

# **UNIVERSITE DE LIMOGES**

Ecole Doctorale Science Technologie Santé ED258

**Faculté de Médecine**

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

N° ....

Document de THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline : *Pharmacologie***

Présentée et soutenue par

Nassim DJEBLI

Le 09 Novembre 2006

## **Etude de l'influence des polymorphismes des enzymes du métabolisme sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs (sirolimus et mycophénolate mofétil) et pharmacocinétique de population du sirolimus**

Directeurs de Thèse : Dr. Annick Rousseau et Pr. Pierre Marquet

Jury :

Président : Pr. Michel Mourad, Professeur (Université catholique de Louvain, Bruxelles)

Rapporteurs : Pr. Pierre Wallemacq, Professeur (Université catholique de Louvain, Bruxelles)

Dr. Saik Urien, Directeur de Recherche INSERM (Paris)

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

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

# Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement les personnes qui m'ont encadré tout au long de ce travail de thèse, ces personnes qui m'ont fait confiance, guidé, soutenu, aidé et encouragé. Pierre Marquet, merci pour vos enseignements, votre disponibilité, votre rigueur et vos compétences qui m'ont beaucoup appris. Annick Rousseau, merci pour votre disponibilité, votre patience, votre bonne humeur et vos précieux conseils.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre qui m'a accueilli dans le service de Pharmacologie et Toxicologie et m'a permis de réaliser ce travail de thèse dans des conditions optimales.

Monsieur le Professeur Pierre Wallemacq, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et c'est un honneur que de vous compter parmi les membres de ce jury

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

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

Je remercie Monsieur le Professeur Yannick Le Meur pour sa contribution dans ce travail de thèse, qui est fruit d'une collaboration étroite entre le service de Néphrologie et celui de Pharmacologie et Toxicologie.

François-Ludovic Sauvage, Jean-Louis Dupuy, Franck Giraudie, Karine Delaune, et Laetitia Vignaud, je vous remercie pour votre aide et vos conseils.

Franck Saint-Marcoux, Aurélie Prémaud, Nicolas Picard, Belkacem Boussera, Benkali Khaled et Dorra Dridi, je vous remercie pour votre aide, vos conseils et vos encouragements.

Monsieur Jean-Hervé Comte, je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité et vos conseils.

Je remercie tout le personnel du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges pour tout ce qu'ils m'ont apporté dans la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie également tous mes amis et proches qui m'ont entouré et soutenu durant ces trois dernières années.

Je remercie très chaleureusement les personnes sans qui rien n'aurait été possible, mes parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans tous mes projets, ainsi que mon frère Sofiane et ma sœur Amina

Et enfin, je remercie très particulièrement ma chère et tendre Lina qui m'a beaucoup aidé et soutenu pendant cette période de thèse

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	6
INTRODUCTION .....	8
<b>I- ETAT DE L'ART / REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>12</b>
1. Pharmacogénétique.....	12
1.1. Généralités .....	12
1.2. Pharmacogénétique en transplantation .....	14
1.2.1. Enzymes du métabolisme de phase I .....	15
Polymorphismes du CYP3A4.....	15
Polymorphismes du CYP3A5.....	17
1.2.2. Enzymes du métabolisme de phase II .....	19
Pharmacogénétique et production de MPAG .....	20
Pharmacogénétique et production d'AcMPAG .....	21
1.2.3. Transporteurs d'efflux .....	23
La P-glycoprotéine .....	23
La Multi-drug Resistance associated Protein 2 (MRP2) .....	25
1. Pharmacocinétique de population (PKpop).....	26
1.1. Généralités .....	26
1.2. Pharmacocinétique de population et estimation de l'exposition aux immunosuppresseurs.....	27
1.2.1. Régression linéaire multiple (RLM) .....	28
1.2.2. Pharmacocinétique de population et estimation Bayésienne .....	29
1.2.3. Application des outils d'adaptation de posologie développés.....	44
<b>II- TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LE SIROLIMUS.....</b>	<b>47</b>
1. Influence du polymorphisme <i>CYP3A5*3</i> sur la clairance orale du sirolimus chez les patients transplantés rénaux en période précoce et à l'état stable (article 1) .....	48
2. Interaction métabolique de la ciclosporine avec le sirolimus en fonction du polymorphisme <i>CYP3A5*3</i> (article 2).....	62
3. Analyse pharmacocinétique de population du sirolimus et estimation Bayésienne chez des patients transplantés rénaux (article 3).....	95
<b>III- TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LE MYCOPHENOLATE MOFETIL .....</b>	<b>113</b>
Influence des polymorphismes du promoteur et de l'exon 2 <i>C802T</i> du gène de l' <i>UGT2B7</i> et des traitements associés sur la production <i>in vitro</i> de l'Acyl-MPAG et chez des patients adultes transplantés rénaux (article 4).....	114
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>152</b>

**CONCLUSION.....157**

**BIBLIOGRAPHIE .....159**

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcMPAG : acyl-glucuro-MPA

AUC : aire sous la courbe

CL/F : clairance apparente

CL<sub>int</sub> : clairance intrinsèque

CV% : coefficient de variation

CYP : cytochrome P450

CYP3A4r : CYP3A4 recombinant

CYP3A5r : CYP3A5 recombinant

G-6-PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

IMPDH2 : inosine monophosphate déshydrogénase

K<sub>m</sub> : constante de Mickaelis

M3G : 3-glucuronide de la morphine

M6G : 6- glucuronide de la morphine

MDR : multi-drug resistance

MHH : microsomes hépatiques humains

MHR : microsomes hépatiques de rats

MIH : microsomes intestinaux humains

MMF : mycophénolate mofétil

MPA : Acide mycophénolique

MPAG : phényl-glucuro-MPA

MPAGls : MPA-phényl-glucoside

MRH : microsomes rénaux humains

P-gp : P-glycoprotéine

Pkpop : pharmacocinétique de population

RLM : régression linéaire multiple

SNP : single nucléotide polymorphism

STP : suivi thérapeutique pharmacologique

TPMT : thiopurine méthyltransférase

V<sub>c</sub>/F : volume central apparent de distribution

V<sub>max</sub> : vitesse enzymatique maximale (activité)

V<sub>p</sub>/F : volume périphérique apparent de distribution

## INTRODUCTION

De tout temps, l'imaginaire humain n'a cessé d'être exalté par le fantasme d'un être composite, comme en témoignent les mythes antiques du Sphinx ou du Centaure. C'est sur ce fond de chimères que s'inscrit l'histoire scientifique de la transplantation d'organes qui, à partir du XXe siècle, va faire basculer la greffe humaine de l'univers de la légende à celui de la réalité. Avec les années, les transplantations d'organes se sont affirmées comme thérapeutiques alternatives raisonnables dans des situations de dégradation irréversible d'organes vitaux. De plus, en augmentant leurs taux de succès, les équipes de transplantation ont multiplié les indications de transplantations (élargissement des indications, élargissement des critères d'âges, réduction des contre-indications relatives aux traitements immunosuppresseurs utilisés).

Les médicaments immunosuppresseurs sont administrés à vie chez les patients transplantés. Leur rôle est d'éviter le rejet du greffon, qui est la complication majeure de la transplantation. Ce phénomène résulte d'une réaction de l'hôte vis-à-vis du greffon qui est considéré comme étranger par l'organisme receveur. Après l'utilisation des traitements tels que les corticoïdes en 1950, l'irradiation du receveur par les rayons X en 1955 et l'introduction en 1960 d'autres substances (azathioprine, 6-mercaptopurine et méthotrexate), Jean-François Borel en 1972 découvrit les propriétés immunosuppressives de la ciclosporine, dont le mécanisme est l'inhibition de la calcineurine, ce qui a spectaculairement modifié la présentation clinique de rejet malgré les importants effets secondaires qu'elle pouvait entraîner. Vingt-trois ans plus tard apparaît le tacrolimus comme alternative intéressante bien qu'il présente autant d'effets indésirables. En 1996 a été proposé comme alternative à l'azathioprine le mycophénolate mofétil (MMF), une pro-drogue de l'acide mycophénolique (MPA), qui agit en inhibant l'inosine monophosphate deshydrogénase

de type 2 (IMPDH2). Plus récemment, ont été introduites des molécules inhibitrices de la mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) telles que le sirolimus, découvert et utilisé plusieurs années auparavant pour ses propriétés anti-fongiques, mais dont les propriétés immunosuppressives ont été testées suite à son analogie structurale avec le tacrolimus. Dépourvu de néphrotoxicité, il est utilisé en association à de faibles doses de ciclosporine et/ou de MMF. L'évérolimus, un autre inhibiteur de la mTOR et analogue structural du sirolimus avec une meilleure biodisponibilité est actuellement proposé en association à la ciclosporine (Billaud, 2004).

Outre la surveillance clinique régulière imposée par l'utilisation des traitements immunosuppresseurs, le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) est une stratégie d'individualisation de la prescription qui contribue efficacement à l'amélioration du rapport bénéfice/risque d'un certain nombre de thérapeutiques. Le principe du STP conduit à établir la dose à administrer à chaque patient sur la base des concentrations sanguines (sériques ou plasmatiques) du médicament et/ou de métabolites. Pour qu'un médicament soit éligible au titre du STP, il faut (idéalement) qu'il réunisse les caractéristiques suivantes :

- une relation concentration-effet (réponse thérapeutique ou toxicité) plus étroite que la relation dose-effet,
- une grande variabilité de la relation dose-concentration d'un patient à un autre,
- une zone thérapeutique étroite (c'est-à-dire, pour la Food and Drug Administration des Etats-Unis, si  $DL_{50} < 2 \times DE_{50}$ , ou si la dose minimale toxique  $< 2 \times$  dose minimale efficace, ou encore si l'utilisation efficace et sûre du médicament nécessite un dosage minutieux et une surveillance du patient )
- une réponse pharmacologique difficilement accessible par une mesure d'effet.

Une condition supplémentaire vient s'ajouter à ces pré-requis : l'existence d'une méthode de dosage validée.

Les médicaments immunosuppresseurs satisfont aux trois dernières de ces exigences. En revanche, la relation concentration-effet n'est pas parfaitement établie pour tous les médicaments et les différentes populations de patients transplantés. En particulier la valeur de la variable d'exposition la plus pertinente, voire son choix, font encore l'objet de recherche pour le MPA par exemple.

Le STP, qui vise à optimiser l'effet thérapeutique tout en diminuant les effets secondaires, est obligatoire pour la ciclosporine (Keown et col., 1998; Marquet et col., 2004) et pour le sirolimus (Vidal, 2006), et fortement recommandé pour les autres immunosuppresseurs précédemment cités (Billaud, 2004; Marquet et col., 2004). Le STP est en particulier justifié par la fourchette thérapeutique étroite qui caractérise cette classe de médicaments.

Le STP d'une molécule nécessite une bonne connaissance de tous les facteurs individuels (par exemple, profil génétique, traitements associés, état physiopathologique) capables d'affecter la pharmacocinétique et secondairement l'efficacité et/ou la toxicité d'une molécule (risque de rejet et/ou d'effets secondaires).

Le profil génétique est en effet un facteur important à considérer en plus du STP basé sur l'ajustement de la dose en fonction des concentrations résiduelles. Les polymorphismes des enzymes responsables du métabolisme et des protéines de transport, sans parler des polymorphismes des protéines impliquées dans le mécanisme d'action du médicament, peuvent affecter l'expression et/ou l'activité de ces enzymes. Il peut en résulter une modification importante de la pharmacocinétique du médicament avec des conséquences probables sur son efficacité ou sur l'apparition de toxicité (effets secondaires). Il semble donc intéressant d'étudier l'effet des polymorphismes génétiques susceptibles d'être à l'origine de ces modifications suite à l'administration d'un traitement immunosuppresseur. Les traitements associés, inévitables en transplantation, peuvent également être à l'origine d'interactions médicamenteuses et sont donc à prendre en compte dans l'individualisation de la posologie d'un médicament. Enfin, certaines pathologies peuvent modifier la pharmacocinétique du médicament, il faut donc en être informé et les considérer pour l'individualisation de posologie.

La connaissance de la pharmacocinétique d'un médicament est importante pour un bon STP. Paradoxalement, une seule étude pharmacocinétique du sirolimus basée sur une analyse compartimentale, chez 36 patients adultes transplantés rénaux en période stable sous ciclosporine, a été rapportée dans la littérature internationale (Ferron et col., 1997).

Suivant cet ordre d'idées, après un bref rappel et un exposé de l'état de l'art sur la pharmacogénétique et la pharmacocinétique de population des immunosuppresseurs, les objectifs de ce travail étaient :

- d'étudier *in vivo* l'effet des polymorphismes les plus pertinents (en terme d'impact fonctionnel) des enzymes du métabolisme sur la pharmacocinétique du sirolimus chez des patients adultes transplantés rénaux et de déterminer l'impact de cet effet sur l'individualisation de la dose ;
- d'étudier *in vitro* l'interaction métabolique de la ciclosporine avec le sirolimus en fonction du profil génétique considéré ;

- de développer un modèle pharmacocinétique de population pour le sirolimus chez des patients adultes transplantés rénaux, pour étudier l'influence potentielle de facteurs individuels et développer un estimateur Bayésien permettant l'estimation des paramètres pharmacocinétiques et des indices d'exposition individuels à partir d'un nombre limité de prélèvements.
- d'étudier l'influence des polymorphismes des enzymes du métabolisme du MPA, forme active du mycophénolate mofétil, et des traitements associés sur la production des métabolites du MPA.

Les deux premières parties de ce mémoire présentent des généralités sur la pharmacogénétique, en particulier des enzymes du métabolisme et des transporteurs d'efflux en transplantation, et sur la pharmacocinétique de population, en particulier celle des immunosuppresseurs.

Les deuxième et troisième parties portent sur nos travaux personnels concernant le sirolimus et le mycophénolate, respectivement.

Enfin, la discussion envisage : l'impact clinique de nos résultats et leurs implications possibles sur les pratiques actuelles en terme d'individualisation thérapeutique par le choix du médicament, le choix *a priori* de la dose en tenant compte du profil génétique, des interactions médicamenteuses et de caractéristiques individuelles ; et les perspectives en matière de validation clinique et à beaucoup plus grande échelle de ces approches.

# I- ETAT DE L'ART / REVUE DE LITTÉRATURE

## 1. Pharmacogénétique

### 1.1. Généralités

La pharmacogénétique est la discipline qui étudie les bases génétiques de la variabilité de la réponse aux médicaments. En effet, certains variants alléliques de gènes codant pour des enzymes du métabolisme, des cibles ou des transporteurs intervenant dans le devenir et les effets des médicaments dans l'organisme sont associés à des gains ou des pertes de fonction. Le métabolisme des médicaments est sous le contrôle d'enzymes de phase I, incluant de nombreuses isoformes des cytochromes P450 (CYP) et/ou d'enzymes de phase II qui catalysent des réactions de conjugaison. La pharmacogénétique a pour objectif clinique ultime d'optimiser les décisions thérapeutiques en terme de choix de la dose et/ou du médicament à administrer en fonction du génome de l'individu, en passant par l'étude des mécanismes moléculaires responsables de ces variations et par l'évaluation de leur importance clinique, tentant ainsi de réduire la variabilité inter-individuelle de la réponse au médicament. Il a été avancé que la génétique serait impliquée à 20-95% dans la variabilité inter-individuelle de la biodisponibilité et des effets des médicaments (Evans et McLeod, 2003).

Historiquement, cette notion de variabilité inter-individuelle de la réponse aux xénobiotiques et ses importantes implications a été rapportée dès 1909 par Garrod dans son ouvrage « erreurs innées du métabolisme ». D'autres exemples peuvent être cités tels que la caractérisation de la non-sensibilisation à la phénylthiourée comme caractère autosomal récessif en 1932 (Snyder, 1932); ou la découverte d'une déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) en 1956 (Carson, 1956). Motulsky en 1957 a défini le concept selon lequel des défauts métaboliques pourraient expliquer les différences individuelles de la réponse aux médicaments (Motulsky, 1957). Le terme « pharmacogénétique » a été inventé par Vogel en 1959 (Vogel, 1959) et sa définition a été

largement développée et illustrée par des exemples documentés et confirmés en 1962 par Kalow (Kalow, 1962). Il s'en est suivi une vingtaine d'années durant lesquelles certaines mutations, à l'origine d'une variabilité ont été identifiées. Ces résultats coïncidaient avec les découvertes de plusieurs isoformes d'enzymes du métabolisme. Mahgoub et al. en 1977 ont découvert le polymorphisme de la débrisoquine hydroxylase (Mahgoub et col., 1977), plus tard appelée CYP2D6 (Gonzalez et col., 1988). Par la suite ont été découverts de nombreux polymorphismes concernant les enzymes du métabolisme de phase I et II et, plus récemment, les transporteurs d'efflux.

La pharmacogénétique tente ainsi d'expliquer le lien entre le polymorphisme structural du gène et la conséquence, c'est-à-dire l'exposition au médicament qui en résulte, afin de proposer éventuellement la thérapeutique et/ou la dose la plus adaptée.

Un des exemples historiques les plus frappants concerne le polymorphisme de la thiopurine méthyltransférase (TPMT) qui métabolise la 6-mercaptopurine en 6-méthyl mercaptopurine, au cours des traitements par azathioprine ou par 6-mercaptopurine. Ce polymorphisme, caractérisé par la présence ou non de deux mutations ponctuelles ou Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) au niveau de la séquence du gène de la TPMT, définissant l'haplotype TPMT\*3A, peut entraîner une myélotoxicité iatrogène sévère, voire mortelle chez les individus mutés homozygotes. A l'inverse, une inefficacité du traitement peut être observée chez des individus présentant une forte activité de TPMT. L'activité de la TPMT, présente également dans les érythrocytes, peut être mesurée par une simple prise de sang. Ces deux types d'analyse, déterminations phénotypique et génotypique, le phénotype étant défini comme étant l'expression visible du génotype, ont été parmi les premiers tests pharmacogénétiques à être utilisés en clinique (Weinshilboum et col., 1999). Le CYP2D6, enzyme très polymorphe, est un autre exemple pour lequel ces études génotype-phénotype ont été appliquées. Cette isoforme intervient dans l'hydroxylation d'une quarantaine de médicaments parmi lesquels des anti-arythmiques, des antagonistes des récepteurs bêta-adrénergiques, des anti-dépresseurs tricycliques, des neuroleptiques et des opiacés (Eichelbaum et Gross, 1990). Plusieurs tests pour la détermination du phénotype sont possibles, dont celui du dosage dans l'urine de la 4-hydroxy-débrisoquine, produit d'hydroxylation de la débrisoquine après administration orale. Le génotype du CYP2D6 conditionne l'appartenance à un groupe phénotypique : (i) des non-métaboliseurs \*3, \*4, \*5, \*6, \*7 et \*8 ; (ii) des métaboliseurs lents \*9, \*10 et \*41 ; (ii) des métaboliseurs rapides (normaux) \*1 et \*2 ; et enfin (iii) des métaboliseurs ultra-rapides, par la duplication du gène CYP2D6 (Fux et col., 2005).

Cependant, différentes étapes sont nécessaires avant d'aboutir à l'utilisation en clinique des données de la pharmacogénétique. En effet, il faut d'abord passer par la sélection des gènes candidats (c'est-

à-dire intervenant dans le métabolisme, le transport ou le mécanisme d'action), pour lesquels il faut identifier l'ensemble des polymorphismes pertinents (délétions, insertions, SNPs, duplication) et déterminer leurs fréquences dans une ou différentes populations (la fréquence des polymorphismes étant souvent très variable en fonction de l'ethnie). L'étape suivante consiste à établir des associations génotype-phénotype par l'utilisation de modèles cellulaires, animaux ou humains (cultures cellulaires, fractions et microsomes à partir de biopsies d'organes) en comparant des variants génétiques aux sauvages. Une confirmation *in vivo* de cet effet par mise en évidence d'associations entre les polymorphismes sélectionnés et les paramètres pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques est nécessaire, et doit être suivie éventuellement d'une validation dans une plus large population. Dans certains cas, ces études peuvent aboutir à des modèles pharmacocinétiques de population incluant ces données pharmacogénétiques avec ou sans données pharmacodynamiques (Burckart et Liu, 2006).

La pharmacogénétique s'intéresse ainsi à toutes les thérapies qui font appel à des enzymes du métabolisme, des protéines de transport ou des protéines cibles présentant des polymorphismes. Il peut être important d'en tenir compte lors de certains traitements du système nerveux central, respiratoire ou cardiovasculaire (Tribut et col., 2002). Cependant, cette discipline prend un intérêt particulier dans les traitements à moyen ou long terme pour lesquels le STP est également recommandé, tels qu'en transplantation, en oncologie ou en virologie.

