expression ou de fonction de la P-gp mais certains SNP sont susceptibles d'expliquer une partie de la variabilité inter-individuelle de sa capacité de transport ⁷⁶. Les polymorphismes les plus étudiés sont une substitution de C vers T en position 3435 (exon 26), une substitution de C vers T en position 1236 (exon 12) et une substitution de G vers T ou A en position 2677 (exon 21) ⁷⁶. Le SNP 2677G>T/A est un SNP non synonyme qui résulte en un changement d'acide aminé de la protéine. En revanche, les SNP 1236 C>T et 3435 C>T sont des SNPs synonymes qui n'ont pas pour conséquence de changement d'acide aminé. Bien que ce soit un polymorphisme silencieux, il a été montré que le polymorphisme 3435C>T conduisait à une diminution des niveaux d'ARNm par diminution de la stabilité de cet ARNm ⁷⁷ et à la formation d'une protéine altérée dans sa conformation et sa fonction ⁷⁸. Cependant, la significativité fonctionnelle de ce SNP reste controversée : Hoffmeyer *et al* avaient décrit une association à la limite de la significativité entre le génotype homozygote 3435TT et l'expression diminuée de la protéine ⁷⁹ mais

d'autres études n'avaient pas retrouvés ce résultat⁸⁰⁻⁸². Une étude sur l'expression placentaire de la P-gp et le 3435 C>T chez la mère et le fœtus décrivait une association positive entre l'expression de la P-gp et le génotype CC3435 chez la mère et le fœtus par rapport au génotype variant 3435TT, mais dans un contexte de tests multiples⁸⁰. Les études d'associations entre l'expression de la P-gp et les autres polymorphismes n'ont pas permis d'identifier des génotypes modifiant l'expression en ARNm⁸⁰⁻⁸² ou protéique de la P-gp^{80,83}. D'autres analyses étaient basées sur l'étude des haplotypes plutôt que sur l'analyse par génotype, ce qui doit théoriquement augmenter la puissance pour détecter des interactions et des associations avec des SNP qui n'ont pas été génotypés⁷⁶. Une étude a montré une association entre l'haplotype 1236 C>T, 2677G>T/A 3435 C>T et l'expression en ARNm de la P-gp⁸¹ mais ces résultats étaient basés sur une analyse en sous groupes avec de très faibles effectifs de patients. A l'inverse d'autres études n'ont pas montré d'association entre ces haplotypes et l'expression en ARNm⁸⁴ ou protéique de la P-gp chez le fœtus⁸⁰.

II.1.(2) Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2)

II.1.2.(a) Généralités

Les protéines MRP appartiennent également à la superfamille des transporteurs ABC. Elles comptent 9 membres MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), MRP5 (ABCC5), MRP6 (ABCC6), MRP7 (ABCC10), MRP8 (ABCC11), et MRP9 (ABCC12)⁸⁵. MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7, sont des protéines de 190kDa et ont dans leur structure 2 cassettes de liaison à l'ATP (ABC) et 17 hélices transmembranaires. Ces protéines sont exprimées de façon prédominante dans le foie mais aussi dans le rein et dans l'intestin⁸⁶. La protéine MRP2, produite par le gène *ABCC2* contient 1545 acides aminés⁸⁷. La figure 7 représente les différents domaines de cette protéine. Dans la membrane canaliculaire des hépatocytes, MRP2 joue un rôle important dans l'excrétion biliaire de différents types de substances dont la bilirubine conjuguée et de multiples métabolites glucuroconjugés⁸⁸. Chez l'homme, certaines mutations héréditaires rares résultent en une perte quasi-totale de fonction de MRP2 caractérisant une maladie chronique : le syndrome de

Dubin-Johnson (hyperbilirubinémie conjuguée) ⁸⁹. La protéine MRP2 est exprimée dans le rein au niveau de la face apicale des tubules proximaux et serait responsable de l'efflux apical dans l'urine des substrats. Les MRPs transportent des composés hydrophiles parmi lesquels les glucuronides, glutathions et sulfuroconjugués de composés endogènes et exogènes ⁹⁰.

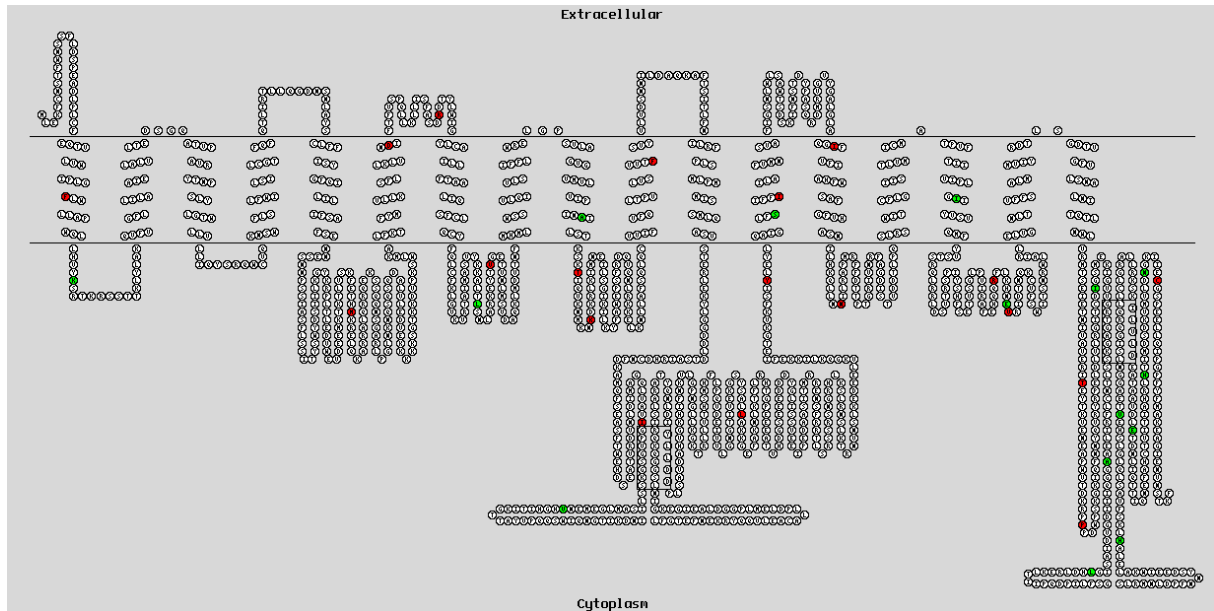


Figure 7. Différents domaines de la protéine d'efflux MRP2 (SNP non synonymes en rouge et synonymes en vert, exons dans les carrés noirs). (The UCSF Pharmacogenomics of Membrane Transporters project database is supported by NIH/NIGMS (U01 GM61390)).

II.1.2.(b) Rôle dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

La protéine de transport MRP2 intervient dans l'excrétion du MPAG et probablement de l'AcMPAG au niveau hépato-biliaire. Après son passage dans la bile, de petites quantités de MPAG sont détectées dans les selles (environ 6%) alors que le reste est déconjugué au niveau local par des bactéries intestinales pour redonner du MPA. Le cycle entéro-hépatique conduit à une augmentation secondaire des concentrations de MPA plasmatique 6 à 12h après la prise contribuant à environ 40% de l'exposition au MPA ⁹¹. Les SNPs conduisant à modifier

l'activité de MRP2 peuvent en théorie influencer ce processus et donc affecter l'exposition au MPA ⁹². Une sécrétion tubulaire active de MPAG dans les urines représente le mécanisme d'élimination principale du MPA ⁹³. Ce mécanisme pourrait, au moins en partie, faire intervenir MRP2 ⁹⁴. Un autre facteur important est l'inhibition de MRP2 par la ciclosporine entraînant une diminution de l'excrétion biliaire du MPAG et donc du cycle entéro-hépatique du MPA ⁹⁵. Par conséquent, en l'absence d'ajustement des doses sur la base des concentrations, les transplantés rénaux recevant de la ciclosporine ont généralement des expositions au MPA 30 à 40% inférieures à ceux qui reçoivent du tacrolimus, sirolimus ou du mycophénolate mofétil seul ⁹⁶. Cet effet est compensé par le suivi thérapeutique pharmacologique. En outre, les concentrations de MPA augmentent après l'arrêt de la ciclosporine ⁹⁷.

Concernant les inhibiteurs de la calcineurine, le transporteur MRP2 pourrait contribuer, en plus de la P-gp, à l'excrétion biliaire de la ciclosporine et de ses métabolites ⁹⁸; en revanche, le tacrolimus n'est ni substrat, ni inhibiteur de MRP2 ⁹⁹. Concernant le sirolimus, il n'y a actuellement aucune preuve que le transporteur MRP2 soit impliqué dans son excrétion biliaire ou rénale.

II.1.2.(c) Variabilité pharmacogénétique

Des polymorphismes du gène codant pour cette protéine ont été décrits ⁸⁸ avec une action possible sur l'exposition au MPA. Le polymorphisme le plus largement étudié est un SNP du promoteur -24 C>T. Cependant, les données concernant la conséquence fonctionnelle de ce polymorphisme sont contradictoires; en effet, aucune différence en terme d'expression en ARNm ou d'expression de la protéine n'a été observée chez l'homme au niveau duodéal ¹⁰⁰ ou placentaire ¹⁰¹. Il semble, *in vivo*, que ce polymorphisme pourrait réguler positivement la protéine ¹⁰². Un autre SNP fréquemment étudié est le 3972 C>T de l'exon 28 qui est en déséquilibre de liaison modéré avec le -24C>T ⁹². Ce SNP a été associé à une diminution de l'exposition à l'irinotécan ¹⁰³ mais étant donné qu'il s'agit d'une mutation silencieuse, cet effet pourrait être la conséquence du déséquilibre de liaison avec le MRP2 24C>T. En effet, aucun effet significatif sur l'ARNm ou l'expression de la protéine n'a été observé ¹⁰¹. Le troisième SNP fréquemment étudié est le 1249G>A de l'exon 10 entraînant la substitution

d'une valine par une isoleucine au niveau de l'acide aminé 417. Cependant, ses conséquences fonctionnelles n'ont pas été clairement établies ¹⁰¹.

II.1.(3) Organic anion transporter peptides (OATP)

II.1.3.(a) Généralités

Ces protéines comptent 11 membres codés par des gènes de la superfamille des Solute Carrier (*SLC* ; sous-famille *SLCO*) ¹⁰⁴. Ce sont des protéines de transport transmembranaire intervenant dans l'influx cellulaire de composés anioniques. Les substrats de ces OATPs sont notamment les sels biliaires, des stéroïdes conjugués, des hormones thyroïdiennes, des peptides anioniques et de nombreux médicaments ou xénobiotiques. De par leur expression sélective au niveau des membranes apicales ou basolatérales de cellules polarisées (foie, rein, intestin), ces transporteurs peuvent affecter significativement la pharmacocinétique et par conséquent l'effet des médicaments substrats. Au niveau du tractus digestif, une expression au niveau de la membrane apicale des entérocytes a été observée et pourrait contribuer à l'absorption digestive de certains médicaments substrats. Au niveau hépatique, les OATPs, localisés au niveau basolatéral de la membrane des hépatocytes, interviendraient dans la capture depuis le sang vers les hépatocytes. Bien que le mécanisme de fonctionnement des OATPs ne soit pas entièrement élucidé, une étude récente suggère que les OATPs transportent leurs substrats par une translocation à travers un pore central, chargé positivement ¹⁰⁵. Ce transport est indépendant des gradients sodiques, potassiques ou chlorés, du potentiel de membrane et de la présence d'ATP. La capture des substrats par les OATPs semble faire intervenir un échange électriquement neutre dans lequel la capture cellulaire est couplée à l'efflux d'anions comme le bicarbonate, le glutathion ou des dérivés S-conjugués du glutathion ¹⁰⁶. Les protéines les plus étudiées sont celles exprimées au niveau hépatique : OATP1B1 (anciennement connu sous le nom OATP2 ou OATP-C) et OATP1B3 (anciennement connu sous le nom OATP8) codées par *SLCO1B1* et *SLCO1B3*, respectivement.

II.1.3.(b) Rôle dans la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Le MPA n'est pas substrat de l'OATP1B1 ou de l'OATP1B3¹⁰⁷. En revanche, son principal métabolite, le MPAG, est substrat de ces deux transporteurs localisés au niveau des sinusoides hépatiques^{107,108}. Ils participeraient à la capture du MPAG circulant et constitueraient une seconde voie d'alimentation du cycle entéro-hépatique du MPA (en plus de la production hépatique du MPAG). La ciclosporine est un inhibiteur connue des OATPs mais aucune donnée ne permet de penser qu'elle soit substrat de ces transporteurs¹⁰⁹. Le tacrolimus n'est ni inhibiteur, ni substrat de ces transporteurs¹¹⁰. Concernant le sirolimus, une étude *in vitro* réalisée dans notre unité, avec plusieurs types cellulaires (HEK293 transfectées, Caco-2 et HepaRG) a montré que le sirolimus, comme la ciclosporine, n'est pas substrat mais inhibiteur de ces transporteurs¹¹¹.

II.1.3.b.(i) Variabilité pharmacogénétique

De nombreux polymorphismes ont été décrits dans les gènes codant pour les OATPs¹¹². Une liste exhaustive peut être obtenue par consultation des données du projet PMT (« Polymorphism of Membrane Transporters » de l'Université de Californie à San Francisco : <http://pharmacogenetics.ucsf.edu>). Trois SNPs du gène SLCO1B1 (338A>G, 521T>C et 463C>A), en fort déséquilibre de liaison entre eux et 3 SNPs du gène SLCO1B3 (334T>G en déséquilibre de liaison complet avec le 699G>A et 767G>C), résultants en un changement d'acides aminés ont été particulièrement étudiés^{107,113}.

II.2 Associations

pharmacogénétique/pharmacocinétique/pharmacodynamie

Nous aborderons dans cette partie, pour chaque immunosuppresseur, les relations décrites dans la littérature, entre pharmacogénétique et pharmacocinétique des immunosuppresseurs. Nous décrirons ensuite pour chaque immunosuppresseur les principaux effets indésirables et ferons une revue de la littérature pour les associations pharmacogénétique / effets indésirables.

