

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale BIO-SANTE

Faculté de Médecine

INSERM UMR-S850 (Laboratoire de pharmacologie médicale)

N°

Pré-document de THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : *Pharmacologie*

Présentée et soutenue par

Koukeb ROUGUIEG-MALKI

Le 07 Juillet 2010

Etudes des relations génotype-phénotype des enzymes du métabolisme et des transporteurs d'efflux des xénobiotiques

Directeurs de Thèse : Dr. Nicolas Picard et Pr. Pierre Marquet

Jury :

Rapporteurs :

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

Pr. Laurent Becquemont, Professeur-praticien hospitalier (Université de Paris-Sud)

Membres :

Dr. Delphine Allorge, Maître de conférence-praticien hospitalier (Université de Lille 2)

Pr. Pierre Marquet, Professeur-praticien hospitalier (Université de Limoges)

Dr. Nicolas Picard, Maître de conférence-praticien hospitalier (Université de Limoges)

Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement **Monsieur le Professeur Pierre Marquet** de m'avoir accueillie au sein de l'unité Inserm UMR-S850. Je vous remercie pour votre confiance, votre rigueur et votre aide pertinente et précieuse tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie également **Monsieur le Docteur Nicolas Picard** pour m'avoir encadré. Nicolas, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi : tu as été présent tout au long de ma thèse et tu as su rendre ce travail très intéressant. Je te remercie pour ta patience, ta rigueur qui offre un encadrement de grande qualité, ta gentillesse et ta disponibilité.

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

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

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

Madame le Docteur Delphine Allorge, j'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez voulu accorder à ce travail en acceptant de le juger et je suis honorée par votre présence dans mon jury.

Je tiens également à remercier l'équipe de la tumorothèque du CHU de Limoges, dirigée par le Professeur François Labrousse, avec qui nous avons collaboré pour initier et mener à bien le projet GenColon. Un grand merci à Karine Faucher pour sa gentillesse, son sérieux et sa disponibilité. Merci à Sandrine, Sylvain, Emilie et Daniel.

Je remercie François Ludovic Sauvage, le maître de la spectrométrie de masse, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils. Surtout n'hésites pas à me faire appel si l'autosampler tombe en panne !!!

Je remercie tous les membres de l'équipe Inserm UMR-S850 pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur : Patricia Festa, Olivier Gensburger, Jean-Hervé Comte, Virginie de Merindol, Anne-Laure Gagez, Jean-Batiste Woillard, Fabien Lamoureux, Aurélie Prémaud, Franck Saint-Marcoux et Annick Rousseau.

Je remercie tout le personnel du service de Pharmacologie, Toxicologie et de Pharmacovigilance du CHU de Limoges, plus particulièrement, Karen Poole, les ingénieurs Magali (Merci pour les stups...grâce à toi, j'ai pu finir ma thèse dans de bonnes conditions ☺), Sylvain, Pascale et Rozen, merci à tous pour votre sympathie et bonne humeur ; les attachés de recherche clinique Hélène Roussel et Fabrice Beavogui, merci pour votre aide, votre patience et votre disponibilité ; les techniciens Jean-Louis Dupuy, Franck Giraudie et Karine Delaune, je vous remercie pour votre aide et votre sympathie.

Je remercie aussi très chaleureusement les personnes sans qui rien n'aurait été possible, mes parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans tous mes projets, ainsi que ma sœur Rafika et son mari Yamen et mes frères Kamel, Fateh, Hayder, Soheib, Riadh et sa femme Fahima. Merci à mes petits choux Rami, Sérine, sans oublier Acil et Marwa, pour vos doses magiques.

Un merci tout particulier, à mon chéri Amine pour son amour, sa patience, sa gentillesse et son soutien sans faille durant toute cette période.

Je remercie également très fortement mes beaux-parents, ma mamie Saâda, Hikma, Bayou, Lylou, Amina, Didine et toute la famille.

Je n'oserai pas oublier le reste de ma famille : oncles, tantes, cousines et cousins ; je vous remercie pour votre amour et vos encouragements.

Je remercie très chaleureusement tous mes amis qui m'ont aidé, entouré et encouragé : Fella, Aziza, Khaled, Assia, Hanane, Wahiba, Anouar, Fatima Zohra et Habib.

Résumé

Dans l'organisme, la détoxification des xénobiotiques (médicaments, carcinogènes, ...) fait intervenir des enzymes de métabolisme de phase I et II ainsi que des transporteurs d'efflux. Nos travaux ont porté sur plusieurs aspects des relations génotype-phénotype de ces enzymes et transporteurs. Nous avons montré que le polymorphisme fonctionnel du cytochrome P450 (CYP) 3A5 (enzyme de phase I), *CYP3A5*3* n'avait pas d'effet sur le métabolisme d'un immunosuppresseur, l'évérolimus, *in vitro* et chez 30 patients transplantés rénaux. L'étude de l'implication des UDP-glucuronosyltransférases (UGT ; enzymes de phase II) dans le métabolisme de la buprénorphine (traitement substitutif aux opiacés) a montré que les isoformes impliquées étaient les UGT 1A1, 1A3 et 2B7. Nous avons également montré *in vitro* que chez les porteurs du génotype *UGT1A1*1/*1*, la présence d'au moins un allèle muté du polymorphisme *UGT2B7 G-842A* était associée à une activité élevée de glucuroconjugaison de la buprénorphine. Nous avons développé une méthode « cocktail » pour évaluer l'activité de cinq UGTs hépatiques (1A1, 1A4, 1A6, 1A9 et 2B7) *in vitro*. Cette approche repose sur la mesure simultanée de l'activité enzymatique de plusieurs enzymes après incubation d'un mélange de substrats sélectifs en présence de microsomes hépatiques humains. Cette méthode a été utilisée pour évaluer l'effet inhibiteur de la buprénorphine sur l'activité de ces cinq UGT. Enfin, une étude rétrospective de l'association entre les polymorphismes génétiques des UGT 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 2B7 et de transporteurs d'efflux (MDR1 et MRP2) et la survenue du cancer colorectal (CCR) a été réalisée en comparant des cas (atteints de cancer colorectal) à deux groupes de témoins (malades atteints de cancer rénal ou volontaires sains). Trois polymorphismes du gène *ABCB1/MDR1* (C1236T, G2677T et C3435T) ainsi que son haplotype triplement muté sont significativement liés à une plus faible incidence du CCR. Nous retrouvons également, pour la première fois, une association entre ce cancer et certains haplotypes du gène *ABCC2/MRP2*. Ces travaux apportent des connaissances, d'une part sur l'impact de polymorphismes génétiques sur le métabolisme de médicaments et d'autre part sur leur implication potentielle dans le développement du CCR.

Mots-clés : xénobiotique, détoxification, génotype, phénotype, spectrométrie de masse

Abstract

In the body, the detoxification of xenobiotics (drugs, carcinogens ...) involves phase I and II biotransformation enzymes, as well as efflux transporters. We investigated several aspects of the genotype-phenotype relationships of these enzymes and transporters. We showed that the functional polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 3A5 (Phase I enzyme), CYP3A5*3 has no influence on the metabolism of the immunosuppressive drug everolimus, in vitro and among 30 kidney transplant patients. We found that the UDP-glucuronosyltransferase (UGT; phase II enzymes) isoforms involved in the metabolism of buprenorphine (opioid replacement therapy) are the UGT 1A1, 1A3 and 2B7. Moreover, we showed in vitro that among UGT1A1*1/*1 genotype carriers, the presence of at least one UGT2B7 G-842A mutated allele was associated with an increased buprenorphine glucuronidation activity. We developed an in vitro « cocktail » method to evaluate the hepatic activity of five UGTs (1A1, 1A4, 1A6, 1A9 and 2B7). This approach consists in the simultaneous estimation of several enzyme activities after incubation of a mixture of selective substrates with human liver microsomes. We used this method to evaluate the inhibitory effect of buprenorphine on these five UGT activities. Finally, we retrospectively investigated the association between common polymorphisms in the genes coding UGT 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 and 2B7 and efflux transporters (MDR1 and MRP2) and colorectal cancer (CRC) by comparing cases (colorectal cancer patients) to two control groups (patients suffering from kidney cancer or healthy volunteers). Three polymorphisms of the MDR1/ABCB1 gene (C1236T, G2677T and C3435T) as well as its triple mutant haplotype were significantly related to a very low incidence of CRC. We also found for the first time an association between this cancer and MRP2/ABCC2 gene haplotypes. These investigations provide knowledge about polymorphisms impact on drug metabolism and potential involvement in CRC.

Key-words: xenobiotic, detoxification, genotype, phenotype, mass spectrometry

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|------------|
| INTRODUCTION | 12 |
| I. ETAT DE L'ART - REVUE DE LITTERATURE | 15 |
| 1. Enzymes du métabolisme et transporteurs d'efflux | 15 |
| 1.1. Les enzymes de phase I..... | 15 |
| 1.1.1. Localisation et régulation de l'expression des cytochromes P450 | 16 |
| 1.1.2. Contribution des CYP3A au métabolisme hépatique et intestinal..... | 17 |
| 1.1.3. Contribution des polymorphismes des CYP3A à la variabilité pharmacocinétique inter-individuelle des immunosuppresseurs | 20 |
| 1.2. Les enzymes de phase II | 26 |
| 1.2.1. La réaction de glucuroconjugaison..... | 26 |
| 1.2.2. Nomenclature et classification des UDP-glucuronosyltransférases | 27 |
| 1.2.3. Localisation et structure des UDP-glucuronosyltransférases | 28 |
| 1.2.4. Distribution tissulaire | 31 |
| 1.2.5. Variabilité génétique des UGT et implication pharmacologique | 33 |
| 1.3. Transporteurs d'efflux..... | 44 |
| 1.3.1. Mécanisme de transport à travers l'épithélium intestinal..... | 45 |
| 1.3.2. Les transporteurs ABC intestinaux..... | 46 |
| 1.3.3. La P-glycoprotéine | 48 |
| 1.3.4. MRP2 et MRP3 | 52 |
| 1.3.5. La BCRP | 54 |
| 2. Méthodes de phénotypage <i>in vitro</i> des enzymes de métabolisme | 57 |
| 2.1. Généralités | 57 |
| 2.2. Principaux modèles biologiques d'étude de métabolisme <i>in vitro</i> | 58 |
| 2.2.1. Enzymes recombinantes..... | 58 |
| 2.2.2. Fractions subcellulaires | 59 |
| 2.2.3. Culture cellulaire | 61 |
| 2.2.4. Coupes tissulaires..... | 62 |
| 2.2.5. Organe isolé perfusé..... | 63 |
| 2.3. Approches d'étude de métabolisme <i>in vitro</i> | 64 |
| 2.3.1. Identification des enzymes responsables d'une réaction enzymatique..... | 64 |
| 2.3.2. Extrapolation <i>in vitro-in vivo</i> | 68 |
| 2.3.3. Prédiction des interactions médicamenteuses..... | 73 |
| 2.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse..... | 76 |
| 2.4.1. Séparation par chromatographie liquide..... | 77 |
| 2.4.2. Détection par spectrométrie de masse | 77 |
| 2.4.3. Identification et caractérisation des métabolites..... | 79 |
| 2.4.4. Quantification des métabolites | 81 |
| II. TRAVAUX PERSONNELS | 82 |
| 1. Influence du polymorphisme du CYP3A5 (<i>CYP3A5*1/*3</i>) sur le métabolisme hépatique et la pharmacocinétique de l'évérolimus (article 1) | 83 |
| 2. Contribution des UGT au métabolisme de la buprénorphine et la norbuprénorphine et relation avec leur polymorphisme génétique <i>in vitro</i> (article 2) | 102 |
| 3. Développement d'une méthode CL-SM/SM pour l'évaluation simultanée des activités de glucuroconjugaison <i>in vitro</i> | 111 |
| 3.1. Matériels et Méthodes..... | 112 |
| 3.1.1. Enzymes et microsomes | 112 |
| 3.1.2. Protocole d'incubation | 112 |
| 3.1.3. Détermination de la spécificité des substrats..... | 113 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.1.4. | Méthode analytique | 114 |
| 3.1.5. | Application du cocktail : détermination de l'effet de la buprénorphine sur l'activité des UGT... | 114 |
| 3.2. | Résultats | 114 |
| 3.2.1. | Développement de la méthode analytique..... | 114 |
| 3.2.2. | Spécificité des substrats | 116 |
| 3.2.3. | Incubation en cocktail versus incubation individuelle..... | 118 |
| 3.2.4. | Application de la méthode : évaluation de l'effet inhibiteur de la buprénorphine sur l'activité des UGT hépatiques..... | 120 |
| 3.3. | Discussion et conclusion | 121 |
| 4. | Etude rétrospective de l'association entre les polymorphismes des enzymes de glucuroconjugaison et des transporteurs des xénobiotiques et la survenue du cancer colorectal..... | 123 |
| 4.1. | Matériels et Méthodes | 123 |
| 4.1.1. | Sujets de l'étude | 123 |
| 4.1.2. | Echantillons d'ADN et analyse génétique..... | 124 |
| 4.1.3. | Analyses statistiques | 125 |
| 4.2. | Résultats | 125 |
| 4.2.1. | Démographie | 125 |
| 4.2.2. | Analyse génotypique | 125 |
| 4.2.3. | Analyse haplotypique | 127 |
| 4.3. | Discussion et perspectives | 127 |
| | CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE | 132 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 136 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------------|--|
| ABC | <u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette |
| ADN | <u>A</u> cide <u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique |
| ARNm | <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>n</u> ucléique <u>m</u> essenger |
| ATP | <u>A</u> dénosine <u>T</u> riphosphate |
| AUC | Aire sous la courbe (<u>A</u> rea <u>U</u> nder the <u>C</u> urve) |
| CsA | Ciclosporine A |
| CL_{int} | <u>C</u> lairance <u>I</u> ntrinsèque |
| C_{max} | <u>C</u> oncentration <u>m</u> aximale |
| CYP | <u>C</u> ytochrome <u>P</u> 450 |
| CL | <u>C</u> hromatographie <u>L</u> iquide |
| MDR | <u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance protein |
| MFH | <u>M</u> icrosomes de <u>F</u> oie <u>H</u> umain |
| MIH | <u>M</u> icrosomes d' <u>I</u> ntestin <u>H</u> umain |
| MRP | <u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein |
| NADP(H) | <u>N</u> icotinamide <u>A</u> dénine <u>D</u> inucléotide <u>P</u> hosphate (Hydrogéné ou forme réduite) |
| S₅₀ | Concentration du substrat à laquelle la V _{max} est atteinte cinétique de Hill |
| SM | <u>S</u> pectrométrie de <u>M</u> asse |
| SNP | Mutation ponctuelle (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucléotide <u>P</u> olymorphism) |
| UDP-GlcA | <u>U</u> DP- <u>G</u> lucuronic <u>A</u> cid |
| UGT | <u>U</u> DP- <u>G</u> lucuronosyl <u>T</u> ransférase |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Nomenclature des cytochromes P450..... | 16 |
| Figure 2 : Structure putative d'une protéine UGT. (A) Structure primaire des domaines fonctionnels d'une UGT. (B) Représentation de la structure d'une UGT emboîtée dans la membrane du réticulum endoplasmique..... | 29 |
| Figure 3 : Représentation graphique du locus UGT1A. Seul un exon 1 variable est joint aux 4 exons communs 2-5 lors de la transcription..... | 30 |
| Figure 4 : Représentation graphique du locus UGT2 (4q13) et des gènes le composant. La taille des introns est variable, tandis que celle des exons est conservée à travers le locus. | 31 |
| Figure 5 : Comparaison des modèles biologiques utilisés pour l'étude de métabolisme <i>in vitro</i> | 57 |
| Figure 6 : Illustration de l'isolement des fractions subcellulaires..... | 59 |
| Figure 7 : Approche d'identification de l'enzyme impliquée dans une voie métabolique (Court, 2004) | 64 |
| Figure 8 : La vitesse (V) de transformation du produit versus la concentration du substrat ([S]) (courbes de gauche) et la transformation de Eadie-Hofstee correspondante (courbes à droite) pour les réactions Michaéliennes à une (A) ou deux enzymes (B) ; d'auto-inhibition (C) ; et d'auto-activation (D)..... | 69 |
| Figure 9 : Chromatogrammes d'ions extraits par CL-SM/SM. L'échantillon analysé contenait l'ensemble des 6 substrats (ETO, LOR, TFP, SER, MEF et AZT) et leur glucuroconjugué respective..... | 115 |
| Figure 10 : Test de spécificité des substrats sélectionnés pour la méthode de cocktail. Chaque substrat a été incubé individuellement avec les six enzymes recombinantes à phénotyper par la méthode de cocktail. A) Etoposide (250 µM), B) Lorazepam (100 µM), C) Trifluopérazine (80 µM), D) Acide méfénamique (140 µM) et E) Azidothymidine (200 µM). | 117 |

Figure 11 : Effet inhibiteur de l'estradiol (inhibiteur spécifique de l'UGT1A1) sur le métabolisme du MEF incubé seul ou avec l'ETO dans les MFH. L'inhibition de la glucuroconjugaison de l'ETO, substrat sonde de l'UGT1A1 incubé seul ou avec le MEF, a été utilisé comme un contrôle. 118

Figure 12 : Comparaison des résultats obtenus par incubation des six substrats en cocktail ou individuellement à différents niveaux de concentrations : A) faibles, B) intermédiaires et C) fortes. 119

Figure 13 : Comparaison des résultats obtenus par incubation des substrats seuls ou en sous-cocktails (un sous-cocktail incluant ETO, TFP et MEF et l'autre incluant SER et AZT). 120

Figure 14 : Etude de l'effet inhibiteur de la buprénorphine sur l'activité des UGT hépatiques en utilisant le cocktail. 121

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Réaction métabolique et changement de masse associé (Kostiainen et al., 2003)..... | 79 |
| Tableau 2 : Liste des UGT et de leurs substrats spécifiques sélectionnés | 112 |
| Tableau 3 : Temps de rétention et transitions MRM des substrats et des glucuroconjugués étudiés..... | 115 |
| Tableau 4 : Liste des polymorphismes génétiques analysés | 124 |
| Tableau 5 : Analyse univariée de l'association entre les polymorphismes sélectionnés et le cancer colorectal. Résultats obtenus suite à la comparaison des cas aux témoins atteints de cancer rénal. | 126 |
| Tableau 6 : Analyse univariée de l'association entre les polymorphismes sélectionnés et le cancer colorectal. Résultats obtenus suite à la comparaison des cas aux volontaires sains... | 127 |

INTRODUCTION

Dans l'organisme, le métabolisme et/ou la détoxification de tout composé exogène (xénobiotique) incluant médicaments et carcinogènes environnementaux, constituent le rôle principal des enzymes de métabolisme ainsi que les transporteurs d'efflux. Le métabolisme de xénobiotiques est, par conséquent, divisé en trois phases qui aboutissent au final à l'élimination dans la bile et l'urine. La première étape de cette biotransformation dite « Phase I de métabolisme » est catalysée essentiellement par les cytochromes P450 (CYP). Elle représente une étape de fonctionnalisation en apportant des modifications simples à la molécule d'origine, l'hydroxylation étant la transformation la plus fréquente. Les métabolites qui en résultent sont souvent nombreux (c'est le cas pour les immunosuppresseurs) et peuvent posséder à divers degrés l'activité de la molécule mère. Pour les substances de l'environnement, cette étape représente souvent la transformation d'une molécule inoffensive en une molécule cancérogène. Cette phase de métabolisme précède souvent, mais pas systématiquement, diverses étapes de conjugaison regroupées sous le terme de « Phase II de métabolisme » et catalysées entre autres par les enzymes de la famille des UDP-Glucuronosyltransférases (UGT). Les glutathione-S-transférases, les sulfotransférases et les acétyltransférases font également partie des enzymes qui interviennent dans cette phase de métabolisme. Cette étape de conjugaison est nécessaire pour rendre les composés plus hydrophiles et appropriés pour une excrétion dans l'urine ou la bile.