## **1.2. Pharmacogénétique en transplantation**

Les patients transplantés, traités avec différentes associations de médicaments ayant une fourchette thérapeutique étroite, vivent en permanence avec le risque d'une sous-immunosuppression pouvant favoriser un phénomène de rejet aigu, voire la perte du greffon, ou d'une sur-immunosuppression avec apparition d'effets toxiques tels que néphrotoxicité, hépatotoxicité, hyperlipidémie, leucopénie ou hypertension, d'infections ou de pathologies néoplasiques (par effet thérapeutique exagéré). Le STP est utilisé pour pallier ces conséquences mais ne suffit pas, en pratique, à éviter l'ensemble de ces effets indésirables et l'apport de la pharmacogénétique serait à même d'améliorer encore le rapport bénéfice/risque des patients, en individualisant *a priori* (avant même la première administration) la nature et les doses des immunosuppresseurs administrés.

Dans le domaine de la transplantation, les variations inter-individuelles aux traitements sont importantes, et plus importantes que les variations intra-individuelles, ce qui est compatible avec

l'idée que le profil génétique soit un des déterminants de la réponse aux traitements, c'est-à-dire de leurs caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (efficacité et effets indésirables). L'identification récente de nombreux polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme et des protéines de transport des xénobiotiques a conforté cette hypothèse.

En particulier, la ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et l'évérolimus sont essentiellement métabolisés par des enzymes de phase I alors que le MMF, après hydrolyse en MPA, subit principalement un métabolisme de phase II. Tous ces immunosuppresseurs sont des substrats de transporteurs d'efflux tels que la P-glycoprotéine (P-gp), codée par le gène *MDR1* (ou *ABCB1*), ou la multidrug resistance related protein 2 (MRP2).

### **1.2.1. Enzymes du métabolisme de phase I**

Les enzymes du métabolisme de phase I des immunosuppresseurs sont essentiellement constituées des CYP3A4 et CYP3A5. En effet, la ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et l'évérolimus sont principalement métabolisés par ces isoformes (Kronbach et col., 1988; Sattler et col., 1992; Kovarik et col., 2001c). Nous avons précédemment démontré dans l'équipe que le MPA subit également un métabolisme de phase I par les CYP3A4/5 en 6-O-desméthyl-MPA (Picard et col., 2004), bien que de façon marginale.

Les CYP3A jouent un rôle important dans le métabolisme de 2/3 des médicaments mis sur le marché (Wrighton et Stevens, 1992; Guengerich, 1995) et de plusieurs substances endogènes. Ils sont principalement exprimés au niveau hépatique et intestinal (Cholerton et col., 1992; Thummel et Wilkinson, 1998) et sont caractérisés par une grande variabilité d'expression d'un individu à l'autre (Shimada et col., 1994; Guengerich, 1995; Paine et col., 1997), probablement due aux différents polymorphismes connus : plus d'une trentaine pour le CYP3A4 et plus d'une dizaine pour le CYP3A5.

#### *Polymorphismes du CYP3A4*

Malgré le nombre élevé de polymorphismes identifiés au niveau du gène du CYP3A4 (Human CYP allele nomenclature Committee), ils sont peu fréquents dans la population (< 5 % pour la plupart) et ont une faible incidence sur l'activité et/ou l'expression de l'enzyme. Le *CYP3A4\*1B*, correspondant au SNP A-392G au niveau du promoteur du gène, présent dans 3,6 à 9,6 % de la population caucasienne, 53 à 67 % de la population Africaine ou Afro-Américaine et absent dans la

population asiatique est le polymorphisme le plus fréquent du CYP3A4 (Walker et col., 1998; Ball et col., 1999; Sata et col., 2000; van Schaik et col., 2000; Garcia-Martin et col., 2002; Hamzeiy et col., 2002). Une étude *in vitro* a montré que le promoteur du gène *CYP3A4* portant l'allèle muté *\*1B*, inséré en amont du gène de la luciférase en utilisant les cellules HEPG2 et MCF7, entraînait une augmentation significative de son expression comparé à celui portant l'allèle sauvage *\*1A* (Amirimani et col., 1999). Cependant, aucune association n'a été observée entre le génotype *CYP3A4\*1B* et la pharmacocinétique des substrats utilisés (Ball et col., 1999; Westlind et col., 1999; Sata et col., 2000; Wandel et col., 2000). D'autres polymorphismes de fréquence plus faible ont été identifiés, tels que le *CYP3A4\*2* qui est retrouvé à une fréquence de 2,7 % dans la population caucasienne (van Schaik et col., 2000), et qui est associé à une clairance intrinsèque de la nifédipine diminuée par rapport au génotype sauvage, sans avoir d'effet sur la 6 $\beta$ -hydroxylation ni sur la pharmacocinétique de la testostérone (Sata et col., 2000). Le *CYP3A4\*3*, retrouvé à une fréquence de 1 à 4 % dans la population Caucasienne (van Schaik et col., 2000; Dai et col., 2001), n'est associé à aucune variabilité du métabolisme de la testostérone, de la progestérone ou du chloryrifos (Dai et col., 2001; Eiselt et col., 2001). Il semble donc difficile de faire un lien entre le génotype du CYP3A4 et la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de ses substrats.

Certaines études ont, néanmoins, montré un effet significatif du *CYP3A4\*1B* sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs. L'étude de Hesselink et al. (Hesselink et col., 2003), réalisée chez des patients transplantés rénaux recevant de la ciclosporine (n=110) ou du tacrolimus (n=64), a montré des concentrations résiduelles standardisées par la dose (C0/dose) de tacrolimus significativement plus faibles chez les patients portant au moins un allèle *CYP3A4\*1B* que chez les patients portant le génotype sauvage *CYP3A4\*1A/\*1A*. Pour la ciclosporine en revanche, l'impact de ce polymorphisme est beaucoup moins marqué : cette étude et d'autres, réalisées chez des patients transplantés rénaux (Rivory et col., 2000; von Ahsen et col., 2001), n'ont montré aucun effet significatif de ce polymorphisme sur la pharmacocinétique de la ciclosporine. L'étude de Min et al., réalisée chez seulement 14 volontaires sains, reste la seule à avoir montré que l'aire sous la courbe standardisée par la dose (AUC/dose) de ciclosporine était significativement plus faible, respectivement de 11 et de 46 %, chez les individus *CYP3A4\*1B/\*1A* et *CYP3A4\*1B/\*1B*, que chez les individus *CYP3A4\*1A/\*1A* (Min et Ellingrod, 2003). Ce résultat singulier est peut-être dû au schéma de l'étude, c'est-à-dire la comparaison d'effectifs comparables (et faibles) pour les trois génotypes (*\*1A/\*1A* n=4, *\*1A/\*1B* n=6 et *\*1B/\*1B* n=4), qui ne reflète pas leur fréquence réelle dans la population. En ce qui concerne le sirolimus, Anglicheau et al. ont trouvé une influence

significative du polymorphisme CYP3A4\*1B sur les C0/dose de sirolimus, lorsque ce médicament est utilisé comme traitement de secours chez des patients transplantés rénaux. En revanche, aucune association n'était observée chez les patients co-traités par un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) ni, de manière plus étonnante, chez les patients sous sirolimus utilisé seul en traitement initial (Anglicheau et col., 2005). Cependant, ces deux populations étaient représentées par un plus faible nombre de patients (n=51 et n=29 *versus* n=69, respectivement). De plus, le dosage du sirolimus était réalisé dans cette étude par HPLC, moins fiable que la technique LC-MS/MS de référence.

### *Polymorphismes du CYP3A5*

Parmi les différents polymorphismes identifiés au niveau du gène du CYP3A5 (SNPs et insertions de bases), le plus fréquent et le plus étudié est le CYP3A5\*3, dont la fréquence allélique est d'environ 90 % dans la population Caucasienne (Hustert et col., 2001; Kuehl et col., 2001; Hesselink et col., 2003), et de seulement 30 % dans la population Africaine (Hustert et col., 2001). Il correspond à une substitution d'une base Adénosine par une base Guanosine en position 6986 au niveau de l'intron 3 du gène CYP3A5 (A6986G), aboutissant ainsi à une erreur d'épissage de l'ARNm transcrit, à l'origine de la production d'une protéine tronquée inactive de 102 acides aminés (Kuehl et col., 2001). Il en résulte que seuls les individus portant au moins un allèle sauvage CYP3A5\*1 expriment la protéine CYP3A5 à des taux significatifs (Hustert et col., 2001; Kuehl et col., 2001). Ce polymorphisme est donc important à considérer de par son implication fonctionnelle et sa fréquence dans la population. D'autres polymorphismes du CYP3A5 ont été identifiés, de fréquence beaucoup plus faible mais entraînant néanmoins une perte d'activité enzymatique. C'est le cas du CYP3A5\*6 (G14685A), dont la fréquence est quasi-nulle dans la population caucasienne mais atteint 10 % dans la population africaine. Ce polymorphisme entraîne la délétion de l'exon 7 au niveau du transcrit, aboutissant à une protéine tronquée inactive de 184 acides aminés (Hustert et col., 2001).

L'implication du polymorphisme CYP3A5\*3 dans la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du tacrolimus a été suggérée dès 2002 par MacPhee et al. (Macphee et col., 2002), et confirmée par d'autres études qui ont montré des C0/dose significativement plus faibles à toutes les périodes post-transplantation chez les porteurs d'au moins un allèle CYP3A5\*1, dans des populations d'adultes greffés rénaux (Hesselink et col., 2003; Haufroid et col., 2004; Tsuchiya et

col., 2004; Macphee et col., 2005; Zhao et col., 2005) ou hépatiques (Zheng et col., 2004). Zheng et al (Zheng et col., 2003) ont montré chez des enfants transplantés hépatiques, une différence significative des concentrations de tacrolimus standardisées par la dose et par le poids corporel entre les patients expressers (\*1/\*3 + \*1/\*1) et non-expressers (\*3/\*3) du CYP3A5, au 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> mois après la transplantation. Le rapport de dose de tacrolimus à administrer entre patients transplantés rénaux adultes expressers et non-expressers a même été estimée à environ 2 fois (Haufroid et col., 2004; Tsuchiya et col., 2004; Macphee et col., 2005; Mourad et col., 2005). L'étude de Thervet et al. chez des patients transplantés rénaux a montré l'effet « dose/réponse » de ce polymorphisme sur les C0/dose de tacrolimus : les patients *CYP3A5\*1/\*1* avaient les valeurs de C0/dose les plus faibles, les patients *CYP3A5\*3/\*3* les valeurs les plus élevées et les patients hétérozygotes *CYP3A5\*1/\*3* des valeurs intermédiaires (Thervet et col., 2003). Une étude, présentée récemment au World Transplant Congress (WTC, Boston, USA ; 2006) et réalisée chez 384 patients transplantés rénaux recevant du tacrolimus, a montré que l'inclusion du génotype CYP3A5\*3 dans le modèle développé par régression linéaire expliquait 53% de variabilité des concentrations de tacrolimus en plus (p=0,001), par rapport à un modèle incluant seulement la race du patient (caucasienne ou afro-Américaine) (p=0,43) (Beznik-Cizman et col., 2006). Enfin, Goto et al. ont constaté chez des greffés hépatiques que les C0/dose de tacrolimus étaient significativement plus faibles chez les patients porteurs d'un greffon avec le génotype *CYP3A5\*1/\*1* (Goto et col., 2004) que chez les autres, montrant ainsi l'influence du génotype du donneur.

En ce qui concerne la pharmacocinétique de la ciclosporine, une fois encore l'impact de ce polymorphisme semble être moins déterminant que pour les autres immunosuppresseurs. Certaines études, réalisées chez des patients transplantés rénaux, n'ont trouvé aucune association significative (Hesselink et col., 2003; Anglicheau et col., 2004; Zhao et col., 2005; Macphee et col., 2006). L'étude de Min et al. (Min et col., 2004) en revanche, réalisée chez 16 individus sains, a montré une différence significative des valeurs d'AUC et de clairance chez des individus *CYP3A5\*1/\*1* (n=6) comparé aux individus *CYP3A5\*3/\*3* (n=6) (p=0.03 et p=0.04, respectivement). Notons que le test statistique n'a été fait qu'entre le groupe des homozygotes sauvages et homozygotes mutés, sans prendre en compte les données des hétérozygotes. De plus, le faible nombre d'individus ayant participé à l'étude et leur sélection préalable en fonction du génotype CYP3A5 peut avoir, ici aussi, affecté la validité de ces résultats. Toutefois, une diminution significative (1,6-fois) des C0/dose a également été observée pour de plus grands effectifs de patients transplantés rénaux stables exprimant le CYP3A5 comparé aux non-expressers (Haufroid et col., 2004).

Pour le sirolimus, les résultats restent controversés : Anglicheau et al (Anglicheau et col., 2005) ont montré une association significative entre le polymorphisme *CYP3A5*\*3 et les C0/dose/kg de poids chez 69 patients transplantés rénaux recevant le sirolimus comme traitement de secours :  $89 \pm 65$  ng/mL/mg de dose/kg pour les expresseurs (n=11) *versus*  $145 \pm 93$  ng/mL/mg de dose/kg pour les non-expresseurs (n=58). En revanche, chez les patients sous sirolimus utilisé en traitement initial ou chez les patients co-traités par un anti-calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus), les auteurs n'ont observé aucune association significative. L'étude de Mourad et al. (Mourad et col., 2005) chez 84 patients transplantés rénaux stables (6,2 à 285,3 mois après la greffe) recevant du sirolimus en association ou pas avec le tacrolimus (n=24 et n=60, respectivement), dont certains étaient sous prednisolone (n=81), n'a montré aucune association significative entre le génotype *CYP3A5*\*3 et les valeurs de C0/dose (ou des doses ajustées) de sirolimus, que ce soit dans la population entière ou dans la population de patients co-traités par le tacrolimus.

## **1.2.2. Enzymes du métabolisme de phase II**

Le MMF, prodrogue du MPA, est le seul immunosuppresseur qui subit majoritairement un métabolisme de phase II. En effet, les autres immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus et évérolimus) sont principalement (mais pas exclusivement) métabolisés par les *CYP3A*, comme détaillé précédemment.

Le MPA est majoritairement métabolisé en son métabolite inactif le phényl-glucuro-MPA (MPAG) (Bullingham et col., 1998). Le MPAG est ensuite partiellement excrété dans la bile et participe au cycle entéro-hépatique du MPA après déconjugaison intestinale (Bullingham et col., 1998). De plus, deux autres métabolites minoritaires du MPA ont été isolés, l'acyl-glucuro-MPA (AcMPAG) et le MPA-phényl-glucoside (MPAGIs) (Schutz et col., 1999; Shipkova et col., 1999). Plus récemment, une étude menée dans notre équipe a permis d'identifier d'autres métabolites, le 6-O-desméthyl-MPA et les 2 glucuronides correspondants, au niveau sanguin et urinaire (Picard et col., 2004).

Une activité immunosuppressive de l'AcMPAG par un effet inhibiteur sur la prolifération lymphocytaire a été rapportée (Shipkova et col., 2001), suite à l'inhibition de l'activité de l'IMPDH2 (Schutz et col., 1999). Son mécanisme d'inhibition a été initialement considéré comme non-compétitif et réversible (comme celui du MPA) (Schutz et col., 1999), mais des études *in vitro* de la même équipe a suggéré qu'il s'agissait probablement d'une inhibition irréversible de l'IMPDH2 par l'AcMPAG, par formation d'un complexe covalent sous forme d'une imine, entre le résidu lysine de l'IMPDH2 et la fonction aldéhyde de l'AcMPAG (Shipkova et col., 2001;

Armstrong et col., 2004). Il est en effet bien connu que les acyl-glucuronides sont caractérisés par une réactivité électrophile aboutissant à la formation d'adduits aux protéines et aux macromolécules, mécanisme supposé de leur toxicité (Ritter, 2000; Shipkova et col., 2003). L'AcMPAG est ainsi susceptible d'être responsable de certains effets secondaires attribués au MMF, tels que la leucopénie ou la toxicité gastro-intestinale (Wieland et col., 2000). En revanche, le MPAGs ne montre aucune activité immunosuppressive (Schutz et col., 1999) et aucune toxicité ne lui a été attribué.

Une étude récente dans notre équipe (Picard et col., 2005) a montré que la production hépatique de MPAG était principalement due à l'UGT1A9 et qu'une faible partie était probablement prise en charge par les UGT1A1 et UGT1A6, alors que les UGT1A7, UGT1A8, UGT1A10 et en plus faible proportion l'UGT1A9 contribueraient à la production de MPAG au niveau intestinal et ainsi à l'effet du premier passage hépatique du MPA. Par ailleurs, l'UGT1A9 étant également fortement exprimée au niveau rénal, la production rénale de MPAG est également importante à considérer, ce qui ne semble pas avoir encore fait l'objet d'études. Notre équipe a également montré que la production de l'AcMPAG était principalement due à l'UGT2B7, surtout exprimée au niveau hépatique, mais également au niveau rénal et intestinal (Czernik et col., 2000; Fisher et col., 2001; Antonio et col., 2003).

### *Pharmacogénétique et production de MPAG*

L'influence sur la production de MPAG des polymorphismes des UGTs concernés a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. Bernard et al. (Bernard et Guillemette, 2004) en utilisant des microsomes hépatiques, rénaux et intestinaux humains (MHH, MRH et MIH), ont montré que les polymorphismes *UGT1A9*\*3 (T98C ; M33T) et *UGT1A8*\*3 (G830A; C277Y) entraînent une diminution de la clairance intrinsèque ( $Cl_{int}$ ) de la production de MPAG. L'étude de Girard et al. (Girard et col., 2004) avec des MHH a montré que les SNPs T-275A et C-2152T situés au niveau du promoteur du gène de l'UGT1A9 étaient associés à une expression plus élevée de l'enzyme et à une  $Cl_{int}$  de formation de MPAG augmentée. Une étude très récente (Bernard et col., 2006) a montré que plusieurs transcrits stables de polymorphismes de l'UGT1A8 dans des cellules HEK-293 – *UGT1A8*\*3, \*5 (A173G, T240A), \*7 (A231T), \*8 (S43L) et \*9 (N53G) – étaient associés à une diminution de 3,3 à 82,5 fois de la production de MPAG par rapport aux cellules HEK-293 transfectées avec le génotype sauvage.

Une étude *in vivo* chez 95 patients transplantés rénaux (Kuypers et col., 2005) a montré une exposition au MPA significativement plus faible chez les patients porteurs du SNP T-275A ou C-2452T, ou des 2 à la fois, comparés à ceux porteurs du génotype sauvage : les  $AUC_{0-12h}/dose$  étaient en moyenne 2 fois plus faibles et les  $C_0/dose$  2,3 fois plus faibles.

### *Pharmacogénétique et production d'AcMPAG*

Plusieurs études se sont penchées sur les polymorphismes de l'UGTB7 et leur influence sur l'activité enzymatique de glucuronoconjugaison. Le polymorphisme de l'UGT2B7 le plus connu et le plus étudié est le SNP C802T au niveau de l'exon 2 du gène, à l'origine d'une substitution d'une histidine en tyrosine en position 268 de la protéine. L'impact de ce SNP sur l'activité de glucuronoconjugaison reste controversé. En effet, plusieurs études n'ont montré aucun effet de ce SNP : Holthe et al. (Holthe et col., 2002) n'ont trouvé aucun effet de ce polymorphisme sur les ratios métaboliques plasmatiques des métabolites 3- et 6-glucurono-conjugués de la morphine (M3G/M, M6G/M et M3G/M6G) chez des patients cancéreux recevant un traitement morphinique chronique ; de la même manière, l'étude de Bhasker et al. (Bhasker et col., 2000) n'a montré aucune différence significative, entre les 3 groupes génotypiques de ce polymorphisme, de la glucuronoconjugaison de l'androstérone, du menthol et de la morphine (en M3G) avec des MHH génotypés provenant de sujets caucasiens ; Coffman et al. (Coffman et col., 1998), en utilisant des cellules HEK-293 exprimant les 2 variants alléliques (CC802 ou 802TT), n'ont également observé aucune différence significative de glucuronoconjugaison de plusieurs opioïdes, du menthol, de l'androstérone et des 2 formes (R) et (S) du propranolol. De la même manière, aucune différence significative de glucuronoconjugaison de l'azathioprine, de la morphine ou de la codéine n'a été observée par Court et al. (Court et col., 2003), sur des MHH génotypés pour l'*UGT2B7*\*2.