II.2.(1) Acide mycophénolique

II.2.1.(a) Associations

pharmacogénétique/pharmacocinétique

II.2.1.a.(i) Influence des polymorphismes de MRP2 sur la pharmacocinétique du MPA

Plusieurs études ont recherché un effet du polymorphisme -24 C>T sur l'exposition au MPA et la grande majorité n'ont pas observé d'association entre ce SNP et les paramètres pharmacocinétiques du MPA et ce, quelque soit l'inhibiteur de calcineurine associé (tacrolimus^{107,113-115} ou ciclosporine^{107,114}). Seule une étude a rapporté des résultats positifs : Naesens et al ont étudié 95 patients transplantés rénaux co-traités par tacrolimus et ont constaté qu'en période précoce post greffe (J7), chez des patients présentant une dysfonction hépatique, les patients porteurs du génotype sauvage CC-24 présentaient une exposition au MPA plus faible, pour une même dose, comparé aux patients porteur d'au moins un allèle muté⁹². Les auteurs observaient en outre une AUC_{6-12h} de MPA largement plus faible, ce qui suggère une diminution du cycle entéro-hépatique. En période stable, l'allèle variant était associé à une plus faible clairance orale au MPA⁹². Cette étude rapportait un effet similaire pour le SNP 3972 C>T sur la pharmacocinétique du MPA ; cependant, ce SNP étant silencieux, il est probable que cet effet soit lié au SNP -24 C>T. En revanche, un travail de la même équipe n'a pas retrouvé d'association entre les SNPs de MRP2 et l'exposition au MPA

chez 100 patients transplantés rénaux ¹¹⁴. De même, Baldelli n'a pas observé d'influence du -24 C>T et 1249 G>A sur l'exposition au MPA et MPAG ¹¹⁶. Une étude portant sur 388 transplantés rénaux co-traités par du tacrolimus n'a pas observé d'association entre le SNP 3972 C>T et l'AUC_{0-12h} du MPA ¹¹⁵. De même, nous n'avons pas observé d'effet de ces SNPs sur la pharmacocinétique du MPA chez des transplantés rénaux co-traités par de la ciclosporine, du tacrolimus ou du sirolimus ¹⁰⁷.

II.2.1.a.(ii) Influence des polymorphismes des OATP sur la pharmacocinétique du MPA

Une étude réalisée dans notre unité et une étude réalisée chez 87 transplantés rénaux japonais traités par du tacrolimus n'ont pas mis en évidence de relation entre les polymorphismes de l'OATP1B1 et la pharmacocinétique du MPA ^{107,113}.

En revanche, nous avons observé chez 70 patients transplantés rénaux co-traités par tacrolimus ou sirolimus que les porteurs de l'haplotype *SLCO1B3* 334G/699A avaient une AUC_{0-12h}/dose moyenne de MPA environ 1,4 fois plus faible et une augmentation parallèle du rapport MPAG/MPA compatible avec une diminution du cycle entéro-hépatique par rapport aux patients porteur de l'haplotype sauvage (334T/699G) ¹⁰⁷. Cet effet n'était pas observé chez 115 patients co-traités par ciclosporine ¹⁰⁷ ce qui peut très probablement être expliqué par l'effet inhibiteur de la ciclosporine sur l'activité de l'OATP1B3. Des données *in vitro* obtenues à l'aide d'une lignée cellulaire (HEK293T) exprimant la version sauvage et mutée de l'OATP1B3 ont permis de confirmer que la capture cellulaire du MPAG était diminuée par le polymorphisme ¹⁰⁷.

Cependant, une étude réalisée chez 87 patients Japonais a conclu à une augmentation de l'AUC_{6-12h}/dose de MPA chez les patients porteurs du génotype 334GG/699AA par rapport aux porteurs du génotype 334TT ¹¹³. Les auteurs ont avancé l'hypothèse suivante : l'absorption du MPA par les hépatocytes et son excrétion biliaire pourraient être plus élevées chez les patients porteurs du génotype 334GG. Ceci est en contradiction avec les résultats *in vitro* de Letshert *et al* qui montrent que l'activité OATP1B3 est réduite chez les porteurs de l'allèle 334G ¹¹⁷ et par nos propres données confirmant une diminution d'activité de l'OATP1B3 par le polymorphisme. Il est à noter que plus récemment, Miura *et al.* ont publié un autre travail dans lequel ils observent, conformément à notre hypothèse, une AUC_{0-12h} plus

élevée de MPAG, pour une même dose de MPA, chez les patients homozygotes pour le 334G par rapport aux porteurs d'un allèle sauvage ¹¹⁸.

II.2.1.a.(iii) Influence des polymorphismes des UGT sur la pharmacocinétique du MPA

- UGT1A9

Une étude réalisée chez des transplantés rénaux a montré que les porteurs de l'haplotype de l'UGT1A9 -275A/-2152T avaient, pour une même dose administrée, une exposition au MPA plus faible que les porteurs de l'haplotype sauvage T-275/C-2152 ($p=0,02$, $n=448$) ¹¹⁴. Ces résultats confirment ceux obtenus par la même équipe dans un sous groupe de 32 patients traités par 2 g/j de MMF avec une aire sous la courbe (AUC_{0-12h}) de MPA deux fois plus faible pour les porteurs de l'haplotype variant -275A/-2152T de l'UGT1A9 ¹¹⁹. Ces résultats ont été aussi observés dans le travail de Lévesque, chez des volontaires sains, après une prise unique de 2 g de MMF (17 porteurs de l'haplotype variant de l'UGT1A9 (-275A/-2152T) vs 17 porteurs de l'haplotype sauvage de l'UGT1A9 (T-275/C-2152) ¹²⁰. De façon similaire, van Schaik *et al* ont observé ces mêmes résultats chez les transplantés rénaux co-traités par du tacrolimus mais pas chez ceux co-traités par de la ciclosporine. Cela suggère une augmentation de MPAG dans les hépatocytes secondairement à l'inhibition de l'excrétion biliaire du MPAG dans la bile ¹¹⁵. A l'inverse, un effet de ces polymorphismes a été observé par Johnson chez des patients co-traités par de la ciclosporine alors qu'aucune différence n'étaient observée chez les patients co-traités par du tacrolimus ¹²¹. Ceci peut s'expliquer dans le groupe tacrolimus par le fait que seulement 3 patients étaient porteurs de l'allèle -275A et -2152T. Une autre étude a observé que chez les transplantés rénaux porteurs de ces allèles variants, pour une même dose de MMF, une proportion significativement plus élevée d' AUC_{0-12h} de MPA étaient en dessous de la zone thérapeutique recommandée (30 mg.h/l) ¹²². Une étude réalisée dans notre unité ainsi qu'une autre étude n'ont pas observé d'effet de ces polymorphismes sur la pharmacocinétique du MPA ^{107,116}. L'influence des polymorphismes fréquents en position -440 et -331 reste controversée. Baldelli *et al.* ont observé, chez 40 transplantés rénaux, des AUC_{0-12h} de MPA plus élevées chez les porteurs de l'allèle -440T/-331C de ces SNPs, pour une même dose de MMF ¹¹⁶. Cette association n'a pas été retrouvée dans une étude réalisée dans notre unité ¹⁰⁷ ni dans l'étude de Lévesque *et al.* chez 48 volontaires sains après prise unique de 1,5 g de MMF ¹²⁰.

Bien que très peu fréquent, le SNP caractéristique de l'allèle *UGT1A9*3* (98 T>C) a été très étudié. Lévesque *et al* ont observé une augmentation des AUC_{0-12h} de MPA et d'AcMPAG chez les porteurs de l'allèle variant (98C), cependant, sur 305 sujets, seuls 5 sujets étaient porteurs de ce polymorphisme¹²⁰. De façon similaire, dans une cohorte de 338 transplantés rénaux co-traités par tacrolimus ou ciclosporine, 10 patients étaient porteurs de l'allèle variant et présentaient une augmentation de l' AUC_{0-12h} de MPA, pour une même dose de MMF, au cours de la première année¹¹⁵. Ces données suggèrent fortement une association entre l'*UGT1A9 98T>C* et la pharmacocinétique du MPA, cependant, du fait de la très faible fréquence de ce polymorphisme, il faut être prudent avant de tirer des conclusions définitives.

- *UGT1A8*

Trois études n'ont pas observé d'influence de l'allèle déficitaire *UGT1A8*3* (SNP 830 G>A) sur l' AUC_{0-12h} de MPA, cependant, du fait de la faible fréquence de ce polymorphisme, il est possible que ces études aient manqué de puissance pour pouvoir observer un effet de ce SNP^{115,121,123}. Des données sont contradictoires pour l'effet de l'allèle *UGT1A8*2* (SNP 518 C>G) sur la pharmacocinétique du MPA. Une équipe a observé, chez des patients transplantés rénaux, du pancréas ou rein-pancréas, des concentrations C_0 /dose de MPA 60% plus élevées chez les porteurs homozygotes ou hétérozygotes de l'allèle *UGT1A8*2* (C518G) par rapport aux porteurs de l'allèle *UGT1A8*1* et ce, uniquement chez les patients co-traités par du tacrolimus ($p=0,01$), alors que cet effet n'était pas observé chez les patients co-traités par de la ciclosporine ($n=117$)¹²¹. Inversement, l'équipe de van Schaik a observé une AUC_{0-12h} de MPA plus élevé pour les porteurs homozygotes de l'allèle 518G par rapport aux porteurs de l'allèle sauvage uniquement dans le groupe ciclosporine alors qu'aucun effet n'était observé dans le groupe tacrolimus¹¹⁵. De même, dans le sous groupe de patient traités par tacrolimus ou sirolimus, une étude de notre unité montrait une réduction de l' AUC_{0-12h} de MPA chez les porteurs homozygotes de l'allèle variant 518G cependant, ce groupe ne contenait que 4 patients et après prise en compte de la correction de Bonferonni, cet effet ne persistait pas¹⁰⁷. Deux autres équipes n'ont pas observé de relation entre les paramètres pharmacocinétiques du MPA et les polymorphismes *UGT1A8*2* ou **3* que ce soit après prise unique chez des volontaires sains¹²⁰ ou chez des patients transplantés rénaux japonais recevant du MMF associé à du tacrolimus¹²⁴.

- *UGT1A7*

Le polymorphisme *UGT1A7 622 C>T* n'a pas été associé à des modifications de la pharmacocinétique du MPA^{120,125}.

- UGT2B7

Levesque *et al* ont montré que chez 17 volontaires sains, après prise unique de MMF, les AUC_{0-12h} de MPA étaient plus élevées chez les sujets porteurs homozygotes du variant UGT2B7 802T par rapport aux individus porteur de l'allèle sauvage C802¹²⁰. Dans cette même étude en revanche, ils ne retrouvaient pas d'effet de ce SNP sur la production d'AcMPAG¹²⁰. Une étude réalisée chez 40 transplantés rénaux a montré des valeurs de C_{max}/dose de MPA significativement plus élevées chez les porteurs homozygotes de l'allèle variant alors que l'AUC_{0-12h} de MPA n'était pas différente chez les porteurs ou non du SNP 802C>T¹¹⁶. Deux autres études réalisées chez des japonais¹²⁴ ou des caucasiens¹¹⁵ n'ont pas rapporté d'effet de ce SNP sur l'exposition au MPA. Cette UGT étant impliquée dans une voie de métabolisme mineure du MPA, une conséquence importante de son polymorphisme sur l'exposition au MPA semble peu probable. Une étude réalisée au sein de notre unité a montré que les porteurs de l'UGT2B7 -842A avaient une AUC_{0-9h} d'AcMPAG significativement plus élevée à 1 et 3 mois après transplantation rénale chez 40 patients co-traités par du sirolimus alors qu'aucun effet n'était observé chez les patients co-traités par du tacrolimus ou du sirolimus⁶⁵. Aucun effet de ce SNP n'a été observé sur la pharmacocinétique du MPA ou de l'AcMPAG chez 332 transplantés rénaux co-traités par un inhibiteur de la calcineurine¹²⁶.

II.2.1.(b) Association pharmacogénétique/pharmacodynamique

II.2.1.b.(i) Pharmacogénétique des effets indésirables de l'acide mycophénolique

Les principaux effets indésirables rapportés pour le MPA sont des événements digestifs (diarrhées) et hématologiques (neutropénies et anémies). Ces effets indésirables seraient responsables d'un pourcentage d'inobservance des patients de près de 30%^{21,127}.

En pratique, la dose de MMF doit être réduite chez près de 25% des patients pour leucopénie. Concernant la diarrhée, elle répond le plus souvent à un fractionnement de la dose en plusieurs prises ou à une réduction de la dose²².

II.2.1.b.i.1 Rappel des effets indésirables digestifs de l'acide mycophénolique

Les effets gastro-intestinaux du MMF semblent être indépendants de la voie d'administration¹²⁸ et une étude récente menée chez un nombre suffisant de patients n'a pas montré de relation entre la dose ou les concentrations de MPA et de ses métabolites et la diarrhée liée au MMF¹²⁹. Les patients traités par ciclosporine+MMF présentent moins de diarrhées que les patients co-traités par tacrolimus+MMF¹²⁹. Le MPA et également ses métabolites pourraient être responsables de ces effets indésirables. L'implication directe du MPA pourrait passer par son effet inhibiteur de l'IMPDH. En effet, comme de nombreuses cellules de l'organisme, les cellules de l'épithélium intestinal sont partiellement dépendantes de la voie de l'IMPDH pour la croissance et la réplication¹⁵. Cette inhibition locale de la réplication pourrait être à l'origine d'une perturbation de l'absorption des liquides et de diarrhées. Des cas d'atrophies villositaires ont été rapportés chez des patients présentant des diarrhées suivant l'administration de MMF. Ces atrophies villositaires disparaissaient après arrêt du MPA^{130,131}. D'autre part, il a été montré que l'AcMPAG, comme la plupart des métabolites glucuroconjugués formés à partir d'une fonction acide carboxylique (acyl-glucuroconjugués), est un composé réactif pouvant former des adduits avec l'albumine¹³² ainsi qu'avec des protéines tissulaires (rein, colon, foie) chez l'animal^{133,134}. Ce métabolite entraînerait par ailleurs la libération de cytokines *in vitro* et *in vivo*^{132,135}. Ces éléments alimentent l'hypothèse qu'un mécanisme local soit à l'origine des troubles gastro-intestinaux liés à la prise de MMF.