A l'échelle cellulaire, ces enzymes de phase I et II sont principalement présentes dans le réticulum endoplasmique lisse (enzymes microsomales) et/ou dans le cytoplasme (enzymes cytosoliques). A l'échelle tissulaire, la biotransformation des substances endogènes et des xénobiotiques a lieu dans les tissus contenant ces enzymes de métabolisme. Indépendamment des mécanismes d'absorption, les molécules administrées par voie orale traversent la barrière gastro-intestinale et le foie en empruntant le système porte. Par la suite et avant d'atteindre la circulation systémique, le substrat est transporté par voie sanguine (veines sus-hépatiques et artère pulmonaire) et il passe par les poumons. Par conséquent, le foie, l'intestin et les poumons représentent les organes les plus riches en enzymes et ils peuvent contribuer à différents degrés au métabolisme de xénobiotiques.

Plusieurs études ont démontré que le transport de composés vient compléter ce système de métabolisme et de défense contre les xénobiotiques. Les transporteurs d'efflux réduisent la charge locale cellulaire de composés toxiques, renforçant ainsi la protection de la cellule contre les effets toxiques. Ces transporteurs sont essentiellement exprimés dans la membrane apicale des cellules épithéliales (comme les entérocytes) qui sont exposées aux xénobiotiques. Dans ces cellules, les mêmes transporteurs peuvent d'une part réduire l'entrée de xénobiotiques et d'autre part éliminer leurs produits de détoxification. Cette étape est dite « Phase III de métabolisme » montrant la complémentarité des étapes d'oxydation, de conjugaison et d'extrusion. La toute première fonction consistant en l'expulsion directe de xénobiotiques rentrant dans la cellule, elle représente la première ligne de défense contre les xénobiotiques et de même pourrait être nommée « Phase 0 de métabolisme ».

Différents facteurs interviennent dans la modulation et la régulation des enzymes du métabolisme et des transporteurs. Ces facteurs peuvent être endogènes (ex. polymorphismes génétiques) ou exogènes (ex. induction, inhibition et états pathologiques) et contribuent aux variations inter- et intra-individuelles de la capacité métabolique. Ces régulations peuvent se traduire ainsi par une altération de la clairance et donc le taux sérique des xénobiotiques. De nombreuses pathologies ont été également associées au polymorphisme génétique de ces enzymes et/ou transporteurs.

Ce travail de thèse portait sur plusieurs aspects des relations génotype-phénotype de ces enzymes et transporteurs. Ces aspects ont été abordés de façon expérimentale (modèles d'étude *in vitro* du métabolisme) et clinique.

Les objectifs étaient :

- d'étudier l'influence du polymorphisme *CYP3A5*3* sur le métabolisme de l'évérolimus,
- d'identifier les UGT impliquées dans le métabolisme de la buprénorphine et d'étudier par la suite les relations génotype-phénotype entre les polymorphismes de ces UGT et le métabolisme de la buprénorphine,
- de développer une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour la détermination simultanée de cinq activités de glucuroconjugaison *in vitro* (approche « cocktail »). Cette méthode sera la base d'études futures des relations génotype-phénotype des UGT *in vitro* ;

- et enfin, de rechercher des associations entre les polymorphismes génétiques des enzymes de phase II et des transporteurs d'efflux et la survenue du cancer colorectal.

La première partie de ce mémoire présente une étude bibliographique sur les enzymes de métabolisme de phase I et II et les transporteurs d'efflux. Dans la seconde partie, nous décrirons les méthodes et les techniques analytiques pour l'étude du métabolisme *in vitro*. La troisième partie porte sur la présentation des résultats de nos travaux personnels. Enfin, la discussion envisage l'impact de ces résultats sur la contribution et l'importance de la génétique dans le domaine médical.

I. ETAT DE L'ART - REVUE DE LITTERATURE

1. Enzymes du métabolisme et transporteurs d'efflux

1.1. Les enzymes de phase I

Le but des réactions de phase I est de rendre les substrats plus hydrophiles afin de favoriser leur élimination en y introduisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique (ex. oxydation aromatique ou aliphatique) ou en dégageant des groupements hydrophiles, comme des amines primaires (-NH₂), sulfhydryles (-SH) ou carboxyles (-COOH) déjà présents sous forme masquée sur le composé parent pour augmenter la polarité (ex. désacétylation, déhalogénéation).

Les enzymes responsables de la phase I sont principalement les CYP. Ces derniers sont des monooxygénases dites aussi « hémio-thiolates », apportant donc des électrons au substrat. Ces électrons sont fournis par le NADPH via la réduction du CYP par une enzyme dite NADPH-cytochrome P450 réductase ou par un autre système redox faisant intervenir le NADH et le cytochrome b₅. Les CYP sont localisés dans le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule et ce sont des enzymes transmembranaires.

Le séquençage du génome humain a révélé la présence de 115 gènes CYP humains : 57 actifs et 58 pseudo-gènes (Nelson, 2006) (Figure 1).

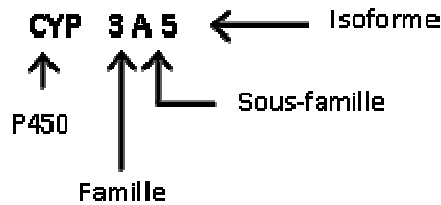


Figure 1 : Nomenclature des cytochromes P450

Les CYP jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de composés endogènes (comme les stéroïdes, les acides gras et les prostaglandines) ou exogènes (comme les médicaments, les carcinogènes et autres polluants environnementaux).

1.1.1. Localisation et régulation de l'expression des cytochromes P450

Chez les mammifères, les CYP sont les plus abondants au niveau du foie, en quantité et en diversité. Le foie est le premier organe, après l'intestin grêle, à être en contact avec les xénobiotiques via le système veineux porte. Ses fonctions de synthèse et de détoxification ne sont en fait que le reflet macroscopique des acteurs principaux de l'échelle microscopique : les CYP. Ces derniers sont donc présents en nombre abondant dans le foie, et sont plus précisément localisés dans les membranes du RE des hépatocytes (Stier, 1976). Le RE est en effet une structure lipidique particulière, très favorable aux échanges et disposant d'une surface étonnamment large (comprenant 7 à 11 m²/g du poids du foie) comparé à son volume, ce qui fait de lui la structure idéale pour héberger les enzymes de phase I et II de métabolisme (Lewis and Pratt, 1998). Sachant que 12 à 15% du RE est composé de CYP, on peut estimer approximativement que les CYP comptent pour un peu moins de 1% du poids total d'un hépatocyte (Ruckpaul and Rein, 1984).

Au sein de la membrane du RE, des études stœchiométriques ont suggéré que les CYP se regrouperaient par six ou par huit autour d'une réductase, un partenaire fournisseur en électrons (Schwardz, 1991). Ces unités hexamériques (ou octamériques) subissent alors une diffusion transversale à l'intérieur de cette membrane phospholipidique du RE, elle-même sujette à une diffusion latérale au moyen du « flip-flop ». Par conséquent, les substrats

relativement lipophiles se retrouvent alors facilement acheminés vers le centre réactionnel des CYP afin d'y être métabolisés.

Bien que majoritairement concentrés au niveau du foie, les CYP sont également exprimés dans d'autres organes et tissus tels que le rein, les seins, la prostate, la peau, l'épithélium nasal, le placenta, le cerveau, le poumon, la rate, le pancréas et la région gastro-intestinale (Hakkola et al., 1998; Hellmold et al., 1998; Waterman, 1992; Williams et al., 2000). Toutefois, même si les CYP sont identifiés dans ces autres organes, ils demeurent en concentration faible et leur participation dans les biotransformations de xénobiotiques n'est pas bien définie dans certaines localisations.

En raison de leur diversité, tant au niveau de leurs localisation, sélectivité et réactivité vis-à-vis des substrats entre les espèces (Guengerich, 1997), il est relativement difficile d'étudier cette superfamille. Parfois, au sein même des mammifères, des différences de comportements, d'inductibilité et de sélectivité sont observées (Lewis et al., 1998; Smith, 1991). En conséquence, il peut être parfois très difficile d'extrapoler à l'homme des résultats obtenus à partir d'expériences menées sur des rongeurs, par exemple (Lewis et al., 1998). On sait par ailleurs qu'il existe chez les mammifères des différences de niveaux d'expression des CYP en fonction du sexe (Schenkman et al., 1967) et du régime alimentaire (Ioannides, 1999). Il existe enfin une variation de facteurs cellulaires contrôlant l'expression de ces CYP dans les tissus, qui conduit à différents niveaux d'expression de ces enzymes dans les différents tissus (Wolff and Strecker, 1992).

1.1.2. Contribution des CYP3A au métabolisme hépatique et intestinal

La sous-famille CYP3A revêt une grande importance étant donné son niveau d'expression élevé au sein des principaux organes de métabolisme, tels le foie et l'intestin grêle, et son rôle dans le métabolisme d'une grande diversité de médicaments. Au niveau intestinal, le CYP3A est le plus abondant avec un contenu spécifique moyen représentant entre 50 et 70% de la quantité des CYP (Paine et al., 2006). Il convient de signaler toutefois que peu de données existent quant à l'importance et l'abondance des autres CYP dans l'intestin. Comme le CYP3A hépatique, le CYP3A entérique est localisé dans un seul type cellulaire, les cellules épithéliales cylindriques matures absorbantes (les entérocytes) qui composent la muqueuse

limitante. Le contenu microsomal entérique en CYP3A, aussi bien que l'activité catalytique associée, sont généralement plus importants dans la région proximale et ensuite déclinent nettement vers l'iléon distal (Paine et al., 1997; Zhang et al., 1999). En commun également avec le CYP3A hépatique, le CYP3A entérique présente une variabilité interindividuelle significative, avec des valeurs contenu/activité spécifique (duodénum/jéjunum proximal) dans la zone proximale chevauchantes avec celles du foie (Paine et al., 1997). Bien que la masse totale de CYP3A dans l'intestin grêle soit estimée à environ 1% de celle du foie (Yang et al., 2004), les études chez l'homme ont démontré que le CYP3A peut contribuer significativement, et dans certains cas à parts égales avec le CYP3A hépatique, au métabolisme de premier passage de plusieurs médicaments (ex. ciclosporine, midazolam et vérapamil) (Paine et al., 1996; von Richter et al., 2001). Tous ces substrats sont absorbés par voie transcellulaire. Par conséquent, le passage apparent obligatoire de molécules à travers les entérocytes, couplé avec le ratio contenu/activité de CYP3A microsomal comparable à celui du foie, peut être plus important dans l'estimation du métabolisme de premier passage intestinal, que la prise en compte de la masse totale d'enzymes.

Cinq membres constituent cette sous-famille : CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 et plus récemment identifié le CYP3A43 (Gellner et al., 2001). En ce qui a trait au CYP3A3, des résultats suggèrent que cette isoenzyme représente tout simplement un variant allélique du CYP3A4, en raison du degré d'homologie élevé (97%) dans leurs séquences avec seulement 11 acides aminés différents (Wilkinson, 1996). Les isoenzymes ayant un intérêt particulier en clinique, CYP3A4 et CYP3A5, présentent aussi un degré important d'homologie dans leur séquence nucléotidique (89%) (Smith et al., 1998). Enfin, le CYP3A7 est exprimé majoritairement chez le fœtus, le nouveau-né et dans le placenta ou le tissu endométrial, puis disparaît dans les premières semaines de vie au profit du CYP3A4 (Schuetz et al., 1993).

Le rôle relatif de l'activité CYP3A hépatique versus intestinale dans la clairance des médicaments après administration orale ou intraveineuse est difficile à évaluer, et une telle estimation a été généralement basée sur les déterminations *in vitro* des taux d'expression de CYP3A ou des activités dans des microsomes intestinaux ou hépatiques, ou encore par des modèles de prédiction en incorporant les données expérimentales obtenues *in vitro* et/ou *in vivo*. Chez les caucasiens, la concentration d'ARN messager (ARNm) du CYP3A4 est 24-fois plus élevée dans le foie que dans l'intestin grêle (Koch et al., 2002). Pour le CYP3A5 (*1A/*3A), un rapport similaire a été retrouvé. Toujours chez des caucasiens, le contenu microsomal de la protéine CYP3A dans le foie et l'intestin grêle était de 70,4 (de 5,6 à 381)

dans le foie et de 18,7 (de 0,5 à 34,1) pmol/mg de protéines microsomales dans un homogénat jéjunal (Lin et al., 2002). De plus, comparés aux hépatocytes, les entérocytes représentent également une très faible quantité de tissu. En conséquence, le foie aurait un rôle dominant dans le métabolisme du premier passage des substrats du CYP3A4 (Lin et al., 1999). Les corrélations entre le contenu microsomal hépatique de CYP3A ou les résultats du test respiratoire à l'érythromycine dit « erythromycin breath test [EBT] » (mesure de l'activité hépatique de CYP3A4 après administration intraveineuse d'érythromycine) et la clairance systémique de plusieurs substrats de CYP3A, ont par la suite confirmé le rôle important de CYP3A hépatique dans le métabolisme. Cependant, le rôle relatif de CYP3A intestinal dans le métabolisme de médicaments reste à déterminer *in vivo*.

Les activités CYP3A hépatique et intestinale ne sont pas forcément corrélées et peuvent même être inversement corrélées au plan individuel (Gorski et al., 2003; Mouly et al., 2005). Il y a une dizaine d'années, il a été proposé d'évaluer indirectement le métabolisme intestinal en analysant la corrélation entre les concentrations plasmatiques de médicament obtenues après administration orale d'un médicament substrat de CYP3A et l'activité hépatique de CYP3A4 estimée par EBT (Hall et al., 1999). Une bonne corrélation entre le résultat de l'EBT et l'exposition systémique au substrat testé indiquerait que le site le plus important du métabolisme d'un substrat est le foie et pas l'intestin. Une mauvaise corrélation, en revanche, pourrait indiquer un rôle pour le CYP3A intestinal dans le métabolisme. Une minutieuse et éclairante étude basée sur cette approche chez des volontaires a montré que la féلودipine peut subir un métabolisme substantiel dans les entérocytes durant l'absorption (Lown et al., 1997). L'administration orale de jus de pamplemousse, un inhibiteur de CYP3A, a augmenté significativement la biodisponibilité orale de la féلودipine (augmentation de 3,1-fois de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps [AUC] et de 4,3-fois de la concentration maximale plasmatique [C_{max}]) et causé une diminution concomitante de l'activité CYP3A4 dans les entérocytes. Comme la clairance intraveineuse (estimée par EBT) n'a pas été altérée par la coadministration du jus de pamplemousse, il a été déduit que la disponibilité orale élevée de la féلودipine n'était pas le résultat de la diminution de l'activité hépatique de CYP3A mais celui de l'inhibition de CYP3A4 intestinale. Apparemment, le jus de pamplemousse inhibe principalement le CYP3A au niveau intestinal mais pas dans le foie. Ces constatations suggéraient donc que le CYP3A intestinal contribue d'une manière importante au métabolisme de premier passage de la féلودipine. L'importance relative du foie et de l'intestin dans le métabolisme de premier passage a été également explorée avec la

ciclosporine (CsA) et le midazolam chez des patients transplantés hépatiques durant la phase anhépatique de leur opération (Kolars et al., 1991;Paine et al., 1996). Le métabolisme de premier passage intestinal de ces deux médicaments était considérable. Environ 43% de la dose de midazolam administrée duodénalement ont atteint le sang portal sous forme du principal métabolite hydroxylé (Paine et al., 1996). Curieusement, toutefois, sur la base des quantités totales calculées de CYP3A dans l'intestin grêle ou le foie humains et des CL_{int} du midazolam mesurées dans les microsomes hépatiques et intestinaux, la capacité totale de la CL_{int} de l'intestin grêle entier a été estimée à seulement 1,4% de celle du foie humain moyen. Cela indique une vaste divergence apparente avec les résultats obtenus *in vivo* chez les patients anhépatiques décrits antérieurement. Cependant, les anomalies techniques en mesurant spécifiquement le contenu protéique et l'activité de CYP3A intestinal ne peuvent être exclues. Ces résultats illustrent la difficulté de réaliser une évaluation appropriée du métabolisme hépatique ou intestinal en se basant sur une extrapolation des données *in vitro*. Il est probable que des facteurs non pris en compte dans les études microsomales, comme la circulation sanguine hépatique et intestinale, les protéines plasmatiques fixatrices de médicaments, les interactions entre la capture de médicament, les systèmes d'efflux et de métabolisme et le positionnement relatif du CYP3A dans l'organisme, ont un rôle très important dans la contribution relative au métabolisme du premier passage.

En conclusion, les études susmentionnées et d'autres réalisées comme par exemple sur la CsA par Wu et col. (Wu et al., 1995) fournissent diverses indications que le CYP3A puisse contribuer substantiellement au métabolisme intestinal de premier passage d'un panel de médicaments.

1.1.3. Contribution des polymorphismes des CYP3A à la variabilité pharmacocinétique inter-individuelle des immunosuppresseurs

La majorité des médicaments immunosuppresseurs (IS) présentent un index thérapeutique étroit et une large variabilité interindividuelle de leurs profils pharmacocinétique et pharmacodynamique. Toute sous-immunosuppression s'accompagne du risque de perte de greffon, ou toute sur-immunosuppression de celui d'effets indésirables ou de toxicité. L'optimisation du régime immunosuppresseur est extrêmement importante, puisque un échec

d'individualisation convenable d'un tel régime peut perturber la balance entre la sur-immunosuppression et le rejet (Burckart et al., 2006). Le suivi thérapeutique pharmacologique de plusieurs IS est utilisé afin de contribuer efficacement à l'amélioration du rapport bénéfice/risque.