D'autres études ont montré que le variant 802T était associé à une augmentation de l'activité de l'enzyme : l'étude de Sawyer et al. (Sawyer et col., 2003), menée chez des patients recevant de la morphine, a montré une diminution significative du ratio M6G/M chez les patients portant le génotype CC802 par rapport aux porteurs C802T, et de ces derniers par rapport aux porteurs 802TT ( $p=0,031$ ), de même que les concentrations plasmatiques de M3G et de M6G étaient significativement plus faibles chez les patients CC802 ( $p=0,045$  et  $0,004$ , respectivement) ; Thibaudeau et al. (Thibaudeau et col., 2006), utilisant des cellules portant l'un ou l'autre des 2 variants alléliques, a montré une glucuronoconjugaison du 4-hydroxyestradiol et du 4-

hydroxyestrone 2 fois plus faible avec le variant CC802 (UGT2B7\*1), probablement due à une activité ( $V_{max}$ ) et à une affinité ( $K_m$ ) altérées.

En revanche, l'étude de Wiener et al. (Wiener et col., 2004), avec des MHH génotypés, a trouvé au contraire que les MHH portant le génotype 802TT étaient associés à une diminution significative de la glucurono-conjugaison par l'UGT2B7 du 4-méthylnitrosamino-1-3pyridyl-1-butanol, métabolite principal du 4-méthylnitrosamino-1-3pyridyl-1-butanone qui est un procarcinogène retrouvé abondamment dans le tabac, comparés aux MHH portant le génotype homozygote sauvage CC802 ( $p < 0,05$ ).

Sur un versant plus pharmacodynamique, l'étude de Lin et al. (Lin et col., 2005) a montré, chez des sujets exposés à la benzidine, une prévalence significativement plus forte du génotype 802TT chez ceux atteints de cancer de la vessie que chez les sujets indemnes (25% *versus* 9%,  $p = 0,006$ ). Une augmentation significative de la fréquence allélique du 802T a également été retrouvée dans le groupe des patients atteints (46% *versus* 33%,  $p = 0,03$ ). Cette étude suggère que le variant 802T de l'UGT2B7 aurait plus d'activité de glucurono-conjugaison de la benzidine que le génotype C802, ce métabolite se retrouvant par la suite dans la vessie où il est hydrolysé en benzidine, à l'origine de cet effet cancérigène.

Une seule étude récente a recherché l'effet de ce polymorphisme *in vitro* sur la production d'AcMPAG, en utilisant des cellules HEK-293 exprimant soit le variant muté 802TT soit le génotype sauvage CC802 (Bernard et col., 2006). Cette étude a montré que la production d'AcMPAG était comparable dans les deux lignées cellulaires et que ce polymorphisme n'avait pas d'effet sur l'activité de glucurono-conjugaison de l'UGT2B7.

D'autres SNPs de l'UGT2B7 ont été identifiés, sur l'exon 2 (G735A et T801A), sur l'exon 4 (G1059C et T1062C) et dans la région du promoteur (A-1248G, T-1241C, T-1054C, G-842A, A-268G, T-161C et T-102C), aboutissant à trois haplotypes majeurs (Holthe et col., 2003; Duguay et col., 2004; Saeki et col., 2004). En effet, tous les SNPs de la région du promoteur cités ci-dessus sont en parfait déséquilibre de liaison entre eux, et en déséquilibre de liaison inverse avec le C802T de l'exon 2 et le G1059C de l'exon 4. Un autre SNP de la région du promoteur (G-79A), avec une beaucoup plus faible fréquence (moins de 2%) a été découvert récemment ; il serait associé à une diminution de l'activité de glucurono-conjugaison de la morphine (Duguay et col., 2004).

### 1.2.3. Transporteurs d'efflux

Les transporteurs d'efflux refoulent certains xénobiotiques, métabolites et molécules endogènes vers l'extérieur de la cellule. Ces protéines jouent un rôle important dans la régulation de l'absorption, de la distribution et de l'excrétion de nombreux xénobiotiques.

#### *La P-glycoprotéine*

La P-glycoprotéine (P-gp) est membre de la famille des transporteurs membranaires ABC (ATP-Binding Cassette) codée par le gène *ABCB1*, également appelé *MDR1* (pour Multi-Drug Resistance). La P-gp est ubiquitaire, elle est exprimée au niveau de la partie apicale des hépatocytes, des entérocytes, des cellules rénales, musculaires, testiculaires, placentaires et au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Thiebaut et col., 1987; Borst et col., 1993; Kusuhara et col., 1998; Tanigawara, 2000). Divers SNPs du gène *MDR1* ont été identifiés (Kim, 2002; Kroetz et col., 2003). La ciclosporine, le tacrolimus et le sirolimus étant des substrats de la P-gp (Saeki et col., 1993; Miller et col., 1997), l'influence des polymorphismes du gène *MDR1* sur la pharmacocinétique de ces immunosuppresseurs a été largement étudiée. La principale conclusion qui en ressort est que les allèles sauvages des principaux SNPs du gène *MDR1* (C1236, G2677 et C3435) sont associés à une plus importante activité de transport de la P-gp.

En ce qui concerne la ciclosporine, certaines études n'ont trouvé aucun effet significatif du SNP G2677T/A et/ou C3435T, localisés au niveau de l'exon 21 et 26 du gène *MDR1*, respectivement, sur sa biodisponibilité chez des volontaires sains (Min et Ellingrod, 2002), en transplantation cardiaque (Balram et col., 2003) ou en transplantation rénale (Hesselink et col., 2003; Mai et col., 2003; Haufroid et col., 2004; Hesselink et col., 2004; Singh et col., 2004). Chez des patients transplantés hépatiques un mois après la greffe, Bonhomme-Faivre et al. (Bonhomme-Faivre et col., 2004) ont trouvé des valeurs significativement plus élevées de C<sub>0</sub>/dose de ciclosporine chez les porteurs homozygotes du génotype muté 3435TT, suggérant une activité plus faible de la P-gp codée par le variant muté 3435T. Le même constat a été fait chez des patients transplantés rénaux immédiatement après la greffe (J1 ± 2 jours), mais aucune association significative n'a été retrouvée à J7 ou M1 post-greffe (Azarpira et col., 2006). L'étude de Chowbay et al. (Chowbay et col., 2003) a montré une exposition plus élevée à la ciclosporine chez des patients transplantés cardiaques en période stable portant l'haplotype muté 1236T-2677T-3435T (ces 3 SNPs étant en fort déséquilibre de liaison), comparés à ceux portant l'haplotype sauvage C1236-G2677-C3435 (Kroetz et col.,

2003). Anglicheau et al (Anglicheau et col., 2004) ont également rapporté, chez des patients transplantés rénaux stables, des valeurs de  $C_{max}/dose$  et d' $AUC_{0-4h}/dose$  légèrement mais significativement plus faibles chez les porteurs homozygotes du génotype sauvage CC1236 comparés aux porteurs d'au moins un allèle muté pour ce SNP. A l'opposé, Yates et al. (Yates et col., 2003) ont observé des valeurs significativement plus élevées de clairance apparente chez des patients transplantés rénaux en période stable portant au moins un allèle 3435T (C3435T ou 3435TT), comparés à ceux portant le génotype homozygote sauvage CC3435 ( $40,0 \pm 2,2$  versus  $26,4 \pm 3,1$  L/h,  $p = 0,007$ ). Cependant, ce regroupement hétérozygotes + homozygotes mutés dans le même groupe pour des études statistiques est à éviter car ce SNP ayant une fréquence allélique de plus de 40%, la possibilité de considérer les 3 groupes est faisable, contrairement par exemple au CYP3A5\*3 dont la fréquence de l'allèle sauvage n'est que de 10% (d'autant plus que le critère expresseurs/non-expresseurs observé avec le CYP3A5\*3 n'est pas du tout applicable pour le SNP C3435T du gène MDR1).

Enfin, sur un plan pharmacodynamique, l'étude récente de Hauser et al. (Hauser et col., 2005) a montré une augmentation significative de la néphrotoxicité induite par la ciclosporine (évaluée par différents critères : élévation persistante de créatinine sérique, dysfonction rénale et exclusion d'un rejet de greffe prouvé par biopsie) pendant les 3 premiers mois suivant la greffe chez des patients transplantés rénaux portant un greffon ayant le génotype homozygote muté 3435TT comparé aux autres.

Plusieurs études ont également rapporté l'effet du polymorphisme du gène *MDR1* sur l'exposition au tacrolimus. Certaines n'ont trouvé aucun effet significatif sur les  $C_0/dose$  du tacrolimus des SNPs suivants : du SNP C3435T chez des patients adultes transplantés rénaux à 1 et 2 semaines post-greffe (MacPhee et col., 2004), ou en période stable (Hesselink et col., 2003) ; des SNPs (C1236T, G2677T/A et C3435T) chez des patients transplantés hépatiques, adultes et pédiatriques, à une semaine post-greffe (Goto et col., 2002) ; des SNPs (C1236T, G2677T/A et C3435T) chez des patients transplantés rénaux stables (Haufrond et col., 2004) ; et des SNPs (G2677T/A et C3435T) chez des patients transplantés rénaux à 28 jours après la greffe (Tsuchiya et col., 2004). En revanche, chez des patients adultes transplantés rénaux adultes à 3 mois post-greffe, Anglicheau et al. (Anglicheau et col., 2003) ont trouvé des valeurs de  $C_0/dose$  significativement plus élevées chez les porteurs des génotypes homozygotes mutés 1236TT et 2677TT/AA/TA que chez les homozygotes sauvages, avec des valeurs intermédiaires pour les patients hétérozygotes, tandis qu'une tendance non significative était retrouvée avec le SNP C3435T. Une autre étude chez des patients pédiatriques transplantés cardiaques a montré que les valeurs des  $C_0/dose/kg$  étaient

significativement plus faibles à partir du 6<sup>ème</sup> mois après la greffe chez les patients homozygotes sauvages GG2677 et CC3435, comparés aux patients portant au moins un allèle muté (Zheng et col., 2003). Le même constat avait été fait avec les C0/dose/kg de tacrolimus chez des patients adultes transplantés rénaux trois mois après la greffe pour le SNP C3435T (Macphee et col., 2002).

En ce qui concerne le sirolimus, des études récentes n'ont montré aucune association significative entre les différents SNPs (C1236T, G2677T/A et C3435T) et les C0/dose de sirolimus chez des patients transplantés rénaux 3 mois après la greffe (Anglicheau et col., 2005) ou en période stable (Mourad et col., 2005).

Enfin, aucune étude n'a rapporté de transport du MPA et/ou de ses métabolites par la P-gp, ni *a fortiori* d'effet pharmacogénétique de la P-gp sur la pharmacocinétique du MPA.

### *La Multi-drug Resistance associated Protein 2 (MRP2)*

Il a été démontré que la protéine d'efflux MRP2, codée par le gène *ABCC2*, était responsable de l'excrétion biliaire du MPAG et en partie de celle de l'AcMPAG à partir des hépatocytes. C'est par son effet inhibiteur de l'activité de MRP2, que ne possède pas le tacrolimus, que la ciclosporine aurait un effet sur le cycle entéro-hépatique du mycophénolate (Kobayashi et col., 2004; Hesselink et col., 2005; Westley et col., 2006). Plusieurs polymorphismes du gène *ABCC2* ont été identifiés et certains d'entre eux impliqués dans le syndrome de Dubin-Johnson qui est un ictère héréditaire à bilirubine, principalement conjuguée, dont l'étiologie est une déficience du transporteur MRP2 (Suzuki et Sugiyama, 2002). Des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe ont montré une diminution significative des rapports métaboliques d'AUC de MPAG et MPAGls [(AUC de MPAG)/(AUC de MPA) et (AUC de MPAGls)/(AUC de MPA)] chez les patients adultes transplantés rénaux co-traités par le sirolimus et portant au moins un allèle muté pour le SNP C-24T, comparés aux patients portant le génotype sauvage CC-24. En revanche, aucune association significative n'était observée chez les patients co-traités par la ciclosporine (Djebli et col., 2005). Aucune autre étude concernant l'effet des polymorphismes du gène *ABCC2* n'a été rapportée à notre connaissance.

# 1. Pharmacocinétique de population (PKpop)

## 1.1. Généralités

L'importante variabilité de la pharmacocinétique d'un médicament est souvent responsable d'une difficulté d'optimisation et de maîtrise de l'efficacité d'un traitement. L'objectif principal de la pharmacocinétique de population (PKpop) est de quantifier cette variabilité et d'identifier les facteurs qui en sont à l'origine. La connaissance de ces facteurs peut permettre de proposer des adaptations de posologie individuelles plus rationnelles et de distinguer des sous-groupes de population « à risque ».

Cette variabilité se décompose en (Beal et Sheiner, 1992; Urien, 2002) :

- Variabilité inter-individuelle, qui peut en partie s'expliquer par des facteurs physiopathologiques : démographiques (sexe, âge, poids, race...), génétiques (polymorphismes d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la pharmacocinétique du médicament), environnementaux (tabac, alcool, régime alimentaire...), fonctionnels (maladie concomitante, insuffisance rénale ou hépatique...) ou biologiques (généralement témoins des facteurs fonctionnels : clairance de la créatinine, bilan hépatique, concentrations des protéines plasmatiques ...). Ces différents facteurs, appelés covariables, sont à l'origine d'une variation des paramètres pharmacocinétiques entre individus ou, parfois même, chez un même individu au cours du traitement.
- Variabilité résiduelle, qui correspond à la part de la variabilité non expliquée par le modèle. Elle inclue notamment les erreurs de mesure (variabilité liée aux erreurs d'horaires d'administration et de prélèvements –même minimes- et aux méthodes analytiques...).
- Variabilité inter-occasion, qui décrit les variations des paramètres pharmacocinétiques chez le même patient au cours du temps.

La PKpop désigne une technique générale d'analyse des données qui permet d'estimer la valeur centrale (moyenne ou médiane) des paramètres pharmacocinétiques et leur variabilité (variance)

dans une population donnée, ainsi que d'étudier l'influence des covariables potentielles sur ces paramètres pharmacocinétiques.

Les principales méthodes utilisées pour la PKpop reposent sur le principe du maximum de vraisemblance qui stipule que la meilleure estimation des paramètres est celle rendant maximale la probabilité du résultat observé. On distingue les approches paramétriques (ex. logiciels NONMEM, P-PHARM ...) et non-paramétriques (ex. logiciels NPLM, NPEM, BigWinPops ...).

## **1.2. Pharmacocinétique de population et estimation de l'exposition aux immunosuppresseurs**

Les analyses de PKpop prennent toute leur importance dans l'étude des traitements immunosuppresseurs pour expliquer la variabilité pharmacocinétique. En effet, ces médicaments présentent un index thérapeutique étroit, entre une toxicité dont les conséquences peuvent être sévères et l'inefficacité qui peut se traduire par la perte du greffon. De plus, ils sont caractérisés par une forte variabilité pharmacocinétique. Enfin, une exposition optimale à ces traitements est capitale, non seulement pour éviter le rejet aigu, mais également pour tenter de prolonger la vie du greffon (et du malade). C'est dans cette optique que le STP a été rendu obligatoire pour certains immunosuppresseurs, et est fortement recommandé pour d'autres (voir paragraphe 3 page 6).

Cependant en immunosuppression, il est actuellement admis que la concentration résiduelle, ou C<sub>0</sub>, indice le plus fréquemment utilisé pour individualiser les posologies de ces médicaments, n'est souvent pas assez représentatif de l'exposition globale au médicament pour permettre un ajustement individuel optimal de la posologie. L'AUC entre deux doses est probablement un meilleur reflet de l'exposition réelle du patient au médicament et donc la meilleure alternative au STP basé sur le C<sub>0</sub>. L'estimation de l'AUC sur la base de 8 à 12 prélèvements sanguins est difficilement faisable en pratique clinique courante. Des méthodes d'estimation de l'AUC basées sur des stratégies de prélèvements en nombre limité ont été développées pour tous les médicaments immunosuppresseurs prescrits (à l'exception de l'évérolimus) pour limiter le risque de rejet d'organes solides. On trouve des méthodes basées sur la régression linéaire multiple et des méthodes d'estimation Bayésienne.

### 1.2.1. Régression linéaire multiple (RLM)

Des équations obtenues par régression linéaire multiple ont été développées pour évaluer une variable d'exposition (le plus souvent l'AUC) à partir de plusieurs valeurs de concentration recueillies à des temps de prélèvement particuliers. L'exposition est souvent décrite comme une fonction linéaire de 2 ou 3 concentrations, de la forme :

$$AUC = A_0 + A_1 C_{t1} + A_2 C_{t2} + \dots + A_n C_{tn}$$

où  $A_0, A_1, A_2 \dots A_n$  sont des constantes,  $C_{t1}, C_{t2}, \dots C_{tn}$  sont les valeurs de concentrations mesurées à  $t_0, t_1, t_2 \dots t_n$ .

Des équations ont été développées, principalement pour la ciclosporine, le MMF et le tacrolimus. David et al. avaient réalisé une revue des équations dédiées à la ciclosporine (David et Johnston, 2001). Ils ont souligné que la grande majorité de ces équations n'avaient pas été validées dans un groupe indépendant de patients, et concernaient principalement la transplantation rénale. Très récemment, Ting et al. ont publié une revue faisant l'état de l'art des équations développées pour les immunosuppresseurs autres que la ciclosporine (Ting et col., 2006).

Pour tous ces médicaments, des équations ont été établies pour la période post-greffe précoce aussi bien que pour la période stable. La plupart de ces stratégies de prélèvements limités établies sur la base de la régression linéaire multiple requièrent 2 à 4 prélèvements sanguins, collectés dans les 6 premières heures post-dose.

Si certaines de ces études n'incluaient que des effectifs réduits de patients (ex. 10 patients pour Yeung et al. 2001 (Yeung et col., 2001) et 20 pour Le Guellec et al. 2002 (Le Guellec et col., 2002)), d'autres concernaient plus d'une centaine de sujets (ex. 140 patients pour van Hest et al. (van Hest et col., 2005)).

Les performances de ces équations sont souvent rapportées uniquement sous forme d'un coefficient de corrélation entre les AUCs prédites et les AUCs calculées par la méthode des trapèzes, le biais et la précision n'étant pas évalués (Ku et Min, 1998; Schutz et col., 1998; Johnson et col., 1999; Filler et Mai, 2000; Kuypers et col., 2004) ce qui rend quasi-impossible la comparaison de ces équations entre elles (pour des nombres différents de sujets) ou avec un estimateur Bayésien. Ces techniques sont théoriquement limitées par le strict respect des horaires de prélèvement (par exemple,  $\pm 5$  minutes pour le MMF (Prémaud, 2004)). Lorsque des équations établies par une équipe ont été testées par des équipes indépendantes, les résultats étaient parfois beaucoup moins satisfaisants (Willis et col., 2000; Taylor et col., 2001). Ainsi Schutz et al. (Schutz et col., 1998) avaient développé une équation à partir de 62 profils complets de MPA chez 36 enfants transplantés rénaux

stables. Les temps de prélèvements étaient 0, 1,25h et 6h post-dose, permettant l'estimation de l' $AUC_{0-12h}$  avec un  $r^2 = 0,88$ . L'équation a ensuite été appliquée chez 25 patients transplantés adultes stables par une autre équipe, conduisant à un coefficient de corrélation plus faible ( $r^2 = 0,59$ ) (Willis et col., 2000). Le fait d'appliquer une équation à des patients indépendants, mais également différents, conduisait donc ici à une dégradation notable des performances. Bien que non mentionnés dans la publication, on peut présumer que le biais et les erreurs individuelles maximales associée à un  $r^2 = 0,59$  étaient importants. A notre connaissance en immunosuppression, les résultats de la validation d'une équation utilisée dans une étude indépendante n'ont jamais été aussi satisfaisants que les résultats obtenus dans l'étude initiale.

Il est important de souligner que les méthodes de régression linéaire multiple n'ont aucun fondement pharmacocinétique ; ces équations résultent uniquement de corrélations entre l'index d'exposition étudié et des concentrations recueillies à des délais post-dose définis. Elles ne permettent pas en particulier de retracer la courbe de concentration en fonction du temps et donc pas de vérifier visuellement sa pertinence et son adéquation avec les concentrations mesurées, ni de calculer d'autres indices d'exposition ( $C_{max}$ , AUC partielles) ou les paramètres pharmacocinétiques individuels (clairance, volume de distribution ...).

### **1.2.2. Pharmacocinétique de population et estimation Bayésienne**

La méthode d'estimation Bayésienne combine : un modèle pharmacocinétique de population (information *a priori*) et quelques valeurs de concentrations obtenues chez le patient traité ainsi que, parfois, des caractéristiques individuelles (covariables significatives dans le modèle de population).

A défaut d'analyse de population, les paramètres pharmacocinétiques moyens et leur variabilité peuvent être obtenus par la méthode dite « en deux étapes » : celle-ci consiste à déterminer les paramètres pharmacocinétiques moyens et leur matrice de variance-covariance dans un groupe de patients à partir des paramètres individuels calculés, dans un premier temps, chez chacun d'entre eux. Cette méthode ne constitue pas une analyse de population. Elle peut paraître simple à mettre en œuvre mais requiert des prélèvements nombreux chez chacun des patients. Elle présente l'inconvénient de surestimer les variabilités inter-individuelle et résiduelle.