II.2.1.b.i.2 Effets indésirables hématologiques et infectieux de l'acide mycophénolique

Les résultats d'études randomisées semblent indiquer que le MMF ne soit pas significativement associé à une incidence plus importante d'effets indésirables par rapport à l'azathioprine¹³⁶. Les premiers essais sur le MMF en transplantation rénale avaient suggéré une plus forte incidence d'infections opportunistes (CMV, Herpes simplex et zona) par rapport à l'azathioprine. Cependant, la seule différence significative a été observée pour l'infection tissulaire à CMV et ce, chez les patients recevant 3 g/j de MMF alors que cette différence n'était pas observée chez les patients recevant 2g/j de MMF. De plus, le développement de la maladie CMV et d'infections à CMV sous MMF semble aller de pair avec la leucopénie. Les leucopénies surviennent chez 10 à 35% des patients²¹ et peuvent s'expliquer par le mécanisme d'action du MPA (l'inhibition sélective de la prolifération des

lymphocytes). Les concentrations plasmatiques de MPA, et en particulier l'AUC_{0-12h}, ont été significativement associées à des infections sévères et à des leucopénies^{137,138}. Le groupe de coopération européen d'étude du MMF a rapporté que 6,8% des patients traités par 3g/j de MMF et 4,2% de ceux traités par 2g/j de MMF développaient une anémie par rapport à 1,8% dans le groupe placebo ne recevant que de la ciclosporine et des corticoïdes. Une autre étude internationale a observé 15% et 9% d'anémies, chez les patients traités par 3g/j et 2g/j de MMF respectivement, comparé à 10% dans le groupe recevant de l'azathioprine²². Les mécanismes de l'anémie ne sont pas totalement élucidés et ne peuvent être que partiellement expliqués par le mode d'action du MPA. Deux études de cas rapportent chez 5 patients une aplasie érythroïde prouvée par biopsie, secondaire à la prise de MMF^{139,140}. Cet effet a plus été attribué à un effet général antiprolifératif qu'à un effet spécifique sur les lymphocytes. D'autre part, pour des doses fortes de MMF, il a été rapporté une association entre d'une part les concentrations plasmatiques de MPA et l'AUC de MPA avant traitement et d'autre part le taux d'hémoglobine chez des transplantés rénaux stables¹⁴¹. Cependant, une étude chez des transplantés rénaux, dans les 12 premiers mois post-transplantation, co-traités par MMF/tacrolimus n'a pas observé de relations significatives entre le MPA et l'apparition d'anémies¹⁴². D'autres facteurs que le MPA pourraient être impliqués dans cet effet indésirable : lors de transplantation rénale, il semble qu'il y ait un affaiblissement de la faculté de l'allogreffe à produire de l'érythropoïétine¹⁴³. De plus, les infections virales telles que l'infection à CMV, à l'EBV et au Parvovirus B19, fréquentes chez les receveurs de greffe, sont responsables d'aplasies médullaires généralisées¹⁴⁴.

II.2.1.b.(ii) Principales associations décrites

II.2.1.b.ii.1 MRP2 et effets indésirables

Concernant les effets indésirables du MPA, Naesens *et al* ont observé une augmentation du risque de diarrhée dans la première année post-transplantation chez les porteurs de l'allèle variant -24T par rapport aux porteurs de l'allèle sauvage⁹². En revanche, deux autres études n'ont pas retrouvé cet effet ni sur la diarrhée, ni sur d'autres symptômes gastro-intestinaux^{113,145}. Aucune association entre les polymorphismes 1249G>A et 3972C>T et la diarrhée n'a été rapportée¹¹⁴.

II.2.1.b.ii.2 OATP et effets indésirables

Aucune association n'a été observée entre le polymorphisme 334T>G de l'OATP1B3 et la diarrhée due au MPA chez 87 transplantés rénaux co-traités par du tacrolimus¹¹³. Dans une étude réalisée chez 218 transplantés rénaux, une équipe a observé un effet protecteur de l'allèle *SLCO1B1**5 (correspondant à l'OATP1B1 521 T>C) sur le critère combiné « effets indésirables du MMF »¹⁰⁸.

II.2.1.b.ii.3 UGT et effets indésirables

La conséquence des SNPs de l'UGT1A9 sur le risque d'effets indésirables du MPA et l'efficacité du traitement reste controversée. Le polymorphisme essentiellement étudié est celui du promoteur -275T>A/-2152C>T. Une étude conduite chez des transplantés rénaux recevant du MMF à dose fixe en association avec du tacrolimus a observé que la présence des SNPs -275A et -2152C était associée à une augmentation du risque de rejet aigu¹¹⁵. Dans cette étude les patients porteurs de ces SNPs avaient une exposition au MMF diminuée par rapport aux non-porteurs. Une seconde étude chez des transplantés rénaux co-traités par tacrolimus a retrouvé cette même diminution d'exposition au MMF pour les porteurs de ces SNPs et a montré par ailleurs une association entre ces SNPs et un nombre augmenté d'effets indésirables gastro-intestinaux¹⁴⁶. En revanche une étude de Kuypers *et al* n'a pas retrouvé d'impact sur le rejet aigu ou les effets indésirables gastro-intestinaux¹¹⁹. Concernant les effets indésirables hématologiques, seule une étude chez des enfants, réalisée cependant sur un effectif faible (n=16), a montré que les patients homozygotes ou hétérozygotes pour le polymorphisme UGT1A9 C-331T avaient plus de leucopénies que les homozygotes mutés¹⁴⁷. De par son rôle dans la production de l'AcMPAG, un métabolite actif du MPA et susceptible de former des adduits avec certaines protéines tissulaires, l'influence du polymorphisme de l'UGT2B7 sur le risque d'effets indésirables du MPA a été particulièrement étudié.

Dans une étude réalisée chez 67 transplantés rénaux d'origines diverses, le score sur l'échelle d'intensité des symptômes gastro-intestinaux était plus faible chez les patients porteurs d'un allèle variant *UGT2B7* 802T (en déséquilibre de liaison total avec l'UGT2B7 -842 G>A) comparé aux porteurs homozygotes de l'allèle sauvage¹⁴⁵. Dans le cas particulier de la diarrhée, aucune association n'était cependant retrouvée. Dans une seconde étude chez 332 transplantés rénaux co-traités par du tacrolimus ou de la ciclosporine, aucun effet de l'UGT2B7 -842 G>A n'a été observé concernant le risque de diarrhées liées au MMF¹²⁶.

Du fait de l'association entre les concentrations plasmatiques de MPA et les infections sévères et les leucopénies liées au MMF^{137,138}, tout polymorphisme capable de modifier les concentrations circulantes pourrait être responsable de tels effets indésirables ; cependant, van Agteren *et al* n'ont pas observé d'association entre l'UGT2B7-842 G>A et l'incidence des leucopénies chez des transplantés rénaux¹²⁶.

II.2.(2) Inhibiteurs de la calcineurine (Ciclosporine A et Tacrolimus)

II.2.2.(a) Association pharmacogénétique/pharmacocinétique

II.2.2.a.(i) Influence des polymorphismes d'ABCB1 sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

De nombreuses études portant sur l'association entre les polymorphismes d'*ABCB1* et la pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine ont été réalisées. Pour la ciclosporine, les résultats sont controversés : aucune association significative entre le polymorphisme de l'exon 26 du gène et la pharmacocinétique de la ciclosporine n'a été observée chez deux populations de transplantés rénaux^{148,149}. Seule une étude rapporte des valeurs du rapport C₀/dose plus faibles chez les patients porteurs des allèles sauvages pour l'exon 12 (1236CC) chez 106 patients¹⁵⁰. En revanche, dans cette même étude, l'analyse par haplotype des polymorphismes des exons 12, 21 et 26 ne montre pas de relation avec la pharmacocinétique de la ciclosporine. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'impact clairement établi des polymorphismes de la P-gp sur la pharmacocinétique de la ciclosporine.

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des polymorphismes *ABCB1* sur la pharmacocinétique du tacrolimus : la plupart n'ont pas mis en évidence d'effet des SNPs des exons 26, 12 et 21, étudiés seuls^{148,151} ou regroupés en haplotypes^{149,152}. Seule une étude a trouvé un rapport C₀/dose plus élevé chez les greffés rénaux (n=81) porteurs des allèles mutés pour les exons 12 et 21 par rapport aux sauvages porteurs des allèles sauvages¹⁵². Les auteurs

mettaient également en évidence un effet significatif de l'haplotype muté (T-T/A-T) constitué des SNP des exons 12, 21 et 26 du gène *ABCB1* par rapport à l'haplotype sauvage (C-G-C).

II.2.2.a.(ii) Influence des polymorphismes du CYP3A sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Comme pour *ABCB1*, les associations entre les polymorphismes du CYP3A et la pharmacocinétique de la ciclosporine sont controversées : pour le CYP3A5, Haufroid *et al* ont montré dans le cadre d'une étude réalisée chez 50 patients greffés rénaux stables sous ciclosporine (et 50 sous tacrolimus) que les concentrations résiduelles rapportées à la dose de ciclosporine administrée (C_0 /dose) étaient 1,6 fois plus faibles chez les patients expresseurs du CYP3A5 que chez les patients non-expresseurs¹⁴⁹. Toutefois, cet effet n'a pas été retrouvé par Anglicheau *et al* (n=106) ni par Hesselink *et al* (n=104)^{148,150}. Concernant le CYP3A4, aucune relation entre la pharmacocinétique de la ciclosporine et le polymorphisme *CYP3A4*1B* n'a été rapportée chez des patients transplantés rénaux^{148,151}.

Au contraire de la ciclosporine, il a été démontré pour le tacrolimus, une forte influence de plusieurs polymorphismes des enzymes du métabolisme sur l'exposition au médicament (C_0 /dose) : Hesselink *et al* ont retrouvé des rapports C_0 /dose plus faibles chez les patients greffés rénaux porteurs de l'allèle *CYP3A4*1B* (n=10) que chez les patients porteurs de l'allèle sauvage (n=54)¹⁴⁸. Cette étude ainsi que celles de Macphee *et al* (n=180), de Thervet *et al* (n=80) et de Haufroid *et al* (n=50) ont aussi montré que les rapports C_0 /dose étaient plus faibles chez les porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5*1* que chez les homozygotes pour le *CYP3A5*3*^{149,153,154}.

II.2.2.(b) Association pharmacogénétique/pharmacodynamique

II.2.2.b.(i) Effets indésirables des inhibiteurs de la calcineurine

Le choix entre le tacrolimus ou la ciclosporine peut être guidé par leur spectre d'effets indésirables. En plus de la néphrotoxicité qui est l'effet indésirable majeur des inhibiteurs de la calcineurine, des études en transplantation rénale ont comparé les effets indésirables de la ciclosporine à ceux du tacrolimus^{155,156}. Les événements communs les plus rapportés étaient les infections du tractus urinaire (tacrolimus 28,3% ; ciclosporine 26,2%) et l'anémie (tacrolimus 15,7% ; ciclosporine 21,4%). L'incidence de survenue de diabète insulino-dépendant (tacrolimus 8,0% ; ciclosporine 3,7%), les tremblements (tacrolimus 12,2% ; ciclosporine 4,1%), l'hypomagnésémie (tacrolimus 6,6% ; ciclosporine 1,5%) et les gastrites (tacrolimus 3,1% ; ciclosporine 0,4%) ont été plus importants dans le groupe tacrolimus que ciclosporine. En pratique, une vigilance importante, une insulinothérapie ou la conversion du tacrolimus à la ciclosporine aux premiers signes d'intolérance glucidique après la greffe permettent de limiter l'incidence de cette complication. En revanche, l'hirsutisme (tacrolimus 0% ; ciclosporine 4,4%) l'hypertrophie gingivale (tacrolimus 0% ; ciclosporine 4,1%), l'hypercholestérolémie (tacrolimus 4,2% ; ciclosporine 8,9%), les hémorragies gastro-intestinales (tacrolimus 0,3% ; ciclosporine 2,6%) et les ictères cholestatiques (tacrolimus 0,3% ; ciclosporine 2,6%) étaient plus fréquents dans le groupe de patients traités par ciclosporine. En pratique, la conversion au tacrolimus de patients transplantés hypercholestérolémiques sous ciclosporine permet le plus souvent de corriger ce trouble métabolique¹⁵⁷. La fréquence et le type d'infection étaient similaires dans les 2 groupes et l'infection à CMV a été l'infection grave la plus fréquemment observée (tacrolimus 7% ; ciclosporine 6,3%). Trois cas de cancer ont été observés sur 557 patients : un carcinome de la peau dans le groupe ciclosporine et un lymphome intestinal et un carcinome de la thyroïde dans le groupe tacrolimus.

II.2.2.b.(ii) Néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine

La néphrotoxicité liée à la ciclosporine a été mise en évidence par Calne *et al.* alors que cette molécule était prescrite pour la première fois à des transplantés rénaux à la fin des années 70⁶. Ces effets néphrotoxiques étaient réversibles à la diminution de dose ou à l'arrêt du

médicament. L'introduction du tacrolimus en clinique, dans le début des années 1990, a montré que ce médicament avait des effets secondaires néphrotoxiques comparables à ceux associés à l'utilisation de la ciclosporine ¹⁵⁸. Aujourd'hui, après plus de 20 ans d'utilisation de ces médicaments, la néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine est l'un des plus grands défis pour les transplantateurs. Il existe 2 formes de néphrotoxicité au niveau clinique : une forme aigue et une forme chronique. La forme aigue survient quelques jours après le début du traitement par inhibiteur de la calcineurine et les symptômes sont similaires à d'autres dysfonctions précoces du greffon tel que le rejet aigue. Cette toxicité aigue est rapidement et complètement réversible à la diminution de la dose ou à l'arrêt du traitement ¹⁵⁹. Elle est caractérisée au plan physiopathologique par une constriction des artérioles glomérulaires afférentes entraînant une diminution du taux de filtration glomérulaire ¹⁶⁰. Les inhibiteurs de la calcineurine entraînent aussi une contraction des cellules mésangiales conduisant à une modification de la perméabilité glomérulaire. La forme chronique de néphrotoxicité à ces médicaments est caractérisée par un lent déclin de la fonction rénale pouvant évoluer vers l'insuffisance terminale et la plupart du temps associé à de l'hypertension. Bien que certains patients avec une toxicité chronique induite par les inhibiteurs de la calcineurine puissent présenter une protéinurie, la plupart n'en présentent pas et cette absence de protéinurie chez des patients transplantés permet de distinguer la néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine d'autres causes d'échec chronique de transplantation comme la réapparition de la maladie rénale initiale ou le rejet chronique d'origine humorale. En revanche, contrairement à la toxicité aigue, l'insuffisance rénale qui en découle ne s'améliore pas après réduction de dose ou arrêt du traitement. Histologiquement, cette néphrotoxicité chronique est caractérisée par de vastes modifications de l'architecture rénale pouvant inclure une hyalinose des artérioles, une sclérose glomérulaire associée à l'épaississement de la capsule de Bowman, une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle ¹⁶¹. Il est cependant délicat de faire la différence entre les changements histologiques associés à l'utilisation prolongée des inhibiteurs de la calcineurine de ceux induits par l'hypertension, le diabète ou le vieillissement pouvant d'ailleurs coexister avec la néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine ¹⁶².