La pharmacogénétique (PG) étudie l'influence des variations génétiques sur le devenir et/ou la réponse aux médicaments en recherchant les relations entre l'expression du gène ou ses mutations ponctuelles (ou single nucleotide polymorphisms, SNPs) avec leur efficacité ou leur toxicité. En effet, certains variants alléliques de gènes codant pour des enzymes du métabolisme, des transporteurs ou des protéines cibles intervenant dans le devenir et les effets des médicaments dans l'organisme, peuvent, au moins partiellement, être responsables de certaines variabilités pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques observées pour les IS chez les sujets transplantés (Cattaneo et al., 2008). Durant cette dernière décennie, la connaissance de la PG des IS en transplantation d'organes a avancé considérablement et porte la promesse d'une médecine personnalisée.

Chez l'homme, les CYP3A contribuent au métabolisme de la plupart des IS, tels que les inhibiteurs de la calcineurine (la ciclosporine et le tacrolimus) et le sirolimus (Kuehl et al., 2001). Dans la sous-famille des CYP3A, CYP3A4 et CYP3A5 sont les isoformes les plus importantes et les plus abondantes, avec une homologie de séquence en acides aminés d'environ 85% et un large chevauchement de substrats (Gorski et al., 1994). Le CYP3A4 est principalement localisé dans le foie, le jéjunum, le côlon et le pancréas, tandis que le CYP3A5 est plus fréquemment présent dans l'intestin grêle et l'estomac. Néanmoins, le CYP3A5 représenterait au moins 50% du contenu CYP3A hépatique chez les sujets exprimant CYP3A5 (Kuehl et al., 2001).

Les différences interindividuelles de CYP3A4 et CYP3A5 contribuent largement aux variations de biodisponibilité orale et de clairance systémique des IS. Comparés aux autres CYP, les gènes codant pour les CYP3A4 et 3A5 ont relativement peu de polymorphismes et leurs effets fonctionnels sur la pharmacocinétique des IS en transplantation d'organes ont été largement étudiés.

Lamba et col. ont montré que les taux de CYP3A chez des donneurs humains peuvent varier d'environ 40-fois dans le foie, comme dans l'intestin grêle (Lamba et al., 2002). De plus, l'activité et l'expression de CYP3A peuvent être fortement influencées par de nombreux médicaments et composés alimentaires, qui peuvent soit inhiber l'activité enzymatique soit induire l'expression du gène (Mandlekar et al., 2006). Les polymorphismes génétiques

peuvent de plus affecter l'expression des enzymes CYP3A. Le polymorphisme du CYP3A5 est l'un des plus étudiés. Kuehl et col. ont montré que les porteurs de l'allèle *CYP3A5*1* expriment la protéine CYP3A5 tandis que les individus homozygotes pour l'allèle *CYP3A5*3* ne l'expriment pas (Kuehl et al., 2001). Par conséquent, la biodisponibilité orale et la clairance systémique des substrats de CYP3A peuvent avoir des variations interindividuelles liées à ce polymorphisme, avec parfois des conséquences importantes quant à l'efficacité et la toxicité du médicament.

Le CYP3A est, ainsi, un des plus importants facteurs dans la variabilité de l'exposition au médicament et constitue un agent important dans les interactions médicament-médicament et médicament-alimentation.

1.1.3.1. Polymorphisme du CYP3A4 et pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Le CYP3A4 présente une grande variabilité interindividuelle d'activité enzymatique. Koch et col. ont analysé des extraits hépatiques et intestinaux et montré que l'ARNm de CYP3A4 constitue le transcrit CYP3A le plus abondant (Koch et al., 2002). En moyenne, 95% du pool d'ARNm total étudié était constitué par le CYP3A4. Cinq SNPs dans le promoteur et 19 SNPs dans la région codante ont été décrits sur le gène codant pour cette isoforme. En dépit de l'expansion de la connaissance à propos des mutations du gène *CYP3A4*, l'impact des variants alléliques sur l'activité enzymatique reste mal connu, probablement à cause de la fréquence extrêmement faible de ces variants. Le *CYP3A4*1B* (A-392G) situé dans le promoteur est un des polymorphismes les plus fréquents. Ce polymorphisme est présent dans 3,6 à 9,6% de la population caucasienne, 53 à 67% de la population africaine ou afro-américaine et absent dans la population asiatique (Ozawa et al., 2004; Sata et al., 2000; van Schaik et al., 2000).

Le SNP *CYP3A4*1B* a donc été largement étudié et il a été spéculé que la variation interindividuelle d'activité CYP3A puisse être attribuée à l'expression polymorphique de cet enzyme.

Ciclosporine et tacrolimus

Les résultats de plusieurs études ont montré un impact pharmacologique non significatif du polymorphisme *CYP3A4*1B* sur la pharmacocinétique de la ciclosporine (CsA). Von Ahsen et col. n'ont trouvé aucun effet significatif de ce SNP sur les doses de CsA nécessaires à

maintenir les concentrations minimales chez 124 patients caucasiens transplantés rénaux stables (Von Ahsen et al., 2001). Une autre étude menée récemment chez des patients transplantés rénaux en Inde a montré que le *CYP3A4*1B* n'avait aucune influence sur les pharmacocinétiques de la CsA et du tacrolimus (Singh et al., 2009). Plusieurs autres études (Garcia-Martin et al., 2002; Rivory et al., 2000) ont permis de conclure que le génotype variant *CYP3A4*1B* n'aurait pas d'association avec la clairance de la CsA chez les patients transplantés. En revanche, une étude menée chez 103 patients chinois transplantés rénaux a démontré que les porteurs du génotype *CYP3A4*1/*1* ont une concentration minimale ajustée sur la dose (C0/dose) plus élevée que ceux porteurs du génotype *CYP3A4*18B/*18B* (Qiu et al., 2008).

Certaines études ont, néanmoins, montré un effet significatif du *CYP3A4*1B* sur la pharmacocinétique des immunosuppresseurs. Une étude de Hesselink et col., menée chez patients transplantés rénaux, a montré des concentrations résiduelles standardisées par la dose (C0/dose) de tacrolimus significativement plus faibles chez les porteurs d'au moins un allèle *CYP3A4*1B* que chez sujets homozygotes pour le génotype sauvage (Hesselink et al., 2003). Par ailleurs, l'effet du *CYP3A4*1B* pourrait être influencé par le déséquilibre de liaison existant entre *CYP3A4*1B* et *CYP3A5*3* (Floyd et al., 2003; Kuehl et al., 2001). Kuypers et col. ont observé que les AUC_{0-12h} standardisées par la dose étaient plus faibles chez les patients transplantés rénaux avec le génotype *CYP3A4*1B/CYP3A5*1* que chez les porteurs du génotype *CYP3A4*1A/CYP3A5*1*, mais cette différence n'était pas statistiquement significative (Kuypers et al., 2007).

1.1.3.2. Polymorphisme du CYP3A5 et pharmacocinétique des immunosuppresseurs

Les polymorphismes génétiques de *CYP3A5* sont associés à des effets pharmacocinétiques plus significatifs sur les médicaments IS que ceux de *CYP3A4*. A ce jour, plusieurs variants alléliques ont été identifiés (du *CYP3A5*2* au *CYP3A5*7*) par séquençage (Hustert et al., 2001; Jounaidi et al., 1996). Le *CYP3A5*3* semble être le polymorphisme fonctionnel le plus important dans le gène *CYP3A5*. Il correspond au variant A6986G situé dans l'intron 3. Il a été admis que seuls les individus porteurs d'au moins un allèle *CYP3A5*1* (A à la position 6986) produisent des taux élevés d'ARNm et expriment la protéine *CYP3A5* en quantité significative (Kuehl et al., 2001). L'allèle *CYP3A5*3* (G en position 6986) est associé à une

variabilité de séquence dans l'intron 3 en créant un site d'épissage anormal et code pour un ARNm tronqué avec un codon stop prématuré. Chez les sujets *CYP3A5*3/*3*, l'expression de *CYP3A5* représentait seulement 4,2% et 2,7% des *CYP3A* hépatiques et jéjunaux, respectivement. Chez certains patients, la coexistence des autres variants alléliques *CYP3A5*2*, *CYP3A5*6* et *CYP3A5*7* avec l'allèle *CYP3A5*1* peut empêcher l'expression de *CYP3A5* (Hustert et al., 2001). La fréquence allélique du *CYP3A5*3* varie entre 50% chez les Afro-américains et 90% chez les Caucasiens (Lamba et al., 2002). Les populations japonaise et chinoise expriment approximativement trois fois plus fréquemment *CYP3A5* que les sujets caucasiens (Hiratsuka et al., 2002;Kuehl et al., 2001).

Tacrolimus

Parmi les transplantés cardiaques pédiatriques et pulmonaires adultes, les porteurs de l'allèle *CYP3A5*1* requièrent une dose plus importante de tacrolimus (kg/jour) que les patients homozygotes *CYP3A5*3* afin d'atteindre des taux résiduels adéquats de tacrolimus (Zheng et al., 2003;Zheng et al., 2004). Le même résultat a également été constaté chez les transplantés rénaux (Thervet et al., 2003;Zhang et al., 2005). Plus récemment, il a été démontré que les expresseurs de *CYP3A5* présentent des C0/dose de tacrolimus significativement plus faibles et des épisodes de rejet plus fréquents (Singh et al., 2009). De plus, MacPhee et col. (2002 et 2005) ont étudié les SNPs du pseudogène *CYP3API* (G-44A), qui est lié au *CYP3A5*3* et associé à l'expression du *CYP3A5*. Ils ont trouvé que l'identification du génotype *CYP3A5*3* pourrait être utilisée pour prédire la dose de tacrolimus et serait plus importante que la détermination du génotype *CYP3API* (Macphee et al., 2002;Macphee et al., 2005). De plus, la présence d'au moins un allèle *CYP3A5*1* est associée à la survenue plus précoce d'épisodes de rejet post-greffe en raison de concentrations inadéquates dans le contexte d'un traitement initial sans induction biologique (Macphee et al., 2004). Plusieurs études ont clairement démontré que les patients porteurs de l'allèle *CYP3A5*1* requièrent une dose plus importante de tacrolimus afin d'atteindre les mêmes concentrations sanguines que les sujets porteurs du génotype *CYP3A5*3/*3* (Haufroid et al., 2004;Hesselink et al., 2003;Singh et al., 2009; Thervet et al., 2003). De plus, il a été démontré que l'influence du génotype du donneur est également très importante (Uesugi et al., 2006). Les patients recevant un foie d'un donneur porteur du génotype *CYP3A5*1/*1* ont tendance à avoir des C0/dose plus faibles et requièrent des doses supérieures de tacrolimus par rapport aux patients transplantés de foie porteur du génotype *CYP3A5*3/*3* (Elens et al., 2007; Goto et al., 2004;Yu et al., 2006).

Ciclosporine

La CsA est métabolisée par le système CYP3A, et est également un inhibiteur potentiel des enzymes CYP3A. Une grande variabilité inter- et intra-individuelle a été observée dans l'exposition de patients greffés recevant la CsA. Néanmoins, peu d'études ont montré le rôle des polymorphismes des CYP3A sur cette variabilité (Anglicheau et al., 2004 ;Fredericks et al., 2007;Haufroid et al., 2004;Qiu et al., 2008;Singh et al., 2009). Hesselink et col. n'ont trouvé aucune association entre le polymorphisme génétique du *CYP3A5* et les C₀/dose de CsA (Hesselink et al., 2003). De façon inattendue, dans une étude la clairance orale de la CsA était significativement faible chez les expresseurs de *CYP3A5* que chez les non expresseurs (Yates et al., 2003). Les auteurs ont admis que ce résultat pouvait être un artéfact attribuable à la relation dans la population étudiée entre les polymorphismes *CYP3A5* et *ABCB1*, puisque tous les non-expresses de *CYP3A5* étaient aussi porteurs de l'allèle muté *3435T* du gène *ABCB1* (cf. paragraphe 1.3.3.2). Cependant, une étude menée par Haufroid et col., a démontré chez des patients transplantés rénaux caucasiens que les concentrations sanguines de CsA rapportées à la dose étaient cohérentes avec le statut expresseur/non expresseur (Haufroid et al., 2004). Une autre étude menée chez 16 volontaires sains a montré une différence significative des valeurs d'AUC et de clairance entre les individus *CYP3A5*1/*1* (n=6) et les individus *CYP3A5*3/*3* (n=6) (Min et al., 2004).

Sirolimus

Le sirolimus est un autre immunosuppresseur utilisé en transplantation d'organes afin de prévenir le rejet d'allogreffe, avec une grande variabilité inter- et intra-individuelle de ses paramètres pharmacocinétiques. Le sirolimus étant également substrat de CYP3A, les effets des polymorphismes de CYP3A sur la pharmacocinétique de ce médicament ont été examinés et des résultats contradictoires ont été rapportés. Dans une étude rétrospective, Anglicheau et col. ont initialement rapporté que les patients porteurs de l'allèle *CYP3A5*1* et ayant reçu le sirolimus comme première thérapie, nécessitaient des doses plus élevées afin d'atteindre les concentrations cibles (Anglicheau et al., 2005). L'influence du *CYP3A5*1/*3* fut, par la suite, confirmée par une étude prospective menée dans notre unité (Le Meur et al., 2006). Par modélisation Bayésienne, Djebli et col. ont démontré un effet significatif du polymorphisme *CYP3A5*1/*3* sur la clairance orale du sirolimus (Djebli et al. 2006). Cependant, d'autres études n'ont trouvé aucune association génotype-phénotype significative, peut-être du fait de l'intervention de médicaments associés. Par exemple, un traitement simultané avec la CsA

pourrait masquer les effets du polymorphisme *CYP3A5* sur le métabolisme du sirolimus (Anglicheau et al., 2005). En effet, la CsA pourrait atténuer l'effet de ce polymorphisme par inhibition compétitive du métabolisme du sirolimus par le *CYP3A5*, bien qu'une étude *in vitro* montre des résultats en opposition avec cette hypothèse (Picard et al., 2007).

1.2. Les enzymes de phase II

La phase II du métabolisme comprend les réactions de conjugaison, définies par la liaison covalente d'une molécule endogène (polaire) à un groupement fonctionnel d'une molécule substrat (hydrophobe). Bien que le substrat contenant un groupement fonctionnel approprié puisse directement subir la phase II du métabolisme, la conjugaison se produit souvent consécutivement à une réaction de phase I, durant laquelle le groupement fonctionnel est ajouté au substrat. Parmi les enzymes responsables des réactions de phase II, notons les sulfotransférases, les N-acétyltransférases, les glutathion-S-transférases, les catéchol-O-méthyltransférases et surtout les enzymes uridine diphosphate glucuro-transférases (UGT) qui font l'objet de la suite de ce présent chapitre.

1.2.1. La réaction de glucuroconjugaison

La glucuroconjugaison représente la plus importante réaction de biotransformation de phase II. Elle est catalysée par deux familles d'enzymes UGT, incluant chacune au moins huit enzymes qui sont régulées de manière spécifique selon le tissu (Mackenzie et al., 2005; Miners et al., 2004). Les UGT sont impliquées dans la détoxification des endobiotiques (ex. bilirubine, thyroxine, stéroïdes) et des xénobiotiques (tels que les composés phytochimiques, les hydrocarbures polycycliques carcinogènes et une variété de médicaments de toutes les classes thérapeutiques). Les enzymes UGT représentent ainsi un système de défense extrêmement réactif contre la mutagénicité des carcinogènes chimiques environnementaux et la toxicité des intermédiaires métaboliques de xénobiotiques et endobiotiques (Kiang et al., 2005; Lepine et al., 2004). La réaction de glucuroconjugaison implique deux molécules, soit la molécule-cible substrat, également appelée aglycone, et le co-substrat spécifique l'acide uridine diphosphate glucuronique (UDP-GlcA). Au cours de cette réaction, le groupement glucuronide est transféré au composé aglycone sur l'un de ses

sites fonctionnels, impliquant le plus souvent un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre. Ce transfert augmente sensiblement la polarité du substrat et par conséquent son hydrophilie, ce qui favoriserait son excrétion par la bile et l'urine (Guillemette et al., 2003; Tukey and Strassburg, 2000). Cette réaction provoque également un encombrement stérique diminuant d'autant l'affinité de la plupart des composés glucuroconjugués pour leur récepteur spécifique, comme par exemple le cas de l'estradiol-glucuroconjugué (Belanger et al., 1998; Moffat et al., 2001).

1.2.2. Nomenclature et classification des UDP-glucuronosyltransférases

Depuis 30 ans, la nomenclature des UGT a évolué en fonction de la découverte successive de plusieurs isoformes ainsi que de la résolution parallèle de l'organisation génomique des régions codantes pour cette superfamille d'enzymes. La nomenclature actuelle regroupe sous le terme « UGT » non seulement les UDP-Glucuronosyl-Transférases (responsables du transfert d'un acide glucuronique sur une molécule lipophile), mais aussi tous les membres de la superfamille des UDP-Glycosyl-Transférases (responsables du transfert d'un sucre quelconque sur une molécule lipophile).

A ce jour, une vingtaine d'UGT a été identifiée chez l'homme, qui sont distribuées en 4 familles distinctes (UGT1-3 et UGT8) et 5 sous-familles (UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A et UGT8A) sur la base de divergences au cours de l'évolution et d'homologies (Mackenzie et al., 2005). Le comité international de nomenclature compile et met à jour la nomenclature des membres de la superfamille des UGT, qui est accessible sur site : http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/.

Les deux sous-familles UGT1A et UGT2B sont très bien caractérisées dans la littérature et ont fait l'objet d'études exhaustives : elles jouent des rôles cruciaux dans la glucuroconjugaison d'une variété de composés endogènes et exogènes.

La famille UGT3 contient deux membres dits UGT3A1 et 3A2 (Mackenzie et al., 2005). Ces deux enzymes présentent 78% d'homologie de séquence, laissant supposer que l'UGT3A2 est une N-acétylglucosaminyltransférase comme l'UGT3A1 (Mackenzie et al., 2008). Cependant, le sucre transféré par UGT3A2 est présentement inconnu, tout comme le sont son activité spécifique, ses substrats, sa localisation subcellulaire et sa distribution.

UGT8A1, le seul représentant de la famille UGT8, catalyse le transfert du galactose sur une céramide, étape-clé de la biosynthèse de galactocérébroside¹ sur la gaine de myéline des neurones : de cette fonction fut d'ailleurs tiré son nom complet, soit UDP-galactose céramide galactosyltransférase (Bosio et al., 1996).

Les prochains chapitres portent spécialement sur les deux familles les mieux caractérisées UGT1A et UGT2B. L'acronyme « UGT » renverra donc ci-après à « UDP-glucuronosyltransférase ».