A ce jour, un certain nombre d'articles présentant des analyses pharmacocinétiques de population de médicaments immunosuppresseurs avec ou sans développement d'estimateurs Bayésiens ont été publiés. Plusieurs études concernaient la ciclosporine, le MPA et le tacrolimus. Une seule étude de population a été rapportée pour le sirolimus (Ferron et col., 1997), mais sans estimateur Bayésien. Il en est de même pour l'évérolimus (Kovarik et col., 2001a). Les caractéristiques et les résultats des études pharmacocinétiques de population et des estimateurs Bayésiens développés pour les médicaments immunosuppresseurs sont résumés dans le tableau 1.

La ciclosporine est caractérisée par un index thérapeutique étroit et une très large variabilité inter-individuelle de sa pharmacocinétique. Toutefois les origines de cette variabilité sont encore mal connues. Quelques études pharmacocinétiques de population potentiellement susceptibles d'identifier les sources individuelles de cette variabilité (caractéristiques biométriques, âge, paramètres biologiques, génotypes ...) ont été réalisées. La plupart de ces études incluaient des effectifs limités de patients (Parke et Charles, 1998; Parke et Charles, 2000; Schadeli et col., 2002; Cremers et col., 2003; Hesselink et col., 2004; Rousseau et col., 2004; Rosenbaum et col., 2005), ce qui réduit le nombre de covariables pouvant être testées et diminue la probabilité de trouver une covariable significative. En effet, plus l'effectif de la population est grand, plus la population étudiée est représentative de la population générale et plus grande est la variabilité des covariables testées. Les études de population rapportées pour la ciclosporine concernaient généralement un seul type de greffe (cardiaque (Parke et Charles, 1998; Parke et Charles, 2000), cardio-pulmonaire (Rosenbaum et col., 2005), hépatique (Breant et col., 1996; Charpiat et col., 1998) ou rénale (Schadeli et col., 2002; Cremers et col., 2003; Hesselink et col., 2004; Rousseau et col., 2004; Tokui et col., 2004)). Seulement deux études de population ont réalisé l'analyse de bases de données incluant des patients ayant reçu une transplantation cardiaque, pulmonaire ou rénale (Kyhl et col., 1998; Saint-Marcoux et col., 2006). Saint-Marcoux et al. ont conclu à des valeurs différentes de paramètres d'absorption selon le type de greffe. Plusieurs études (Parke et Charles, 2000; Hesselink et col., 2004; Rosenbaum et col., 2005; Saint-Marcoux et col., 2006) ont montré une relation statistiquement significative entre le poids corporel et la clairance apparente. Seuls Hesselink et al. (Hesselink et col., 2004) ont recherché l'influence de covariables génétiques et pu montrer une relation entre la clairance apparente et le génotype *CYP3A4\*1B*. Divers estimateurs Bayésiens capables d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques individuels de la ciclosporine et l'exposition à ce médicament (AUC) ont été proposés. La plupart ont été développés à partir de paramètres

moyens obtenus par approche en deux étapes et non à partir d'un modèle de population. En conséquence, ces estimateurs sont dédiés à une population homogène de patients, tels que des patients adultes ayant reçu depuis plus de trois mois une greffe rénale (Leger et col., 2002), cardiaque (Monchaud et col., 2003) ou hépatique (Charpiat et col., 1998), ou des transplantés pulmonaire stables atteints ou non de mucoviscidose (Rousseau et col., 2003). Certains de ces estimateurs sont utilisés en pratique clinique quotidienne mais leur utilisation est limitée à la population particulière dans laquelle ils ont été développés. A la suite de leur analyse PKpop de diverses populations de transplantés cardiaques, pulmonaires (avec ou sans mucoviscidose) et rénaux (adultes et pédiatriques), Saint-Marcoux et al. (Saint-Marcoux et col., 2006) ont développé un estimateur Bayésien précis, à partir de concentrations mesurées 0, 1 et 3 h post-dose, avec un biais moyen sur l'estimation de l' $AUC_{0-12h}$  de  $2,0 \pm 10,5\%$  et un intervalle allant de -19,0 à +21,4%.

Le MMF était d'abord administré en dose standard : généralement 500 ou 1000 mg, en 2 doses quotidiennes en fonction du type de greffe et du traitement associé. Un certain consensus semble maintenant se dégager en faveur de l'intérêt du STP de ce médicament. Le meilleur indice d'exposition serait l' $AUC$  de MPA plutôt que la concentration résiduelle (Shaw et col., 1995; Shaw et col., 2001). L'allure des profils pharmacocinétiques de MPA varie en fonction du temps et du traitement immunosuppresseur associé. Les modèles pharmacocinétiques structuraux adaptés à la description de ces profils diffèrent ainsi selon la période post-greffe.

Au delà de 3 mois post-greffe, globalement, les profils sont relativement classiques avec éventuellement un rebond entéro-hépatique. Plusieurs estimateurs Bayésiens ont été proposés pour cette période stable, soit sur la base d'un modèle de population chez des patients co-traités par la ciclosporine (Le Guellec et col., 2004) ou par l'un des deux anti-calcineurines (ciclosporine ou tacrolimus) (Payen et col., 2005), soit sur la base de paramètres moyens déterminés par approche en deux étapes chez des patients co-traités par la ciclosporine (Premaud et col., 2005b). L'étude rapportée par Le Guellec et al. (Le Guellec et col., 2004), menée chez des patients adultes transplantés rénaux, a utilisé un modèle bi-compartimental avec une absorption d'ordre 0, mais avec une valeur élevée de l'erreur résiduelle. Plus récemment, Payen et al. (Payen et col., 2005) ont développé un autre modèle de population chez des enfants et adolescents transplantés rénaux, sur la base d'un modèle à deux compartiments avec une absorption d'ordre 1 et un temps de latence. Ces deux analyses ont conclu à une influence significative du poids corporel sur le volume apparent du compartiment central ; Le Guellec et al. (Le Guellec et col., 2004) ont aussi montré une relation entre le poids et la clairance apparente. Prémaud et al. (Premaud et col., 2005b) ont développé un

estimateur Bayésien par approche en deux étapes pour des patients adultes transplantés rénaux en période stable, en utilisant un modèle pharmacocinétique à 2 compartiments où l'absorption était décrite sur la base d'une loi gamma. Aucun de ces estimateurs ne peut décrire un second pic de concentration, mais Prémaud et al. (Premaud et col., 2005b) ont montré qu'en terme de biais et de précision de l'AUC, ce n'était pas nécessaire chez ces patients sous ciclosporine et en période stable. A côté de ces travaux qui concernaient uniquement des patients transplantés, Funaki et al. (Funaki, 1999) ont réalisé une analyse de population dans un groupe de patients dont environ la moitié avait reçu une greffe rénale, les autres recevant du MMF dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (et donc probablement sans ciclosporine associée, bien que ce ne soit pas mentionné dans l'article). L'objectif de cette étude était d'appliquer en analyse de population un modèle de circulation entéro-hépatique. Les auteurs ont mis au point un modèle tri-compartimental représentant l'intestin, la vésicule biliaire, le reste de l'organisme étant représenté par le compartiment central. Le rebond était décrit comme un relargage biliaire vers l'intestin sous forme de bolus. Aucune variabilité résiduelle ou inter-individuelle n'était rapportée dans cet article.

L'étude de PKpop de van Hest et al. (van Hest et col., 2005) concernait des données recueillies chez 140 patients adultes transplantés rénaux sous ciclosporine pendant la période post-greffe immédiate et pendant la période stable (jusqu'à 6 mois post-greffe). Un modèle bi-compartimental avec une absorption d'ordre 1 et un temps de latence était employé. Contrairement aux deux études précédemment citées, celle-ci n'a pas trouvé que le poids était une covariable significative de  $V_c/F$ . En période post-greffe précoce, les cinétiques du MPA en fonction du temps sont assez complexes et instables ; elles présentent des délais d'absorption variables et des profils avec un ou plusieurs pics de concentration (Johnson et col., 1999; Shum et col., 2003). Or, l'exposition au MPA durant cette phase aurait un impact significatif sur l'incidence de rejet aigu dans les premiers mois post-greffe (Kiberd et col., 2004). La littérature contient très peu de modèles de population permettant de décrire la pharmacocinétique du MPA en période précoce : Shum et al. (Shum et col., 2003) ont mené une étude PKpop chez des transplantés rénaux adultes sous ciclosporine au cours du premier mois après la greffe. Cette étude a notamment mis en évidence la difficulté de modéliser les profils pharmacocinétiques observés dans cette période et a suggéré le recours à des modèles complexes pour mieux décrire le comportement pharmacocinétique du MPA (tel un modèle décrivant une clairance variable au cours du temps...). Dans la même équipe, Staatz et al. (Staatz et col., 2005) ont étudié la pharmacocinétique de population du MPA dans la première semaine suivant la greffe (J3, J5 et J7) chez des patients transplantés rénaux co-traités par le tacrolimus ou la ciclosporine à l'aide d'un modèle structural avec absorption d'ordre un et élimination bi-exponentielle. La valeur de  $CL/F$

était inversement proportionnelle au taux d'albumine sérique, et plus élevée de 27% chez les patients recevant de la ciclosporine que chez ceux recevant du tacrolimus. Un seul estimateur Bayésien dédié à la période précoce a été publié (Premaud et col., 2005b). Cet estimateur, développé au sein de notre équipe par approche en deux étapes, prenait en compte des données issues de patients transplantés rénaux à deux périodes post-transplantation (J7 et M1). Les profils étaient décrits par un modèle mono-compartmental avec une double absorption gamma et, à l'aide de trois prélèvements (20 min, 1h et 3h post-dose), la méthode Bayésienne permettait l'estimation de l'AUC<sub>0-12h</sub> du MPA avec un biais moyen (précision) de -5,7% (20,5%) à J7 et de -8,2% (14,4%) à M1.

Le tacrolimus est un immunosuppresseur largement utilisé dans différents types de transplantation d'organes solides (foie, rein, cœur et cœur-poumon). Il présente une zone thérapeutique étroite et d'importantes variabilités inter- et intra-individuelles, avec un risque d'interactions médicamenteuses et de toxicité (Sandborn et col., 1995; Venkataramanan et col., 1995; Kershner et Fitzsimmons, 1996). Il a été démontré que le STP basé sur les C<sub>0</sub> améliorait le pronostic clinique (Venkataramanan et col., 2001).

Pour le tacrolimus, plusieurs analyses PK<sub>pop</sub> ont été développées (Sam et col., 2000; Fukatsu et col., 2001; Garcia Sanchez et col., 2001; Macchi-Andanson et col., 2001; Staatz et col., 2002) (Staatz et col., 2003; Antignac et col., 2005; Zahir et col., 2005). Outre l'estimation globale des paramètres pharmacocinétiques moyens et de la variabilité inter- et intra-individuelle dans la population étudiée, ces analyses visaient à déterminer et à quantifier l'origine de ces variations (étude de l'effet des covariables pertinentes). La plupart d'entre elles ont retenu un modèle mono-compartmental avec une absorption et une élimination d'ordre 1 et ont conclu à une relation significative entre le délai post-greffe - ou le délai après le début du traitement - et la clairance apparente du tacrolimus.

Des estimateurs Bayésiens ont été développés avec des objectifs différents. Certains auteurs ne s'intéressaient qu'à la prédiction des concentrations résiduelles des prochains jours à partir de plusieurs concentrations résiduelles recueillies sur une courte période (Macchi-Andanson et col., 2001; Staatz et col., 2003; Willis et col., 2003), mais les performances des estimateurs n'étaient pas suffisantes pour qu'une application en clinique puisse être envisagée (Macchi-Andanson et col., 2001; Staatz et col., 2003). Deux estimateurs Bayésiens ont été développés sur la base de paramètres moyens déterminés par approche en deux étapes (Saint-Marcoux et col., 2005; Scholten et col., 2005), dans le but d'estimer l'AUC du tacrolimus. Scholten et al. (Scholten et col., 2005) ont

développés chez des patients adultes transplantés rénaux un estimateur Bayésien permettant de prédire avec précision l'AUC<sub>0-12h</sub> à partir de 2 prélèvements : C0 et un autre prélèvement réalisé entre 2h et 4h après la prise de tacrolimus. Les travaux de Saint-Marcoux et al. (Saint-Marcoux et col., 2005), réalisés dans l'équipe, concernaient la greffe pulmonaire; l'estimateur Bayésien développé permettait une bonne estimation des AUC<sub>0-12h</sub> à partir de prélèvements réalisés à 0, 1h et 3h après la prise du tacrolimus chez des patients indemnes de mucoviscidose et à 0, 1,5h et 4h chez les patients mucoviscidosiques. Scholten et al. (Scholten et col., 2005) avaient retenu un modèle bi-compartimental avec absorption d'ordre un et temps de latence. Saint-Marcoux et al. ont appliqué le modèle mono-compartimental avec absorption décrite par une double-loi gamma, développé pour le MPA ; ce modèle était (sur leurs données) plus performant que l'ordre 1.

L'évérolimus est un immunosuppresseur portant une chaîne 2-hydroxyéthyl en position 40 de la structure du sirolimus (Sedrani et col., 1998). Ce médicament a été développé dans le but d'améliorer la biodisponibilité du sirolimus et de diminuer sa distribution tissulaire extensive grâce à une plus grande polarité. L'évérolimus, caractérisé par une demi-vie plus courte (30 h), est ainsi administré en 2 doses quotidiennes et atteint plus rapidement l'état stable (au cours de la première semaine) sans nécessité d'une dose de charge (Kirchner et col., 2004). L'évérolimus est couramment administré en association avec un inhibiteur de la calcineurine (tacrolimus ou ciclosporine) (Jorga et Johnston, 2005) en transplantation rénale et cardiaque, mais également en transplantation hépatique et cardio-pulmonaire. Contrairement au sirolimus, la pharmacocinétique de l'évérolimus semble moins influencée par la co-administration de la ciclosporine (Kovarik et col., 2002). L'évérolimus est également caractérisé par une importante variabilité pharmacocinétique inter-individuelle et par un index thérapeutique étroit, justifiant le recours au STP. Les valeurs des C0 étant assez bien corrélées aux valeurs d'AUC, il est recommandé que le STP soit basé sur les valeurs de C0 (Kovarik et col., 2001b).

Une seule étude PK<sub>pop</sub> de l'évérolimus a été rapportée par la littérature : Kovarik et al. (Kovarik et col., 2001a) ont développé, chez des patients transplantés rénaux au cours des 6 mois suivant la greffe, un modèle Pk<sub>pop</sub> mono-compartimental avec une absorption et une élimination d'ordre 1 et une biodisponibilité dépendante de la dose de tacrolimus administrée.

Aucune méthode d'estimation de l'AUC par stratégie d'échantillonnage limité n'a été rapportée, ni par la méthode de régression multilinéaire, ni par estimation Bayésienne.

Les rares travaux publiés sur la PKpop du sirolimus seront présentés au chapitre II, dans le cadre de nos travaux personnels.

**Tableau 1 : résumé des études de pharmacocinétique de population, avec ou sans développement d'estimateurs Bayésiens et des études rapportant le développement d'estimateurs Bayésiens à partir de « paramètres pharmacocinétiques de population » obtenus par approche en deux étapes.**

Molécule / Référence	Type d'étude	Population étudiée	Délai post-greffe	Modèle PK	Covariables identifiées	Perform. PKpop	Validation pop, EB	Stratégie LSS (EB)	Perform. EB
Ciclosporine  Parke 1998 SAN/NEO	Pkpop	A*, Greffe cardiaque groupe pop (n=36) et groupe test (n=33)	> 3 mois	1 cpt, abs. ordre 1	délai post-greffe sur F	var. résid.: 77 ng/mL	EB dans groupe test indépendant	_____	_____
Kyhl 1998 NEO	Pkpop	A*, greffe rénale n=728 et greffe cardiaque, pulmonaire ou cardio-pulmonaire (n=151)	> 3 mois	2 cpts, abs. ordre 0	_____	_____	_____	_____	_____
Parke 2000, 121 SAN/NEO	Pkpop	A*, greffe cardiaque (n=46)	S3	2 cpt, abs. ordre 1	délai post-greffe sur F; poids sur CL/F	var. resid.: 13% et 54 µg/L	Bootstrap	_____	_____
Debord 2001; Léger 2002 NEO	Pk + EB	A*, greffe rénale (n=20)	> M3	2 cpts, abs. loi gamma	_____	_____	EB dans groupe test (permutation circulaire)	EB; 0, 1, 3h	Biais moy. = -0,49%, RMSE = 2,00%
Schadeli 2002 (SAN/NEO 1dose/j)	Pkpop	A*, greffe rénale: groupe pop (n=50), groupe test (n=10)	> A3	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	_____	var. resid.: 14% (ME) et 34% (S)	EB dans groupe test indépendant	EB; 8h	Biais (moy. ± SD) = 8,3 ± 6,6 %

Cremers 2003 NEO	Pkpop+ EB	A*, greffe rénale: groupe pop (n=12), groupe test (n=20) + greffe rein-pancréas: groupe pop (n=8) et groupe test (n=20)	n=30 <3 mois, n=30 >3 mois	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	—	—	EB dans groupe test indépendant	EB; 0, 1, 3h	<u>rein</u> : Biais = -6 à + 3%, RMSE = 3 à 9%; <u>rein-pancréas</u> : Biais = -6 à + 1%, RMSE = 3 à 9%
Monchaud 2003 NEO	Pk + EB	A*, greffe cardiaque (n=14)	S1, M3 et A1	2 cpts, abs. loi gamma	—	—	EB dans groupe test (permutation circulaire)	EB; 0, 1, 3h	Biais moy. ± SD = +3,06 ± 12,16% (S1); +1,5 ± 1,61% (M3); -0,20 ± 11,42% (A1)
Rousseau 2003 NEO	Pk + EB	A*, greffe pulmonaire avec mucoviscidose (n=9) et sans et (n=10)	> 3 mois	2 cpts, abs. loi gamma	—	—	EB dans groupe test (permutation circulaire)	1 EB pour patients sans muco et 1 EB pour patients avec muco EB; 0, 1, 3h	<u>muco</u> : Biais moy. = 3,01%, RMSE = 8,67%; <u>non-muco</u> : Biais moy. = 5,29%, RMSE = 10,03%
Rousseau 2004 NEO	Pkpop + EB	A*, greffe rénale groupe pop (n=70) et groupe test (n=10)	> 3 mois	2 cpts, abs. loi erlang	aucune	var résiduelle : 4,8% 27µg/L	EB dans groupe test indépendant	EB; 0,1,3h	Biais = 0,6 à 8,7%, RMSE = 5,3%
Tokui 2004 NEO	Pkpop + EB	A*, greffe rénale (n=125)	> 5 mois	2 cpts, abs. ordre 1	poids sur Vd/F	var. resid.: 10,2 %	—	EB; 0, 1h, 2h	Biais = 8,0 ± 7,2 %

Hesselink 2004 NEO	Pkpop	A*, greffe rénale (n=123) et greffe cardiaque (n=28)	> M3	2 cpts, abs. ordre 1	poids, ethnité et génotype CYP3A4*1B sur CL/F	var. resid.: 22,2 %	—	—	—
Rosenbaum 2005 SAN/NEO	Pkpop	A*, greffe cœur-poumon (n=21) ou pulmonaire (n=27)	S1 à S52	1 cpt, abs. ordre 1	Itraconazole oui/non, mucoviscidose oui/non et poids sur CL/F	var. resid.: 60,1%	—	—	—
Saint-Marcoux 2006 NEO	Pkpop + EB	<u>A</u> *: greffe cardiaque (n=16), greffe pulmonaire (avec ou sans mucoviscidose) (n=99), greffe rénale (n=44); <u>P</u> *: greffe rénale (n=31) groupe pop (80%) et groupe test (20%)	toutes (J2 à A1)	2 cpts, abs. Erlang	type de greffe et délai post-greffe sur Ktr; poids sur CL/F et Vc/F	var. resid.: 10,7 % et 47,5 µg/L (EMIT); 11,2% et 28,2 µg/L (FPIA); 10,8% et 37,4 µg/L (LC-MS)	data-splitting et EB dans groupe test	EB; 0, 1, 3h	Biais (moy. ± SD) = 2,0 ± 10,5 % (-19,0 à +21,4%)
<b>Mycophenolate mofétil</b>									
Shum 2003	Pkpop	A*, greffe rénale (n=22)	J2, J5 et J28	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	poids sur CL/F et Vc/F	var. résid.: 7,6% et 0,57 mg/L	—	—	—
Le Guellec 2004	Pkpop + EB	A*, greffe rénale groupe pop (n=60), groupe test (n=10)	> M6	2 cpts, abs. ordre 0	poids sur CL/F et Vc/F	var. résid.: 2,04 mg/L, valeur de part prop. non rapportée	EB dans groupe test indépendant	EB; 20 min, 1h, 3h	Biais moy. = 7,7%, RMSE = 12,4%