Il a été montré dans une cohorte de patients traités par ciclosporine pour une greffe de rein et de pancréas, sans signes de néphrotoxicité initiale, qu'à 10 ans, l'incidence cumulée de néphrotoxicité chronique était proche de 100% ¹⁶³. Une autre étude menée chez des patients traités par tacrolimus a montré que les changements vasculaires caractéristiques de la

néphrotoxicité chronique des inhibiteurs de la calcineurine augmentaient avec le délai post-transplantation ¹⁶⁴. Cependant, le risque de développer une insuffisance rénale chronique due aux inhibiteurs de la calcineurine était lié à l'utilisation de doses fortes et à une prise prolongée de ces médicaments. Le risque de développer cette néphrotoxicité pourrait dépendre aussi de facteurs de susceptibilité individuels et pas seulement de l'exposition systémique de ces immunosuppresseurs.

II.2.2.b.(iii) Principales associations décrites

II.2.2.b.iii.1 Influence des polymorphismes d'ABCB1 sur les effets indésirables

Les études d'associations se sont ensuite focalisées sur les devenir des patients transplantés et notamment en prenant en compte le génotype du donneur. Hauser *et al* ont montré chez 97 patients qu'un génotype « donneur 3435TT » (exon 26 du gène *ABCB1*) et non un génotype « receveur 3435TT », était associé à la néphrotoxicité de la ciclosporine ¹⁶⁵. Dans cette étude, ni la dose de ciclosporine, ni son exposition n'étaient associées à la néphrotoxicité de la ciclosporine ce qui laisserait penser qu'une élimination locale réduite par l'épithélium tubulaire rénal serait la cause de la néphrotoxicité.

Pour le tacrolimus, une étude récente a montré chez 252 transplantés rénaux suivis prospectivement pendant 3 ans que les allèles 3435T du donneur et du receveur étaient significativement associés à la fibrose interstitielle et à l'atrophie tubulaire ¹⁶⁴. Comme pour la ciclosporine, l'exposition systémique au tacrolimus n'a pas été associée à ces modifications. Une étude rétrospective portant sur 832 transplantés rénaux traités par inhibiteurs de la calcineurine n'a pas observé de relation entre le génotype *ABCB1* du donneur étudié en SNP ou haplotype et la survie à un an post-transplantation ¹⁶⁶. Concernant la fonction rénale, il a été montré chez 147 transplantés rénaux suivis prospectivement que les patients porteurs des variants 2677T et 3435T avaient 3 fois plus de risque de reprise de fonction rénale retardée par rapport aux non porteurs de l'allèle (homozygotes sauvages) ¹⁶⁷. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce retard de reprise de fonction rénale chez les porteurs de l'allèle *3435T* pourrait provenir d'une accumulation intra-cellulaire de ciclosporine dans les leucocytes

provoquant une augmentation de la production locale d'oxygène réactif. Cependant, chez les patients traités par tacrolimus, ces résultats n'ont pas été observés.

II.2.2.b.iii.2 Influence des polymorphismes du CYP3A sur les effets indésirables

Le rôle des variations génétiques des CYP3As sur les effets indésirables des inhibiteurs de la calcineurine a été moins étudié que le rôle sur la pharmacocinétique de ces médicaments. Il n'a pas été mis en évidence d'association entre le nombre de rejets dans les 3 premiers mois et le polymorphisme CYP3A5 chez des transplantés rénaux recevant du tacrolimus^{153,154}. Cependant Macphee *et al* ont observé un rejet plus précoce chez les porteurs homozygotes et/ou hétérozygotes de l'allèle CYP3A5*1 ($p < 0.05$)¹⁵³. Il a été rapporté une plus forte incidence de néphrotoxicité du tacrolimus chez 95 transplantés rénaux pour les patients porteurs de l'allèle CYP3A5*1 que pour les patients porteurs homozygotes de l'allèle CYP3A5*3¹⁶⁸. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par une autre équipe¹⁶⁹. A l'exception d'une étude qui observait une meilleure survie du greffon chez les porteurs de l'allèle CYP3A5*1¹⁷⁰ par rapport aux porteurs de l'allèle CYP3A5*3, aucune association significative n'a été observée entre survie du greffon ou risque de rejet aigu et les polymorphismes du CYP3A^{171,172}.

II.2.(3) Sirolimus

II.2.3.(a) Association pharmacogénétique/pharmacocinétique

II.2.3.a.(i) ABCB1 et pharmacocinétique

Dans une étude portant sur 47 transplantés rénaux chinois recevant du sirolimus, des corticoïdes à faible dose et pas d'inhibiteur de la calcineurine, il n'a pas été observé d'association entre le 3435 C>T et le rapport C₀/dose de sirolimus¹⁷³. Des résultats similaires ont été observés chez 149 transplantés rénaux traités par sirolimus depuis plus de trois mois : les SNP des exons 12, 21 ou 26 n'étaient pas associés avec le rapport C₀/dose de sirolimus, que ce soit chez 51 patients traités par sirolimus *de novo*, chez 29 patients traités par sirolimus

associé à un inhibiteur de la calcineurine ou chez 69 patients traités initialement par des inhibiteurs de la calcineurine et secondairement remplacés par du sirolimus ¹⁷⁴.

II.2.3.a.(ii) CYP3A et pharmacocinétique

Anglicheau *et al* ont montré que des rapports C_0 /dose de sirolimus étaient diminués, chez les patients greffés rénaux porteurs d'au moins un allèle *CYP3A4*1B* (d'un facteur 2 environ pour les hétérozygotes et d'un facteur 3,5 pour les porteurs homozygotes) ou *CYP3A5*1* (facteur 1,5 pour les hétérozygotes et 2 pour les porteurs homozygotes). La majorité de ces patients recevaient le sirolimus secondairement à un traitement par des inhibiteurs de la calcineurine et (n=69 sur 120) ¹⁷⁴. En revanche, les auteurs ne retrouvaient pas d'effet des allèles *CYP3A4*1B* ou *CYP3A5*1* sur le rapport C_0 /dose pour les patients traités par du sirolimus *de novo* (n=51 sur 120) ou quand ils étaient co-traités par ciclosporine ou tacrolimus (n=20 et 9, respectivement). Une étude de notre unité réalisée chez 21 greffés rénaux traités par du sirolimus *de novo* a montré des valeurs d'exposition au sirolimus (AUC/dose, C_0 /dose, C_{max} /dose) plus faibles chez les patients porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5*1* ¹⁷⁵. A l'inverse, aucun effet de ces polymorphismes sur le besoin en dose ou le rapport C_0 /dose de sirolimus n'a été observé par Mourad *et al* dans une population de 85 transplantés rénaux comptant 38 patients traités par sirolimus *de novo* et 47 patients recevant la molécule secondairement à un traitement par inhibiteurs de la calcineurine ¹⁷⁶.

II.2.3.(b) Association pharmacogénétique/pharmacodynamique

II.2.3.b.(i) Effets indésirables du sirolimus

Un retard de cicatrisation a été observé chez des transplantés rénaux avec une incidence de 47% dans le groupe sirolimus comparé à seulement 8% dans le groupe tacrolimus ¹⁷⁷. Le sirolimus a été associé à un risque accru de reprise retardée de la fonction rénale par rapport aux autres traitements (OR =1,42, intervalle de confiance à 95% [1,07-1,90]) ¹⁷⁸.

Une évaluation approfondie des troubles cutanés liés au sirolimus a montré que 99% des patients traités par sirolimus présentaient des effets indésirables cutanés (aphtes (60%), éruptions cutanées semblables à de l'acné (46%), folliculite du cuir chevelu (26%), onychopathies chroniques (74%)¹⁷⁹. La prise en charge de ces troubles cutanéomuqueux passent par un traitement local mais peut amener dans certains cas à une diminution ou un arrêt du sirolimus^{179,180}.

Une étude a montré que la prévalence de l'anémie à 12 mois était de 31% chez des transplantés rénaux traités par MMF vs 57% pour des transplantés rénaux traités par sirolimus¹⁸¹. L'anémie induite par le sirolimus est caractérisée par une microcytose et le mécanisme exact de cet effet indésirable n'est pas complètement élucidé. Plusieurs hypothèses pour expliquer cette diminution du volume globulaire moyen ont été proposées : certains ont proposé un effet direct du sirolimus sur l'homéostasie du fer¹⁸², d'autres un mécanisme faisant intervenir une inflammation chronique après observation de faibles niveaux de fer sérique associés à une ferritine sérique normale ainsi qu'une élévation sérique de cytokines inflammatoires¹⁸³. Le dernier mécanisme proposé est celui d'un lien entre la m-TOR et la phosphoinositol-3-kinase qui joue un rôle dans la différenciation de progéniteurs érythroïdes. Les auteurs ont montré une diminution de la prolifération des lignées de cellules érythroïdes *in vitro* lorsqu'elles sont traitées par sirolimus¹⁸⁴. Il est recommandé en cas d'anémie de réaliser un bilan étiologique, de diminuer ou d'arrêter le MMF, d'introduire des stimulateurs de l'érythropoïèse et si besoin d'arrêter le sirolimus¹⁸¹.

Une augmentation de la protéinurie a été observée chez des patients convertis d'inhibiteurs de la calcineurine au sirolimus. Il est postulé que cet effet pourrait venir du fait de la suppression de l'effet antiprotéinurique des inhibiteurs de la calcineurine. Il a cependant été montré que le sirolimus pouvait entraîner par lui-même des protéinuries¹⁸⁵. Le mécanisme imputé n'est pas clairement élucidé et pourrait être lié à des interférences avec la réabsorption de l'albumine par les tubules proximaux et/ou des effets inhibiteurs du sirolimus sur le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire¹⁸⁶.

La protéinurie associée au sirolimus est généralement inférieure à 500 mg/j mais est significativement plus élevée chez les patients recevant du sirolimus secondairement à un traitement par inhibiteurs de la calcineurine que chez les patients traités par sirolimus *de novo*¹⁸⁷.

La pneumopathie interstitielle est un effet indésirable du sirolimus mal défini¹⁸⁸. Des symptômes variés ont été observés et l'arrêt du sirolimus a entraîné le rétablissement des

patients dans les 6 mois ¹⁸⁹. Concernant les dyslipidémies, une revue de la littérature récente incluant 17 essais randomisés contrôlés a été réalisée sur les concentrations plasmatiques de cholestérol et de triglycérides chez des patients traités par des inhibiteurs de la m-TOR versus patients non traités par ces médicaments ¹⁹⁰. Toutes les études, sauf une, ont rapporté des concentrations sériques de cholestérol et de triglycérides augmentées ou une prévalence accrue d'utilisation de traitement hypolipémiants. Il semblerait que l'augmentation du cholestérol total passe par une augmentation du cholestérol LDL. Il est actuellement recommandé de prendre en charge la dyslipémie de ces patients de la même manière que les patients non transplantés à haut risque de maladies cardio-vasculaires et en cas de besoin, d'envisager un changement de molécule ¹⁹⁰. Enfin, des cas de lymphoedème, réversibles à l'arrêt du traitement, ont été décrits ¹⁹¹.

II.2.3.b.(ii) Principales associations décrites

II.2.3.b.ii.1 Influence des polymorphismes d'ABCB1 sur les effets indésirables

Concernant les effets indésirables, Anglicheau *et al* (n=149) n'ont observé aucune relation entre les polymorphismes *ABCB1* (du receveur) et les principaux effets indésirables du sirolimus (anémie, dyslipidémie, thrombopénie) ou les résultats cliniques (rejet aigu ou fonction du greffon) ¹⁷⁴.

II.2.3.b.ii.2 Influence des polymorphismes du CYP3A sur les effets indésirables

Anglicheau *et al* (n=149) n'ont observé aucune relation entre les polymorphismes CYP3As et les principaux effets indésirables du sirolimus (anémie, dyslipidémie, thrombopénie) ou les résultats cliniques (rejet aigu ou fonction du greffon) ¹⁷⁴. L'étude réalisée dans notre unité n'a montré aucune association entre le génotype CYP3A5 et l'incidence globale des effets indésirables liés au sirolimus, cependant, une tendance à une incidence plus élevée de leucopénies chez les non exprimeurs a été observée ¹⁷⁵.

III Travaux personnels : Etudes d'associations

Les travaux personnels réalisés dans ce travail concernent des études d'associations entre des polymorphismes génétiques et les effets indésirables du traitement immunosuppresseur. Ils sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques.

- Le premier article concerne l'influence des polymorphismes génétiques des gènes *ABCB1* et *CYP3A* du donneur sur la perte du greffon en étudiant l'effet des SNPs indépendamment ou l'effet de l'haplotype chez des transplantés rénaux traités par ciclosporine.

Cet article est publié dans *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2010 Jul;88(1):95-100).

- Le second article, porte sur l'association entre des polymorphismes des protéines de transport et de métabolisme du MPA et les effets indésirables digestifs du MMF chez des transplantés rénaux.

Cet article est publié dans *le British Journal of Clinical Pharmacology* (2010 Jun;69(6):675-83).

- Le troisième article concerne l'influence des polymorphismes de protéines de la voie m-TOR (P70S6 kinase, m-TOR et Raptor) sur la survenue des effets indésirables du sirolimus en transplantation rénale.

Cet article a été soumis dans l'*American Journal of Transplantation*

ARTICLE 1 :

Donor P-gp Polymorphisms Strongly Influence Renal Function and Graft Loss in a Cohort of Renal Transplant Recipients on Cyclosporine Therapy in a Long-Term Follow-Up

J-B Woillard & J-P Rerolle, N Picard, A Rousseau, A Guillaudeau, E Munteanu, M Essig, M Drouet, Y Le Meur and P Marquet

Clin Pharmacol Ther. 2010 Jul;88(1):95-100.

Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients with long term follow-up.