1.2.3. Localisation et structure des UDP-glucuronosyltransférases

Les UGT représentent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires liées au RE de la cellule. Une UGT mature est composée d'environ 530 acides aminés (50 et 57 kDa). Elle est classée comme protéine transmembranaire de RE de type I avec un domaine luminal constitué d'environ 95% du polypeptide et un domaine cytoplasmique d'environ 20 résidus seulement. La figure 2 représente schématiquement la structure des UGT humaines. La région amino-terminale (N-terminale ; 286 acides aminés) de la protéine contient un peptide signal permettant l'intégration de la chaîne polypeptidique dans le RE (Ouzzine et al., 1999). Cette petite séquence est clivée après l'insertion et ne fait pas partie de la protéine active. La région suivant la séquence signal constitue le domaine de liaison au substrat et confère à l'UGT la spécificité de son activité catalytique. Un domaine transmembranaire de 20 à 30 acides aminés responsable de la rétention à la membrane du RE est situé en position 3' de la chaîne. Cette région non-clivée fait protubérance du côté cytoplasmique et serait probablement également impliquée dans des interactions avec des protéines cytosoliques, ceci dans le but de maintenir l'activité enzymatique des UGT (Jackson et al., 1990). La région carboxylique terminale (C-terminale ; 245 acides aminés) est quant à elle responsable de la reconnaissance du co-substrat. La structure de la région C-terminale et sa séquence en acides aminées sont très conservées dans la superfamille des UGT humaines et chez les autres espèces (Miley et al., 2007).

¹Galactocérébroside = type de sphingolipide de la membrane myéline.

Les UGT peuvent exister sous forme monomérique mais également sont capables d'une homo- et d'une hétéro-dimérisation (Ghosh et al., 2001; Operana et al., 2007).

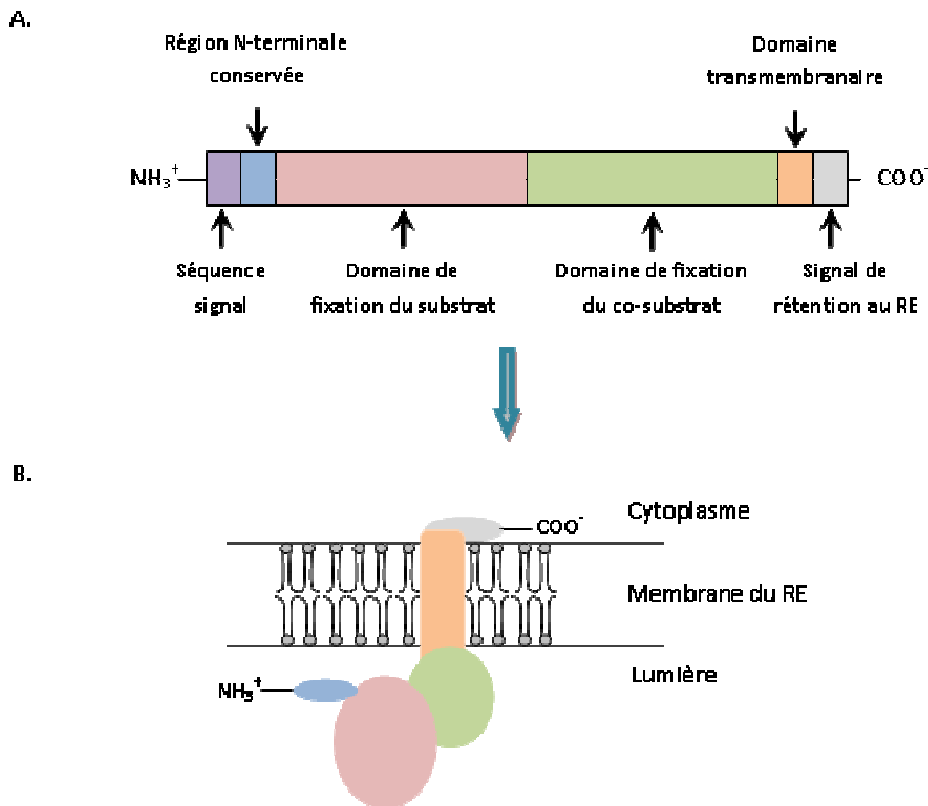


Figure 2 : Structure putative d'une protéine UGT. (A) Structure primaire des domaines fonctionnels d'une UGT. (B) Représentation de la structure d'une UGT emboîtée dans la membrane du réticulum endoplasmique.

1.2.3.1. Gène et structure de l'UGT1A

Le locus multigénique *UGT1A* humain est physiquement localisé sur le chromosome 2q37 et fait environ 198 kb (Ritter et al., 1992). Ce gène très complexe composé de 17 exons code pour 9 membres de la famille UGT1A (Figure 3). En effet, la structure du gène *UGT1A* est constituée d'une série de 13 exons « 1 » uniques en 5' du gène et de 4 exons communs à toutes les UGT1A (exons 2 à 5) en 3'. Chaque UGT1A fonctionnelle est le produit de la transcription et de l'épissage de seulement un des treize exons « 1 », toujours regroupé à la cassette des exons 2 à 5 communs, amenant à une région C-terminale identique pour toutes les isoformes (Gong et al., 2001; Owens et al., 2005). Chaque transcrit est ainsi composé de cinq exons, le premier (exon 1) étant propre à chaque isoforme et codant principalement le

domaine de liaison au substrat, alors que les exons communs 2 à 5 codent pour le domaine de liaison de l'UDP-GlcA.

Les neufs membres de l'UGT1A détectés chez l'homme sont : UGT1A1 (Ritter et al., 1992), UGT1A3 (Mojarrabi et al., 1996), UGT1A4 (Ritter et al., 1992), UGT1A5 (Finel et al., 2005), UGT1A6 (Harding et al., 1988), UGT1A7 (Strassburg et al., 1997), UGT1A8 (Strassburg et al., 1998), UGT1A9 (Wooster et al., 1991) et UGT1A10 (Strassburg et al., 1997).

Il a été établi récemment que le promoteur du gène *UGT1A5* est peu fonctionnel (Gardner-Stephen et al., 2007), en corrélation ainsi avec son expression extrêmement variable et faible dans le foie et le tractus digestif (Finel et al., 2005; Strassburg et al., 1997). De multiples alignements de séquences de l'exon 1 ont montré une homologie de séquence variant de 86 à 92% entre l'UGT1A3, 1A4, et 1A5 et de 75 à 91% entre l'UGT1A8, 1A9 et 1A10 (Gong et al., 2001; Green et al., 1998).

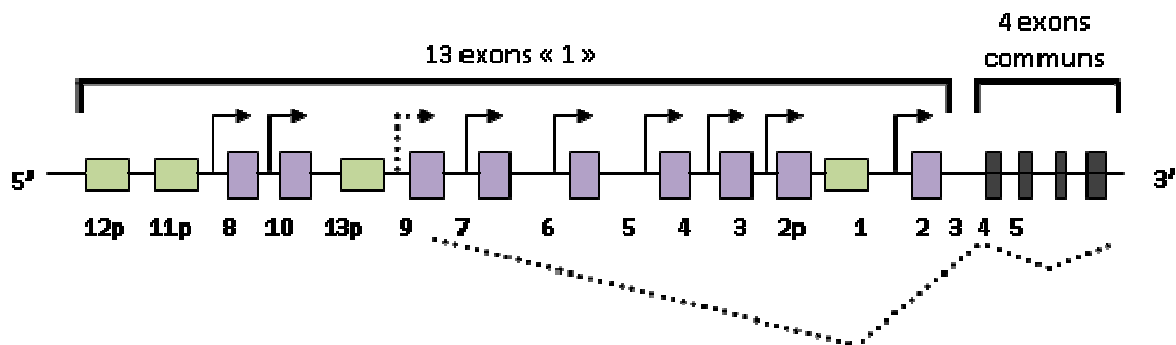


Figure 3 : Représentation graphique du locus UGT1A. Seul un exon 1 variable est joint aux 4 exons communs 2-5 lors de la transcription.

1.2.3.2. Gène et structure de l'UGT2A et 2B

Les gènes *UGT2A* et *UGT2B* sont regroupés en cluster et localisés sur le chromosome 4q13-q21.1, codant pour trois et sept protéines fonctionnelles, respectivement (Figure 4). Similairement aux protéines UGT1A, les enzymes UGT2A1 et UGT2A2 sont produites par un épissage différentiel d'exons 1 et de 5 exons communs (exons 2 à 6). Cependant, UGT2A3 et chacune des UGT2B sont codées par des gènes individuels. La famille UGT2A partage au moins 60% d'homologie de séquence avec les UGT2B. Elle assure la glucuronidation principalement dans l'épithélium olfactif (Jedlitschky et al., 1999). Par conséquent, la fonction biologique principale proposée à la famille UGT2A est l'initiation et/ou la

terminaison du signal odorant. Il est important de noter qu'elle n'a sans doute pas que cette fonction et à ce jour, l'importance clinique de l'enzyme UGT2A reste à élucider.

La sous-famille UGT2B quant à elle compte 7 protéines fonctionnelles chez l'homme, soit UGT2B4 (Jin et al., 1993), UGT2B7 (Ritter et al., 1990), UGT2B10 (Jin et al., 1993), UGT2B11 (Beaulieu et al., 1998), UGT2B15 (Turgeon et al., 2000), UGT2B17 (Beaulieu et al., 1996) et UGT2B28 (Levesque et al., 2001). Pour toutes les isoformes, la taille des exons est conservée, tandis que celle des introns varie de façon importante.

Comme pour les UGT1A, les membres de la famille UGT2B partagent un haut degré d'homologie de la région C-terminale de la protéine, correspondant au domaine de fixation du co-substrat (codé par les exons 2 à 6), et un important degré de divergence en N-terminale, correspondant au domaine de reconnaissance du substrat (codé par l'exon 1).

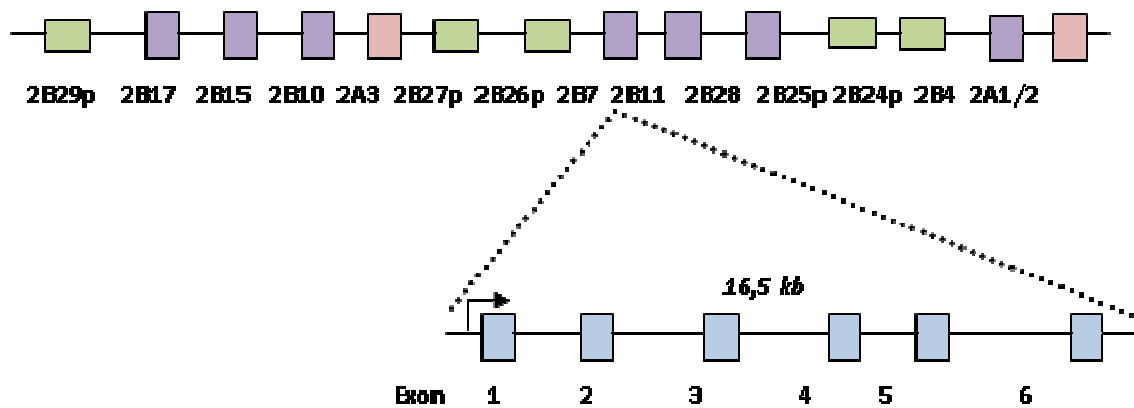


Figure 4 : Représentation graphique du locus UGT2 (4q13) et des gènes le composant. La taille des introns est variable, tandis que celle des exons est conservée à travers le locus.

1.2.4. Distribution tissulaire

L'expression des UGT est régulée par diverses substances chimiques et hormonales, activatrices des récepteurs nucléaires qui régulent cette expression (Barbier et al., 2003;Shelby et al., 2006). Par conséquent, les membres de cette superfamille d'enzymes ne sont pas exprimés constitutivement dans tous les tissus.

Les principales UGT participant au système de détoxification hépatique sont : 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B4, 2B7, 2B10 et 2B15 (Strassburg et al., 1997;Tukey et al., 2000;Ohno et al., 2009). Les ARNm de l'UGT2B17 (Nakamura et al., 2008) et l'UGT2B28 (Ohno et al., 2009) ont également été détectés au niveau hépatique. Bien que l'organe de

glucuroconjugaison ayant reçu le plus d'attention soit le foie, les recherches focalisées sur les UGT du tractus digestif ont montré leur importance. En raison de leur localisation, les UGT intestinales contribuent significativement au métabolisme de premier passage des substrats après administration orale, et peuvent limiter l'exposition systémique des substrats subissant une recirculation entérohépatique (Soars et al., 2002).

Il n'a pas été noté de différences significatives entre les concentrations protéiques de la famille UGT1A ont été observées entre tissus hépatique et intestinal, qui présentent des activités catalytiques (conjugaison et détoxification) identiques pour de nombreux substrats, incluant les carcinogènes, les amines tertiaires et les stéroïdes (Gregory et al., 2004 ; Mizuma et al., 2009; Soars et al., 2002). Les UGT 1A7, 1A8 et 1A10 sont exprimées exclusivement dans le tractus digestif. De plus, l'expression des différentes isoformes varie substantiellement de la zone proximale à la partie distale du tube digestif. L'UGT1A7, par exemple, est présente seulement dans l'œsophage et l'estomac (Tukey and Strassburg, 2000). L'UGT1A8 serait présente principalement au niveau du côlon alors que son expression dans l'intestin grêle reste controversée (Ohno et al., 2009; Strassburg et al., 1998). L'UGT1A10 quant à elle, est détectable tout au long du tube digestif (Ohno et al., 2009).

Les ARNm des UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 2B4, 2B7, 2B10 et 2B15 ont également été détectés dans l'intestin grêle (Tukey and Strassburg, 2000). Le côlon humain, quant à lui, contient les UGT suivantes : 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9 et 2B7.

Il a été admis également que plusieurs tissus autres que le foie et le tractus digestif sont extrêmement impliqués dans la glucuroconjugaison. Ce sont généralement ceux responsables de l'absorption et/ou de l'excrétion de composés (tels que médicaments) auxquels ils sont exposés. Fisher et col., en se basant sur l'activité de la glucuroconjugaison de la morphine en position 3, ont suggéré que les concentrations d'UGT2B7 dans le rein humain approchaient ceux du foie humain (Fisher et al., 2001). De plus, les transcrits de l'UGT2B sont exprimés abondamment dans les tissus sensibles aux stéroïdes. Par exemple, les ARNm des UGT 2B10 (Turgeon et al., 2001), 2B11 (Beaulieu et al., 1998), 2B15 (Levesque et al., 1997), et 2B17 (Beaulieu et al., 1998) ont été détectés dans la prostate, alors que les ARNm des UGT 2B11 (Turgeon et al., 2001) et 2B28 (Levesque et al., 2001) sont présents dans le tissu mammaire. Comme dit précédemment, l'UGT2A1 est principalement exprimée dans l'épithélium nasal (Jedlitschky et al., 1999). Parmi les autres tissus où la glucuroconjugaison pourrait avoir lieu, on note le cerveau (King et al., 1999) et le placenta (Collier et al., 2004).

1.2.5. Variabilité génétique des UGT et implication pharmacologique

Durant cette dernière décennie, plus de cent SNPs dans le promoteur et les séquences codantes du gène *UGT1A* ont été identifiés et caractérisés. Parmi ces SNPs, plusieurs présentent des fréquences alléliques individuelles allant jusqu'à 40-50% dans la population générale (Ehmer et al., 2004; Maitland et al., 2006). Des études ont démontré que ces variants de *UGT1A* se produisent simultanément et sont en déséquilibre de liaison (Ehmer et al., 2004; Kohle et al., 2003), et que les haplotypes les regroupant influencent la glucuroconjugaison par expression de protéines fonctionnellement altérées (Ehmer et al., 2004; Guillemette et al., 2000), par modulation de la régulation transcriptionnelle (Erichsen et al., 2008; Lankisch et al., 2005), ou les deux. En raison de ce potentiel à influencer le métabolisme de médicaments et donc d'intervenir dans leurs effets secondaires, une attention considérable a été portée à leur étude pharmacogénétique (Nagar and Rimmel, 2006; Strassburg et al., 2008).

Dans cette sous-section, un résumé de la littérature portant sur les différents polymorphismes fonctionnels des principales UGT et leurs effets *in vitro* et *in vivo* sera présenté.

1.2.5.1. Le gène *UGT1A1*

UGT1A1 est la seule enzyme physiologique capable de former les glucuroconjugués hydrophiles de la bilirubine (Bosma et al., 1994), qui subissent pas la suite une élimination rénale ou biliaire. Plusieurs autres composés endogènes et exogènes sont métabolisés par cette isoforme, tels que l'estradiol et son principal métabolite 2-hydroxy-estrone et de nombreux médicaments tels que le gemfibrozil¹ (Ogilvie et al., 2006), le métabolite de l'irinotécan (Ando et al., 1998), les antirétroviraux (Lankisch et al., 2006), certains anti-inflammatoires non stéroïdiens [AINS] (kétoprofène et ibuprofène) (Kuehl et al., 2005) et la buprénorphine (King et al., 1996). De plus, des xénobiotiques mutagènes, comme les benzo[α]pyrènes, sont glucuroconjugués et détoxifiés par l'*UGT1A1* (Fang et al., 2004). Des altérations de l'activité *UGT1A1* sont donc capables de moduler le métabolisme et l'exposition de médicaments et de composés cancérigènes. En effet, le nombre de variants génétiques de l'*UGT1A1* est

¹Gemfibrozil = médicament de la classe des fibrates ; prescrit dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

d'environ 113, et ils induisent différents degrés de variabilité fonctionnelle. Le polymorphisme le mieux étudié est l'*UGT1A1**28, une variation commune dans la boîte TATA, 53 paires de bases en amont du codon ATG. Il a été démontré que cette région hypervariable pouvait contenir 5, 6, 7 ou 8 répétitions du dinucléotide «TA», 6 étant la forme la plus répandue et constituant l'allèle de référence (Hall et al., 1999). L'*UGT1A1**28 correspond à une seule insertion TA, amenant ainsi à la séquence A(TA)₇TAA au lieu de la séquence prédominante A(TA)₆TAA. Ceci est associé à une réduction du niveau de transcription de l'*UGT1A1* d'environ 70%, phénomène causé par une diminution de la capacité d'attachement du facteur de transcription nommé « TATA-binding protein » (Hsieh et al., 2007). La présence de cette variation entraîne donc une diminution concomitante des niveaux du transcrit et de la protéine UGT1A1 (Girard et al., 2006). La fréquence du génotype homozygote muté (*UGT1A1**28/*28) est de 23% chez les sujets afro-américains (Beutler et al., 1998), 16% chez les européens (Bosma et al., 1995), 12% chez les indiens (Balram et al., 2002), et 8% chez les égyptiens (Kohle et al., 2003). Chez les japonais et les chinois, les fréquences sont faibles (Ando et al., 1998; Balram et al., 2002).