Payen 2005	Pkpop + EB	P*, greffe rénale groupe pop (n=41) et groupe test (n=9)	toutes (J12 à J3754)	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	poids sur Vc/F	var. résid.: 0,56 µg/mL	EB dans groupe test indépendant	EB; 1h, 4h	Biais moy. = -0,9%, RMSE = 6,02%
Prémaud 2005	Pk + EB	A*, greffe rénale (n=45)	J3, J7 et J30 (n=25) et >3mois (n=20)	J3, J7 et J30 : 1 cpt, double-absorption gamma ; >M3 : 2 cpts, abs. avec une loi gamma	—	—	EB dans groupe test (permutation circulaire)	EB; 20 min, 1h et 3h	J7: Biais moy. = -5,7%, RMSE = 20,5%; M1: Biais moy. = -8,2%, RMSE = 14,4%; >M3: Biais moy. = +0,4%, RMSE = 12,0%
Van Hest 2005	Pkpop	A*, greffe rénale (n=140)	J3, J28 et J140	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	Clcréat, Alb., sexe et dose de ciclosporine sur CL/F; Clcréat et Alb. sur Vc/F	var. résid.: 0,45 mg/L	Bootstrap	—	—
Staatz 2005	Pkpop	A*, greffe rénale (n=117)	J3, J5 et J7	2 cpts, abs. ordre 1	Alb. et adm. de ciclosporine sur CL/F	var. résid.: 41%	Bootstrap	—	—

<b>Tacrolimus</b>									
Sam 2000	Pkpop	P*, greffe hépatique groupe pop (n=16), groupe validation (n=4)	> J4 et <A3	1 cpt, abs. ordre 1	age sur CL/F ; BSA sur Vd/F ; poids et taux de bilirubine sur F	var. résid.: 5,79 ng/mL	EB dans groupe test indépendant	—	—
Garcia-Sanchez 2001	Pkpop (pour estimation de CL)	P*, greffe hépatique (n=18)	M2 à A4	1 cpt, abs. ordre 1	poids, temps après début du traitement et taux bilirubine sur CL/F	var. résid.: 29,5%	—	—	—
Fukatsu 2001	Pkpop	A*, greffe hépatique (n=35)	Jusqu'à M1	1 cpt, abs. ordre 1	poids du greffon, délai et dysfonctions hépatique et rénale sur CL/F	var. résid.: 2,9 ng/mL	—	—	—
Staatz 2002	Pkpop	A*, greffe rénale (n=70)	J2 à J1475	1 cpt, abs. ordre 1	hématocrite, délai et conc. d'ASAT sur CL/F	var. résid.: 3,7 ng/mL	—	—	—
Staatz 2003	Pkpop	A*, greffe hépatique groupe pop (n=68) et groupe test (n=36)	J2 à J115	2 cpt, abs. ordre 1	fonction hépatique et hématocrite sur CL/F ; poids sur V/F	var. résid.: 3,3 ng/mL	EB dans groupe test indépendant	—	—

Antignac 2005	Pkpop (détermination de CL/F suivant délai)	A*, greffe hépatique (n=37)	immédiatement après la greffe jusqu'à M1	1 cpt, abs. ordre 1	délai post- greffe et Alb. sur CImax	var. résid.: 3,06 ng/mL	Bootstrap	—	—
Zahir 2005	Pkpop	A*, greffe hépatique groupe pop n=47 et groupe validation n=20	M1	1 cpt, Ka = cte	hématocrite, Alb. et adm. de diltiazem oui/non et fluconazole oui/non sur CL/F	var. résid.: 22,4%	EB dans groupe test indépendant	—	—
Saint-Marcoux 2005	Pk + EB	A*, greffe pulmonaire muco (n=11) et non-muco (n=11)	>3M et <A10	1 cpt, double- absorption gamma	—	—	EB dans groupe test (permutation circulaire)	EB; 0, 1 et 3h pour non- mocu ; 0, 1,5 et 4h pour muco	<u>Non-muco:</u> Biais = - 1,1% et RMSE = 8,7% ; <u>Muco:</u> Biais = -3,6% et RMSE = 6,8%
Scholten 2005	Pk + EB	A*, greffe rénale groupe pop (n=17) ; groupe test (n=26) et groupe pour EB (n=15)	S2 à A1	2 cpts, abs. ordre 1 et lag- time	délai sur CL/F	—	EB dans groupe test indépendant	EB; 0 et 3h	Biais moy. = +0,3% et RMSE = 7,1%

<b>Sirolimus</b>									
Ferron 1997	Pkpop	A*, greffe rénale (n=36)	>M3	2 cpts, abs. ordre 1 et lag-time	poids et surface corporelle sur CL/F et poids sur Vp/F	—	—	—	—
<b>Évérolimus</b>									
Kovarik 2001	Pkpop	A*, greffe rénale (n=673)	< M6	1 cpt, abs. ordre 1, F dose-dép	ethnie (Africaine ou pas), adm. erythromycine oui/non, azathioprine oui/non ou itraconazole oui/non sur CL/F	var. résid.: 9,3% et 1,56 ng/mL	—	—	—

\*A : adultes ; P : pédiatriques ; perform. : performances ; pk : étude pharmacocinétique ; pkpop : étude pharmacocinétique de population ; pk + EB : estimateur Bayésien développé à partir de paramètres de pop. déterminés par méthode en 2 étapes ; pkpop + EB : estimateur Bayésien développé à partir d'un modèle de pop. ; NEO : étude utilisant la formulation Néoral<sup>®</sup> de ciclosporine, SAN : formulation Sandimmun<sup>®</sup> ; ME : formulation en micro-émulsion ; S : formulation standard ; délai post-greffe J, S, M et A : jours, semaines, mois et années post-greffe ; var. résid. : variabilité résiduelle.

Tous les modèles ont été développés avec une élimination d'ordre 1.

L'ensemble de ces études appelle plusieurs commentaires :

- La première difficulté en modélisation pharmacocinétique est la détermination d'un modèle structural capable de décrire les profils pharmacocinétiques observés. Cette difficulté est aiguë avec certains médicaments de la famille des médicaments immunosuppresseurs. Un modèle inadéquat entraîne une erreur résiduelle élevée (c'est-à-dire supérieure à 25-30%), ce qui est le cas pour plusieurs modèles de populations publiés pour le mycophénolate et la ciclosporine. La ciclosporine est caractérisée par des profils d'absorption « différés », incluant chez certains patients une première phase « plate » dans la courbe concentration-temps. Les modèles pharmacocinétiques classiques d'ordre zéro ou d'ordre un avec éventuellement un temps de latence sont inadaptés à la description de tels profils. Des modèles basés sur les lois de probabilités Gamma (Debord et col., 2001; Leger et col., 2002; Monchaud et col., 2003; Rousseau et col., 2003), Weibull (Hoem et col., 1981) ou Erlang (Rousseau et col., 2004) ont conduit à de meilleurs résultats. L'acide mycophénolique présente des allures de profils avec un rebond enterohépatique. Ce rebond est souvent faible dans l'association ciclosporine – MMF, il est d'intensité plus importante sous tacrolimus. Mais la difficulté principale avec le MMF est la modélisation des profils de concentration du MPA collectés dans les premières semaines post-greffe. Ces profils présentent souvent plusieurs pics de concentrations, d'intensités relatives très variables. Shum et al (Shum et col., 2003) ont testé de nombreux modèles structuraux avec ou sans rebond enterohépatique pour finalement retenir, faute de mieux, un modèle classique à deux compartiments avec absorption et élimination d'ordre un (et temps de latence) dont les performances étaient médiocres. La comparaison des résultats obtenus (tableau 1) montre qu'un modèle d'absorption basé sur deux lois Gamma (Premaud et col., 2005a) donne les meilleurs résultats globaux pour le MMF.

- Certaines analyses de population ont été réalisées à partir de données collectées dans un suivi de routine. Ainsi, des études réalisées avec le tacrolimus ne comprennent que des concentrations résiduelles (Sam et col., 2000; Fukatsu et col., 2001; Garcia Sanchez et col., 2001; Staatz et col., 2002; Antignac et col., 2005; Zahir et col., 2005). Ces études visent principalement à étudier la variabilité de la clairance apparente mais donnent en général des résultats trop imprécis pour être utilisés pour le calcul de l'AUC.

- Peu d'articles se sont intéressés à l'influence des covariables, que ce soit des facteurs pharmacogénétiques (touchant les transporteurs et les enzymes du métabolisme) ou environnementaux (liés au terrain physiopathologique, aux traitements associés). Hesselink et al. (Hesselink et col., 2004) ont étudié l'influence des polymorphismes *CYP3A4\*1B*,

*CYP3A5\*3* et de *MDR1* sur la pharmacocinétique de la ciclosporine chez des patients transplantés rénaux et ont pu montrer une influence significative du *CYP3A4\*1B* sur la clairance apparente (Hesselink et col., 2004). L'influence de la mucoviscidose a été étudiée sur la pharmacocinétique de la ciclosporine par Saint-Marcoux et al. (Saint-Marcoux et col., 2006).

Des études récentes concluent à la nécessité de considérer la forme libre du MPA qui peut être mieux corrélée à l'effet et/ou aux concentrations en métabolite(s) actif(s) (Atcheson et col., 2004).

### **1.2.3. Application des outils d'adaptation de posologie développés**

Des équations établies par RLM ont été utilisées en clinique du fait de la simplicité de leur mise en œuvre : elles ne réclament que l'utilisation d'une calculette. Dans la littérature, très peu d'études ont comparé chez les mêmes patients les performances de la RLM et de l'estimation Bayésienne. Une étude qui présentait le développement d'équations par RLM et d'estimateurs Bayésiens pour la ciclosporine (Monchaud et col., 2003) a montré que les performances de l'adaptation sur la base d'une simple équation obtenue par régression pouvait être tout à fait comparable à celle d'un estimateur Bayésien. Cette publication soulignait dans sa discussion que la régression multilinéaire : (i) requiert 2 temps de prélèvements contre 3 pour l'estimateur Bayésien ; (ii) mais nécessite un strict respect des temps de prélèvements ; (iii) avec des temps de prélèvements plus tardifs que l'estimation Bayésienne, imposant un séjour à l'hôpital de 6h au lieu de 3h ; (iv) et ne permet aucun contrôle de l'AUC prédite alors qu'avec l'estimation Bayésienne il est possible de « vérifier » visuellement l'adéquation entre le profil pharmacocinétique prédit et les concentrations observées.

Le plus gros essai thérapeutique (en terme de nombre de patients inclus) de type concentration-contrôlée en transplantation était basé sur des équations établies par RLM. Dans cette étude, les patients étaient randomisés en deux bras : dose fixe *versus* dose adaptée sur la base d'AUC-cibles. Les résultats de cette étude, nommée FDCC (investigateur principal Dr. T. van Gelder), ont été récemment présentés au World Transplant Congress (WTC, Boston, USA ; 2006). Il ressort que 38 % des patients sous ciclosporine dans le bras ajusté n'avaient pas atteint l'exposition cible à J10 et 17% à M1. Ceci s'explique probablement partiellement par l'inadéquation des estimateurs utilisés.

Peu des estimateurs Bayésiens présentés dans le tableau 1 ont été utilisés en clinique (à moins que les utilisations prospectives ultérieures ne soient pas rapportées dans la littérature).

L'estimateur développé pour la ciclosporine par Léger et al. (Léger et col., 2002) a servi de base à un essai thérapeutique d'épargne en ciclosporine à long terme, sous couvert d'un ajustement de la dose administrée par méthode Bayésienne. Il s'agit d'un essai clinique de type « exposition – contrôlée » (PHRC national 1998, promoteur CHU de Rouen, investigateur principal Dr. I. Etienne) qui évalue la possibilité de réduire de moitié l'exposition à la ciclosporine pour minimiser sa toxicité à moyen terme (2 ans), chez les patients greffés rénaux stables. Cette diminution a été réalisée sur la base de l' $AUC_{0-12h}$  de la ciclosporine, estimée par méthode Bayésienne : dans le groupe « AUC forte », l' $AUC_{0-12h}$  cible était de 4,3 mg.h/L (c'est-à-dire la valeur moyenne chez les greffés rénaux après un an de greffe, mesurée préalablement par les centres investigateurs chez 100 patients) ; dans le groupe « AUC faible », l' $AUC_{0-12h}$  cible était de 2,2 mg.h/L. Cette étude vient de s'achever et les résultats sont en cours d'analyse statistique.

Les estimateurs développés par Aurélie Prémaud (Premaud et col., 2005b) sont à la base du protocole APOMYGRE, évaluant l'individualisation de posologie du MMF par méthode Bayésienne. Cet essai (PHRC régional 2002, promoteur CHU de Limoges, investigateur principal Pr. Y. Le Meur) avait le même objectif que l'étude internationale FDCC, citée plus haut: évaluer l'intérêt du STP du Cellcept<sup>®</sup>. Les estimateurs Bayésiens utilisés permettaient d'estimer les paramètres pharmacocinétiques individuels du MPA, forme active du MMF, chez tous les patients et d'ajuster régulièrement la posologie sur la base de l' $AUC_{0-12h}$  de MPA dans un bras de l'essai (*versus* une dose standard, adaptée uniquement sur des critères cliniques de tolérance, dans l'autre). Les résultats préliminaires à 6 mois, présentés à l'American Transplantation Congress 2005, montraient une réduction significative de l'incidence des rejets aigus déclarés, et des rejets aigus confirmés par biopsie, dans le bras avec adaptation posologique. Les résultats définitifs (à 12 mois) présentés au World Transplant Congress 2006 ont confirmé une incidence significativement plus faible de rejets aigus, cliniques ( $p = 0,01$ ) aussi bien que confirmés par biopsie ( $p = 0,02$ ), dans le groupe ajusté, sans différence d'incidence des effets indésirables (à l'exception des infections virales à herpès virus, plus fréquentes dans ce bras ;  $n=8$  et 1, respectivement ;  $p = 0,05$ ).

Ces deux études apportent des arguments majeurs en faveur de la pertinence du suivi thérapeutique de la ciclosporine et du MMF et ont démontré que l'estimation Bayésienne est parfaitement applicable au suivi des traitements immunosuppresseurs.

Aujourd'hui, plus de 30 équipes de transplantation, françaises et étrangères, adaptent les traitements de ciclosporine et de MMF à l'aide de ces estimateurs. En effet, ces outils d'adaptation de posologie par méthode Bayésienne de la ciclosporine et du MPA ont été récemment mis à disposition des centres de transplantation francophones ou anglophones sous forme d'un site Web gratuit, accessible à travers le site du CHU de Limoges (site ABIS - Adaptation Bayésienne des Immunosuppresseurs - sur <http://www.chu-limoges.fr/stp/stpaccs.htm> ). Plus de 2000 demandes d'adaptation de posologie ont été adressées par ces équipes au cours des 17 premiers mois d'existence de ce site (avril 2005 – août 2006).

# **II-TRAVAUX PERSONNELS**

## **CONCERNANT LE SIROLIMUS**

# **1. Influence du polymorphisme *CYP3A5*\*3 sur la clairance orale du sirolimus chez les patients transplantés rénaux en période précoce et à l'état stable**

Le sirolimus, anciennement appelé rapamycine, a été découvert dans les années 1970 pour ses propriétés anti-fongiques et a eu une évaluation en transplantation dès 1995 pour son analogie structurale avec le tacrolimus. Il a été autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1999 et une AMM (Autorisation de mise sur le marché) Européenne lui a été accordée en mars 1999 pour « la prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque faible à modéré recevant une transplantation rénale ».

Le sirolimus est caractérisé par une faible biodisponibilité et une importante variabilité pharmacocinétique. Il est principalement métabolisé par la famille des CYP3A (CYP3A4 et CYP3A5) (Sattler et col., 1992), par hydroxylation et déméthylation. On pouvait donc supposer que les polymorphismes de ces enzymes du métabolisme étaient responsables d'au moins une partie de cette variabilité pharmacocinétique.

Du fait de certains polymorphismes et de phénomènes d'induction ou d'inhibition du CYP3A4 par d'autres médicaments, les taux hépatiques et intestinaux de cette isoforme sont variables d'un individu à l'autre. Le polymorphisme le plus fréquent, le *CYP3A4*\*1B (3,6 à 9,6% dans la population caucasienne), serait associé à une augmentation de l'expression du gène.

Le CYP3A5 a une structure similaire au CYP3A4, mais certains SNPs sont à l'origine d'une expression très polymorphe, notamment le *CYP3A5*\*3 dont la forme homozygote aboutit à un phénotype nul (les patients *CYP3A5*\*3/\*3 n'expriment pas le CYP3A5). En revanche, les taux hépatiques et intestinaux de CYP3A5 peuvent atteindre 50% des protéines CYP3A chez les individus avec au moins un allèle sauvage *CYP3A5*\*1. La fréquence allélique du

polymorphisme *CYP3A5\*3*, est de 90% dans la population caucasienne (Hustert et col., 2001; Kuehl et col., 2001; Hesselink et col., 2003), et seuls les individus portant au moins un allèle sauvage (*CYP3A\*1/\*3* ou *CYP3A5\*1/\*1*) expriment donc le CYP3A5 à des taux significatifs (Hustert et col., 2001; Kuehl et col., 2001), d'où la notion « d'expressers » et de « non-expressers » du CYP3A5. Ce SNP correspond à une substitution A>G en position 6986 du gène (intron 3) qui est à l'origine d'une erreur d'épissage de l'ARNm transcrit, aboutissant à la production d'une protéine tronquée inactive de 102 acides aminés (Kuehl et col., 2001).

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'implication du polymorphisme *CYP3A5\*3* dans la variabilité pharmacocinétique du sirolimus. Des profils complets de concentration du sirolimus ont été obtenus pour 47 patients à l'état stable. Pour 21 d'entre eux, des profils complets de concentration ont également été obtenus à la première et 2<sup>ème</sup> semaines (S1 et S2) et au premier mois (M1) suivant la greffe. Le sirolimus a été dosé par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les patients ont été génotypés pour le *CYP3A5\*3* par PCR en temps réel (RQ-PCR pour Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction).

Chez les patients à l'état stable, les valeurs d'AUC, de C<sub>max</sub> et de C<sub>0</sub> standardisées par la dose (AUC/dose, C<sub>max</sub>/dose et C<sub>0</sub>/dose), étaient significativement plus faibles chez les patients « expressers » (n=6) que chez les « non-expressers » (n=41) (26,6±15,7 vs 51,1±21,1, p=0,008; 4,8±3,3 vs 7,7±3,3, p=0,02; et 1,5±0,8 vs 3,0±1,5, p=0,01, respectivement). Les mêmes résultats ont été obtenus chez les 21 patients suivis à S1, S2 et M1 après la greffe (3 expressers et 18 non-expressers ; p < 0,005 à toutes les périodes). Au cours de ce travail, nous avons également montré que la dose moyenne nécessaire pour atteindre les C<sub>0</sub> cibles à l'état stable pour les patients « expressers » du CYP3A5 tendait à être plus élevée que pour les « non-expressers » (10 vs 4 mg, p=0,07). De plus, chez les patients suivis de S1 à M3, les C<sub>0</sub> cibles n'étaient atteintes qu'entre M1 et M3 après la greffe en moyenne dans les 2 groupes génotypiques de patients, malgré un STP régulier.

Une seule étude avait auparavant montré l'effet de ce polymorphisme du CYP3A5 sur la pharmacocinétique du sirolimus. Elle portait sur 69 patients transplantés rénaux recevant du sirolimus en traitement de secours, c'est-à-dire à distance de la greffe et sans anti-calcineurine associée. Elle rapportait des résultats similaires, c'est-à-dire une exposition standardisée plus faible chez les expressers du CYP3A5, mais uniquement en terme de C<sub>0</sub>/dose, s'agissant

d'une étude observationnelle rétrospective sans profils pharmacocinétiques (Anglicheau et col., 2005).

Les résultats obtenus au cours de notre travail montrent une diminution significative de l'activité métabolique et de la clairance orale du sirolimus chez les patients portant le génotype muté homozygote *CYP3A5\*3/\*3* et suggèrent que le génotypage *a priori* des patients, c'est-à-dire avant la première administration du produit, permettrait d'individualiser les doses de sirolimus et ainsi d'atteindre beaucoup plus rapidement l'état stable.