J-B Woillard^{1,2*} and J-P Rerolle^{1,4*}, N Picard^{1,2,3}, A Rousseau^{1,2}, A Guillaudeau⁵, E Munteanu⁴, M Essig^{1,4}, M Drouet⁶, Y Le Meur^{1,7}, P Marquet^{1,2,3}

¹Inserm, UMR S-850, Limoges, F-87025, France; ²Univ Limoges, Limoges, F-87025, France; ³CHU Limoges, Hôpital Dupuytren, Service de Pharmacologie-Toxicologie, Pharmacovigilance, Limoges, F-87042, France ; ⁴CHU Limoges, Hôpital Dupuytren, Service de Néphrologie, Limoges, F-87042, France ; ⁵CHU Limoges, Hôpital Dupuytren, Service d'Anatomie Pathologique, Limoges, F-87042, France ; ⁶CHU Limoges, Hôpital Dupuytren, Service d'Immunologie, Limoges, F-87042, France ; ⁷CHU Brest, Hôpital de la Cavale Blanche, Service de Néphrologie, Brest, F-29200, France.

*These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to P. Marquet, INSERM U850, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

Tel: +33555435895; fax: +33555435936

e-mail: pierre.marquet@unilim.fr

Short-title: Donor's P-gp polymorphisms and graft loss

2897 words, 25 references, 1 figures and 4 tables

Keywords: Kidney transplantation, cyclosporine A, pharmacogenetics, graft loss, P-glycoprotein, CYP3As.

Abstract

Cyclosporine A (CsA) is a substrate for cytochrome P450 3A and the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp; *ABCB1*), both abundantly expressed in the kidney. We retrospectively investigated the role of polymorphisms in *CYP3A4*, *CYP3A5* and *ABCB1* kidney graft donors on recipient renal function and subsequent graft loss, in a long-term cohort of recipients transplanted between 1990 and 2005. DNA from 227 donors and clinical data from the respective 259 recipients were analysed. Graft loss was significantly associated with the donor *ABCB1* variant haplotype (1236T/2677T/3435T vs others haplotype: HR=9.346; 95%CI (2.278-38.461); p=0.0019) and with acute rejection episodes (HR=3.077; 95%CI (1.213-7.812); p=0.0178). The variant haplotype was also associated with a greater decrease in renal function (homozygotes for TTT -3.047 mL.min⁻¹/y; heterozygotes for TTT -4.435 mL.min⁻¹/y; others -2.186 mL.min⁻¹/y; p=0.0240). *ABCB1* polymorphisms in donors influence long-term graft outcome, favouring the decrease in renal function and graft loss in transplant recipients receiving CsA.

ARTICLE 2 :

Risk of diarrhoea in a long-term cohort of renal transplant patients given mycophenolate mofetil: the significant role of the UGT1A8*2 variant allele

Woillard JB & Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Drouet M, Munteanu E, Essig M, Marquet P, Le Meur Y.

Br J Clin Pharmacol. 2010 Jun;69(6):675-83.

Risk of diarrhea in a long-term cohort of renal transplant patients given mycophenolate mofetil: the significant role of the *UGT1A8*2* variant allele.

J.B. Woillard^{1,2*} and J.P. Rerolle^{1,4*}, N. Picard^{1,2,3}, A. Rousseau^{1,2}, M. Drouet^{5,6}, E. Munteanu⁴, M. Essig^{1,4}, P. Marquet^{1,2,3}, Y. Le Meur^{1,7}

¹Inserm, UMR S-850, Limoges, France; ²Univ Limoges, Limoges, France; ³CHU Limoges, Service de Pharmacologie et Toxicologie, Pharmacovigilance, Limoges, France ; ⁴CHU Limoges, Service de Néphrologie, Limoges, France ; ⁵CHU Limoges, Service d'Immunologie, Limoges, France ; CNRS UMR 6101, Limoges, France ; ⁷CHU Brest, Hôpital de la Cavale Blanche, Service de Néphrologie, Brest, France.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to P. Marquet, INSERM U850, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

Tel: +33555435895; fax: +33555435936

e-mail: pierre.marquet@unilim.fr

Running head: Pharmacogenetics of mycophenolate-induced diarrhea

Keywords: Kidney transplantation, mycophenolate mofetil, pharmacogenetics, diarrhea, uridine diphosphate-glucuronosyltransferase, *UGT1A8*2*

Word count: 3640 words

3 tables and 4 figures

Summary

Aim: In renal transplant patients given mycophenolate mofetil (MMF), we investigated the relationship between the digestive adverse events and polymorphisms in the UGT genes involved in mycophenolic acid (MPA) intestinal metabolism and biliary excretion of its phase II metabolites.

Methods: Clinical data and DNA from 256 patients transplanted between 1996 and 2006 and given MMF with cyclosporine (CsA, n=185), tacrolimus (TAC, n=49) or sirolimus (SIR, n=22), were retrospectively analyzed. The relationships between diarrhea and polymorphisms in *UGT1A8* (*2 518C>G, *3 830G>A), *UGT1A7* (622C>T), *UGT1A9* (-275T>A), *UGT2B7* (-840G>A) and *ABCC2* (-24C>T, 3972C>T) or the co-administered immunosuppressant were investigated using the Cox proportional hazard model.

Results: Multivariate analysis showed that patients on TAC or SIR had a 2.8 higher risk of diarrhea than patients on CsA (HR=2.809; 95%CI (1.730-4.545); p<0.0001) and that non-carriers of the *UGT1A8**2 allele (CC518 genotype) had a higher risk of diarrhea than carriers (C518G and 518GG genotypes) (HR=1.876; 95%CI (1.109-3.175); p=0.0192). When patients were split up with respect to the immunosuppressive co-treatment, a significant effect of *UGT1A8**2 was found in those co-treated with cyclosporine (HR=2.414; 95%CI (1.089-5.354); p=0.0301) but not TAC or SIR (p=0.4331).

Conclusion: These results suggest that a possible inhibition of MPA metabolites biliary excretion by cyclosporine and a decreased intestinal production of these metabolites in *UGT1A8**2 carriers may be protective factors against MMF-induced diarrhea.

ARTICLE 3 :

Association of sirolimus adverse effects with m-TOR, p70S6K or Raptor polymorphisms in kidney transplant recipients

J-B. Woillard & N. Kamar, A. Rousseau, L. Rostaing, P. Marquet, N. Picard

**Association of sirolimus adverse effects with m-TOR, p70S6K or Raptor polymorphisms
in kidney transplant recipients**

J-B. Woillard^{123*} and N. Kamar^{456*}, A. Rousseau¹², L. Rostaing⁴⁵⁶, P. Marquet¹²³, N.
Picard¹²³

¹INSERM UMR S-850, Limoges, France; ²Univ Limoges, Limoges, France; ³CHU Limoges,
Department of Pharmacology and Toxicology, Limoges, France; ⁴CHU Toulouse, Department
of Nephrology-Dialysis and Multi-Organ Transplantation, Toulouse, France; ⁵INSERM U563,
IFR-BMT, CHU Purpan, Toulouse, France; ⁶Univ Paul Sabatier, Toulouse, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Dr. Nicolas Picard, INSERM UMR-S850, 2 rue du Dr
Marcland, 87025 Limoges, France

Tel: +33555435895; fax: +33555435936

e-mail: nicolas.picard@unilim.fr

Running head: sirolimus and m-TOR pathway polymorphisms

Keywords: sirolimus, adverse event, mammalian target of rapamycin, p70S6 kinase, raptor,
pharmacogenetics.

Abstract

Sirolimus inhibits m-TOR which binds with Raptor and phosphorylates p70S6 kinase, a protein involved in numerous cell signalling pathways. We investigated the association of candidate polymorphisms in m-TOR, Raptor and p70S6K, sirolimus dose and exposure, and other time-independent as well as time-dependent covariates, with sirolimus-induced adverse events in kidney transplant recipients. This study included a first group of 113 patients, switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus and a validation group of 63 patients from another clinical trial, with the same immunosuppressive regimen. An m-TOR variant haplotype was significantly associated with a decrease in hemoglobin levels in the two populations of patients (discovery group: $\beta = -0.82$ g/dl, $p = 0.0076$; validation group: $\beta = -1.58$ g/dl, $p = 0.0308$). Increased sirolimus trough levels were significantly associated with increased total cholesterol levels (discovery group: $\beta = 0.02$ g/l, $p < 0.0001$, validation group: $\beta = 0.02$ g/l, $p = 0.0002$) and triglyceride levels (discovery group: $\beta = 0.02$ g/l, $p = 0.0059$, validation group: $\beta = 0.05$ g/l, $p = 0.0370$). Sirolimus trough levels were also associated with an increased risk for cutaneous adverse events and oedemas in the discovery group, but this was not confirmed in the validation group. These results provide evidence of an association between an m-TOR haplotype and a decrease in hemoglobin in renal transplant recipients.

CHAPITRE 3 : MODELISATION PHARMACOGENETIQUE/PHARMAC OCINETIQUE APPLIQUEE AUX MEDICAMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS ADMINISTRES AUX TRANSPLANTES RENAUX

I Introduction

La variabilité pharmacocinétique d'un médicament conduit à des concentrations différentes lorsqu'une même dose est administrée. Cette situation est fréquente, elle se rencontre pour la majorité des médicaments mais avec une amplitude différente. Dans les études traditionnelles de pharmacocinétique, l'unité d'analyse est l'individu et un des objectifs des critères d'inclusions auxquels doivent satisfaire les patients pour être inclus dans un essai clinique est de restreindre les sources de variabilité. Au contraire, dans l'approche de population, l'unité d'analyse est une population c'est à dire un ensemble d'individus ¹⁹². La pharmacocinétique de population a été introduite par Sheiner *et al* ¹⁹³ et l'objectif initial de cette discipline est de décrire la pharmacocinétique d'un médicament, d'identifier et de quantifier les sources de variabilité entre patients. La méthode la plus souvent utilisée pour l'analyse des données de

population est une méthode de modélisation à effets mixtes (incluant des effets fixes et aléatoires). Les modèles non linéaires à effets mixtes sont implémentés dans NONMEM®, le logiciel le plus utilisé en pharmacocinétique de population. La méthode d'estimation utilisée dans NONMEM® est paramétrique. Dans les modèles à effets mixtes, on peut décomposer le modèle en sous-modèles :

- le modèle à effets fixes (ou modèle structural) : appelé ainsi car il quantifie la relation entre un effet mesurable (exemple : fonction rénale, concentration sanguine du médicament, concentration d'albumine) et les paramètres pharmacocinétiques. Ainsi, ce modèle est composé des paramètres pharmacocinétiques auxquels vont éventuellement s'ajouter l'effet de facteurs individuels couramment appelés covariables.
- Le modèle d'erreur, qui décrit les effets aléatoires c'est à dire la variabilité, est lui-même décomposé en :
 - variabilité interindividuelle : ces effets aléatoires vont s'intéresser à la distribution de la déviation des paramètres pharmacocinétiques individuels par rapport à la moyenne de la population. La variance et les covariances de ces distributions informent sur ces distributions : la matrice de variance covariance peut être utilisée pour décrire les relations entre les variabilités des différents paramètres pharmacocinétiques.
 - variabilité résiduelle : c'est la part de la variabilité non expliquée par le modèle. Cette variabilité inclut les erreurs de mesure, les erreurs liés aux temps de recueil et toute déviation du modèle mathématique par rapport à la réalité. Il existe aussi la variabilité inter-occasion correspondant à la variabilité des paramètres au cours du temps lors de ré-administrations du produit espacées dans le temps.

Ainsi lors d'une étude de pharmacocinétique de population, l'ensemble des données recueillies chez tous les patients de la population d'étude est analysé simultanément. Cette analyse détermine les paramètres pharmacocinétiques moyens ainsi que leur variabilité inter-individuelle (non expliquée par le modèle).

La distribution des valeurs des paramètres PK individuels autour de la valeur du paramètre moyen peut suivre différents modèles. Le modèle de dispersion le plus fréquemment utilisé en

pharmacocinétique est une distribution log normale (équivalent à un coefficient de variation constant) qui peut s'écrire : Paramètre $PK_{\text{individuel}} = \text{Paramètre } PK_{\text{moyen}} \cdot \exp(\eta)$ où η représente le coefficient de variabilité interindividuelle. Ainsi la clairance d'un médicament (notée CL) pour un individu i est alors notée : $CL_i = CL_{\text{moy}} \exp(\eta_i)$ (où $CL_i = CL$ de l'individu i ; $CL_{\text{moy}} = CL$ moyenne de la population).

La variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques peut s'expliquer par la variabilité de facteurs individuels (covariables). L'intégration des covariables au modèle structurel a donc pour objectif de diminuer la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique (non expliquée par le modèle) et de diminuer la variabilité résiduelle. Les covariables pourront être des facteurs démographiques, génétiques, environnementaux ou biologiques.

II Développement d'un modèle pharmacogénétique / pharmacocinétique par la méthode des modèles non linéaires à effets mixtes

II.1 Analyse des covariables génétiques

L'objectif des travaux de modélisation PG/PK est d'expliquer la variabilité de la pharmacocinétique entre individus à travers les variations (SNPs et haplotypes) de gènes codants, pour des protéines impliquées dans la pharmacocinétique.

Les données génétiques ne peuvent pas être prises en compte comme une variable ordinale classique. La graduation des effets va dépendre du modèle génétique choisi.

Les différents modèles disponibles sont le modèle de base correspondant à l'absence d'effet du polymorphisme génétique et les modèles incluant les polymorphismes en tenant compte du modèle génétique. Plusieurs types de modèles décrivent l'effet du polymorphisme d'un gène comme covariable et donc la graduation de l'effet dans les groupes génotypiques (cf. paragraphe Chapitre 2.I.1.(2).

Les équations utilisées dépendent du modèle génétique choisi.

Si l'on veut détecter l'effet d'un SNP, en notant C l'allèle sauvage et T l'allèle muté, alors un individu pourra avoir les génotypes CC, CT ou TT. Nous utiliserons la notation β_{CC} , β_{CT} et β_{TT} pour les pénétrances associées aux génotypes CC, CT et TT respectivement. Nous prendrons le génotype CC comme référence tel que $\beta_{CC}=1$.