Le variant *UGT1A1**36 ayant la séquence A(TA)₅TAA conduit à une augmentation de la transcription de l'*UGT1A1*. Le variant *UGT1A1**37, avec la séquence A(TA)₈TAA, induit quant à lui une réduction de la transcription et est associé à la maladie de Crigler-Najjar de type II (Beutler et al., 1998). Ces constatations suggèrent une association inverse de la transcription avec le nombre des répétitions du dinucléotide TA. Les variabilités de fréquence de l'*UGT1A1**28 dans les populations distinctes géographiquement et dans l'évolution suggèrent la présence d'une diversité ethnique. Ceci est renforcé par la découverte, chez les asiatiques souffrant du syndrome de Gilbert, d'autres variants dans l'exon 1 tels que *UGT1A1**6 (Gly71Arg ; rs4148323 ; fréquence : 13-23%) (Takeuchi et al., 2004), *UGT1A1**7 (Tyr486Asp ; fréquence : 3%) (Aono et al., 1993), *UGT1A1**27 (Pro229Gln ; rs35350960 ; fréquence <1%) (Aono et al., 1995), et *UGT1A1**62 (Phe83Leu ; rs56059937 ; fréquence : 1%), tous variants non identifiés chez les caucasiens ou les africains (Udomuksorn et al., 2007). L'homozygotie pour l'allèle *UGT1A1**7 (souvent associé à l'homozygotie pour l'allèle *UGT1A1**6) a été identifiée chez les sujets asiatiques avec le syndrome de Crigler-Najjar de type II (Akaba et al., 1998).

Variants de l'UGT1A1 associés au syndrome de Gilbert et susceptibilité au cancer

L'*UGT1A1* est capable de métaboliser des composés alimentaires carcinogènes et des polluants environnementaux, comme les HAP (Fang et al., 2004). Une hypothèse a été émise

au sujet de la réduction de la glucuroconjugaison dans les tissus porteurs des variants *UGT1A1**28, qui pourrait provoquer le développement de maladies associées aux carcinogènes, tels une transformation néoplasique.

Dans une étude de type cas-témoins (268 patients chinois atteints de cancer colorectal et 441 volontaires sains), le risque de développer un cancer colorectal (CCR) était associé au SNP *UGT1A1**6 avec un odds ratio (OR) de 2,03 et une combinaison de l'allèle *UGT1A1**6 avec les variants de l'*UGT1A7* augmentait cet OR à 2,34 (Tang et al., 2005). A noter que l'association avec le polymorphisme *UGT1A7**3 avait déjà été rapportée (OR de 2,7) (Strassburg et al., 2002).

Comme l'*UGT1A1* est également impliquée dans la voie d'élimination de certains estrogènes tels l'estradiol et les dérivés 2-methoxy (Lepine et al., 2004), il a été supposé que l'*UGT1A1**28 pourrait aussi avoir un impact sur le risque de développer un cancer estrogéno-dépendant. Quoique certaines divergences existent dans la littérature actuelle, ce variant conférerait une protection face au cancer de l'endomètre (Duguay et al., 2004), mais prédisposerait au cancer invasif du sein (Guillemette et al., 2000). Toutefois, une étude ultérieure a rapporté une association du polymorphisme *UGT1A1**28 avec une diminution du risque de survenue du cancer de sein (Sparks et al., 2004).

Variants de l'UGT1A1 associés au syndrome de Gilbert et prédisposition à la toxicité médicamenteuse

Un exemple remarquable est l'influence de la glucuroconjugaison sur les effets indésirables de l'irinotécan, agent anticancéreux (Innocenti et al., 2004; Innocenti et al., 2006; Lankisch et al., 2008), désigné sous le terme de « irinogénétique » par certains auteurs.

L'irinotécan (Campto®) est une pro-drogue, dérivée hémisynthétique de la camptothécine¹, et utilisé dans le traitement du CCR métastatique et d'autres tumeurs solides (Douillard et al., 2000; Folprecht and Kohne, 2004; Fujimoto et al., 2010). Il est converti par les carboxylestérases ubiquitaires en 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (SN-38), métabolite avec 100 fois plus d'activité antitumorale (Kawato et al., 1991). Le SN-38 est principalement inactivé par les protéines UGT1A, en générant des glucuroconjugués du SN-38 qui sont éliminés par la suite via la bile et l'urine (Tukey et al., 2002). Le polymorphisme de la boîte TATA est associé à une importante réduction de la glucuroconjugaison du SN-38, induisant ainsi une augmentation de la biodisponibilité du médicament. Cette modification dans la

¹Camptothécine = alcaloïde pentacyclique anticancéreux, extrait de l'arbre chinois *Camptotheca acuminata*.

pharmacocinétique de l'irinotécan entraîne une augmentation des risques d'effets indésirables délétères liés à la prise du médicament, tels que myélosuppression (principalement leucopénie et thrombocytopénie) et diarrhées de forts grades (Innocenti and Ratain, 2003), observées chez 29-44% de patients (Douillard et al., 2000), nécessitant souvent d'arrêter ou de baisser la dose du médicament.

1.2.5.2. Le gène *UGT1A3*

L'activité de l'*UGT1A3* a été déterminée par clonage et expression de la protéine recombinante en culture cellulaire (Mojarrabi et al., 1996). Cette isoforme est exprimée au niveau intestinal et à faible taux dans le foie (Strassburg et al., 2000). Les taux d'expression dans l'estomac et le côlon sont également faibles (Strassburg et al., 1997; Strassburg et al., 1999). Les études d'activité catalytique ont révélé un large spectre de substrats, incluant des xénobiotiques tels que HAP (Mojarrabi et al., 1996), les amines (Green et al., 1998), des AINS comme le flurbiprofène et le kétoprofène (Kuehl et al., 2005), les statines (Prueksaritanont et al., 2002), les estrogènes (Iwai et al., 2004), et les acides biliaires (Trottier et al., 2006; Trottier et al., 2006), et des dérivés de la vitamine D (Kasai et al., 2005).

Peu d'études ont été publiées concernant les polymorphismes de ce gène et ceux identifiés ont été regroupés dès leur découverte et étudiés en fonction des différents haplotypes qu'ils forment.

Les polymorphismes localisés sur l'exon 1 du gène (*UGT1A3*2* et *UGT1A3*3*) (Caillier et al., 2007; Ehmer et al., 2004; Iwai et al., 2004) sont associés à des altérations fonctionnelles de la protéine exprimée (Iwai et al., 2004). Les variants Trp11Arg (rs3821242) et Val47Ala (rs6431625) ont été identifiés chez les caucasiens avec des fréquences entre 35 et 44%. Basé sur ce profil d'activité et cette fréquence élevée des variants dans la population caucasienne, une implication dans le métabolisme de médicaments et un rôle dans la prédisposition au cancer semblent possibles. Cependant, une étude cas-témoins chez 258 sujets souffrant de carcinome hépatocellulaire (CHC) et 470 volontaires sains n'a démontré aucune association avec les polymorphismes de l'*UGT1A3* (Ehmer et al., 2004).

1.2.5.3. Le gène *UGT1A4*

Le gène humain *UGT1A4* a été cloné initialement par Ritter et col. (Ritter et al., 1991). Quelques polymorphismes ont été retrouvés dans les régions codantes et introniques de ce

gène ; cependant, seulement 2 variants de l'exon 1 ont démontré une certaine fonctionnalité. Ces variants génétiques sont *UGT1A4*2* (Pro24Thr ; rs6755571) et *UGT1A4*3* (Leu48Val ; rs2011425), présents dans 8 à 9% de la population caucasienne. Ils sont associés à une altération de l'activité catalytique de l'enzyme (Ehmer et al., 2004). L'analyse des activités catalytiques a démontré que non seulement le niveau d'activité changeait mais également la spécificité pour différents substrats. En effet, la mutation non-sens Leu48Val est associée à un accroissement de la capacité de glucuroconjugaison de la clozapine (antipsychotique), de l'imipramine (antidépresseur) et de la cyproheptadine (antihistaminique et antisérotonergique) (Mori et al., 2005). A l'inverse, ce polymorphisme est également associé à une diminution de l'activité pour le tamoxifène (utilisé dans le traitement et la prévention du cancer du sein) (Sun et al., 2006a), la tigogénine (hypocholestérolémiant) (Mori et al., 2005), la β -naphthylamine (amine carcinogène) et la dihydrotestostérone (Ehmer et al., 2004). Le variant Pro24Thr entraîne lui aussi un effet substrat-dépendant, l'enzyme *UGT1A4* glucuroconjuguant moins efficacement en sa présence la β -naphthylamine et la dihydrotestostérone (Ehmer et al., 2004), mais de façon plus efficace le 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (procarcinogène pulmonaire dérivé de la cigarette et de sa fumée) (Wiener et al., 2004a).

1.2.5.4. Le gène *UGT1A6*

Plusieurs études ont identifié des polymorphismes dans le gène *UGT1A6*, qui sembleraient contribuer à la variabilité interindividuelle. Deux polymorphismes très rapprochés sur l'exon 1 de l'*UGT1A6* (Thr181Ala et Arg184Ser) ont été, à l'origine, déterminés par Ciotti et col. ; ils participent à l'haplotype *UGT1A6*2* (Ciotti et al., 1997). Lors de sa découverte, en utilisant des allozymes recombinants, *UGT1A6*2* fut associé à une diminution de la glucuroconjugaison de plusieurs composés tels que les phénols, la coumarine, certains β -bloquants et les salicylés comparé à l'haplotype de référence *UGT1A6*1* (Ciotti et al., 1997). Les prévalences rapportées pour les génotypes *UGT1A6*1/*1* et *UGT1A6*2/*2* sont de 37-41 et de 8-11%, respectivement, principalement dans la population caucasienne (Chan et al., 2005;McGreavey et al., 2005).

Une étude d'association entre certains polymorphismes et l'apparition d'effets indésirables suite à la prise de tolcapone¹ a démontré que la présence de l'*UGT1A6*2* était reliée à une aggravation du risque de toxicité hépatique, causée probablement par une élimination réduite du médicament (Acuna et al., 2002). Comme l'*UGT1A6* catalyse également la conjugaison de l'aspirine (Hutt et al., 1986), il a été supposé que la présence du variant *UGT1A6*2* pouvait avoir un impact sur l'action anti-tumorale de ce médicament fortement utilisé. Effectivement, deux larges études cas-témoins indépendantes sont parvenues à démontrer que l'effet inhibiteur de ce médicament sur le cancer colique était amplifiée chez les porteurs d'au moins un allèle de faible activité de l'*UGT1A6*, confortant l'hypothèse de départ (Bigler et al., 2001; Chan et al., 2005). Cependant, ce résultat n'a pu être confirmé par une troisième étude similaire (McGreavey et al., 2005).

Des résultats contradictoires ont été obtenus *in vitro* dans des études d'association génotype-phénotype en utilisant des substrats relativement non spécifiques de l'*UGT1A6* (4-nitrophénol, 1-naphtol et 4-méthyl-umbelliféronne) (Nagar et al., 2004; Peters et al., 2003). De plus, Nagar et col. ont découvert que l'haplotype *UGT1A6*2* contenait une substitution en acide aminé additionnelle, Ser7Ala (Nagar et al., 2004). En utilisant la sérotonine comme substrat spécifique de l'*UGT1A6*, Krishnaswamy et col. ont démontré que la présence de la mutation Arg184Ser dans l'haplotype augmentait significativement l'affinité de l'enzyme pour la molécule-cible, tandis que la combinaison Ser7Ala et Thr181Ala augmentait considérablement la vitesse maximale de la réaction (V_{max}) (Krishnaswamy et al., 2005). Par conséquent, leurs effets combinés dans l'haplotype *UGT1A6*2* entraînent une augmentation significative de l'efficacité de la glucuroconjugaison pour différents substrats tels que la sérotonine et son métabolite le 5-hydroxytryptophol, le paracétamol et l'acide valproïque. Ainsi cette étude a permis de prouver que l'*UGT1A6*2* est associé à une forte activité comparé à la séquence de référence *UGT1A6*1* (Krishnaswamy et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par Hubner et col. en démontrant que chez l'homme la présence de l'*UGT1A6*2* était associée à une protection contre le CCR et ce indépendamment de la prise d'aspirine (Hubner et al., 2006).

Il a été conclu que comme l'*UGT1A6* joue un rôle principal dans l'élimination de divers substances alimentaires carcinogènes, tels que les benzo[*a*]pyrènes et les amines

¹ Tolcapone = médicament antiparkinsonien inhibiteur de la catéchol-O-méthyltransférase

hétérocycliques, l'allèle *UGT1A6*2* serait impliqué efficacement dans la détoxification de ces éléments néfastes au niveau du tractus digestif.

Toutefois, il existe un fort déséquilibre de liaison entre *UGT1A6*2*, *UGT1A1*28* et *UGT1A7*3* (associé à une faible activité de UGT1A7), et ce dans plusieurs populations distinctes (Kohle et al., 2003; Peters et al., 2003; Urawa et al., 2006). Ce fait, associé à l'important chevauchement de substrats entre les membres de la famille UGT1A, rend difficile de conclure avec certitude sur l'effet *in vivo* associé à ces variations fréquentes.

1.2.5.5. Le gène *UGT1A7*

Le rôle de l'UGT1A7 dans la détoxification de mutagènes et de pro-carcinogènes par glucuroconjugaison a été suggéré par de nombreuses études (Bock, 1991; Nowell et al., 1999; Zheng et al., 2002). Cette hypothèse a été considérablement étudiée, avec une diminution attendue du métabolisme de carcinogènes ou de médicaments en présence de polymorphismes génétiques identifiés et caractérisés de l'*UGT1A7*, combinant trois substitutions en acides aminés dans l'exon 1 (Asn129Lys, Arg131Lys et Trp208Arg) (Guillemette et al., 2000; Strassburg et al., 2002). Ces variations mènent à quatre haplotypes différents du gène *UGT1A7* : l'haplotype de référence *UGT1A7*1* (Asn129 Arg131 Trp208), *UGT1A7*2* (Lys129 Lys131 Trp208), *UGT1A7*3* (Lys129 Lys131 Arg208) et *UGT1A7*4* (Asn129 Arg131 Arg208). Les haplotypes *UGT1A7*3* et **4* présentent une activité de glucuroconjugaison beaucoup plus faible que les celles des haplotypes *UGT1A7*1* et **2* (Guillemette et al., 2000).

L'UGT1A7 étant la principale transférase impliquée dans la glucuroconjugaison du SN-38, ses polymorphismes ont été considéré comme des facteurs génétiques potentiellement liés à la réponse anti-tumorale ainsi qu'à l'apparition de toxicités suite à l'administration d'irinotécan (Lankisch et al., 2008; Villeneuve et al., 2003). Enfin, Bernard et Guillemette (2004) ont démontré que les allèles de faible activité *UGT1A7*3* et **4* sont associés à une réduction de la glucuroconjugaison de l'acide mycophénolique¹ (MPA) (Bernard and Guillemette, 2004).

Ci-dessous une synthèse de plusieurs études de type cas-témoins, analysant l'association de l'*UGT1A7*3* avec la survenue de certaines types de cancer.

¹Acide mycophénolique = métabolite pharmacologiquement actif du mycophénolate mofétil ; immunosuppresseur très utilisé en transplantation d'organes.

Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Une association significative entre les variant *UGT1A7*3* et le CHC, d'étiologie virale ou non, a été retrouvée chez des sujets caucasiens (n=59) (Vogel et al., 2001) et japonais (n=280) (Wang et al., 2004). Plus récemment, deux études menées chez des sujets souffrant de CHC, 165 français comparés à 314 témoins (Stucker et al., 2007) et 244 coréens comparés à 223 patients avec une hépatite B sans CHC (Kong et al., 2008) ont montré une association positive entre *UGT1A7*3* et le CHC chez les porteurs d'une infection virale. Ces données suggèrent que les haplotypes de l'*UGT1A7* à faible activité métabolique de carcinogènes pourraient représenter un marqueur de risque pour l'apparition du CHC chez les caucasiens aussi bien que chez les asiatiques, dans les limites étiologiques et de sélection de patients des cohortes. Toutefois, comme l'*UGT1A7* n'est pas exprimée au niveau hépatique, aucune explication mécanistique plausible n'a été fournie ; celle-ci pourrait impliquer des haplotypes avec d'autres UGT.

Cancer pancréatique et cancer pulmonaire

Une association du cancer pancréatique avec l'*UGT1A7*3* a été rapportée chez 52 patients allemands (Ockenga et al., 2003), mais ces constatations n'ont pas été reproduites dans une étude italienne menée chez 61 patients (Piepoli et al., 2006) et surtout dans une étude multinationale incluant 973 patients souffrant de cancer pancréatique et 1532 témoins (Verlaan et al., 2005). Ces observations suggèrent que ni les variants du gène *UGT1A7* ni les autres polymorphismes du gène *UGT1A* ne sont des facteurs de risque pour le cancer pancréatique.

Enfin, le génotype *UGT1A7*3/*3* était significativement associé à l'incidence du cancer pulmonaire dans une étude japonaise (113 patients et 178 volontaires sains) (Araki et al., 2005).

1.2.5.6. Le gène *UGT1A8*

Le nombre de polymorphismes de l'*UGT1A8* décrit dans la littérature est minime, et peu d'entre eux seraient associés à une altération d'activité catalytique de l'isoforme. Le SNP *UGT1A8*2* (C518G ; rs1042597 ; Ala173Gly) a été évalué sur une variété de substrats lors de son identification et il a été démontré que l'allèle variant diminuait l'efficacité de glucuroconjugaison *in vitro* de l'estrone, de certains hydroxybenzo[α]pyrènes et du 4-méthylumbelliférone, comparé à l'allèle de référence l'*UGT1A8*1*. Un autre polymorphisme de

l'exon 1, l'*UGT1A8*3* (G830A ; rs17863762 ; Cys277Tyr), entraîne l'abolition complète de l'activité de l'UGT1A8 pour une grande diversité de substrats dont certains benzo[α]pyrènes et des dérivés 4-OH-estrogéniques (Huang et al., 2002;Thibaudeau et al., 2006). De plus, la présence de la variation *UGT1A8*2* est responsable d'une conjugaison *in vitro* moins efficace du MPA et de son dérivé acyl-glucuronide (AcylMPAG), tandis que l'*UGT1A8*3* a été associé à une activité catalytique quasi indétectable pour ces mêmes substrats (Bernard and Guillemette, 2004;Bernard et al., 2006). Dans le cadre d'une étude chez des volontaires sains comparant 17 sujets sans polymorphismes génétiques à d'autres, porteurs de l'*UGT1A8*2* (n=9) ou de l'*UGT1A8*3* (n=4), aucun impact significatif de l'homozygotie pour l'allèle *UGT1A8*2* et de l'hétérozygotie pour l'*UGT1A8*3* sur la pharmacocinétique de l'AMP n'a été trouvé (Levesque et al., 2007). Kagaya et col. ont retrouvé les mêmes résultats chez des patients japonais transplantés rénaux ; *UGT1A8*2* semblait ne pas affecter la variabilité interindividuelle de la concentration plasmatique du MPA (Kagaya et al., 2007). Cependant, une autre étude menée chez des transplantés rénaux et/ou pancréatiques a démontré que l'effet du polymorphisme *UGT1A8*2* sur le métabolisme du MPA dépendait de l'inhibiteur de la calcineurine associé. En effet, les concentrations du MPA sont supérieures chez les porteurs d'au moins un allèle *UGT1A8*2* s'ils reçoivent en association du tacrolimus (Johnson et al., 2008) et non de la ciclosporine, inhibiteur ubiquitaire des enzymes du métabolisme et des transporteurs d'efflux modifiant la pharmacocinétique du MPA.