## **Article 1**

***CYP3A5\*3* influences sirolimus oral clearance in *de novo*  
and stable renal transplant recipients.**

**(Clinical Pharmacology and Therapeutics.**

**2006 Jul;80(1):51-60)**

## **2. Interaction métabolique de la ciclosporine avec le sirolimus en fonction du polymorphisme *CYP3A5\*3***

Le sirolimus et la ciclosporine sont principalement métabolisés par les CYP3A (CYP3A4 et CYP3A5) et sont également deux substrats de la P-gp. L'interaction pharmacocinétique de la ciclosporine sur le sirolimus a été décrite depuis longtemps (Stepkowski et col., 1996; Kaplan et col., 1998), mais il n'a été montré que plus récemment qu'il s'agissait d'une interaction métabolique impliquant l'inhibition des CYP3A, et non pas la P-gp (Wacher et col., 2002; Cummins et col., 2004).

Les CYP3A5 et CYP3A4 se caractérisent par un recouvrement en spécificité de substrat mais leur activité catalytique peut varier d'un substrat à l'autre : Patki et al. (Patki et col., 2003) ont trouvé des valeurs plus élevées de clairance intrinsèque ( $Cl_{int}=V_{max}/K_m$ ) du CYP3A4 recombinant (CYP3A4r) que du CYP3A5 recombinant (CYP3A5r) pour plusieurs substrats (testostérone, nifédipine, midazolam et triazolam). Au contraire, l'étude de Kamdem et al. (Kamdem et col., 2005) a montré des valeurs 64% plus élevées de  $Cl_{int}$  du CYP3A5r que du CYP3A4r pour le métabolisme du tacrolimus. De plus, il a été récemment démontré que les deux isoformes avaient une susceptibilité différente aux inhibiteurs enzymatiques (Granfors et col., 2006), suggérant que le génotype *CYP3A5* serait non seulement un déterminant de la variabilité inter-individuelle du métabolisme des substrats des CYP3A mais également de la susceptibilité individuelle aux interactions médicamenteuses impliquant l'inhibition des CYP3A.

Au cours de ce travail, nous avons d'abord comparé les clairances métaboliques du sirolimus par les CYP3A4 et CYP3A5 en utilisant des enzymes recombinants ainsi que des microsomes hépatiques humains (MHH) génotypés pour le *CYP3A5\*3*. Nous avons ensuite étudié l'effet inhibiteur de la ciclosporine sur ces deux voies métaboliques indépendamment.

Pour cela, deux approches ont été utilisées :

- la mesure de la production de l'hydroxy-sirolimus et du déméthyl-sirolimus,

- la mesure de la disparition du sirolimus par la technique de la demi-vie d'élimination.

Des valeurs plus faibles de  $Cl_{int}$  d'hydroxylation (0,11 vs 0,24  $\mu\text{l}/\text{pmol CYP}/\text{min}$ ) et de disparition du sirolimus (0,64 vs 2,36  $\mu\text{l}/\text{pmol CYP}/\text{min}$ ) ont été observées avec le CYP3A5r qu'avec le CYP3A4r.

Des valeurs voisines de  $Cl_{int}$  d'hydroxylation, de déméthylation et de disparition ont été observées en comparant les pools de MHH portant le génotype CYP3A5 expresseur ou non-expresser. Le même résultat a été obtenu en comparant les  $Cl_{int}$  de disparition au niveau des MHH individuels génotypés ( $p=0,42$ ). Un effet inhibiteur plus important de la ciclosporine sur la  $Cl_{int}$  de disparition de sirolimus a été observé avec le CYP3A4r qu'avec le CYP3A5r (-44% vs 8%). Le métabolisme du sirolimus était également moins inhibé par la ciclosporine avec le pool des MHH exprimant le CYP3A5 comparé aux non-expresser (-38% vs -56%).

En conclusion, cette étude a montré, en utilisant deux approches différentes, que le CYP3A4 a une activité catalytique plus importante que le CYP3A5 pour le métabolisme du sirolimus et que la ciclosporine a un effet inhibiteur plus important sur le CYP3A4 que sur le CYP3A5. Ces résultats suggèrent également que l'effet du polymorphisme du *CYP3A5\*3* sur le métabolisme hépatique du sirolimus pourrait devenir plus patent en présence d'une inhibition partielle du CYP3A4 par la ciclosporine.

## **Article 2**

**Metabolism of sirolimus in the presence or absence of cyclosporin by genotyped human liver microsomes and recombinant Cytochrome P450 3A4 and 3A5**

**(Accepté sous réserve de modifications dans *Drug Metabolism and Disposition*)**

**METABOLISM OF SIROLIMUS IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF  
CYCLOSPORINE BY GENOTYPED HUMAN LIVER MICROSOMES AND  
RECOMBINANT CYTOCHROMES P450 3A4 AND 3A5**

Nicolas Picard, Nassim Djebli, Francois-Ludovic Sauvage and Pierre Marquet.

Limoges University, Faculty of medicine, Laboratory of medical pharmacology, France (N.P.,  
N.D., P.M.) and Limoges University Hospital, Department of Pharmacology-Toxicology,  
France (N.P., F-L.S., P.M.)

### **3. Analyse pharmacocinétique de population du sirolimus et estimation Bayésienne chez des patients transplantés rénaux**

Une seule étude de pharmacocinétique de population du sirolimus a été publiée à ce jour : l'étude de Ferron et al. (Ferron et col., 1997), menée chez 36 patients transplantés rénaux stables co-traités par la ciclosporine. En particulier, aucune étude PKpop du sirolimus n'a été rapportée chez des patients non traités par des anti-calcineurines.

Les objectifs de notre travail étaient :

- de développer un modèle PKpop du sirolimus chez des patients adultes transplantés rénaux ne recevant pas d'anti-calcineurine associée,
- d'étudier l'influence potentielle de covariables (incluant des polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme du sirolimus) sur sa pharmacocinétique
- de développer un estimateur Bayésien permettant l'estimation des paramètres PK et des indices d'exposition individuels à partir d'un nombre limité de prélèvements obtenus dans les 4 premières heures après administration (pour des raisons d'applicabilité clinique).

Pour cela, 22 patients adultes transplantés rénaux traités par des corticoïdes, du MMF et du sirolimus ont participé à cette étude. Ces patients étaient inclus dans un essai clinique (PHRC CINESIREN) et avaient tous signé un consentement éclairé. Le traitement par le sirolimus consistait en une dose de charge de 15 mg/j le premier et le 2<sup>ème</sup> jour, suivie d'une dose de 10 mg/j pendant 7 jours. Ensuite, l'adaptation individuelle de la dose était basée sur la concentration sanguine résiduelle C<sub>0</sub> (cible entre 10 et 15 µg/L). Des profils complets de concentration du sirolimus ont ainsi été obtenus à la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine (S1 et S2) et au 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> mois (M1 et M3) après la greffe, soit 90 profils et 938 points de

concentration au total. Les dosages de sirolimus ont été réalisés par LC-MS/MS et les génotypages par RQ-PCR. L'analyse PKpop a été développée en utilisant le logiciel NONMEM et la validation par la technique de ré-échantillonnage « Bootstrap » en utilisant le logiciel Wings for NONMEM via l'interface Visual-NONMEM (Boekmann et col., 1992; Gomeni, 1998). Le modèle a été validé par la technique de validation croisée. L'estimateur Bayésien, basé sur une stratégie d'échantillonnage limité, a été développé en utilisant l'option *posthoc* de NONMEM.

L'analyse PKpop a abouti à un modèle bi-compartimental avec une élimination d'ordre 1 et une absorption décrite par une distribution Erlang, qui est un cas particulier de la loi gamma, précédemment décrite par Rousseau et al. (Rousseau et col., 2004). Elle est modélisée par l'addition de n compartiments-délai entre le compartiment dépôt et le compartiment central (dans le cas du sirolimus n=3) avec une constante de transfert identique entre les compartiments-délai et entre le dernier d'entre eux et le compartiment central. Les paramètres pharmacocinétiques moyens estimés par le modèle étaient de  $5,25 \pm 0,25 \text{ h}^{-1}$  pour la constante de transfert (Ktr) et de  $218 \pm 15 \text{ L}$  et  $292 \pm 29 \text{ L}$  pour les volumes apparent de distribution des compartiments central et périphérique ( $V_c/F$  et  $V_p/F$ ), respectivement. La clairance apparente ( $CL/F$ ) était significativement influencée par le polymorphisme *CYP3A5\*3* : elle était de  $14,1 \pm 1,0 \text{ L.h}^{-1}$  pour les patients non-expresseurs (*CYP3A5\*3/\*3*) et de  $28,3 \pm 5,0 \text{ L.h}^{-1}$  pour les patients expresseurs (*CYP3A5\*1/\*1* et *CYP3A5\*1/\*3*). Les coefficients de variation (CV%), c'est-à-dire l'imprécision d'estimation, étaient inférieurs à 15% pour l'ensemble des paramètres de population.

L'estimateur Bayésien développé a permis une estimation précise de l' $AUC_{0-24h}$  en utilisant une combinaison de seulement 3 concentrations mesurées à 0, 1h et 3h après la prise du sirolimus, avec une valeur moyenne de biais non-significative de - 2,1 % (valeurs extrêmes : -22,2 % et + 25,9%) et une bonne précision (RMSE = 10,3 %).

En conclusion, cette étude présente pour la première fois un modèle PKpop du sirolimus chez des patients greffés rénaux sans anti-calcineurine associé, dans les premiers mois suivant la greffe (dès le 7<sup>ème</sup> jour). La seule covariable retenue était le polymorphisme *CYP3A5\*1/\*3*, influençant significativement la clairance apparente du sirolimus. Le modèle final a permis une bonne estimation des paramètres pharmacocinétiques et des

variabilités inter-individuelles. L'estimateur Bayésien développé à partir de ce modèle pharmacocinétique de population ne nécessite que 3 prélèvements sanguins (0, 1h, 3h) et le génotype *CYP3A5*\*3. Ce travail est accepté pour publication dans *Clinical Pharmacokinetics*.

Ultérieurement, l'estimateur Bayésien a pu être évalué dans un groupe indépendant de 28 patients recevant du sirolimus et du MMF, inclus dans un autre essai clinique (étude multi-centrique CONCEPT) pour lequel ils avaient tous signé un consentement éclairé. Ces patients recevaient du sirolimus en association avec la ciclosporine pendant 3 mois après la greffe, puis la ciclosporine était abandonnée au delà de 3 mois. Trente quatre cinétiques riches de sirolimus ont été collectées 4 et 14 semaines après arrêt de la ciclosporine. Les mêmes méthodes de dosage par LC-MS/MS et de génotypage par RQ-PCR ont été utilisées que précédemment. L'estimateur Bayésien a conduit à une estimation satisfaisante des  $AUC_{0-24}$  avec un biais moyen de - 6,6% (-28,8 à + 19,1%) et une précision de 10,6%. Seulement 3 profils sur 34 avaient un biais absolu supérieur à 20%.

Deux patients (3 cinétiques) dans ce groupe de validation présentaient un génotype expresseur du *CYP3A5* (\*1/\*3). Les biais obtenus avec l'estimateur Bayésien pour ces 3 cinétiques étaient de -3,4%, -7,8% et -1,6%.

Cette validation externe confirme les performances de l'estimateur Bayésien publié, ce qui permet d'envisager son utilisation en pratique clinique courante chez des patients sous sirolimus sans association d'anti-calcineurines.

Ce travail a montré que les patients expresseurs du *CYP3A5* (\*1/\*1 et \*1/\*3) avaient une clairance apparente 2 fois supérieure aux non-expresssurs (\*3/\*3). Ces patients requièrent donc des doses d'entretien en moyenne 2 fois plus élevées que les patients non-expresssurs, qui forment la majeure partie de la population (90% environ). L'adaptation individuelle des doses de sirolimus est compliquée par la longue demi-vie de ce médicament. Les corrections de doses ne vont entraîner des « ajustements » de l'exposition qu'après plusieurs semaines. Il est donc d'autant plus important de disposer, pour le sirolimus, d'une méthode précise d'individualisation des doses.

## **Article 3**

# **Sirolimus population pharmacokinetic- pharmacogenetic analysis and Bayesian modeling in kidney transplant recipients**

**(Sous presse dans *Clinical Pharmacokinetics*)**

**III- TRAVAUX PERSONNELS  
CONCERNANT LE  
MYCOPHENOLATE MOFETIL**

# **Influence des polymorphismes du promoteur et de l'exon 2 C802T du gène de l'UGT2B7 et des traitements associés sur la production *in vitro* de l'Acyl-MPAG et chez des patients adultes transplantés rénaux**

L'AcMPAG, métabolite minoritaire du MPA, conserve une activité immunosuppressive (Shipkova et col., 2001) et est susceptible d'être responsable de certains effets secondaires attribués au MMF tels que la leucopénie et la toxicité gastro-intestinale (Ritter, 2000; Wieland et col., 2000; Shipkova et col., 2003).

L'étude de Picard et al. (Picard et col., 2005) a montré que la production d'AcMPAG se fait principalement via l'UGT2B7.

Comme décrit précédemment, plusieurs SNPs du gène de l'UGT2B7 ont été identifiés (voir page 17).

Les objectifs de ce travail étaient :

- d'étudier l'impact d'un des polymorphismes du promoteur du gène de l'UGT2B7, le *G-842A* (ceux-ci étant en parfait déséquilibre de liaison entre eux, cela revient à étudier l'impact de l'haplotype du promoteur) et du SNP au niveau de l'exon 2 le *C802T* (*UGT2B7\*2*) sur l'exposition des patients à l'AcMPAG ainsi que sur la production *in vitro* d'AcMPAG par des MHH.
- de comparer l'exposition à l'AcMPAG à différentes périodes post-transplantation (S1, M1 et M3) des patients traités par du MMF en association avec le sirolimus, le tacrolimus ou la ciclosporine

- et enfin d'étudier l'effet des corticoïdes *in vitro* sur la production d'AcMPAG et *in vivo* sur l'exposition des patients à ce métabolite

Pour cela, nous avons étudié *in vitro* la production d'AcMPAG par 32 MHH génotypés pour les SNPs *G-842* et *C802T* de l'UGT2B7, et comparé la production d'AcMPAG et les paramètres de la cinétique enzymatique ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) entre les 3 génotypes. Nous avons également comparé les concentrations plasmatiques d'AcMPAG chez des patients transplantés rénaux traités par du MMF en association avec le sirolimus (n=40), le tacrolimus (n=24) ou la ciclosporine (n=28) et recevant des doses décroissantes de corticoïdes au cours des 3 premiers mois suivant la greffe. L'effet des corticoïdes sur la production d'AcMPAG a également été étudié *in vitro* en utilisant des microsomes hépatiques de rats (MHR) induits ou pas par la dexaméthasone.

Comme attendu, les deux SNPs de l'UGT2B7 étudiés étaient en parfait déséquilibre de liaison inverse : les individus portant le génotype sauvage homozygote GG-842 (reflétant l'haplotype sauvage du promoteur) étaient homozygotes mutés 802TT, les individus hétérozygotes G-842A étaient hétérozygotes C802T et les individus homozygotes mutés -842AA étaient homozygotes sauvages CC802.

La production d'AcMPAG était respectivement 1,25 et 1,56 fois plus élevée avec les MHH portant le génotype hétérozygote G-842A et homozygote muté -842AA, qu'avec les MHH homozygotes sauvages (p=0,01).

Les cinétiques enzymatiques avec les pools de MHH ont montré des valeurs de  $V_{max}$  respectivement 1,4 et 3,7 fois plus élevées au niveau des pools portant les génotypes G-842A et -842AA comparés au pool portant le génotype GG-842. Les valeurs de  $K_m$  étaient de 0,20, 0,25 et 0,44 mM pour GG-842, G-842A et -842AA, respectivement. Cette nette augmentation de la  $V_{max}$  suggère la responsabilité principale de l'haplotype homozygote muté du promoteur (reflété par le génotype -842AA) et son association probable à une induction de l'expression du gène, tandis que l'augmentation, plus discrète, du  $K_m$  pourrait être due à un effet propre du SNP *C802T*.

Le génotype *UGT2B7* a également influencé significativement et dans le même sens les valeurs d'AUC<sub>0-9h</sub>/dose d'AcMPAG chez les patients sous sirolimus à M1 et M3 après la greffe (p=0,04 pour les 2 périodes). Aucun effet significatif du génotype n'a été observé avec les patients sous tacrolimus ou ciclosporine. Pour les patients sous ciclosporine, l'absence d'effet du génotype sur la production d'AcMPAG est partiellement due à une inhibition du cycle entéro-hépatique du MPA, par inhibition du transporteur MRP2. De plus, une interaction métabolique peut masquer l'effet du polymorphisme par inhibition de la glucurono-conjugaison par l'UGT2B7 due aux anti-calcineurines (ciclosporine et tacrolimus), étant donné que ces 2 immunosuppresseurs sont également (bien que minoritairement) glucurono-conjugués par cette enzyme (Strassburg et col., 2001).

Nous avons également montré *in vitro* que la production d'AcMPAG était plus importante au niveau des MHR induits par la dexaméthasone. Ceci va dans le sens de la diminution *in vivo* de l'AUC<sub>0-9h</sub>/dose d'AcMPAG et de MPAG avec la période post-transplantation (diminution progressive de la dose de corticoïdes avec le temps dans le protocole thérapeutique utilisé dans cette étude).

En conclusion, ce travail a montré l'influence significative des polymorphismes du gène de l'UGT2B7 et des co-médications sur la production d'AcMPAG. La ciclosporine et le tacrolimus, masqueraient l'impact de ces polymorphismes.

## **Article 4**

# **Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and co-medications on Acyl-MPAG production in vitro and in adult renal transplant patients**

**(Version révisée soumise à *The Pharmacogenetics and Genomics Journal*)**

Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and co-medications on Acyl-MPAG production *in vitro* and in adult renal transplant patients

Nassim Djebli<sup>1</sup>, Nicolas Picard<sup>1</sup>, Jean-Philippe Rérolle<sup>2</sup>, Yann Le Meur<sup>2</sup>, and Pierre Marquet<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Limoges University, EA3838, Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, Limoges, France

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

<sup>3</sup> Limoges University Hospital, Department of Pharmacology – Toxicology, Limoges, France

Running head: Effect of *UGT2B7* polymorphisms on AcMPAG production

\* Corresponding author: Prof. Pierre MARQUET, Department of Pharmacology-Toxicology, University Hospital, 2 av. Martin-Luther King, 87042 Limoges, France.

Tel. +33 555 05 64 18

Fax. +33 555 05 61 62. E-mail:

pierre.marquet@unilim.fr

## ABSTRACT

**Introduction** The polymorphic enzyme UGT2B7 metabolizes mycophenolic acid (MPA) into acyl-MPA-glucuronide (AcMPAG), a presumably toxic metabolite. This study aimed at investigating *in vitro* and *in vivo* the impact on AcMPAG production of: (i) the *UGT2B7* gene *G-842A* SNP, in complete linkage disequilibrium with most other known SNPs in the promoter region of this gene and with the *C802T* SNP in exon 2 (*UGT2B7*\*2); and (ii) of the other immunosuppressants given to renal transplant patients in association with mycophenolate mofetil.

**Methods** We compared the production of AcMPAG by human liver microsomes (HLM) genotyped for the *UGT2B7 G-842A* and *C802T* SNPs, and plasma AcMPAG concentrations in genotyped renal transplant patients administered mycophenolate mofetil associated with sirolimus (n=40), tacrolimus (n=24) or cyclosporin (n=28) and decreasing doses of corticosteroids, over the first three months post-transplant. The effect of corticosteroids was also investigated *in vitro* using rats' liver microsomes (RLM).

**Results** The two polymorphisms studied were in complete reverse linkage disequilibrium. AcMPAG production was 1.25 and 1.56-fold higher in *G-842A* and *-842AA* HLM, respectively, compared to *GG-842* HLM ( $p=0.01$ ). Enzyme kinetics showed 1.4 and 3.7-fold higher  $V_{\max}$  in the respective pools of HLM.  $K_m$  values were 0.20, 0.25 and 0.44 mM for the *GG-842*, *G-842A* and *-842AA* genotypes, respectively. This clear increase in  $V_{\max}$  is in favor of the implication of the promoter region polymorphisms, while the slighter increase in  $K_m$  might be due to the *UGT2B7*\*2 SNP. Consistently, the *UGT2B7*

genotype significantly influenced AcMPAG  $AUC_{0-9h}/dose$  in patients on sirolimus at M1 and M3 post-transplant ( $p=0.04$  for both). No effect was observed in patients on tacrolimus and possibly also on cyclosporin, maybe due to pharmacokinetic interaction with mycophenolate. AcMPAG production was increased in corticosteroid-induced RLM, consistent with the observed *in vivo* decrease of MPA metabolites  $AUC_{0-9h}/dose$  with time post-transplant.