Si un modèle génétique multiplicatif est retenu, l'hypothèse selon laquelle la valeur moyenne de la clairance d'élimination dépend du génotype peut s'exprimer selon les équations (1) et (2)

$$CL_i = \text{THETA}(x) * (1 + \beta_{CT})^{CT} * (1 + \beta_{TT})^{TT} * e^{\text{ETA}(x)} \quad (1)$$

Avec la CL moyenne égale à $\text{THETA}(x)$ pour les porteurs du génotype homozygote sauvage, à $\text{THETA}(x) * (1 + \beta_{CT})^{CT}$ pour les porteurs du génotype hétérozygote et à $\text{THETA}(x) * (1 + \beta_{TT})^{TT}$ pour les porteurs du génotype homozygote variant.

ou

$$CL_i = \text{THETA}(x) * \beta_{CC \text{ ou } CT \text{ ou } TT} * e^{\text{ETA}(x)} \quad (2)$$

Avec $\beta_0=1$ pour le génotype homozygote sauvage, $\beta_1=1*c$ pour le génotype hétérozygote et $\beta_2=1*c^2$ pour le génotype homozygote variant

Un modèle additif peut être décrit avec les équations (3) ou (4) :

$$CL_i = \text{THETA}(x) + (\beta_{CT})^{CT} + (\beta_{TT})^{TT} * e^{\text{ETA}(x)} \quad (3)$$

Avec la CL moyenne égale à $\text{THETA}(x)$ pour les porteurs du génotype homozygote sauvage, à $\text{THETA}(x) + \beta_{CT}$ pour les porteurs du génotype hétérozygote et à $\text{THETA}(x) + \beta_{TT}$ pour les porteurs du génotype homozygote variant.

ou

$$CL_i = \text{THETA}(x) * \beta_{CC \text{ ou } CT \text{ ou } TT} * e^{\text{ETA}(x)} \quad (4)$$

Avec $\beta_0=1$ pour le génotype homozygote sauvage, $\beta_1=1+c$ pour le génotype hétérozygote et $\beta_2=1+c^2$ pour le génotype homozygote variant

Pour un modèle récessif ou dominant (exemple du polymorphisme du CYP3A5 : tous les porteurs d'un allèle *1 sont considérés comme expresseurs : les polymorphismes

*CYP3A5*1/*1* et *CYP3A5*1/*3* correspondent aux expresseurs), on pourra utiliser l'équation (5) où CYP est codé 1/0 avec 1 pour les expresseurs et 0 pour les non expresseurs:

$$CL_i = \text{THETA}(x) * (\text{THETA}(y)^{\text{CYP}}) * e^{\text{ETA}(x)} \quad (5)$$

Avec la CL moyenne égale à THETA(x) pour les non expresseurs du CYP3A5 et THETA(x)* (THETA(y) pour les expresseurs du CYP3A5.

II.1.(1) Comparaison des modèles

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour comparer les modèles de pharmacocinétique de population incluant des informations génétiques. Les modèles emboîtés incluant ou non le polymorphisme d'intérêt peuvent être comparés par une approche classique basée sur le test du rapport des vraisemblances. Les critères de sélection d'Akaïké (AIC) ou de BIC voire d'autres critères dérivés¹⁹⁴ peuvent aussi être choisis. Une autre possibilité est de tester par une ANOVA s'il existe une différence pour les estimations bayésiennes des paramètres pharmacocinétiques individuels du modèle structural entre les génotypes.

Bertrand *et al* ont montré, dans une étude de simulation, que le test le plus adapté pour étudier l'influence des différents génotypes sur les paramètres pharmacocinétiques individuels, au regard de l'erreur de type 1 et de type 2, est l'ANOVA¹⁹⁵.

II.2 Modèle de mélange

II.2.(1) Introduction

La population peut être hétérogène et l'hypothèse d'une distribution unimodale pour les valeurs individuelles des paramètres PK peut ne plus être vérifiée. Dans ce cas l'utilisation d'un modèle de mélange peut être un outil utile pour rechercher la présence de sous-populations de patients dans une population donnée. Le modèle de mélange suppose qu'il existe deux (ou plus de 2) sous-populations, chacune associée à un sous modèle et que la population globale est mieux décrite par un seul modèle de population prenant en compte ces sous-modèles. Il est conseillé de tester l'existence d'une répartition bimodale dans un modèle de mélange uniquement si une hypothèse connue peut expliquer cette pluri-modalité de répartition.

On fait l'hypothèse qu'une proportion p de la population est associée à un jeu de paramètres et la proportion $(1-p)$ complémentaire à un autre jeu de paramètres. Le pourcentage p est estimé. Lorsque le modèle de mélange est réalisé, trois conditions doivent être présentes, il faut que:

- la diminution de la fonction objective soit significativement plus importante pour le modèle de mélange que pour le modèle classique avec la(es) covariable(s),
- l'estimation de la proportion p de sujets estimée ne soit pas proche de 0 ou 1 (au moins 10% d'individus dans la sous population de plus faible effectif),
- le paramètre moyen sur lequel sont établies les sous-populations soit significativement différent de 0.

La sous-population la plus probable est alors estimée pour chaque patient. Les sous-populations peuvent représenter des sous-populations biologiques. Un exemple bien connu de modèle de mélange avec sous-populations biologiques sur la clairance est l'exemple des polymorphismes pour l'acétylation du procainamide¹⁹⁶. Dans ce cas, les données révèlent une sous-population comprenant environ 50% de la population avec une valeur de clairance plus élevée (acétyleurs rapides) alors que le reste de la population a une valeur de clairance plus basse (acétyleurs lents).

Il existe différentes options lors de la recherche de sous-populations biologiques :

- si les sous-populations sont bien distinguées, on peut étudier la distribution d'une covariable dans les deux sous-populations. Le but ultime serait d'expliquer totalement le modèle de mélange par une covariable ce qui permettrait de revenir à un modèle classique (exemple de l'information génotype/phénotype pour le procainamide).
- si aucune covariable disponible ne peut expliquer le modèle de mélange, alors celui-ci peut être accepté tel quel mais doit être validé dans une population indépendante.

II.2.(2) Méthodologie

Comme rapporté par Frame *et al*¹⁹⁷, dans une analyse de population pharmacocinétique, on ne commence pas par l'utilisation d'un modèle de mélange. La première étape consiste à développer un modèle « classique ». Les justifications pour tester un modèle de mélange peuvent être une publication antérieure ayant utilisé un tel modèle, une indication graphique d'une distribution plurimodale d'un paramètre PK ou simplement une spéculation sur la base

d'une hypothèse. La distribution graphique plurimodale peut être observée après une estimation des paramètres pharmacocinétiques du modèle sans covariable mais l'absence de cette polymodalité ne sous entend pas forcément qu'il n'existe pas de sous populations car la possibilité de visualiser graphiquement deux sous-populations va dépendre de leurs tailles relatives, de combien elles diffèrent (elles peuvent être confondues en analyse graphique) et de la variabilité du paramètre sur lequel porte le modèle de mélange. Dans tous les cas, un modèle de mélange doit être caractérisé par une diminution significative de la fonction objective (c.a.d. une augmentation de la vraisemblance) par rapport au modèle classique et tout doit être mis en œuvre pour essayer d'expliquer l'origine des sous-populations. Idéalement, dans le cas d'un modèle de mélange en biologie, une explication génétique ou mécanistique peut être trouvée.

Enfin, le modèle de mélange doit conduire à des estimations bayésiennes *a posteriori* pour un individu moins biaisées que celles obtenues avec le modèle classique. Cela vient du fait que le modèle de mélange n'utilise pas simplement l'estimation bayésienne individuelle des effets aléatoires mais aussi l'estimation bayésienne de la sous-population la plus probable pour un individu donné.

III Travaux personnel concernant la modélisation PG/PK du tacrolimus

Dans cette partie de travaux personnels, nous nous sommes intéressés à l'intégration d'un polymorphisme génétique (du gène CYP3A5) dans un modèle de population décrivant la pharmacocinétique du tacrolimus administré sous la forme Advagraf® et Prograf®.

Cet article est publié dans *le British Journal of Clinical Pharmacology* (2011 Mar;71(3):391-402)

ARTICLE 4 :

Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two tacrolimus formulations – twice daily Prograf® and once daily Advagraf®

Woillard JB & de Winter BC, Kamar N, Marquet P, Rostaing L, Rousseau A.

Br J Clin Pharmacol. 2011 Mar;71(3):391-402.

Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two tacrolimus formulations – twice daily Prograf® and once daily Advagraf®

J.B. Woillard^{1*} and B.C.M. de Winter^{1*}, N. Kamar^{4,6,7}, P. Marquet^{1,2,3}, L. Rostaing^{4,5,7}, A. Rousseau^{1,2}

¹Inserm, UMR S-850, Limoges, France; ²Univ Limoges, Limoges, France; ³CHU Limoges, Service de Pharmacologie et Toxicologie, Pharmacovigilance, Limoges, France ; ⁴Department of Nephrology-Dialysis and Multi-Organ Transplantation, University Hospital, Toulouse, France; ⁵INSERM U563, IFR–BMT, CHU Purpan, Toulouse, France; ⁶INSERM U858, IFR–BMT, CHU Purpan, Toulouse, France; ⁷ Univ Paul Sabatier, Toulouse, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to A. Rousseau, INSERM U850, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

Tel: +33555435895; fax: +33555435936

e-mail: annick.rousseau@unilim.fr

Running head: Bayesian estimator for both Prograf® and Advagraf®

Keywords: Kidney transplantation, tacrolimus, population pharmacokinetics, Bayesian estimator, Advagraf®, Prograf®

Word count: 5015 words

5 tables and 4 figures

Summary

Aim: To investigate the differences in the pharmacokinetics of Prograf® and the prolonged release formulation Advagraf® and to develop a Bayesian estimator to estimate tacrolimus inter-dose area-under-the-curve (AUC) in renal transplant patients receiving either Prograf® or Advagraf®.

Methods: Tacrolimus concentration-time profiles were collected, in adult renal transplant recipients, at weeks 1 and 2, and at months 1, 3 and 6 post-transplantation from 32 Prograf® treated patients, and one profile was collected from 41 Advagraf® patients more than 12 months post-transplantation. Population pharmacokinetic (popPK) parameters were estimated using NONMEM. In a second step, the popPK model was used to develop a single Bayesian estimator for the two tacrolimus formulations.

Results: A two-compartment model with Erlang absorption ($n=3$) and first-order elimination best described the data. In Advagraf® patients, a bimodal distribution was observed for the absorption rate constant (K_{tr}): one group with a K_{tr} similar to that of Prograf® treated patients and the other group with a slower absorption. A mixture model for K_{tr} was tested to describe this bimodal distribution. However, the data were best described by the non mixture model including covariates (cytochrome P450 3A5, hematocrit and drug formulation). Using this model and tacrolimus concentrations measured at 0, 1 and 3 hours post-dose, the Bayesian estimator could estimate tacrolimus AUC accurately (bias = 0.1%) and with good precision (8.6%).

Conclusions: The single Bayesian estimator developed yields good predictive performance for estimation of individual tacrolimus inter-dose AUC in Prograf® and Advagraf® treated patients and is suitable for clinical practice.

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION/CONCLUSION

Le suivi thérapeutique pharmacologique a pour but d'individualiser un traitement médicamenteux, en déterminant la posologie la mieux adaptée à chaque patient pour garantir l'efficacité thérapeutique en minimisant le risque d'effets indésirables. Depuis quelques années, la pharmacogénétique a sa place dans ce cadre là comme le montrent les recommandations émises par l'agence du médicament aux Etats-Unis (Food and Drug Administration) ou certaines sociétés savantes. Pour un nombre croissant de médicaments, les informations données aux prescripteurs sous la forme des résumés des caractéristiques du produit (RCP) mentionnent l'intérêt des tests pharmacogénétiques (sans pour autant les rendre obligatoires).

La pharmacogénétique se développe de plus en plus avec un nombre croissant de laboratoires réalisant ce type d'analyses et une modernisation et automatisation des techniques permettant une baisse des coûts de ces analyses. Il existe des exemples majeurs démontrant l'intérêt des tests pharmacogénétiques (en virologie par exemple). De plus, la pharmacogénétique présente un intérêt médico-économique : la prescription d'une dose adaptée à un patient donné permet d'éviter une hospitalisation pour effet indésirable grave et tous les coûts qu'elle engendre.

Cette thèse portait sur une classe de médicament (les immunosuppresseurs) caractérisée par une forte variabilité inter-individuelle pharmacocinétique et une marge thérapeutique étroite avec des effets indésirables problématiques. Ces caractéristiques justifient le STP pour ces médicaments et il n'y a pas de tests pharmacogénétiques utilisés de façon systématique en routine, à l'exception du génotypage de la TPMT et du CYP3A5.

De très nombreuses études pharmacogénétiques ont été réalisées sur ces médicaments, cependant :

- beaucoup se sont intéressées à la PK alors qu'il est probable que le STP (fréquent et généralisé) puisse compenser rapidement des différences d'exposition expliquant des résultats controversés,

- relativement peu d'études ont été réalisées sur les effets indésirables des immunosuppresseurs,
- peu d'études font état d'un suivi du patient suffisamment long pour l'étude de phénotypes d'apparition tardive.

Dans ce travail, nous avons réalisé des études d'associations focalisées sur des SNPs déjà décrits dans la littérature et pour lesquels une hypothèse mécanistique forte justifiait leur effet potentiel sur le phénotype étudié. Le type d'approche gènes-candidats utilisé dans ces travaux permet de déceler des effets discrets et cumulatifs à long terme de polymorphismes et est un complément aux études GWAS permettant de déceler un effet majeur de polymorphisme (expliquant quasiment la totalité de la variabilité).