Récemment, une étude a été réalisée dans notre équipe chez 256 patients transplantés rénaux afin d'analyser la relation entre les effets secondaires digestifs du mycophénolate mofétil d'une part, les polymorphismes des UGT impliquées dans le métabolisme intestinal du MPA et les facteurs modifiant l'excrétion biliaire de ses métabolites glucuroconjugués d'autre part. Les résultats ont montré que l'incidence des diarrhées était plus faible chez les porteurs d'au moins un allèle muté *UGT1A8*2* (génotypes C518G et 518GG) (Woillard et al., 2010), ce qui pouvait être expliqué par une production diminuée des métabolites glucuroconjugués du MPA au niveau intestinal, protégeant contre l'apparition de diarrhées.

1.2.5.7. Le gène *UGT1A9*

L'*UGT1A9* constitue une des principales isoformes exprimées dans le foie et certains tissus extra-hépatiques (rein, testicule et ovaires) (Albert et al., 1999;Strassburg et al., 1998).

Il a été montré *in vitro* que la présence d'au moins un allèle muté du polymorphisme peu fréquent *UGT1A9*3* (exon 1 ; rs72551330 ; Met33Thr), était associée à une diminution

d'activité significative envers le MPA (Bernard and Guillemette, 2004), les dérivés 4-hydroxy-estrogéniques (Thibaudeau et al., 2006) et le 4-aminobiphényle (Olson et al., 2009). De plus, deux études indépendantes menées *in vivo* ont confirmé que l'*UGT1A9*3* avait une influence significative sur la glucuroconjugaison du MPA ; les porteurs de celui-ci présentaient une augmentation de la biodisponibilité du médicament (Kuypers et al., 2005; Levesque et al., 2007). Il a cependant été noté que l'*UGT1A9*3* n'avait pas d'impact sur l'efficacité de glucuroconjugaison du flavopiridol¹ (Villeneuve et al., 2003). Ces études suggèrent que l'efficacité de glucuroconjugaison du variant *UGT1A9^{33Thr}* est substrat-dépendante.

Deux autres SNP ont été décrits au niveau du promoteur de l'*UGT1A9*, soit C-2152T (rs17868320) et T-275A (rs6714486), et sont fortement liés. Cette combinaison est associée *in vivo* à une augmentation significative de la transcription et de l'activité de l'*UGT1A9* (Girard et al., 2004; Girard et al., 2006; Innocenti et al., 2005). Plusieurs études ont démontré que les transplantés rénaux porteurs de ces deux polymorphismes présentent une biodisponibilité sanguine fortement diminuée du MPA (Kuypers et al., 2005), associée à une incidence augmentée d'effets secondaires gastro-intestinaux (Sanchez-Fructoso et al., 2009) et à une incidence augmentée des rejets aigus chez des patients co-traités par le tacrolimus (van Schaik et al., 2009). Kuypers et col. ont conclu que ces variants induisaient une augmentation de l'expression de l'*UGT1A9* au niveau hépatique et intestinal, rendant plus efficace la glucuroconjugaison et l'élimination du MPA (Kuypers et al., 2005).

Dans une étude récente, le polymorphisme fréquent de l'intron 1 de l'*UGT1A9*, *IVS1+399* (I399C>T ; rs2741049) était associé à une augmentation significative de l'expression de la protéine et de son activité envers le SN-38 et le propofol (substrat spécifique de *UGT1A9*) (Girard et al., 2006). L'augmentation de la glucuroconjugaison du SN-38 en présence de ce SNP est significative chez les sujets non porteurs de l'*UGT1A1*28*. L'impact de ce polymorphisme sur la glucuroconjugaison fut ensuite testé dans deux études cas-témoins chez des sujets asiatiques, chez qui la présence d'au moins un allèle muté (génotypes I399C/T et I399T/T) est associée à une diminution de l'exposition au SN-38 (Sandanaraj et al., 2008), alors que cette mutation fréquente n'a aucune influence sur la pharmacocinétique du MPA chez des transplantés rénaux recevant du mycophénolate mofétil en association avec du tacrolimus (Inoue et al., 2007). Une étude menée chez des caucasiens a bouleversé en partie les conclusions obtenues en affirmant que I399 était parfaitement lié à l'allèle *UGT1A9*1b*

¹Flavopiridol = flavone semi-synthétique et inhibiteur de plusieurs kinases cycline-dépendantes

[-118 (dT)_{9>10}]. De plus, les auteurs ont décrit que ces deux polymorphismes ne présentaient aucun effet significatif sur l'expression de l'ARNm ou sur la glucuroconjugaison du MPA et du flavopiridol (Ramirez et al., 2007). Par conséquent, d'autres investigations devront être réalisées pour clarifier l'influence du variant I399C>T sur l'activité catalytique de l'UGT1A9.

1.2.5.8. Le gène *UGT2B7*

Comme pour tous les autres gènes, plusieurs polymorphismes ont été identifiés sur le gène *UGT2B7*. En particulier, l'*UGT2B7*2* (C802T ; exon 2 ; rs7439366), qui engendre une enzyme avec soit une tyrosine soit une histidine à la position 268 (Tyr268His). L'impact de cette mutation sur l'activité catalytique de la protéine reste controversé. Certaines études utilisant des MFH génotypés ou des cellules transfectées n'ont identifié aucune association significative entre ce SNP et la glucuroconjugaison de : la morphine chez des patients cancéreux (Holthe et al., 2003), des opioïdes (la morphine et la codéine), de la zidovudine¹, du menthol, des androgènes et du MPA (Bernard et al., 2006;Coffman et al., 1998;Court et al., 2003). En revanche, d'autres études ont trouvé une association entre le variant 802T et l'augmentation de la glucuroconjugaison pour la morphine chez 99 patients (Sawyer et al., 2003), et pour les métabolites hydroxylés de l'estradiol et l'estrone *in vitro* (Thibaudeau et al., 2006). Par ailleurs, l'allèle l'*UGT2B7*2* était associé à une diminution de la glucuroconjugaison du 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol par des MFH génotypés (Wiener et al., 2004b) et du MPA chez des volontaires sains (Levesque et al., 2007).

Une étude récente a démontré que chez les patients transplantés rénaux traités avec le MPA, la présence d'au moins un allèle muté (génotypes C802T et 802TT) était associée à un effet protecteur contre les effets indésirables GI, quelque soit la formulation du MPA ou l'inhibiteur de la calcineurine co-administré (Yang et al., 2009). Une autre étude chez des patients cancéreux a démontré que la fréquence des nausées suite à la prise de la morphine, était plus élevée chez les patients non-porteurs de l'allèle *UGT2B7*2* (Fujita et al., 2009).

Chez des Chinois exposés à la benzidine, une association significative a été constatée entre l'incidence du cancer de la vessie et la présence d'au moins un allèle muté du variant *UGT2B7*2* (Lin et al., 2005). Cette association n'a pas pu être répliquée dans une étude récente de type cas-témoins chez des sujets caucasiens (Zimmermann et al., 2008). Une autre

¹ Zidovudine = AZT, médicament antirétroviral et le premier utilisé pour le traitement de l'infection par le VIH

étude chez des caucasiens incluant 441 patients atteints de CCR et 600 volontaires sains a montré que la fréquence du génotype *UGT2B7**2/*2 était plus élevée chez les patients ayant une localisation proximale de la tumeur, spécialement chez les hommes, suggérant que ce génotype constitue un facteur de risque pour le développement de CCR proximal (van der Logt et al., 2009).

D'autres SNPs, synonymes ou non, ont été identifiés sur l'exon 2 (G735A et T801A), l'exon 4 (G1059 et T1062) et dans le promoteur (A-1248G, T-1241C, T-1054C, G-842A, A-268G, T-102C) de l'*UGT2B7*, résultant en trois principaux haplotypes. Tous les SNPs du promoteur susmentionnés sont en déséquilibre de liaison complet entre eux et en déséquilibre de liaison inverse avec le SNP exonique C802T. Une étude menée par notre équipe a montré une association significative entre les deux SNPs en déséquilibre de liaison (*UGT2B7**2 et *UGT2B7* G-842A) et le taux de production de l'acylMPAG, aussi bien *in vitro* par des microsomes génotypés qu'*in vivo* chez des patients transplantés rénaux recevant du MMF en association avec le sirolimus (Djebli et al., 2007). Dans une autre étude chez des patients transplantés rénaux, l'association entre le polymorphisme *UGT2B7* G-842A et l'exposition à l'acylMPAG n'a pas été retrouvée. Dans la même étude, aucune influence de ce variant n'a été constatée sur l'incidence des diarrhées ou des leucopénies, deux effets secondaires pour lesquels l'implication de l'acylMPAG a été suspectée (van Agteren et al., 2008).

1.3. Transporteurs d'efflux

Les transporteurs membranaires facilitent la capture ou l'efflux des composés endogènes, d'ions et de médicaments à travers la membrane cellulaire. Ils influencent par conséquent la biodisponibilité des xénobiotiques dans l'organisme en participant à leur absorption, leur distribution et leur élimination.

Les transporteurs sont divisés en deux catégories : la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et la superfamille des transporteurs de solutés (solute carriers [SLC]). Les transporteurs ABC sont des pompes d'efflux qui dépendent de l'hydrolyse de l'ATP afin d'activer le passage des substrats au travers des membranes biologiques (Borst and Elferink, 2002; Glavinas et al., 2004). Ces transporteurs agissent en limitant l'accumulation de composés cytotoxiques aussi bien dans les cellules tumorales (Cole et al., 1992; Doyle et al., 1998; Gottesman, 2002; Juliano and Ling, 1976; Kool et al., 1997; Mirski et al., 1987; Veldman et al., 1999) que dans les tissus sains (Ayrton and Morgan, 2001; Leslie et al., 2005; Thiebaut

et al., 1987). Ce phénomène cellulaire est appelé résistance pléiotropique ou *multidrug resistance* (MDR).

Les membres de la superfamille des SLC assurent généralement la capture cellulaire des nutriments comme le glucose ou les acides aminés, soit par mécanisme de transport passif où le substrat est déplacé selon le gradient de concentration, soit selon un mécanisme secondaire de transport actif, où la translocation du substrat contre le gradient de concentration est couplée à un flux d'ion (gradient électrochimique) (Hediger et al., 2004). Comme les transporteurs ABC, les transporteurs SLC jouent un rôle prononcé dans la pharmacocinétique (absorption, distribution et élimination) d'un large panel de médicaments, toxines, composés endogènes et de leurs métabolites.

1.3.1. Mécanisme de transport à travers l'épithélium intestinal

L'absorption à travers l'épithélium intestinal de divers composés est divisée essentiellement en deux voies : paracellulaire (entre les cellules) et transcellulaire (passage au travers des cellules). La perméabilité paracellulaire est possible uniquement pour les petites molécules et se fait entre les jonctions serrées (tight junction) de la membrane épithéliale. Cependant, l'absorption via cette voie est généralement faible puisque les jonctions limitent la circulation de fluides entre les cellules et assurent ainsi l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires. Le transport transcellulaire est effectué par les trois mécanismes suivants : la diffusion passive à travers la bicouche lipidique, la diffusion facilitée par des transporteurs spécifiques, et l'endocytose (transcytose). Les transporteurs dédiés au transport facilité sont des protéines membranaires.

Les transporteurs membranaires les plus représentatifs et actifs décrits au niveau intestinal, sont les deux superfamilles de transporteurs ABC et SLC. Ces transporteurs assurent des rôles importants de défense contre la pénétration de xénobiotiques et de transport membranaire de nombreux composés endogènes. Les transporteurs ABC fonctionnent de manière active ATP-dépendante. L'hydrolyse de l'ATP entraîne la phosphorylation intermédiaire du transporteur, permettant le transport actif des substrats contre le gradient de concentrations (Dean et al., 2001; Schinkel and Jonker, 2003). Les transporteurs ABC incluent l'archétype P-glycoprotéine (P-gp ou Multidrug resistance protein 1 [MDR1] codée par le gène *ABCB1*),

les Multidrug resistance-related proteins composées de 9 membres (MRP 1-9 codées par les gènes *ABCCs*) et la breast cancer resistance protein (BCRP codée par le gène *ABCG2*). Ces transporteurs ABC expulsent les médicaments, xénobiotiques et métabolites de l'intestin, en assurant ainsi la prévention de leur absorption dans le sang ou dans la circulation lymphatique et la protection de l'organisme contre une toxicité aiguë ou chronique (Jones and George, 2004;Linton, 2007).

Les membres compétents des transporteurs SLC localisés à la surface des cellules épithéliales intestinales appartiennent à la famille des OATP (codés par le gène *SLCO*), des transporteurs solute carriers peptide (PepT1 ; codés par le gène *SLC15A1*) et des OCTNs (codés par le gène *SLC22*) (Englund, 2006). La famille de transporteurs OATs ou OCTs (les deux codés par les gènes *SLC22*) a également été identifiée au niveau intestinal, mais semble avoir surtout une grande importance dans le transport de petites molécules endogènes au niveau rénal. Les transporteurs SLC interviennent dans l'absorption intestinale d'un grand nombre de médicaments.

La suite de ce chapitre portera plus particulièrement sur les transporteurs ABC les mieux caractérisés et présents dans les trois parties structurales de l'intestin grêle : duodénum, jéjunum et l'iléon.

1.3.2. Les transporteurs ABC intestinaux

La superfamille des transporteurs ABC est constituée de 49 membres connus à ce jour, appartenant à 7 sous-familles (ABCA à ABCG) (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>) (Dean et al., 2001;Higgins, 1992).

Les transporteurs ABC limitent l'accumulation intracellulaire de leurs substrats cytotoxiques en les expulsant de la cellule (Takano et al., 2006). Ces transporteurs ABC sont exprimés dans l'épithélium intestinal de l'homme et du rongeur. Dans l'épithélium intestinal, MDR1 (P-gp), MRP2 et BCRP sont exprimées sur la membrane de la bordure en brosse tandis que MRP3 est exprimée au niveau de la membrane basolatérale (Englund, 2006). La P-gp assure le transport de composés hydrophobes neutres ou chargés positivement présentant une grande variété structurale et pharmacologique (Chan et al., 2004;Mizuno et al., 2003;Takano et al., 2006). Comme la P-gp assure le transport de ces importantes molécules via la membrane intestinale, elle peut servir également comme une barrière fonctionnelle contre l'entrée de médicaments (Zhang et al., 2001). Les MRP transportent des composés relativement hydrophiles, comme

les composés endogènes ou exogènes conjugués à l'acide glucuronique, au glutathion ou au radical sulfate (Chan et al., 2004; Suzuki and Sugiyama, 2002). La BCRP transporte à la fois les agents hydrophobes et hydrophiles (Doyle and Ross, 2003). Ensemble, la P-gp, MRP2 et BCRP peuvent donc limiter l'absorption intestinale d'un grand nombre de substances administrées oralement. Les transporteurs ABC exprimés dans la membrane de la bordure en brosse, spécialement la P-gp, peuvent également faciliter l'efflux intestinal de substrats dissous dans la circulation sanguine. D'autre part, les MRP comme la MRP3 localisée sur la membrane basolatérale transportent les substrats du compartiment intracellulaire vers la circulation sanguine et par conséquent empêchent l'influx dans le sens inverse.

Les données existantes montrent que le niveau d'expression des transporteurs ABC varie tout au long du tractus digestif humain. La P-gp est exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, comme les entérocytes, et son expression augmente progressivement de l'estomac au côlon. Son taux d'ARNm dans le côlon est similaire à celui du tissu iléal, qui est approximativement six-fois plus élevé que celui du duodénum (Cao et al., 2005; Thorn et al., 2005).

Les transporteurs MRP2 et BCRP sont également exprimés à la surface apicale des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon. L'expression de MRP2 est plus importante au niveau du duodénum et diminue vers l'iléon et le côlon (Dietrich et al., 2003; Zimmermann et al., 2005). L'expression de l'ARNm de la BCRP est aussi maximale au niveau du duodénum et diminue progressivement en direction du rectum (Gutmann et al., 2005). BCRP et MRP2 sont plus abondantes dans le jéjunum que la P-gp, suggérant les rôles distinctifs de ces protéines dans le transport intestinal (Taipalensuu et al., 2001).

L'expression des transporteurs d'efflux ABC dans l'intestin serait également modulée par différents facteurs comprenant les médicaments comme les stéroïdes, la rifampicine et le phénobarbital, des composés naturels comme le millepertuis, et divers états pathologiques. En particulier, les états pathologiques tels que la maladie de Crohn, les colites ulcéreuses, la diarrhée, l'insuffisance rénale ou l'insuffisance hépatique aiguë peuvent influencer l'expression intestinale de la P-gp (Buchman et al., 2005; Englund et al., 2007; Langmann et al., 2004; Lemahieu et al., 2004; Maezono et al., 2005; Naud et al., 2007; Sun et al., 2006b).

De plus, dans cette dernière décennie, plusieurs polymorphismes génétiques sur les séquences de gènes codant pour les transporteurs ABC ont été identifiés, et étudiés pour la variabilité de leur fréquence en fonction des ethnies et particulièrement pour leur impact fonctionnel sur

l'ARNm et l'expression de la protéine, la spécificité vis-à-vis de leurs substrats, sur la biodisponibilité et les effets thérapeutiques de ceux-ci.

1.3.3. La P-glycoprotéine

1.3.3.1. Structure et régulation de l'expression de la P-glycoprotéine

La P-gp est constituée de 1280 acides aminés et présente un poids moléculaire de 170 kDa (Evseenko et al., 2007; Schinkel and Jonker, 2003). La protéine est formée de deux parties, chacune ayant six domaines transmembranaires hydrophobes et un domaine de liaison de l'ATP. Les deux moitiés sont séparées par une liaison flexible et les deux domaines de liaison de l'ATP sont structurellement identiques. Les 12 domaines transmembranaires sont localisés dans la membrane plasmique. Les domaines de liaison de l'ATP agissent comme des ATPases qui hydrolysent l'ATP en ADP. Les études *in vitro* ont montré que l'activité ATPase peut être induite en présence d'un substrat MDR1 (Kerr et al., 2001; Sauna et al., 2001; Senior et al., 1995). La P-gp contient une large poche de fixation du substrat, assemblée généralement par des domaines transmembranaires (TM5, TM6, TM11 et TM12) qui déterminent la spécificité au substrat (Kajiji et al., 1993; Loo and Clarke, 1994; Zhang et al., 1995). La P-gp est régulée post-traductionnellement au niveau de la membrane plasmique (Paterson and Gottesman, 2007), et contient trois sites de N-glycosylation (N91, N94 et N99) (Gribar et al., 2000). Plusieurs sites de phosphorylation ont également été identifiés, mais les études réalisées sur les mutants ont montré que ces sites ne sont pas responsables ni de la localisation ni de la fonction dans les cultures cellulaires (Germann et al., 1996; Gribar et al., 2000).