**Conclusion** Both *UGT2B7* polymorphisms and co-medications significantly influenced AcMPAG production, but cyclosporin and tacrolimus hindered the phenotypic impact of this trait.

**Key words** *UGT2B7*, mycophenolate, AcMPAG, metabolism, cyclosporin, tacrolimus, sirolimus, corticosteroids, induction, transplantation.

# DISCUSSION

Ce travail de thèse illustre l'intérêt d'identifier et de quantifier l'impact clinique des sources de variabilité pharmacocinétique des immunosuppresseurs, en vue de l'individualisation du traitement en terme de choix du médicament ou de l'association médicamenteuse, de choix de la dose, en fonction du génotype du patient, des interactions médicamenteuses et/ou de la période suivant la greffe.

Les études réalisées au cours de cette thèse ont l'avantage, contrairement à la majorité de celles précédemment décrites dans la littérature, de prendre en compte :

- (i) des cinétiques complètes collectées chez des patients transplantés rénaux, ce qui a permis une meilleure estimation des indices d'exposition lors des études pharmacocinétiques non-compartimentales ;
- (ii) différentes périodes après la transplantation, permettant d'évaluer l'effet du délai post-greffe de J7 à plusieurs années post-greffe;
- (iii) l'influence du génotype sur l'évolution au cours du temps des indices d'exposition ou des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament et/ou de ses métabolites ;
- (iv) différentes combinaisons de traitements, permettant ainsi d'évaluer l'effet des traitements associés sur l'importance de l'impact d'un génotype (ou d'autres caractéristiques individuelles) sur la pharmacocinétique du médicament ;
- (v) des données obtenues *in vitro* et *in vivo*. Cette double-approche avait pour objectif de suivre ce qui se passe exactement au niveau hépatique, d'étudier *in vitro* certaines interférences observées *in vivo* et inversement (mécanismes d'absorption ou d'élimination, expression génique variable d'un organe à l'autre...).

Ces études ont, en revanche, la limite de reposer sur des nombres relativement faibles de patients, ce qui impose la contrainte, lors d'études pharmacogénétiques de n'étudier que les polymorphismes les plus fréquents (à moins de sélectionner les patients inclus en fonction du génotype, comme précédemment décrit par Min et al. (Min et Ellingrod, 2003; Min et col., 2004)). L'implication d'autres polymorphismes, du fait d'un déséquilibre de liaison par exemple, ne peut être écartée.

C'est le cas par exemple des polymorphismes *CYP3A4\*1B* et du gène *MDR1* avec le polymorphisme *CYP3A5\*3* pour le sirolimus, ou des polymorphismes du gène *MRP2* avec ceux de l'*UGT2B7* pour le MMF. L'effectif limité du groupe de patients étudié a aussi limité le nombre de covariables à tester dans l'analyse de population du sirolimus.

Un intérêt clinique majeur pourrait ressortir de ces études pharmacogénétiques.

- En effet, elles pourraient permettre une individualisation du traitement aussi bien en terme d'adaptation de la dose que de choix du médicament.

La relation entre le génotype *CYP3A5\*3* et la pharmacocinétique du sirolimus peut être prise comme exemple : les résultats du suivi des patients recevant du sirolimus au cours des 3 premiers mois suivant la greffe (article 1) montrent que, pendant les périodes précoces, la majorité des patients qui n'expriment pas le *CYP3A5* ont des valeurs de C0 supérieures à la valeur cible et n'atteignent ces cibles qu'au 3<sup>ème</sup> mois post-greffe malgré un STP fréquent. Inversement, la majorité des patients expresseurs du *CYP3A5* ont des valeurs de C0 inférieures aux valeurs cibles et ne les atteignent qu'en moyenne un mois après la greffe. Les doses de charge et d'entretien recommandées ces patients semblent donc être comprises entre les doses réellement nécessaires pour les patients expresseurs et non-expresses. Cette importante association observée entre le génotype *CYP3A5\*3* et la pharmacocinétique du sirolimus pourrait donc aboutir à un ajustement *a priori* des doses de sirolimus afin d'optimiser le traitement. Ainsi, les patients expresseurs du *CYP3A5* recevraient une dose plus importante et inversement, les non-expresses une dose plus faible que la dose actuellement recommandée. L'importante demi-vie d'élimination du sirolimus (environ 62 heures) a probablement contribué en grande partie au très long délai d'atteinte des concentrations résiduelles cibles, malgré l'ajustement itératif des doses. L'étude rapportée dans l'article 1 a ainsi mis en évidence l'intérêt potentiel du génotypage *a priori* des patients pour le *CYP3A5\*3* afin d'optimiser les doses initiales de sirolimus et atteindre plus rapidement l'état stable à l'exposition-cible pour tous les patients. De manière générale, une telle évaluation pharmacogénétique serait très utile pour d'autres médicaments dont la variabilité pharmacocinétique et la demi-vie sont importantes.

L'administration de MMF pourrait aussi être individualisée sur la base du génotype de l'*UGT2B7* (article 4). Une association significative a été observée entre l'haplotype sauvage du promoteur de l'*UGT2B7* (correspondant au génotype muté du SNP *C802T*) et la production *in vitro* d'AcMPAG, avec aussi bien une augmentation de la valeur de  $V_{max}$ , suggérant l'implication des SNPs du promoteur du gène (induction de l'expression du gène), qu'une

augmentation plus discrète du  $K_m$ , suggérant l'implication du SNP C802T (diminution de l'affinité de l'enzyme), ce qui conduit à une  $CL_{int}$  ( $V_{max}/K_m$ ) plus élevée. Les résultats obtenus *in vivo*, chez des patients transplantés rénaux recevant du MMF en association avec le sirolimus, sont en faveur de cette hypothèse. Aucune association significative n'a, en revanche, été observée avec les patients co-traités par des anti-calcineurines. Cet exemple met également en évidence l'intérêt d'un génotypage pour tenter d'interpréter la susceptibilité individuelle des patients aux effets indésirables d'un médicament tel que le MMF (effets indésirables intestinaux et hématologiques en particulier). Une étude cas-témoins (avec-sans effets indésirables du MMF) est actuellement en cours, à partir des dossiers cliniques et de l'ADN des patients recueillis dans divers essais cliniques dans lesquels les patients recevaient du MMF en association à du sirolimus (essai CONCEPT), du tacrolimus (essai TACTIQUE) ou de la ciclosporine (essai APOMYGRE). Si cette étude confirme le caractère prédictif du génotype *UGT2B7* pour les effets indésirables du MMF, des recommandations de choix du médicament ou de la dose administrée pourraient en découler. D'autres études pharmacogénétiques pourraient également jouer un rôle explicatif dans la susceptibilité individuelle aux effets indésirables du sirolimus (troubles lipidiques, cutanés et hématologiques ...), de la ciclosporine (néphrotoxicité ...). Ces études permettraient ainsi la surveillance de certains patients portant un génotype particulier et éventuellement avec une association thérapeutique particulière (exemple des patients sous sirolimus et sans anticalcineurine, expresseurs du *CYP3A5*).

- Ces études pharmacogénétiques montrent également que l'impact d'un polymorphisme génétique peut être plus ou moins important en fonction de l'organe transplanté.

Une des études réalisées au cours de cette thèse (article 2) montre que l'effet du SNP *CYP3A5*\*3 sur le métabolisme hépatique *in vitro* du sirolimus est négligeable, contrairement à ce qui a été observé chez des patients transplantés rénaux par Anglicheau et al. (Anglicheau et col., 2005) et par nous-mêmes (article 1). Nous avons ainsi fait l'hypothèse que l'effet significatif de ce polymorphisme, observé *in vivo*, est probablement due à l'activité du *CYP3A5* au niveau de la barrière intestinale plutôt qu'au niveau hépatique. Des concentrations saturantes sont, en effet, plus susceptibles d'être rencontrées au niveau entérocytaire qu'au niveau hépatocytaire ou systémique. Le polymorphisme du *CYP3A5* n'affectant pas significativement le métabolisme hépatique du sirolimus, ceci suggère également que le génotype *CYP3A5*\*3 du donneur, comparé à celui du receveur, en transplantation hépatique serait d'une importance mineure.

- Ces études pharmacogénétiques permettent également d'améliorer un modèle pharmacocinétique de population, dont l'objectif est, à terme, l'adaptation de posologie.

L'analyse pharmacocinétique de population du sirolimus, chez des patients transplantés rénaux, au cours de cette thèse (article 3), a abouti au développement d'un modèle avec comme seule covariable significative le génotype *CYP3A5\*3* sur la clairance apparente CL/F. Très peu de modèles de population, pour les médicaments immunosuppresseurs, avaient inclus des covariables génétiques. La seule étude à notre connaissance, était celle de Hesselink et al. (Hesselink et col., 2004) qui décrivait la pharmacocinétique de population de la ciclosporine chez des patients transplantés rénaux et cardiaques, incluant comme covariable, en plus de l'ethnie et du poids corporel, le génotype *CYP3A4\*1B* sur la clairance apparente.

Certaines interactions médicamenteuses peuvent moduler (cacher ou révéler) des différences phénotypiques.

L'étude de Anglicheau et al. (Anglicheau et col., 2005) a trouvé une association significative entre les SNPs *CYP3A4\*1B* et *CYP3A5\*3* et les ratios C0/dose chez des patients transplantés rénaux recevant du sirolimus en traitement de deuxième intention. Aucune association significative n'a, en revanche, été observée chez des patients recevant du sirolimus en traitement de première intention (en période précoce) et chez des patients recevant du sirolimus en association à un anti-calcineurine (tacrolimus ou ciclosporine). L'interaction pharmacocinétique probable avec les corticoïdes, prescrits en période précoce, comme avec les anti-calcineurines pourrait être à l'origine de la disparition de l'impact significatif des polymorphismes étudiés sur la pharmacocinétique du sirolimus.

Cette interaction des anti-calcineurines est confirmée dans notre propre étude (article 4), qui montre une association significative entre le génotype de l'*UGT2B7* et la production d'AcMPAG chez des patients transplantés rénaux recevant du sirolimus en association avec le MMF, alors qu'aucune association significative n'a été observée chez des patients co-traités par le tacrolimus ou la ciclosporine. La ciclosporine est connue pour inhiber le cycle entéro-hépatique, par inhibition du transporteur MRP2 (Kobayashi et col., 2004; Hesselink et col., 2005; Westley et col., 2006). Une interaction métabolique est également possible pour la ciclosporine et le tacrolimus qui subissent tous deux une glucurono-conjugaison via l'*UGT2B7* (Strassburg et col., 2001). Nos travaux confirment l'interaction du MMF avec les corticoïdes (article 4). L'influence significative du génotype de l'*UGT2B7* sur la production d'AcMPAG, chez les patients sous sirolimus, n'est pas retrouvée à J7, mais elle l'est à partir du premier mois après la greffe (M1 et M3), c'est-à-dire quand la dose de corticoïdes est très diminuée (en moyenne de 70% à M1 et de 97% à M3). De plus, l'effet des corticoïdes se traduit par des AUC/dose d'AcMPAG et de MPAG plus faibles à M3 qu'à

J7 (inversement les AUC/dose de MPA sont plus élevées à M3). Cette évolution de la pharmacocinétique du MPA et de ses métabolites au cours du temps peut s'expliquer par une diminution de l'induction par les corticoïdes de l'expression des UGTs.

A coté de ces interactions qui masquent l'effet des génotypes du *CYP3A5* et de l'*UGT2B7*, il existe aussi des interactions qui révèlent l'effet d'un polymorphisme. Nous avons montré *in vitro* (article 2) que le génotype *CYP3A5\*3* n'entraîne aucune différence significative sur le métabolisme du sirolimus lorsque celui-ci est incubé seul avec des microsomes hépatiques humains. L'inhibition de ce métabolisme par la ciclosporine révèle en revanche la différence d'activité métabolique du sirolimus entre les expresseurs et les non-expresseurs du *CYP3A5*. En effet, en présence de ciclosporine une différence significative du métabolisme hépatique du sirolimus est observée entre les MHH portant le génotype *CYP3A5\*3/\*3* et ceux portant le génotype *CYP3A5\*1/\*3* ou *\*1/\*1*.

Nos travaux présentent également la première analyse pharmacocinétique de population du sirolimus ayant abouti au développement d'un modèle permettant d'évaluer avec précision les paramètres pharmacocinétiques de population et leur variabilité inter-individuelle chez des patients transplantés rénaux, sans médicament anti-calcineurine associé, aussi bien en période précoce qu'en période stable. Un estimateur Bayésien a été développé à partir de ce modèle de population. Il permet d'estimer avec précision l' $AUC_{0-24h}$  du sirolimus à partir de 3 concentrations recueillies à 0, 1h et 3h post-dose et du génotype *CYP3A5\*3*, ce qui est particulièrement utile pour un médicament à aussi longue demi-vie. Cet estimateur Bayésien présente aussi et surtout l'intérêt d'estimer précisément la clairance apparente du sirolimus, ce qui permet l'estimation précoce de la dose d'entretien à administrer pour ce médicament à longue demi-vie. Cette étude a montré que cette clairance apparente variait en moyenne d'un facteur de 2 en fonction du génotype *CYP3A5\*3*, suggérant le même facteur pour la dose d'entretien nécessaire. L'estimateur Bayésien développé permet théoriquement l'ajustement de la dose d'entretien dès le deuxième jour, malgré la très longue demi-vie du sirolimus (environ 62 heures), ainsi que la ré-administration d'une dose de charge si nécessaire, en particulier pour les patients expresseurs du *CYP3A5*, pour atteindre plus rapidement l'exposition cible et l'état stable.

La possibilité d'une stratégie d'individualisation posologique du sirolimus en deux temps ressort donc de l'ensemble de ces résultats : une adaptation pharmacogénétique *a priori* de la dose de charge et un réajustement pharmacocinétique précoce grâce à l'estimateur Bayésien. Cette approche contribuerait ainsi à fortement diminuer le délai d'atteinte de l'état stable pour tous les patients.

# CONCLUSION

Ce travail de thèse, dont les objectifs principaux étaient l'identification des principales sources de variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique de deux médicaments immunosuppresseurs, le sirolimus et le MMF, et l'analyse PKpop du sirolimus chez des patients transplantés rénaux, nous a permis :

- (i) d'identifier le *CYP3A5\*3* comme étant à l'origine d'une partie de la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du sirolimus, de quantifier sa contribution dans cette variabilité, de montrer l'intérêt du génotypage *a priori* en vue d'une individualisation de la dose de charge du sirolimus afin d'atteindre l'état stable le plus rapidement possible pour tous les patients, de montrer aussi l'intérêt de connaître le génotype *CYP3A5* (expresseurs ou non-expresser) pour le calcul de la dose d'entretien et d'éviter ainsi aussi bien les risques de toxicité et d'apparition d'effets secondaires dus à une sur-exposition que les risques de rejets aigus dus à une sous-exposition ; une étude prospective comparant une telle individualisation de posologie *a priori* à l'attitude actuellement recommandée sera nécessaire pour confirmer ces hypothèses.
- (ii) de montrer *in vitro* une plus importante inhibition par la ciclosporine du métabolisme du sirolimus par le *CYP3A4* que par le *CYP3A5* et l'impact de cette inhibition sur l'apparition d'un effet significatif du polymorphisme *CYP3A5\*3* sur le métabolisme hépatique du sirolimus ; une étude rétrospective ou observationnelle chez des patients recevant l'association sirolimus – ciclosporine sera, là encore, nécessaire pour confirmer l'effet potentialisateur de la ciclosporine sur l'effet pharmacogénétique, par comparaison avec les résultats obtenus chez des patients sous sirolimus seul dans notre travail.
- (iii) de développer une analyse PKpop du sirolimus chez des patients transplantés rénaux au cours des 3 premiers mois suivant la greffe, incluant comme covariable le polymorphisme *CYP3A5\*3* sur la clairance apparente, permettant une bonne estimation des paramètres pharmacocinétiques et des variabilités inter-individuelles et la mise au point d'un estimateur Bayésien capable d'estimer avec précision les paramètres pharmacocinétiques individuels et les indices d'exposition, quelque soit la période post-transplantation, à partir de 3 valeurs de concentration (mesurées 0, 1h et 3h après la prise

du sirolimus) et du génotype du patient ; un essai clinique de faisabilité sera nécessaire pour démontrer que l'estimation précoce de la clairance apparente permet d'estimer la dose d'entretien et, en fonction du niveau d'exposition à J1, la dose de charge complémentaire à administrer pour raccourcir significativement le délai d'atteinte de la cible de concentration résiduelle ou d'AUC<sub>0-24h</sub> (cet essai pourra éventuellement être intégré à l'essai de validation du génotypage *CYP3A5* pré-greffe).

- (iv) enfin, de montrer l'effet significatif du génotype de l'*UGT2B7* sur la production *in vitro* d'AcMPAG, et sur l'exposition *in vivo* à ce métabolite présumé toxique des patients transplantés rénaux recevant du MMF en association avec le sirolimus, cet effet significatif du génotype de l'*UGT2B7* n'ayant pas été observé lors de la co-administration d'anti-calcineurines (tacrolimus ou ciclosporine) ; de montrer *in vitro* que le pré-traitement par les corticoïdes augmente la production d'AcMPAG, probablement par induction de l'expression de l'*UGT2B7*, suggérant l'implication de cette induction *in vivo* dans l'augmentation de l'exposition au MPA et dans la diminution de l'exposition à ses métabolites l'AcMPAG et le MPAG avec le délai post-transplantation. L'analyse rétrospective de divers essais cliniques où les patients ont reçu du MMF en association avec du sirolimus, du tacrolimus ou de la ciclosporine est en cours, pour évaluer l'impact de ce génotype et/ou de l'exposition à l'AcMPAG sur les effets indésirables du MMF.

# BIBLIOGRAPHIE

- Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR RESPONSE: Re: Modification of Clinical Presentation of Prostate Tumors by a Novel Genetic Variant in CYP3A4. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; **91**: 1588-1590.
- Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C, Thervet E Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; **5**: 595-603.
- Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Buchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C, Marquet P CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 422-433.
- Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E 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**: 1889-1896.
- Antignac M, Hulot JS, Boleslawski E, Hannoun L, Touitou Y, Farinotti R, Lechat P, Urien S Population pharmacokinetics of tacrolimus in full liver transplant patients: modelling of the post-operative clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**: 409-416.
- Antonio L, Xu J, Little JM, Burchell B, Magdalou J, Radomska-Pandya A Glucuronidation of catechols by human hepatic, gastric, and intestinal microsomal UDP-glucuronosyltransferases (UGT) and recombinant UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7. *Arch Biochem Biophys* 2003; **411**: 251-261.
- Armstrong VW, Schwabe H, Schmuck B, Scholz C, Wiese C, Bonsack S, Oellerich M The acylglucuronide mycophenolic acid forms a specific covalent adduct with inosine monophosphate dehydrogenase 2. *8th world conference on clinical pharmacology and therapeutics. Brisbane Convention and Exhibition Centre. 1-6 Aùot 2004. Brisbane, Australie.* 2004: A99.
- Atcheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, Duffull SB, Mudge DW, Pillans PI, Johnson DW, Tett SE Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 284-286.
- Azarpira N, Aghdaie MH, Behzad-Behbahanie A, Geramizadeh B, Behzadi S, Malekhoseinie SA, Raisjalal GH, Rahsaz M, Pourgholami A, Sagheb F Association between cyclosporine concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 during the early stage after renal transplantation. *Exp Clin Transplant* 2006; **4**: 416-419.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 288-294.
- Balram C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**: 78-83.