L'étude réalisée sur l'association entre perte du greffon et un haplotype P-gp du donneur a l'intérêt d'avoir été conduite avec un suivi à long terme du patient indispensable pour l'étude de ce phénotype d'apparition très retardée. Ce travail a permis de mettre en évidence l'effet majeur du polymorphisme de la P-gp et laisse penser qu'une diminution d'activité de la P-gp pourrait aboutir à une accumulation intracellulaire de ciclosporine conduisant à long terme à une majoration de la toxicité de la ciclosporine. Il est intéressant de constater qu'une étude antérieure avait mis en évidence un risque de néphrotoxicité de la ciclosporine augmenté dans le cas de donneurs porteurs de ce polymorphisme ¹⁶⁵. Par ailleurs, l'étude de Naesens *et al* chez des patients transplantés rénaux traités par tacrolimus a montré un effet à long terme des polymorphismes ABCB1 du donneur sur la toxicité rénale du tacrolimus ¹⁶⁴. Ces travaux offrent des perspectives intéressantes et suggèrent qu'il pourrait être intéressant, en routine, de réaliser en parallèle des analyses génétiques réalisées chez les donneurs de greffons rénaux un génotypage d'ABCB1 pour choisir le traitement immunosuppresseur en fonction. Il conviendrait en effet d'éviter dans la mesure du possible les inhibiteurs de la calcineurine ou de préférer un « switch » précoce vers une autre classe de molécule pour les patients transplantés avec un rein issu d'un porteur de l'haplotype à risque. Nous avons par ailleurs observé une tendance à un risque plus élevé de perte du greffon chez les patients transplantés par un greffon exprimant le CYP3A5. Il a été montré que, lorsqu'elle est exprimée, l'isoforme CYP3A5 est l'isoforme prédominante des CYP3A dans les reins ³⁸. Par conséquent, le génotype CYP3A5 du donneur pourrait influencer les concentrations intra-cellulaires de ciclosporine. En effet, un métabolisme plus élevé de la ciclosporine dans le greffon pourrait diminuer sa concentration rénale et son activité locale, favorisant le rejet et la perte du greffon

à plus long terme. Cependant, les études cherchant à démontrer un effet de l'expression rénal du CYP3A5 sur la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine ou sur la survie du greffon n'ont pas été concluants: Woodahl *et al.*, n'ont trouvé aucun effet significatif de ce polymorphisme sur des lésions rénales chez des patients en greffe de moelle ¹⁹⁸. Par ailleurs, ni nos résultats, ni ceux de Kreutz *et al.*, qui ont étudié l'influence du génotype CYP3A5 de donneurs et des receveurs chez des patients traités par CsA (n = 399) jusqu'à 10 ans après la transplantation n'ont montré un effet statistiquement significatif sur la perte du greffon ¹⁷².

Le travail réalisé sur la pharmacogénétique des effets indésirables digestifs du MMF illustre la méthodologie des études gènes-candidats. Les gènes étudiés concernaient des protéines participant au métabolisme ou au transport des métabolites du MPA. Les polymorphismes étudiés ont été choisis sur des critères de fonctionnalités (*in vitro* ou *in vivo*) et de fréquence. Cette étude prenait par ailleurs en compte des covariables non génétiques tels que la co-médication ou la dose de MMF.

Une majoration du risque de diarrhée a été observée chez les patients recevant le MMF associé au tacrolimus ou au sirolimus par rapport à l'association MMF/ ciclosporine. Une diminution du risque de diarrhée a été observée chez les porteurs de l'allèle *UGT1A8*2*. Nous émettons l'hypothèse que la ciclosporine diminue le risque de diarrhée par inhibition du cycle entéro-hépatique du MPA (impliquant une diminution d'exposition intestinale aux métabolites du MPA). L'expression de l'*UGT1A8* étant limitée à l'intestin, l'allèle déficitaire *UGT1A8*2* pourrait contribuer à une diminution du métabolisme local et donc du risque de diarrhée. Il est à noter que cette protection chez les porteurs du polymorphisme n'était significative que chez les patients co-traités par ciclosporine ce qui pourrait s'expliquer par l'inhibition du cycle entéro-hépatique par la ciclosporine avec une diminution d'élimination hépatobiliaire des métabolites susceptibles d'être déconjugués en MPA par les bactéries de la flore intestinale. Cette hypothèse va dans le sens des résultats de la littérature qui montrent que la dose ou l'exposition au MMF et à ses métabolites n'est pas associée aux effets indésirables digestifs ¹²⁹. Naessens *et al.* ont émis l'hypothèse que le polymorphisme -24 C>T de la protéine de transport MRP2 aurait une action sur les effets indésirables digestifs du MMF ⁹². Notre étude n'a pas retrouvé l'effet de ce polymorphisme, ni d'autres polymorphismes en déséquilibre de liaison avec celui-ci.

Le travail sur les polymorphismes de la voie de la m-TOR est précurseur car il s'intéresse aux polymorphismes des cibles et non des protéines de métabolisme. Les polymorphismes situés sur les cibles pourraient expliquer une partie de la variabilité inter-individuelle des effets

indésirables. Peu d'études se sont intéressées aux cibles et il semble que ce soit une nouvelle stratégie de recherche après une recherche intense sur les voies de métabolisme. Pour cela, il faut avoir une bonne connaissance de la voie biologique et des polymorphismes de cette voie. D'autre part, il est important dans ce type d'étude de prendre en compte l'exposition au médicament qui peut être un facteur confondant. Les outils statistiques « classiques » ne permettent pas de prendre en compte cette exposition lors de visites répétées (études longitudinales) or il est très important de pouvoir caractériser l'évolution des paramètres d'exposition au cours du temps. L'utilisation des modèles à effets mixtes permet de prendre en compte l'évolution intra-individuelle et inter-individuelle des paramètres au cours du temps.

Nous avons observé dans ce travail une diminution de la concentration d'hémoglobine chez les patients porteurs d'un haplotype de la m-TOR par rapport aux patients non porteurs de cet haplotype. La diminution de la concentration d'hémoglobine chez les porteurs de cet haplotype a été confirmée dans une base de donnée indépendante. Il aurait été intéressant de pouvoir mesurer une production différente d'ARNm m-TOR pour les porteurs de cet haplotype, cependant, l'effectif de patients inclus dans la base contenant les données d'expression n'a pas permis cette confirmation : aucun patient n'était porteur de cet haplotype à risque.

Au-delà de la problématique de recherche des marqueurs génétiques permettant d'identifier les patients à risque d'effets indésirables, un second objectif de recherche concerné est l'intégration de données génétiques aux outils d'individualisation thérapeutique.

Dans ce contexte, les travaux de modélisation de la pharmacocinétique de population de l'Advagraf® et du Prograf® ont permis de confirmer le rôle du polymorphisme CYP3A5 sur la CL/F du tacrolimus et de développer un estimateur bayésien intégrant ce polymorphisme. Il serait intéressant d'intégrer le génotypage du *CYP3A5* aux outils d'adaptation utilisés en routine (ABIS : <https://pharmaco.chu-limoges.fr/>) et donc de généraliser les analyses de pharmacogénétique. Il est vrai que ce critère est important principalement en début de traitement, ensuite le STP permet de corriger l'exposition. Il a toutefois été montré que l'exposition dans les premiers jours post-transplantation est fondamentale pour le devenir à long terme du greffon. Une étude récente a confirmé que l'adaptation pharmacogénétique des patients traités par tacrolimus permettait d'atteindre plus rapidement la zone thérapeutique de C_0 ¹⁹⁹ et même s'il n'a pas été montré d'impact clinique à court terme, les auteurs concluaient

que la réalisation de ce génotypage est important du fait d'une augmentation du risque de rejet aigu chez les patients avec AUC faible 2 jours après la transplantation rénale²⁰⁰.

En conclusion, ce travail de thèse illustre différents aspects de la pharmacogénétique au niveau de la prévention des effets indésirables et de l'intégration de la pharmacogénétique aux outils d'individualisations thérapeutiques. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence des polymorphismes des protéines de transport, de métabolisme et des protéines cibles susceptibles d'influencer la pharmacocinétique des médicaments immunosuppresseurs, le devenir du greffon et du patient. Jusqu'à présent, les études publiées concernent essentiellement les variabilités des protéines de transport et de métabolisme et elles n'ont que très peu d'applications en routine clinique. L'investigation des polymorphismes des cibles des immunosuppresseurs est une voie de recherche encore peu explorée. Ce champ de recherche devrait pouvoir mieux expliquer la variabilité inter-individuelle de la réponse au traitement. Dans l'avenir, la pharmacogénétique devrait contribuer à l'amélioration de la prise en charge individuelle du transplanté rénal.

CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

1. Merrill JP, Ober WE, Reid DE, Romney SL. Renal lesions and acute renal failure in pregnancy. *Am J Med* 1956;**21**(5):781-810.
2. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004;**351**(26):2761-6.
3. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;**351**(26):2715-29.
4. Kaplan B, Meier-Kriesche HU. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**(12):3270-1.
5. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999;**353**(9158):1083-91.
6. Calne RY, Thiru S, McMaster P, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. 1978. *J Am Soc Nephrol* 1998;**9**(9):1751-6.
7. Powles RL, Barrett AJ, Clink H, Kay HE, Sloane J, McElwain TJ. Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. *Lancet* 1978;**2**(8104-5):1327-31.
8. Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, et al. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;**81**(16):5214-8.
9. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;**66**(4):807-15.
10. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;**80**(3 Pt 2):S40-5.

11. Wallemacq PE, Reding R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin Chem* 1993;**39**(11 Pt 1):2219-28.
12. Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal* 2009;**21**(6):827-35.
13. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;**369**(6483):756-8.
14. Hartford CM, Ratain MJ. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**82**(4):381-8.
15. Allison AC, Eugui EM. The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 1993;**14**(4):353-80.
16. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972;**2**(7786):1067-9.
17. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993;**136**:5-28.
18. Allison AC, Hovi T, Watts RW, Webster AD. Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 1975;**2**(7946):1179-83.
19. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;**47**(2-3):85-118.
20. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995;**60**(3):225-32.
21. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet* 1995;**345**(8961):1321-5.
22. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1996;**61**(7):1029-37.
23. Danesi R, Mosca M, Boggi U, Mosca F, Del Tacca M. Genetics of drug response to immunosuppressive treatment and prospects for personalized therapy. *Mol Med Today* 2000;**6**(12):475-82.

24. Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, et al. Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase. *Am J Hum Genet* 1998;**63**(2):595-612.
25. Hill WG, Weir BS. Maximum-likelihood estimation of gene location by linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 1994;**54**(4):705-14.
26. Eskin E, Halperin E, Karp RM. Efficient reconstruction of haplotype structure via perfect phylogeny. *J Bioinform Comput Biol* 2003;**1**(1):1-20.
27. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;**68**(4):978-89.
28. Marchini J, Cutler D, Patterson N, et al. A comparison of phasing algorithms for trios and unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 2006;**78**(3):437-50.
29. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007;**39**(7):906-13.
30. Tregouet DA, Tiret L. Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* 2004;**12**(11):971-4.
31. Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN. Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genet Epidemiol* 2007;**31**(4):358-62.
32. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;**348**(6):538-49.
33. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab Dispos* 1996;**24**(5):515-22.
34. Kronbach T, Fischer V, Meyer UA. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 1988;**43**(6):630-5.
35. Karanam BV, Vincent SH, Newton DJ, Wang RW, Chiu SH. FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 1994;**22**(5):811-4.

36. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 1992;**20**(5):753-61.
37. Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P. Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004;**26**(6):600-8.
38. Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996;**50**(1):52-9.
39. Kolars JC, Awni WM, Merion RM, Watkins PB. First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet* 1991;**338**(8781):1488-90.
40. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;**90**(16):1225-9.
41. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003;**42**(4):299-305.
42. Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, et al. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002;**12**(5):355-66.
43. Ball SE, Scatina J, Kao J, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999;**66**(3):288-94.
44. Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, et al. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 2002;**71**(3):196-204.
45. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;**27**(4):383-91.
46. Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001;**11**(9):773-9.
47. Huang W, Lin YS, McConn DJ, 2nd, et al. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2004;**32**(12):1434-45.
48. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005;**15**(10):677-85.

49. Siest G, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Bagrel D. Cellular and molecular aspects of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 1989;**20**(2-4):721-31.
50. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;**40**:581-616.
51. Walker GS, Atherton J, Bauman J, et al. Determination of degradation pathways and kinetics of acyl glucuronides by NMR spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 2007;**20**(6):876-86.
52. Guillemette C, Levesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* 2010;**42**(1):24-44.
53. Lazarus P, Blevins-Primeau AS, Zheng Y, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen. *Ann N Y Acad Sci* 2009;**1155**:99-111.
54. Owens IS, Ritter JK. Gene structure at the human UGT1 locus creates diversity in isozyme structure, substrate specificity, and regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995;**51**:305-38.
55. Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* 1999;**116**(1):149-60.
56. Izukawa T, Nakajima M, Fujiwara R, et al. Quantitative analysis of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos* 2009;**37**(8):1759-68.
57. Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N, Burchell B. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J* 1999;**340** (Pt 3):837-43.
58. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharmacol* 2006;**71**(11):1531-9.
59. Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005;**33**(1):139-46.
60. Bernard O, Guillemette C. The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004;**32**(8):775-8.

61. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 2000;**275**(46):36164-71.
62. Laverdiere I, Caron P, Harvey M, Levesque E, Guillemette C. In Vitro Investigation of Human UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms Responsible for Tacrolimus Glucuronidation: Predominant Contribution of UGT1A4. *Drug Metab Dispos*;**39**(7):1127-30.
63. Girard H, Court MH, Bernard O, et al. Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004;**14**(8):501-15.
64. Bernard O, Tojcic J, Journault K, Perusse L, Guillemette C. Influence of nonsynonymous polymorphisms of UGT1A8 and UGT2B7 metabolizing enzymes on the formation of phenolic and acyl glucuronides of mycophenolic acid. *Drug Metab Dispos* 2006;**34**(9):1539-45.
65. Djebli N, Picard N, Rerolle JP, Le Meur Y, Marquet P. Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and comedications on Acyl-MPAG production in vitro and in adult renal transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2007;**17**(5):321-30.
66. Court MH, Duan SX, Guillemette C, et al. Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos* 2002;**30**(11):1257-65.
67. Sawyer MB, Innocenti F, Das S, et al. A pharmacogenetic study of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 in patients receiving morphine. *Clin Pharmacol Ther* 2003;**73**(6):566-74.
68. Duguay Y, Baar C, Skorpen F, Guillemette C. A novel functional polymorphism in the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 promoter with significant impact on promoter activity. *Clin Pharmacol Ther* 2004;**75**(3):223-33.
69. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993;**268**(9):6077-80.
70. Lamoureux F, Picard N, Boussera B, Sauvage FL, Marquet P. Sirolimus and everolimus intestinal absorption and interaction with calcineurin inhibitors: a differential effect between cyclosporine and tacrolimus. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;**sous presse**.
71. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. Transporter-enzyme interactions: implications for predicting drug-drug interactions from in vitro data. *Curr Drug Metab* 2003;**4**(5):393-8.