1.3.3.2. Variabilité génétique du gène *ABCB1*

Le gène *ABCB1* (autrefois appelé PGY1) est localisé sur le chromosome 7q21.1. Son ADN codant fait environ 4,5 kb, avec 29 exons ayant une taille entre 49 et 587 pb. Selon la base de données des SNPs, maintenue par le centre national pour l'information en biotechnologie des Etats-Unis (NCBI), le gène *ABCB1* humain présente plus de 50 SNPs dans la région codante. L'étude de la localisation des SNPs a permis d'établir plusieurs observations importantes (Fung and Gottesman, 2009) :

- Des SNPs ayant plus de 1% d'hétérozygotie ont été identifiés dans deux-tiers des vingt-neuf exons. Des SNPs ont été identifiés dans le transcrit MDR1 depuis le site 5' d'initiation jusqu'à la région 3' non traduite (Untranslated region [UTR]).
- Dans la région codante, les SNPs résultent en mutations synonymes ou non-synonymes, mais aucun codon non-sens n'a été identifié.
- La majorité des mutations sont traduites en acides aminés localisés dans la région intracellulaire. Seulement quatre SNPs ont été identifiés dans deux des 12 domaines transmembranaires.

Les caractéristiques des SNPs du gène *ABCB1* suggèrent la préservation de l'intégrité structurale du gène au cours de l'évolution. Dans la P-gp, la région extracellulaire est constituée de 96 acides aminés (correspondant à 288 nucléotides). Le taux d'occurrence de SNP dans cette région est de 1,04% (3 SNPs parmi les 288 nucléotides). Ce taux est similaire à celui de SNP (1,3%) dans la région intracellulaire (36 SNPs parmi les 2757 nucléotides). En revanche, le taux d'occurrence de SNPs dans les domaines transmembranaires est beaucoup plus faible (0,503% ou 4 SNPs parmi 795 nucléotides). Ceci suggère que les fonctions des domaines transmembranaires qui ancrent la protéine dans la membrane plasmique et forment les sites de fixation de substrats, sont bien conservées.

Un grand intérêt a été accordé au polymorphisme synonyme fréquemment identifié « C3435T », situé au centre de l'exon 26. Cette substitution est traduite en isoleucine, un résidu hydrophobe. Hoffmeyer et col. ont trouvé que les porteurs de l'allèle 3435T présentaient une diminution significative de l'expression de la P-gp intestinale et une augmentation des taux plasmatiques de digoxine (Hoffmeyer et al., 2000). Cette première observation d'une association entre un polymorphisme silencieux et des modifications fonctionnelles de la protéine a été à l'origine d'un grand nombre de nouvelles études dont le but était de trouver une explication à une telle association. Une des caractéristiques importantes de ce SNP est sa fréquence allélique qui varie en fonction de l'origine ethnique des individus. La majorité des études a été effectuée sur les populations Asiatique et Caucasienne. Chez les Caucasiens, la fréquence du polymorphisme C3435T est comprise entre 0,52 et 0,57. Chez les Africains, en revanche, la prévalence est plus faible (entre 0,17 et 0,27), tandis que dans les populations orientales des fréquences comprises entre 0,41 et 0,47 ont été rapportées (Ameyaw et al., 2001; Kim et al., 2001a; Lee et al., 2005; Schaeffeler et al., 2001).

Les analyses de déséquilibre de liaison ont confirmé que le SNP C3435T est associé avec plusieurs autres SNPs du gène *ABCB1* (Kroetz et al., 2003; Leschziner et al., 2006; Sai et al., 2003; Tang et al., 2004). L'haplotype le plus fréquemment étudié est constitué du polymorphisme C3435T combiné avec le SNP G2677T/A et/ou le SNP C1236T. Un fort déséquilibre de liaison entre ces SNPs a été démontré dans plusieurs études (Jeannesson et al., 2007; Kroetz et al., 2003; Sai et al., 2006). Dans cet haplotype, le SNP situé au niveau de l'exon 21 en position 2677 est un polymorphisme non-synonyme. Cette mutation triallélique G2677T/A conduit donc à deux substitutions d'acide aminé possibles, avec des fréquences différentes : le SNP G2677T (A893S) est beaucoup plus fréquent que le SNP G2677A (A893T). L'autre SNP, C1236T constitue un polymorphisme synonyme au niveau de l'exon 12. Cette mutation est identifiée en troisième position codante pour la glycine. Les sujets d'origine africaine portent principalement l'haplotype sauvage CGC et pas l'allèle muté TTT (Allabi et al., 2005; Tang et al., 2004). Dans la population caucasienne, la fréquence des haplotypes CGC et TTT est approximativement la même (Jeannesson et al., 2007; Potocnik et al., 2008). En revanche, dans les populations asiatique et indienne, l'haplotype TTT est prédominant (Choi et al., 2007; Tang et al., 2004; Xu et al., 2008). De plus, la distribution de fréquence démontre que le génotype *ABCB1* a changé graduellement au cours de la migration humaine, originaire de l'Afrique (Eswaran et al., 2005).

Plusieurs études cliniques ont été donc réalisées afin d'examiner si ces polymorphismes d'*ABCB1* et notamment le SNP C3435T, constituaient un facteur prédictif de la survenue de certaines maladies (ex. le cancer, la colite ulcéreuse, l'épilepsie) ou de la réponse aux traitements (ex. médicaments immunosuppresseurs, médicaments anticancéreux) (Azarpira et al., 2006; Leschziner et al., 2007; Osuga et al., 2006; Saitoh et al., 2005; Sissung et al., 2008). De plus, l'association de la mutation synonyme et l'expression de la protéine dans différents organes (ex. duodénum, intestin, placenta, foie et rein) a été largement étudiée (Goto et al., 2002; Hitzl et al., 2004; Owen et al., 2005) (Goto et al., 2002; Hitzl et al., 2004; Hoffmeyer et al., 2000; Owen et al., 2005; Siegsmond et al., 2002). Ces études n'étaient pas concluantes, avec des observations contradictoires, ce qui a conduit à l'analyse de l'effet des l'haplotype au lieu du SNP C3435T seul.

Peu d'attention a été accordée aux SNPs introniques et non-codants dans le gène *ABCB1*. Seule l'association des polymorphismes introniques avec les maladies a été analysée. Qian et col. ont suggéré que certains SNPs (T-1517C [promoteur], A-41G [intron 1] et T-129C [exon 1b]) étaient probablement associés avec des troubles de l'humeur chez les jeunes (Qian et al.,

2006). Récemment, une association a été constatée entre les SNPs les plus fréquents de l'intron 13 (exon 13+81 C>T) et le cancer colorectal sporadique (CCR) (Potocnik et al., 2008). Soranzo et col. ont montré que les trois SNPs introniques (IVS 25+3050 G>T, IVS 25+5231 T>C, IVS 26+80 T>C) sont associés à une résistance aux médicaments chez les patients épileptiques (Soranzo et al., 2004). Le nombre d'études *in vitro* des SNPs non-codants est très limité. De plus, l'effet des polymorphismes de la région promotrice n'a pas été bien élucidé *in vitro*. Comparée à la région 5'-UTR, la région 3' présente plus de sites polymorphiques. Certains de ces SNPs ont été exprimés de manière stable dans les cellules HEK-293T, permettant de constater qu'aucun d'entre eux n'affectait la stabilité de l'ARNm (Gow et al., 2008a).

1.3.3.3. Association avec les maladies digestives

Plusieurs études ont montré des associations entre le risque de survenue d'une maladie et les polymorphismes de MDR1. A ce jour, l'association la plus consistante rapportée est celle avec la CU (Brant et al., 2003;Ho et al., 2005;Schwab et al., 2003). Schwab et col. ont observé une fréquence augmentée de l'allèle 3435T chez les patients ayant une colite ulcéreuse (CU), mais pas de relation avec la maladie de Crohn (Schwab, 2003). Au contraire, Langmann et col. ont trouvé une régulation négative importante de MDR1 dans les tissus coliques des patients atteints d'une CU mais pas chez les patients ayant la maladie de Crohn (Langmann et al., 2004). Il est intéressant de noter que le gène *ABCB1* est localisé sur le chromosome 7q22 dans une région identifiée, par analyse du génome entier, comme étant associée aux maladies intestinales inflammatoires (Satsangi et al., 1996). Ho et col. ont décrit deux haplotypes, un associé avec la susceptibilité à la CU (3435T/G2677, p=0,03) et l'autre présentant un effet protecteur (C3435/2677T, p=0,002) (Ho et al., 2005). D'autres études ont confirmé cette association pour le SNP G2677T ou pour l'haplotype de *ABCB1* (Brant, 2003;Ho, 2006;Potocnik, 2004). Le rôle physiologique exact de cette protéine dans l'étiologie des maladies inflammatoires intestinales reste contradictoire. Plusieurs autres études de type cas-témoins ont échoué à détecter une association entre ce gène variant et la CU (Croucher et al., 2003;Gazouli et al., 2004).

1.3.4. MRP2 et MRP3

1.3.4.1. Structure et régulation de MRP2 et MRP3

La famille des MRP humaines est composée de 9 membres : MRP1 (*ABCC1*), MRP2 (*ABCC2*), MRP3 (*ABCC3*), MRP4 (*ABCC4*), MRP5 (*ABCC5*), MRP6 (*ABCC6*), MRP7 (*ABCC10*), MRP8 (*ABCC11*), et MRP9 (*ABCC12*) (Hopper et al., 2001; Tammur et al., 2001). Les MRP1-3 et MRP6-7 sont des protéines de 190 kDa ayant 2 ABC et 17 hélices transmembranaires dans leurs structures. Les MRP4-5 et MRP8 ont également 2 ABC mais leurs structures sont formées de 12 hélices transmembranaires. Parmi ces MRP, MRP1-6 sont exprimées dans l'intestin grêle et le côlon humains (Johnson et al., 2006; Maher et al., 2006; Prime-Chapman et al., 2004). De plus, MRP2 et MRP3 peuvent avoir des rôles importants comparées aux autres MRP dans l'intestin en raison de leurs taux d'expression élevés (Hilgendorf et al., 2007; Rost et al., 2002). La protéine MRP2, le produit du gène *ABCC2*, est constituée de 1545 acides aminés, et MRP3, le produit du gène *ABCC3*, est une protéine de 1527 acides aminés (Zhang et al., 2003).

1.3.4.2. Expression et fonctions de MRP2 et MRP3

Le transporteur MRP2 a été initialement connu sous le nom de transporteur canaliculaire multispécifique d'anions organiques (canalicular Multispecific Organic Anion Transporter [cMOAT]), présent dans les canalicules hépatiques (Jansen et al., 1993). Dans la membrane canaliculaire biliaire, MRP2 joue un rôle important dans la sécrétion hépatobiliaire de divers types de substances, incluant la bilirubine glucuroconjugée (Suzuki and Sugiyama, 2002). Ainsi, la déficience en MRP2, comme chez les rats dits « Eisai hyperbilirubinemia » déficients génétiquement en MRP2 et chez la souris *Mrp2*^{-/-}, est associée à une hyperbilirubinémie conjuguée (Chu et al., 2006; Hosokawa et al., 1992). Chez l'homme, la déficience héréditaire du gène *ABCC2* a été identifiée chez les patients souffrant du syndrome de Dubin-Johnson. Ces patients présentent une augmentation de la concentration des glucuroconjugués de la bilirubine dans le sang à cause de leur efflux des hépatocytes vers la

circulation sanguine via la MRP3 basolatérale (Nies and Keppler, 2007). En effet, à l'exception de MRP2, les autres isoformes MRP sont localisées au niveau de la membrane basolatérale dans plusieurs tissus épithéliaux (Konig et al., 1999).

Dans l'intestin grêle du rat, la protéine MRP2 est fortement exprimée dans la membrane de la bordure en brosse des segments proximaux et son expression diminue graduellement du jéjunum à l'iléon distal (Rost et al., 2002; Yokooji et al., 2007). A l'inverse, l'analyse par Western blot de MRP3 a montré que son expression est 1,6-fois plus élevée dans l'iléon que le jéjunum. Dans l'intestin humain, l'expression des MRP a principalement été évaluée par les taux d'ARNm. Seithel et col. (2006) ont classé les transporteurs en fonction du taux relatif d'expression du gène dans le jéjunum et le côlon humains. Ce classement confirme que MRP2 est élevée dans l'intestin proximal et MRP3 dans l'intestin distal (Seithel et al., 2006).

1.3.4.3. Variabilité génétique du gène *ABCC2*

Le gène *ABCC2* est localisé sur le locus chromosomique 10q24 et constitué de 32 exons (dont 31 codants). L'analyse des polymorphismes de ce gène a été réalisée et plus de 40 SNPs ont été identifiés chez des individus sains et dans différentes ethnies (Colombo et al., 2005; Ito et al., 2001; Meyer zu Schwabedissen et al., 2005; Suzuki and Sugiyama, 2002). Considérant le rôle important de MRP2 dans le processus d'excrétion, l'hypothèse a été émise que ces polymorphismes pouvaient contribuer à l'explication des différences interindividuelles dans le transport et l'excrétion. Une étude récente a apporté des informations détaillées sur les variations et les structures haplotypiques du gène *ABCC2* chez les japonais (Sai et al., 2008). En raison de son importance potentielle dans la biodisponibilité des molécules anioniques, et par conséquent dans les effets pharmacologiques et/ou secondaires de ces molécules, la corrélation entre phénotype et génotype a été étudiée (Suzuki and Sugiyama, 2002). Bien que plusieurs études aient suggéré l'association des SNPs avec une expression ou une fonction altérée de MRP2, la connaissance des conséquences biochimiques est encore trop faible et leurs associations avec le phénotype clinique restent à clarifier. Parmi ces différents SNPs, C-24T (promoteur), G1249 (exon 10) et C3972T (exon 28) sont les plus fréquemment observés (Ito et al., 2001; Itoda et al., 2002; Meyer zu Schwabedissen et al., 2005). Itoda et col. ont rapporté un fort déséquilibre de liaison (96%) entre -24T et 3972T chez les sujets japonais (Itoda et al., 2002). Le polymorphisme *G1249A* résulte en une substitution d'une Val par une Ile à la position 417 et le génotype 1249AA était associé à une diminution du taux d'ARNm (Meyer zu Schwabedissen et al., 2005), tandis que le SNP *C3972T* est une mutation

« silencieuse » à la position 1324 (Ile1324Ile). Plusieurs études ont suggéré l'association de ces trois SNPs avec une altération de l'expression ou de la fonction MRP2 (Haenisch et al., 2007; Han et al., 2007). D'autres mutations non-synonymes telles que *C2302T* (Arg768Trp) et *C2366T* (Ser789Phe) dans l'exon 18, ainsi que *G4348A* (Ala1450Thr) dans l'exon 31, ont été identifiées avec des fréquences d'environ 1% uniquement. Comme ces trois SNPs sont localisés près des sites de liaison de l'ATP, un impact fonctionnel peut être attendu mais n'a jamais été prouvé. Enfin, le SNP *C2302T* a été également identifié chez des individus présentant le syndrome de Dublin-Johnson (Materna and Lage, 2003).

1.3.5. La BCRP

1.3.5.1. Structure et régulation de la BCRP

La BCRP a été initialement isolée à partir de la lignée humaine de carcinome mammaire MCF-7/AdrVp résistante à la doxorubicine (Doyle et al., 1998). Allikmets et col. ont localisé son gène en position chromosomique 4q22 et nommé celui-ci *ABCP* (pour ABC Placentaire) (Allikmets et al., 1998). Miyake et col. ont isolé ce gène à partir d'une lignée cellulaire humaine de carcinome du colon hautement résistante à la mitoxantrone ; le gène a été alors appelé *MXR* (*Mitoxantrone Resistance-associated gene*) (Miyake et al., 1999). La BCRP, produit du gène *ABCG2*, est une protéine membranaire de 72 kDa composée de 655 acides aminés (Litman et al., 2001). Elle est constituée d'un domaine N-terminal de liaison à l'ATP (NBD) et de 6 hélices α transmembranaires. La BCRP est donc un héli-transporteur et fonctionne sous forme d'homodimères liés par des ponts disulfures (Staud and Pavek, 2005).

Le gène humain de BCRP (*ABCG2*) présente 16 exons et 15 introns. Son promoteur présente plusieurs sites de régulation : Sp1, AP1 et AP2 et un CCAAT box en aval des îlots CpG (Bailey-Dell et al., 2001). Ee et col. ont identifié un élément ERE (Estrogen Response Element) dans ce promoteur. En effet, un traitement des cellules par l'œstrogène induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de la BCRP. Une mutation au niveau de l'ERE atténue l'effet de l'œstrogène (Ee et al., 2004). Un autre mécanisme de régulation d'expression de la BCRP a été décrit, il s'agit du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). Ceci-ci permet aux cellules tumorales surexprimant la BCRP de survivre dans un environnement hypoxique (Krishnamurthy et al., 2004).

1.3.5.2. Expression et fonctions de la BCRP

En plus des lignées cellulaires tumorales (Brangi et al., 1999; Rocchi et al., 2000), la BCRP est exprimée dans de nombreux tissus humains sains. L'expression de l'ARNm de la BCRP a été détectée dans les cellules ovariennes germinales, le testicule, les canalicules biliaires, dans la bordure en brosse du tubule proximal rénal, la vessie, le cerveau, le cœur et l'endothélium veineux (Doyle and Ross, 2003; Huls et al., 2008; Maliepaard et al., 2001; Taipalensuu et al., 2001). La forte expression de la BCRP dans les cellules de placenta suggère que celle-ci est responsable du transport de nutriments dans la circulation sanguine du fœtus, ou qu'elle permet au fœtus de se débarrasser des métabolites toxiques (Maliepaard et al., 2001). La BCRP est également largement et fortement exprimée dans l'intestin humain le long de l'intestin grêle et du côlon (Englund et al., 2006; Hilgendorf et al., 2007; Taipalensuu et al., 2001).

La BCRP peut transporter un large panel de substrats organiques présentant des différences structurelles et fonctionnelles, tels que les composés hydrophobes, les bases faibles, les anions organiques, les conjugués à l'acide glucuronique, à l'ion sulfate, au glutathion et au glutamylate de nombreuses molécules endogènes et exogènes (Doyle and Ross, 2003; Mao and Unadkat, 2005; Takano et al., 2006). Parmi ces substrats de la BCRP, l'étoposide, substrat aussi de la P-gp et des MRP et le méthotrexate substrat des MRP. L'irinotécan et le tamoxifène sont également substrats de la P-gp. Comme ceux-là, plusieurs autres médicaments qui sont biodisponibles par voie orale, sont reconnus par plusieurs transporteurs d'efflux.