- Beal SL, Sheiner LB *NONMEM user's guides. NONMEM Project Group*, 1992. San Francisco: University of California.
- Bernard O, Guillemette C The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 775-778.
- 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.
- Beznik-Cizman B, Israni A, Cizman B, Bloom RD, Walker KT, R. RT, Feldman HI Impact of CYP3A genotype and race on attainment of target tacrolimus level in first month after renal transplantation. *WTC, Boston USA 1299* 2006.
- Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, Miners JO Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics* 2000; **10**: 679-685.
- Billaud EM *Marquet P., Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs*, 2004. Paris.
- Boekmann AJ, Sheiner LB, Beal SL *NONMEM user's guide, part V: Introductory guide. Technical report of the division of clinical pharmacology, University of California*, 1992. San Francisco: University of California.
- Bonhomme-Faivre L, Devocelle A, Saliba F, Chatled S, Maccario J, Farinotti R, Picard V MDR-1 C3435T polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 21-25.
- Borst P, Schinkel AH, Smit JJ, Wagenaar E, Van Deemter L, Smith AJ, Eijdemans EW, Baas F, Zaman GJ Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol Ther* 1993; **60**: 289-299.
- Breant V, Charpiat B, Sab JM, Maire P, Jelliffe RW How many patients and blood levels are necessary for population pharmacokinetic analysis? A study of a one compartment model applied to cyclosporine. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; **51**: 283-288.
- Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; **34**: 429-455.
- Burckart GJ, Liu XI Pharmacogenetics in transplant patients: can it predict pharmacokinetics and pharmacodynamics? *Ther Drug Monit* 2006; **28**: 23-30.
- Carson PE Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956: 124:484.
- Charpiat B, Falconi I, Breant V, Jelliffe RW, Sab JM, Ducerf C, Fourcade N, Thomasson A, Baulieux J A population pharmacokinetic model of cyclosporine in the early postoperative phase in patients with liver transplants, and its predictive performance with Bayesian fitting. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 158-164.
- Cholerton S, Daly AK, Idle JR The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci* 1992; **13**: 434-439.
- Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 89-95.
- Coffman BL, King CD, Rios GR, Tephly TR The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos* 1998; **26**: 73-77.
- Court MH, Krishnaswamy S, Hao Q, Duan SX, Patten CJ, Von Moltke LL, Greenblatt DJ Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7\*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 1125-1133.
- Cremers SC, Scholten EM, Schoemaker RC, Lentjes EG, Vermeij P, Paul LC, den Hartigh J, de Fijter JW A compartmental pharmacokinetic model of cyclosporin and its predictive

- performance after Bayesian estimation in kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 1201-1208.
- Cummins CL, Jacobsen W, Christians U, Benet LZ CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **308**: 143-155.
- Czernik PJ, Little JM, Barone GW, Raufman JP, Radomska-Pandya A Glucuronidation of estrogens and retinoic acid and expression of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in human intestinal mucosa. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**: 1210-1216.
- Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**: 825-831.
- David OJ, Johnston A Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 100-114.
- Debord J, Risco E, Harel M, Le Meur Y, Buchler M, Lachatre G, Le Guellec C, Marquet P Application of a gamma model of absorption to oral cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 2001; **40**: 375-382.
- Djebli N, Le Meur Y, Picard N, Szelag JC, Rousseau A, Marquet P Influence of MRP2 (C-24T) SNP on MPA metabolic plasma ratios in renal transplant recipients. *Abstract in: Ther Drug Monit.* 2005; **27**: 246.
- 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**: 223-233.
- Eichelbaum M, Gross AS The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism--clinical aspects. *Pharmacol Ther* 1990; **46**: 377-394.
- Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA, Khan KK, He YA, Halpert JR, Wojnowski L Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 447-458.
- Evans WE, McLeod HL Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; **348**: 538-549.
- Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, Jusko WJ Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **61**: 416-428.
- Filler G, Mai I Limited sampling strategy for mycophenolic acid area under the curve. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 169-173.
- Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev* 2001; **33**: 273-297.
- Fukatsu S, Yano I, Igarashi T, Hashida T, Takayanagi K, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; **57**: 479-484.
- Funaki T Enterohepatic circulation model for population pharmacokinetic analysis. *J Pharm Pharmacol* 1999; **51**: 1143-1148.
- Fux R, Morike K, Prohmer AM, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E, Lorenz G, Gleiter CH, Eichelbaum M, Kivisto KT Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**: 378-387.
- Garcia Sanchez MJ, Manzanares C, Santos-Buelga D, Blazquez A, Manzanares J, Urruzuno P, Medina E Covariate effects on the apparent clearance of tacrolimus in paediatric liver transplant patients undergoing conversion therapy. *Clin Pharmacokinet* 2001; **40**: 63-71.

- Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, Garcia-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, Agundez JA CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**: 196-204.
- Girard H, Court MH, Bernard O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perusse L, Guillemette C Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 501-515.
- Gomeni R *Vial-NM user's Manual*. Montpellier, France: Research Development Population Pharmacokinetics, 1998.
- Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics* 1988; **2**: 174-179.
- Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M, Tanaka K, Inui K CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 471-478.
- Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K 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**: 451-457.
- Granfors MT, Wang JS, Kajosaari LI, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT Differential inhibition of cytochrome P450 3A4, 3A5 and 3A7 by five human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; **98**: 79-85.
- Guengerich FP *Human Cytochrome P450*, 1995. Plenum Press, New York.
- Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res* 2002; **500**: 103-110.
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 147-154.
- Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hoher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M, Schwab M 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**: 1501-1511.
- Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot RA Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 545-556.
- Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW, van Gelder T Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am J Transplant* 2005; **5**: 987-994.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **74**: 245-254.
- Hoem JM, Madsen D, Nielsen JL, Ohlsen EM, Hansen HO, Rennermalm B Experiments in modelling recent Danish fertility curves. *Demography* 1981; **18**: 231-244.
- Holthe M, Klepstad P, Zahlens K, Borchgrevink PC, Hagen L, Dale O, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the UGT2B7 H268Y and UGT1A1\*28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; **58**: 353-356.

- Holthe M, Rakvag TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J* 2003; **3**: 17-26.
- Human CYP allele nomenclature Committee. URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 773-779.
- Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ, Jones CE, Allen J, Franzen K, Falk MC, Nicol D The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 492-500.
- Jorga A, Johnston A Novel therapies in transplantation. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; **14**: 295-304.
- Kalow W *Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs*, 1962. Philadelphia.
- Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, Wojnowski L Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 2005; **51**: 1374-1381.
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Napoli KL, Kahan BD The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **63**: 48-53.
- Keown P, Kahan BD, Johnston A, Levy G, Dunn SP, Cittero F, Grino JM, Hoyer PF, Wolf P, Halloran PF Optimization of cyclosporine therapy with new therapeutic drug monitoring strategies: report from the International Neoral TDM Advisory Consensus Meeting (Vancouver, November 1997). *Transplant Proc* 1998; **30**: 1645-1649.
- Kershner RP, Fitzsimmons WE Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; **62**: 920-926.
- Kiberd BA, Lawen J, Fraser AD, Keough-Ryan T, Belitsky P Early adequate mycophenolic acid exposure is associated with less rejection in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1079-1083.
- Kim RB MDR1 single nucleotide polymorphisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 425-427.
- Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 83-95.
- Kobayashi M, Saitoh H, Tadano K, Takahashi Y, Hirano T Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **309**: 1029-1035.
- Kovarik JM, Hsu CH, McMahon L, Berthier S, Rordorf C Population pharmacokinetics of everolimus in de novo renal transplant patients: impact of ethnicity and comedications. *Clin Pharmacol Ther* 2001a; **70**: 247-254.
- Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, Lorber M, Winkler M, Rouilly M, Gerbeau C, Cambon N, Boger R, Rordorf C Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2001b; **69**: 48-56.
- Kovarik JM, Kalbag J, Figueiredo J, Rouilly M, Frazier OL, Rordorf C Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol* 2002; **42**: 95-99.
- Kovarik JM, Sabia HD, Figueiredo J, Zimmermann H, Reynolds C, Dilzer SC, Lasseter K, Rordorf C Influence of hepatic impairment on everolimus pharmacokinetics: implications for dose adjustment. *Clin Pharmacol Ther* 2001c; **70**: 425-430.

- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 481-494.
- Kronbach T, Fischer V, Meyer UA Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 1988; **43**: 630-635.
- Ku YM, Min DI An abbreviated area-under-the-curve monitoring for tacrolimus in patients with liver transplants. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 219-223.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383-391.
- Kusuhara H, Suzuki H, Sugiyama Y The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 1025-1040.
- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, Vanrenterghem Y Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 741-762.
- 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**: 351-361.
- Kyhl LE, Rasmussen SN, Aarons L, Jensen SB Population pharmacokinetics of cyclosporine: influence of covariables and assessment of cyclosporine absorption in kidney, lung, heart and heart + lung transplanted patients. *Transplant Proc* 1998; **30**: 1680.
- Le Guellec C, Bourgoin H, Buchler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P, Paintaud G Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 253-266.
- Le Guellec C, Buchler M, Giraudeau B, Le Meur Y, Gakoue JE, Lebranchu Y, Marquet P, Paintaud G Simultaneous estimation of cyclosporin and mycophenolic acid areas under the curve in stable renal transplant patients using a limited sampling strategy. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; **57**: 805-811.
- Leger F, Debord J, Le Meur Y, Rousseau A, Buchler M, Lachatre G, Paintaud G, Marquet P Maximum a posteriori Bayesian estimation of oral cyclosporin pharmacokinetics in patients with stable renal transplants. *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**: 71-80.
- Lin GF, Guo WC, Chen JG, Qin YQ, Golka K, Xiang CQ, Ma QW, Lu DR, Shen JH An association of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C802T (His268Tyr) polymorphism with bladder cancer in benzidine-exposed workers in China. *Toxicol Sci* 2005; **85**: 502-506.
- Macchi-Andanson M, Charpiat B, Jelliffe RW, Ducerf C, Fourcade N, Baulieux J Failure of traditional trough levels to predict tacrolimus concentrations. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 129-133.
- Macphee IA, Fredericks S, Jorga A, Shiferaw EW, Moreton M, Reboux S, Johnston A, Holt DW CYP3A5\*1 and MDR-1 genotypes do not influence cyclosporin dose requirements in stable renal transplant recipients. *WTC, Boston USA 1255* 2006.
- Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; **79**: 499-502.

- Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002; **74**: 1486-1489.
- MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**: 914-919.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977; **2**: 584-586.
- Mai I, Stormer E, Goldammer M, Johne A, Kruger H, Budde K, Roots I MDR1 haplotypes do not affect the steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003; **43**: 1101-1107.
- Marquet P, Risco E, Le Guellec C, Billaud EM *Suivi thérapeutique du mycophénolate mofétil*, 2004. Paris.
- Miller DS, Fricker G, Drewe J p-Glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **282**: 440-444.
- Min DI, Ellingrod VL C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 400-404.
- Min DI, Ellingrod VL Association of the CYP3A4\*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 305-309.
- Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, McLeod H CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 524-528.
- Monchaud C, Rousseau A, Leger F, David OJ, Debord J, Dantoine T, Marquet P Limited sampling strategies using Bayesian estimation or multilinear regression for cyclosporin AUC(0-12) monitoring in cardiac transplant recipients over the first year post-transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **58**: 813-820.
- Motulsky AG Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc* 1957; **165**: 835-837.
- Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, De Meyer M, Malaise J, Eddour DC, Lison D, Squifflet JP, Haufroid V Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005; **80**: 977-984.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **283**: 1552-1562.
- Parke J, Charles BG NONMEM population pharmacokinetic modeling of orally administered cyclosporine from routine drug monitoring data after heart transplantation. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 284-293.
- Parke J, Charles BG Factors affecting oral cyclosporin disposition after heart transplantation: bootstrap validation of a population pharmacokinetic model. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; **56**: 481-487.
- Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 938-944.
- Payen S, Zhang D, Maisin A, Popon M, Bensman A, Bouissou F, Loirat C, Gomeni R, Bressolle F, Jacqz-Aigrain E Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplant pediatric and adolescent patients. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 378-388.
- Picard N, Cresteil T, Premaud A, Marquet P Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 600-608.

- Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 139-146.
- Prémaud A Pharmacocinétique et suivi thérapeutique pharmacologique du mycophenolate mofétil dans le traitement anti-rejet de greffe. Université de Limoges, 2004,
- Premaud A, Debord J, Rousseau A, Le Meur Y, Toupance O, Lebranchu Y, Hoizey G, Le Guellec C, Marquet P A double absorption-phase model adequately describes mycophenolic acid plasma profiles in de novo renal transplant recipients given oral mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 2005a; **44**: 837-847.
- Premaud A, Le Meur Y, Debord J, Szelag JC, Rousseau A, Hoizey G, Toupance O, Marquet P Maximum a posteriori bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different postgrafting periods. *Ther Drug Monit* 2005b; **27**: 354-361.
- Ritter JK Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 2000; **129**: 171-193.
- Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, Eris J, Duggin G, Ray E, Trent RJ, Bishop JF Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; **56**: 395-398.
- Rosenbaum SE, Baheti G, Trull AK, Akhlaghi F Population pharmacokinetics of cyclosporine in cardiopulmonary transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 116-122.
- Rousseau A, Leger F, Le Meur Y, Saint-Marcoux F, Paintaud G, Buchler M, Marquet P Population pharmacokinetic modeling of oral cyclosporin using NONMEM: comparison of absorption pharmacokinetic models and design of a Bayesian estimator. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 23-30.
- Rousseau A, Monchaud C, Debord J, Vervier I, Estenne M, Thiry P, Marquet P Bayesian forecasting of oral cyclosporin pharmacokinetics in stable lung transplant recipients with and without cystic fibrosis. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 28-35.
- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Ozawa S, Ueno K, Kamakura S, Kamatani N, Komamura K, Kitakaze M, Sawada J Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 1048-1054.
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6077-6080.
- Saint-Marcoux F, Knoop C, Debord J, Thiry P, Rousseau A, Estenne M, Marquet P Pharmacokinetic study of tacrolimus in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis lung transplant patients and design of Bayesian estimators using limited sampling strategies. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 1317-1328.
- Saint-Marcoux F, Marquet P, Jacqz-Aigrain E, Bernard N, Thiry P, Le Meur Y, Rousseau A Patient characteristics influencing ciclosporin pharmacokinetics and accurate bayesian estimation of ciclosporin exposure in heart, lung and kidney transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2006; **45**: 905-922.
- Sam WJ, Aw M, Quak SH, Lim SM, Charles BG, Chan SY, Ho PC Population pharmacokinetics of tacrolimus in Asian paediatric liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2000; **50**: 531-541.
- Sandborn WJ, Lawson GM, Cody TJ, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Steers JL, Krom RA, Wiesner RH Early cellular rejection after orthotopic liver transplantation correlates with low concentrations of FK506 in hepatic tissue. *Hepatology* 1995; **21**: 70-76.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **67**: 48-56.

- Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 1992; **20**: 753-761.
- Sawyer MB, Innocenti F, Das S, Cheng C, Ramirez J, Pantle-Fisher FH, Wright C, Badner J, Pei D, Boyett JM, Cook E, Jr., Ratain MJ A pharmacogenetic study of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 in patients receiving morphine. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**: 566-574.
- Schadeli F, Marti HP, Frey FJ, Uehlinger DE Population pharmacokinetic model to predict steady-state exposure to once-daily cyclosporin microemulsion in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**: 59-69.
- Scholten EM, Cremers SC, Schoemaker RC, Rowshani AT, van Kan EJ, den Hartigh J, Paul LC, de Fijter JW AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005; **67**: 2440-2447.
- Schutz E, Armstrong VW, Shipkova M, Weber L, Niedmann PD, Lammersdorf T, Wiesel M, Mandelbaum A, Zimmerhackl LB, Mehls O, Tonshoff B, Oellerich M Limited sampling strategy for the determination of mycophenolic acid area under the curve in pediatric kidney recipients. German Study Group on MMF Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 1998; **30**: 1182-1184.
- Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999; **45**: 419-422.
- Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc* 1998; **30**: 2192-2194.
- Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 305-315.
- Shaw LM, Sollinger HW, Halloran P, Morris RE, Yatscoff RW, Ransom J, Tsina I, Keown P, Holt DW, Lieberman R, et al. Mycophenolate mofetil: a report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 690-699.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **270**: 414-423.
- Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Wieland E Acyl glucuronide drug metabolites: toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 1-16.
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schutz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1075-1082.
- Shipkova M, Wieland E, Schutz E, Wiese C, Niedmann PD, Oellerich M, Armstrong VW The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid inhibits the proliferation of human mononuclear leukocytes. *Transplant Proc* 2001; **33**: 1080-1081.
- Shum B, Duffull SB, Taylor PJ, Tett SE Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**: 188-197.
- Singh D, Alexander J, Owen A, Rustom R, Bone M, Hammad A, Roberts N, Park K, Pirmohamed M Whole-blood cultures from renal-transplant patients stimulated ex vivo show that the effects of cyclosporine on lymphocyte proliferation are related to P-glycoprotein expression. *Transplantation* 2004; **77**: 557-561.
- Snyder LH The inheritance of taste deficiency in man. *Ohio J. Sci.* 1932; **32**: 436-440.

- Staatz CE, Duffull SB, Kiberd B, Fraser AD, Tett SE Population pharmacokinetics of mycophenolic acid during the first week after renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**: 507-516.
- Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Lynch SV, Tett SE Toward better outcomes with tacrolimus therapy: population pharmacokinetics and individualized dosage prediction in adult liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; **9**: 130-137.
- Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Tett SE Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**: 660-669.
- Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, Kahan BD Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996; **62**: 986-994.
- Strassburg CP, Barut A, Obermayer-Straub P, Li Q, Nguyen N, Tukey RH, Manns MP Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J Hepatol* 2001; **34**: 865-872.
- 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**: 1311-1331.
- Tanigawara Y Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 137-140.
- Taylor PJ, Willis C, Salm P, Tett SE, Pillans PI Accurate estimation of mycophenolic acid AUC. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 301-302.
- Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Daly AK Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; **76**: 1233-1235.
- Thibaudeau J, Lepine J, Tojcic J, Duguay Y, Pelletier G, Plante M, Brisson J, Tetu B, Jacob S, Perusse L, Belanger A, Guillemette C Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. *Cancer Res* 2006; **66**: 125-133.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 7735-7738.
- Thummel KE, Wilkinson GR In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**: 389-430.
- Ting LS, Villeneuve E, Ensom MH Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit* 2006; **28**: 419-430.
- Tokui K, Kimata T, Uchida K, Yuasa H, Hayashi Y, Itatsu T, Nabeshima T Dose adjustment strategy for oral microemulsion formulation of cyclosporine: population pharmacokinetics-based analysis in kidney transplant patients. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 287-294.
- Tribut O, Lessard Y, Reymann JM, Allain H, Bentue-Ferrer D Pharmacogenomics. *Med Sci Monit* 2002; **8**: RA152-163.
- Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 1182-1187.
- Urien S Approches de population et modélisation en pharmacologie. *La lettre du Pharmacologue* 2002; **16**: 79-81.
- van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, Mathot RA Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 1083-1096.
- van Schaik RH, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism

- analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2000; **46**: 1834-1836.
- Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, Scheller D, Ersfeld D, Frick M, Fitzsimmons WE, Virji M, Jain A, Brayman KL, Shaked A Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2001; **41**: 542-551.
- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29**: 404-430.
- Vidal Rapamune (sirolimus). 2006.
- Vogel F Moderne Problem der Humangenetik. *Ergeb. Inn. Med. U. Kinderheilk.* 1959; **12**: 52-125.
- 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**: 1048-1052.
- Wacher VJ, Silverman JA, Wong S, Tran-Tau P, Chan AO, Chai A, Yu XQ, O'Mahony D, Ramtoola Z Sirolimus oral absorption in rats is increased by ketoconazole but is not affected by D-alpha-tocopheryl poly(ethylene glycol 1000) succinate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **303**: 308-313.
- Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, Olopade OI, Weber BL, Rebbeck TR (1998) Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk, in *Human mutation. Mutation in brief*.
- Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **68**: 82-91.
- Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**: 19-52.
- Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC Role of Mrp2 in the hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites: effect of cyclosporine. *Drug Metab Dispos* 2006; **34**: 261-266.
- Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**: 201-205.
- Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, Schutz E, Niedmann PD, Armstrong VW, Oellerich M Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin Biochem* 2000; **33**: 107-113.
- Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. *Cancer Res* 2004; **64**: 1190-1196.
- Willis C, Staatz CE, Tett SE Bayesian forecasting and prediction of tacrolimus concentrations in pediatric liver and adult renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2003; **25**: 158-166.
- Willis C, Taylor PJ, Salm P, Tett SE, Pillans PI Evaluation of limited sampling strategies for estimation of 12-hour mycophenolic acid area under the plasma concentration-time curve in adult renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 549-554.
- Wrighton SA, Stevens JC The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; **22**: 1-21.

- Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR, Meibohm B  
The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition  
in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003; **43**: 555-564.
- Yeung S, Tong KL, Tsang WK, Tang HL, Fung KS, Chan HW, Chan AY, Chan L Determination  
of mycophenolate area under the curve by limited sampling strategy. *Transplant Proc* 2001;  
**33**: 1052-1053.
- Zahir H, McLachlan AJ, Nelson A, McCaughan G, Gleeson M, Akhlaghi F Population  
pharmacokinetic estimation of tacrolimus apparent clearance in adult liver transplant  
recipients. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 422-430.
- Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q, Wang W Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes  
and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005; **37**: 178-181.
- Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, Boyle G, Law Y, Miller S, Lamba J,  
Burckart GJ Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5  
and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* 2003; **3**: 477-483.
- Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, Webber S, Ristich J, Dauber J,  
Iacono A, Grgurich W, Zaldonis D, McDade K, Zhang J, Burckart GJ Tacrolimus dosing in  
adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin  
Pharmacol* 2004; **44**: 135-140.