72. Wu CY, Benet LZ. Disposition of tacrolimus in isolated perfused rat liver: influence of troleandomycin, cyclosporine, and gg918. *Drug Metab Dispos* 2003;**31**(11):1292-5.
73. Wang J, Figurski M, Shaw LM, Burckart GJ. The impact of P-glycoprotein and Mrp2 on mycophenolic acid levels in mice. *Transpl Immunol* 2008;**19**(3-4):192-6.
74. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int* 2006;**70**(6):1019-25.
75. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001;**12**(5):1059-71.
76. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2007;**7**(3):154-79.
77. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;**15**(10):693-704.
78. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;**315**(5811):525-8.
79. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(7):3473-8.
80. Hitzl M, Schaeffeler E, Hofer B, et al. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004;**14**(5):309-18.
81. Goto M, Masuda S, Saito H, et al. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002;**12**(6):451-7.
82. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 2005;**59**(3):365-70.
83. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;**297**(3):1137-43.

84. Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol* 2003;**65**(11):1843-52.
85. Tammur J, Prades C, Arnould I, et al. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 2001;**273**(1):89-96.
86. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997;**57**(16):3537-47.
87. Zhang Z, Smith BA, Wang L, Brock A, Cho C, Schultz PG. A new strategy for the site-specific modification of proteins in vivo. *Biochemistry* 2003;**42**(22):6735-46.
88. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;**54**(10):1311-31.
89. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007;**453**(5):643-59.
90. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003;**55**(3):425-61.
91. Bullingham RE, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant Proc* 1996;**28**(2):925-9.
92. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006;**82**(8):1074-84.
93. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998;**34**(6):429-55.
94. Rosso Felipe C, de Sandes TV, Sampaio EL, Park SI, Silva HT, Jr., Medina Pestana JO. Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzymes involved in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 2009;**41**(5):1441-55.
95. Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, et al. Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 2005;**5**(5):987-94.
96. Gregoor PJ, de Sevaux RG, Hene RJ, et al. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid trough levels in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999;**68**(10):1603-6.

97. Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, et al. Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther Drug Monit* 2001;**23**(6):717-21.
98. Kato R, Nishide M, Kozu C, et al. Is cyclosporine A transport inhibited by pravastatin via multidrug resistant protein 2? *Eur J Clin Pharmacol* 2010;**66**(2):153-8.
99. Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T. Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**309**(3):1029-35.
100. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, et al. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002;**25**(10):1356-9.
101. Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, et al. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos* 2005;**33**(7):896-904.
102. Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH, et al. Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br J Clin Pharmacol* 2005;**59**(4):415-24.
103. Innocenti F, Undevia S, Chen X, et al. Pharmacogenetic analysis of interindividual irinotecan (CPT-11) pharmacokinetic (PK) variability: Evidence for a functional variant of ABCC2. *Journal of Clinical Oncology* 2004;**22**(14):129S-129S; Suppl. S.
104. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004;**447**(5):653-65.
105. Meier-Abt F, Mokrab Y, Mizuguchi K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol* 2005;**208**(3):213-27.
106. Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**293**(1):G271-8.
107. Picard N, Yee SW, Woillard JB, et al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2009;**87**(1):100-8.

108. Michelon H, Konig J, Durrbach A, et al. SLCO1B1 genetic polymorphism influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2010;**11**(12):1703-13.
109. Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**304**(2):610-6.
110. Lemahieu WP, Hermann M, Asberg A, et al. Combined therapy with atorvastatin and calcineurin inhibitors: no interactions with tacrolimus. *Am J Transplant* 2005;**5**(9):2236-43.
111. Picard N, Levoir L, Lamoureux F, Yee SW, Giacomini KM, Marquet P. Interaction of sirolimus and everolimus with hepatic and intestinal organic anion-transporting polypeptide transporters. *Xenobiotica* 2011;**41**(9):752-7.
112. Seithel A, Glaeser H, Fromm MF, Konig J. The functional consequences of genetic variations in transporter genes encoding human organic anion-transporting polypeptide family members. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;**4**(1):51-64.
113. Miura M, Satoh S, Inoue K, et al. Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;**63**(12):1161-9.
114. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, et al. Current target ranges of mycophenolic acid exposure and drug-related adverse events: a 5-year, open-label, prospective, clinical follow-up study in renal allograft recipients. *Clin Ther* 2008;**30**(4):673-83.
115. van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, et al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;**86**(3):319-27.
116. Baldelli S, Merlini S, Perico N, et al. C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 2007;**8**(9):1127-41.
117. Letschert K, Keppler D, Konig J. Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 2004;**14**(7):441-52.
118. Miura M, Kagaya H, Satoh S, et al. Influence of drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008;**30**(5):559-64.

119. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2005;**78**(4):351-61.
120. Levesque E, Benoit-Biancamano MO, Delage R, Couture F, Guillemette C. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and its glucuronide metabolites in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 2008;**9**(7):869-79.
121. Johnson LA, Oetting WS, Basu S, Prausa S, Matas A, Jacobson PA. Pharmacogenetic effect of the UGT polymorphisms on mycophenolate is modified by calcineurin inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;**64**(11):1047-56.
122. van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Ther Drug Monit* 2006;**28**(2):145-54.
123. Levesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO, et al. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**81**(3):392-400.
124. Kagaya H, Inoue K, Miura M, et al. Influence of UGT1A8 and UGT2B7 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;**63**(3):279-88.
125. Inoue K, Miura M, Satoh S, et al. Influence of UGT1A7 and UGT1A9 intronic I399 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2007;**29**(3):299-304.
126. van Agteren M, Armstrong VW, van Schaik RH, et al. AcylMPAG plasma concentrations and mycophenolic acid-related side effects in patients undergoing renal transplantation are not related to the UGT2B7-840G>A gene polymorphism. *Ther Drug Monit* 2008;**30**(4):439-44.
127. Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996;**51**(2):278-98.
128. Pescovitz MD, Conti D, Dunn J, et al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin Transplant* 2000;**14**(3):179-88.
129. Heller T, van Gelder T, Budde K, et al. Plasma concentrations of mycophenolic acid acyl glucuronide are not associated with diarrhea in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;**7**(7):1822-31.

130. Ducloux D, Ottignon Y, Semhoun-Ducloux S, et al. Mycophenolate mofetil-induced villous atrophy. *Transplantation* 1998;**66**(8):1115-6.
131. Kamar N, Faure P, Dupuis E, et al. Villous atrophy induced by mycophenolate mofetil in renal-transplant patients. *Transpl Int* 2004;**17**(8):463-7.
132. Shipkova M, Armstrong VW, Weber L, et al. Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2002;**24**(3):390-9.
133. Asif AR, Armstrong VW, Voland A, Wieland E, Oellerich M, Shipkova M. Proteins identified as targets of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in kidney tissue from mycophenolate mofetil treated rats. *Biochimie* 2007;**89**(3):393-402.
134. Shipkova M, Beck H, Voland A, et al. Identification of protein targets for mycophenolic acid acyl glucuronide in rat liver and colon tissue. *Proteomics* 2004;**4**(9):2728-38.
135. Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, et al. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin Biochem* 2000;**33**(2):107-13.
136. Wang K, Zhang H, Li Y, et al. Safety of mycophenolate mofetil versus azathioprine in renal transplantation: a systematic review. *Transplant Proc* 2004;**36**(7):2068-70.
137. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic Acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the german study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**(3):759-68.
138. Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, et al. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2001;**47**(1):88-94.
139. Engelen W, Verpooten GA, Van der Planken M, Helbert MF, Bosmans JL, De Broe ME. Four cases of red blood cell aplasia in association with the use of mycophenolate mofetil in renal transplant patients. *Clin Nephrol* 2003;**60**(2):119-24.
140. Arbeiter K, Greenbaum L, Balzar E, et al. Reproducible erythroid aplasia caused by mycophenolate mofetil. *Pediatr Nephrol* 2000;**14**(3):195-7.
141. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004;**75**(5):434-47.

142. Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Squifflet JP, et al. Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 2003;**25**(5):609-22.
143. Vanrenterghem Y. Anaemia after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004;**19** Suppl 5:V54-58.
144. Al-Uzri A, Yorgin PD, Kling PJ. Anemia in children after transplantation: etiology and the effect of immunosuppressive therapy on erythropoiesis. *Pediatr Transplant* 2003;**7**(4):253-64.
145. Yang JW, Lee PH, Hutchinson IV, Pravica V, Shah T, Min DI. Genetic polymorphisms of MRP2 and UGT2B7 and gastrointestinal symptoms in renal transplant recipients taking mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2009;**31**(5):542-8.
146. Sanchez-Fructuoso AI, Maestro ML, Calvo N, et al. The prevalence of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Transplant Proc* 2009;**41**(6):2313-6.
147. Prausa SE, Fukuda T, Maseck D, et al. UGT genotype may contribute to adverse events following medication with mycophenolate mofetil in pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;**85**(5):495-500.
148. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;**74**(3):245-54.
149. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;**14**(3):147-54.
150. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004;**75**(5):422-33.
151. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;**47**(6):1048-52.
152. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;**14**(7):1889-96.

153. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005;**79**(4):499-502.
154. Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;**76**(8):1233-5.
155. Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 2002;**359**(9308):741-6.
156. Sperschneider H. A large, multicentre trial to compare the efficacy and safety of tacrolimus with cyclosporine microemulsion following renal transplantation. *Transplant Proc* 2001;**33**(1-2):1279-81.
157. McCune TR, Thacker LR, II, Peters TG, et al. Effects of tacrolimus on hyperlipidemia after successful renal transplantation: a Southeastern Organ Procurement Foundation multicenter clinical study. *Transplantation* 1998;**65**(1):87-92.
158. Starzl TE, Fung J, Jordan M, et al. Kidney transplantation under FK 506. *Jama* 1990;**264**(1):63-7.
159. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;**321**(25):1725-38.
160. English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 1987;**44**(1):135-41.
161. Sis B, Dadras F, Khoshjou F, Cockfield S, Mihatsch MJ, Solez K. Reproducibility studies on arteriolar hyaline thickening scoring in calcineurin inhibitor-treated renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2006;**6**(6):1444-50.
162. Gaston RS. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;**4**(12):2029-34.
163. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;**349**(24):2326-33.
164. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009;**20**(11):2468-80.
165. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;**16**(5):1501-11.

166. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008;**86**(9):1206-13.
167. Cattaneo D, Ruggenti P, Baldelli S, et al. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J Am Soc Nephrol* 2009;**20**(6):1404-15.
168. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**82**(6):711-25.
169. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;**103**(6):546-52.
170. Kreutz R, Bolbrinker J, van der Sman-de Beer F, et al. CYP3A5 genotype is associated with longer patient survival after kidney transplantation and long-term treatment with cyclosporine. *Pharmacogenomics J* 2008;**8**(6):416-22.
171. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008;**18**(4):339-48.
172. Kreutz R, Zurcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;**14**(10):665-71.
173. Miao LY, Huang CR, Hou JQ, Qian MY. Association study of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms with sirolimus trough concentration and dose requirements in Chinese renal transplant recipients. *Biopharm Drug Dispos* 2008;**29**(1):1-5.
174. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005;**5**(3):595-603.
175. Le Meur Y, Djebli N, Szelag JC, et al. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2006;**80**(1):51-60.
176. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005;**80**(7):977-84.

177. Dean PG, Lund WJ, Larson TS, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004;**77**(10):1555-61.
178. Simon JF, Swanson SJ, Agodoa LY, Cruess DF, Bohem EM, Abbott KC. Induction sirolimus and delayed graft function after deceased donor kidney transplantation in the United States. *Am J Nephrol* 2004;**24**(4):393-401.
179. Mahe E, Morelon E, Lechaton S, et al. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation* 2005;**79**(4):476-82.
180. Chuang P, Langone AJ. Clobetasol ameliorates aphthous ulceration in renal transplant patients on sirolimus. *Am J Transplant* 2007;**7**(3):714-7.
181. Augustine JJ, Knauss TC, Schulak JA, Bodziak KA, Siegel C, Hricik DE. Comparative effects of sirolimus and mycophenolate mofetil on erythropoiesis in kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2004;**4**(12):2001-6.
182. Maiorano A, Stallone G, Schena A, et al. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;**82**(7):908-12.
183. Thauant O, Beaumont C, Chatenoud L, et al. Anemia after late introduction of sirolimus may correlate with biochemical evidence of a chronic inflammatory state. *Transplantation* 2005;**80**(9):1212-9.
184. Jaster R, Bittorf T, Klinken SP, Brock J. Inhibition of proliferation but not erythroid differentiation of J2E cells by rapamycin. *Biochem Pharmacol* 1996;**51**(9):1181-5.
185. Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006;**6**(2):429-33.
186. Letavernier E, Legendre C. mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management. *Transplant Rev (Orlando)* 2008;**22**(2):125-30.
187. Amer H, Fidler ME, Myslak M, et al. Proteinuria after kidney transplantation, relationship to allograft histology and survival. *Am J Transplant* 2007;**7**(12):2748-56.
188. Haydar AA, Denton M, West A, Rees J, Goldsmith DJ. Sirolimus-induced pneumonitis: three cases and a review of the literature. *Am J Transplant* 2004;**4**(1):137-9.
189. Champion L, Stern M, Israel-Biet D, et al. Brief communication: sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Ann Intern Med* 2006;**144**(7):505-9.

190. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008;**8**(7):1384-92.
191. Aboujaoude W, Milgrom ML, Govani MV. Lymphedema associated with sirolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004;**77**(7):1094-6.
192. Urien S. Approches de population et modélisation en pharmacologie. *La Lettre du Pharmacologue* 2002;**16**(3):79-81.
193. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res* 1972;**5**(5):411-59.
194. Burnham KP, Anderson D. Model Selection and Multi-Model Inference. 2nd ed. ed: Springer-Verlag New York, Inc., 2002.
195. Bertrand J, Comets E, Mentre F. Comparison of model-based tests and selection strategies to detect genetic polymorphisms influencing pharmacokinetic parameters. *J Biopharm Stat* 2008;**18**(6):1084-102.
196. Hardmann JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
197. Frame B, Miller R, Lalonde RL. Evaluation of mixture modeling with count data using NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2003;**30**(3):167-83.
198. Woodahl EL, Hingorani SR, Wang J, et al. Pharmacogenomic associations in ABCB1 and CYP3A5 with acute kidney injury and chronic kidney disease after myeloablative hematopoietic cell transplantation. *Pharmacogenomics J* 2008;**8**(4):248-55.
199. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther* 2010;**87**(6):721-6.
200. Undre NA. Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2003;**18 Suppl 1**:i12-5.