1.3.5.3. Variabilité génétique du gène *ABCG2*

Le séquençage du gène *ABCG2* extrait à partir de tissus humains a révélé plus de 80 variations différentes (Bosch et al., 2005; Kobayashi et al., 2005).

Deux SNPs, *G34A* (Val12Met) et *C421A* (Gln141Lys) ont été fréquemment observés, qui pourraient modifier la fonction de transport de la BCRP et la sensibilité des cellules porteuses de ces mutations à plusieurs médicaments anticancéreux (Mizuarai et al., 2004). La protéine porteuse de la substitution Val12Met présente une localisation membranaire altérée tandis que la protéine porteuse de la substitution Gln141Lys présente une fonction ATPase altérée. Une baisse d'expression de la protéine a été rapportée pour la mutation Gln141Lys (Imai et al., 2002). Deux études visant à mettre en évidence l'impact fonctionnel du polymorphisme

C421A du gène *ABCG2* sur la biodisponibilité de l'irinotécan (de Jong et al., 2004), du diflomotécan et du topotécan ont été conduites (Sparreboom et al., 2004; Sparreboom et al., 2005). Le SNP *C421A* est localisé dans la région de liaison de l'ATP. Le variant 421A montrait une diminution de 1,3-fois de l'activité ATPase par rapport à la BCRP sauvage (Mizuarai et al., 2004) et les biodisponibilités de diflomotécan, topotécan (Sparreboom et al., 2004; Sparreboom et al., 2005), SN38 et son glucuroconjugué étaient significativement plus élevées (de Jong et al., 2004).

2. Méthodes de phénotypage *in vitro* des enzymes de métabolisme

2.1. Généralités

Le terme « *in vitro* » s'oppose au terme « *in vivo* », ces techniques peuvent être complémentaires ou alternatives à l'expérimentation animale. Leur facilité de mise en œuvre, leur isolement du contexte physiologique permettant l'étude d'un mécanisme d'action, et surtout la possibilité d'utiliser des cellules humaines qui permettent de s'affranchir des différences inter-espèces, en font un outil incontournable. Les réactions de phénotypage *in vitro* sont de plus en plus utilisées non seulement lors des étapes de screening, mais aussi au cours du développement du médicament. Elles sont donc menées afin d'identifier l'enzyme spécifique responsable du métabolisme d'une molécule donnée. Ceci peut être utile dans la prédiction de potentielles interactions médicamenteuses, l'impact d'un polymorphisme sur la biodisponibilité d'un médicament et la formation de métabolites actifs et/ou toxiques, et nécessaire pour estimer la contribution d'une isoforme donnée dans la clairance totale d'un médicament donnée (Ekins et al., 2000; Lu et al., 2003; Williams et al., 2003). Pour les réactions de phénotypage, plusieurs modèles ont été développés à différentes échelles, de l'enzyme recombinante à l'organe intact perfusé (Figure 5).

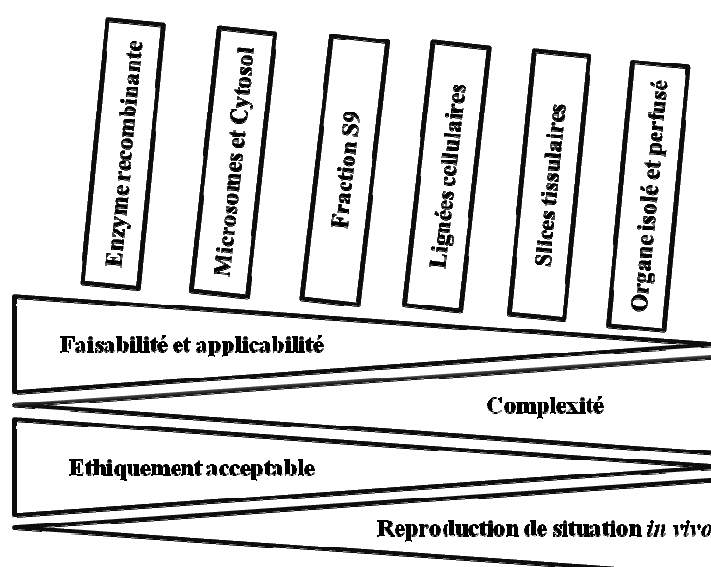


Figure 5 : Comparaison des modèles biologiques utilisés pour l'étude de métabolisme *in vitro*

2.2. Principaux modèles biologiques d'étude de métabolisme *in vitro*

2.2.1. Enzymes recombinantes

Les enzymes exprimées à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) en système hétérologue, constituent un important modèle pour l'étude du métabolisme *in vitro*. Les systèmes d'expression incluent une variété de cellules eucaryotiques présentant une faible activité intrinsèque de l'enzyme à exprimer, notamment :

- les cellules de mammifères telles que les lymphoblastes humaines (Crespi et al., 1997), les cellules d'hépatome humain HepG2 (Wilkening et al., 2003) et les cellules rénales embryonnaires HEK293 (Court et al., 2008),
- les levures (Ikushiro et al., 2004),
- les bactéries (Kollock et al., 2009),
- et cellules d'insectes infectées par un baculovirus (Supersomes®) (Asseffa et al., 1989; Lee et al., 2007). Ce dernier système d'expression sélectionné pour la production de taux élevés d'expression protéique, est le plus utilisé commercialement. Les fractions membranaires des cellules d'insectes présentent des activités UGT et CYP quasi nulles. Les enzymes recombinantes commercialisées sont souvent des enzymes liées à la membrane, qui sont soumises à une centrifugation différentielle sans subir de purification. La présence de cette bicouche lipidique joue probablement le rôle dans le maintien de l'enzyme dans sa conformation native (Crespi and Miller, 1999).

Les modèles recombinants ont l'avantage d'offrir un système enzymatique individuel pour prédire la clairance d'un médicament spécifique par une isoforme (Iwuchukwu et al., 2008; Proctor et al., 2004) ou l'étude de la capacité d'un médicament à inhiber le métabolisme d'un substrat par cette isoforme (risque d'interaction médicamenteuse) (Bjornsson et al., 2003). Toutefois, en raison de l'absence de voies métaboliques compétitives dans ces systèmes, il est impossible d'obtenir des données sur la contribution relative de l'isoforme en question sur le métabolisme global du médicament *in vivo*. Afin de surmonter ce problème lors de l'extrapolation *in vitro-in vivo*, deux approches ont été proposées : celle du facteur d'activité relative (relative activity factor ; RAF) (Crespi et al., 1997; Peters et al., 2008; Toide et al., 2004; Venkatakrisnan et al., 2000) et celle du facteur d'extrapolation inter-système (inter-system extrapolation factor ; ISEF) (Proctor et al., 2004) (cf. paragraphe 2.3.1.1.).

Néanmoins, les enzymes produites à partir d'ADNc et les enzymes purifiées peuvent également servir à confirmer les résultats obtenus à partir de microsomes ou de tissu hépatique humain à l'état natif.

On trouve maintenant sur le marché des préparations recombinantes purifiées pour la plupart des enzymes du métabolisme : CYP co-exprimés avec cytochrome P450 réductase et optionnellement cytochrome b₅, UGT, mono-oxygénases à flavine, époxyde hydrolase et glutathion S-transférases.

2.2.2. Fractions subcellulaires

La notion de préparations subcellulaires englobe les microsomes, d'autres organelles cellulaires et l'homogénat tissulaire. Elles sont obtenues par centrifugation différentielle à haute vitesse d'un homogénat tissulaire obtenu suite à un broyage tissulaire et une lyse cellulaire (Figure 6).

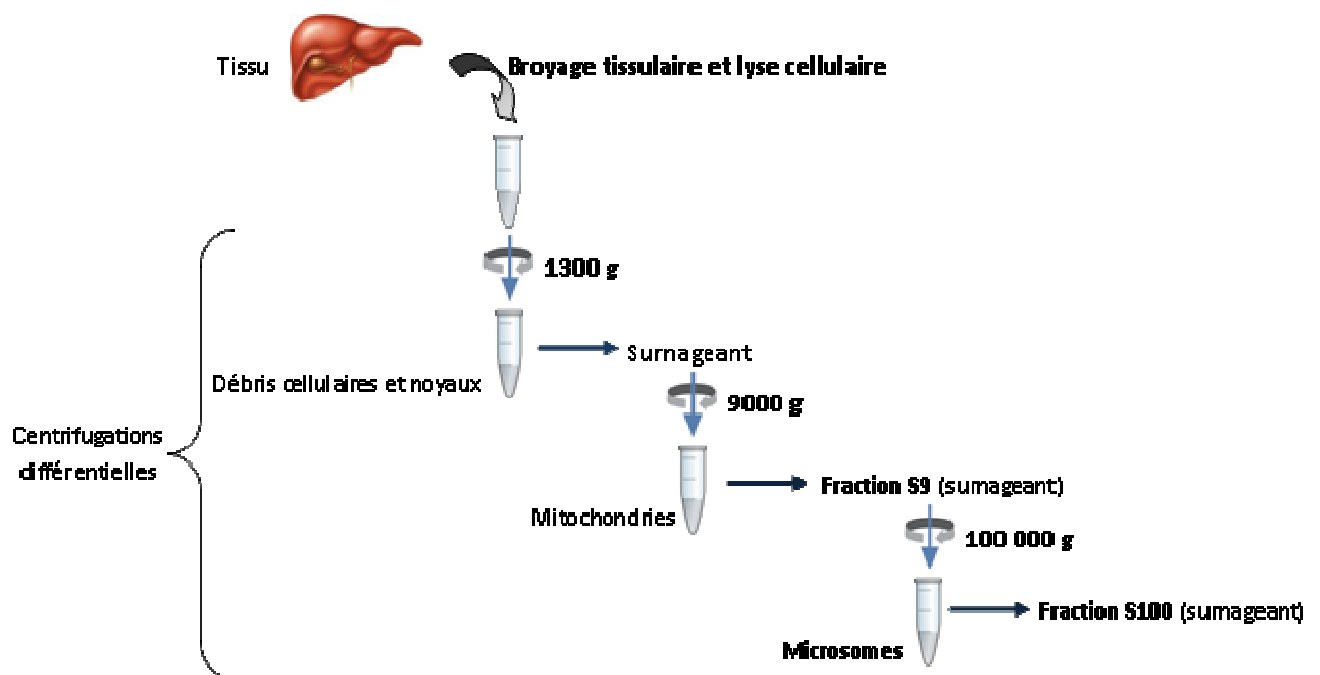


Figure 6 : Illustration de l'isolement des fractions subcellulaires

2.2.2.1. Microsomes

Les microsomes, vésicules du RE, sont préparés par centrifugation différentielle (Pelkonen et al., 1974). Ils sont couramment utilisés pour l'exploration des effets d'un nouveau médicament sur les enzymes du métabolisme et pour l'obtention de données préliminaires sur les interactions susceptibles de survenir entre médicaments (Kumar et al., 1999;Rodrigues and Wong, 1997;Tamaro et al., 2009). Afin de refléter une activité standard de l'enzyme et d'éviter de tirer des conclusions à partir d'échantillons pouvant posséder des voies métaboliques aberrantes, il faut utiliser, soit individuellement soit en pool, des microsomes préparés à partir de plusieurs donneurs différents. En supplémentant les microsomes avec les co-substrats appropriés et d'autres réactifs, il est possible d'étudier individuellement les différentes activités des CYP, UGT et autres transférases, les monooxygénases à flavine et les époxydes hydrolases. Les principaux avantages de ce système sont : facilité de préparation et d'utilisation, disponibilité sur le marché, stabilité à long terme en cryoconservation des activités enzymatiques, concentration enzymatique et turnover ¹élevés et optimisation simple des conditions d'incubation. De plus, Kilfold et col. ont démontré récemment la possibilité de combiner des co-substrats afin d'estimer la clairance pour différents composés métabolisés à la fois par les CYP et UGT, malgré la destruction de l'organisation naturelle des éléments intracellulaires (Kilford et al., 2009). L'inconvénient majeur de ce modèle est le temps d'incubation limité (les activités catalytiques diminuent après 2 heures d'incubation).

2.2.2.2. Fraction S9

La fraction intracellulaire S9 est le surnageant de l'homogénat résultant de la précipitation des noyaux et des mitochondries par centrifugation à la vitesse de 9000 g (d'où l'appellation « S9 »). Elle contient des enzymes microsomales et des enzymes cytosoliques (solubles). L'addition de cofacteurs s'avère nécessaire pour l'activation des enzymes : NADPH pour les CYP, UDP-GlcA pour les UGT, de l'adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate pour les sulfo-transférases, de l'acétyl-coenzyme A et son système régénérateur, et du dithiothréitol pour les N-acétyl-transférases. Comme les microsomes, le S9 peut se cryoconserver pendant plusieurs années.

Son contenu enzymatique permet d'évaluer une activité métabolique globale et d'étudier des réactions séquentielles (Ekins et al., 1999). L'activité enzymatique de ce type de préparation

¹ Turnover = nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par unité de temps.

est toutefois inférieure à celle pouvant être obtenue avec des microsomes (pour les enzymes microsomales) ou du cytosol (pour les enzymes solubles) (Brandon et al., 2003).

2.2.2.3. Fraction cytosolique

La fraction cytosolique, dite aussi « S100 », est le surnageant obtenu après la sédimentation des microsomes par ultra-centrifugation à 100 000 g. Elle contient uniquement les trois enzymes solubles de phase II : les N-acétyltransférases, glutathion-S-transférases et sulfo-transférases. La fraction cytosolique est disponible commercialement pour la plupart des espèces animales. L'avantage principal de cette préparation est de disposer des trois enzymes solubles de phase II à des concentrations supérieures à celles de la fraction S9 et de pouvoir étudier spécifiquement chacune de ces enzymes en fonction du co-substrat utilisé.

2.2.3. Culture cellulaire

2.2.3.1. Hépatocytes et lignées cellulaires hépatiques

Hépatocytes

L'utilisation des hépatocytes primaires ou cryoconservés doit sa popularité à leur forte ressemblance avec le foie *in vivo* et à l'élaboration de méthodes de culture cellulaire à haut rendement. Héritiers des coupes de foie, ils possèdent des caractéristiques identiques en termes de viabilité. Les hépatocytes humains constituent de précieux modèles *in vitro* pour la prédiction de la clairance intrinsèque (Hewitt et al., 2007; Houston and Carlile, 1997) et des interactions médicamenteuses (Fahmi et al., 2008; Hewitt et al., 2007; Ripp et al., 2006). Le phénomène de cytotoxicité peut également être évalué (Gomez-Lechon et al., 2007; Lauer et al., 2009; Tuschl et al., 2008). Ce modèle contient toutes les enzymes de métabolisme de phase I et II, permettant une étude globale du métabolisme du médicament avec prise en compte du passage intra-cellulaire.

La disponibilité limitée des hépatocytes humains primaires est l'inconvénient majeur de ce modèle. Après isolement, les hépatocytes peuvent être maintenus en culture mono-couche pendant quatre semaines (Brandon et al., 2003). Cependant, la viabilité des cellules (phénomènes de dédifférenciation et d'inductibilité) limite leur utilisation à quelques jours après l'isolement (Donato and Castell, 2003). Toutefois, l'amélioration et le progrès des

techniques de conservation par cryogénéisation les rend aujourd'hui commercialement accessibles (Guillouzo et al., 1999;Li et al., 1999).

Lignées cellulaires hépatiques

Des lignées d'adénomes ou de carcinomes hépatiques ont été développées comme alternatives à la culture primaire d'hépatocytes (HepG2, BC2 ...) (Doostdar et al., 1988;Ekins et al., 2000;Gomez-Lechon et al., 2001;Wen et al., 2005). Elles ont l'avantage d'une culture facile avec des concentrations relativement stables des enzymes du métabolisme. En revanche, un inconvénient majeur limitant leur utilisation est leur profil enzymatique incomplet (absence ou faible expression des plus importantes enzymes de métabolisme) (Wilkening et al., 2003), largement influencé par le milieu de culture (Brandon et al., 2003). Il est difficile de détecter certains métabolites dans ces lignées et d'étudier les isoformes de CYP ou d'autres enzymes à cause de leurs faibles taux d'expression (Vickers et al., 1992). Une équipe de l'Inserm a caractérisé la lignée « HepaRG » au phénotype très proche des hépatocytes natifs, exprimant de manière stable les enzymes du métabolisme en quantité proche de la physiologie, et exprimant également les récepteurs nucléaires permettant l'induction sur une période de six semaines en culture (Gripon et al., 2002;Aninat et al., 2006;Josse et al., 2008;Kanebratt and Andersson, 2008).

2.2.3.2. Lignées cellulaires transgéniques

La transfection cellulaire est une autre approche pour l'obtention de lignées cellulaires exprimant de façon stable des enzymes de métabolisme à des niveaux d'expression importants (Gasser et al., 1999;Wooster et al., 1993).

Ce modèle, dont font partie les supersomes, permet l'étude des réactions enzymatiques spécifiques et individuelles. Il peut également être utilisé pour produire des métabolites, élucider leur structure chimique et les caractériser sur le plan pharmacologique (Brandon et al., 2003). La limite de ce modèle est le nombre d'isoformes exprimées (une ou quelques unes), qui ne reflète pas la situation *in vivo*.

2.2.4. Coupes tissulaires

Cette technique dont les prémices datent du début du 20^{ème} siècle, a connu depuis une quinzaine d'années un vif regain d'intérêt. Les progrès technologiques rendent possible la

production de façon reproductible de coupes plus fines (250 µm), d'épaisseur régulière et ce avec un traumatisme cellulaire minimal (Brandon et al., 2003). Ces micro-tranches ou slices tissulaires constituent le modèle *in vitro* le plus complexe, et le plus proche de la situation *in vivo*. L'architecture cellulaire du tissu et les communications intercellulaires sont préservées et l'ensemble des enzymes du métabolisme est exprimé. Il a été utilisé dans de nombreuses études de métabolisme avec des résultats très pertinents (Ekins, 1996;van de Kerkhof et al., 2006). L'architecture complexe de ce modèle, ralentissant la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le tissu, est vraisemblablement à l'origine d'une activité métabolique plus faible que celle pouvant être observée avec les hépatocytes ou les microsomes (de Graaf et al., 2002;Lin and Lu, 1998). Ceci peut être compensé par des durées d'incubation plus longues (allant jusqu'à 24 heures). Ce modèle est une alternative à la culture cellulaire pour les études d'induction (Edwards et al., 2003;van de Kerkhof et al., 2008).

2.2.5. Organe isolé perfusé

L'organe isolé et perfusé est un modèle *in vitro* qui reproduit les fonctions de l'organe *in situ* (conservation de l'architecture tridimensionnelle). Il n'a jamais été mis en œuvre avec des organes humains et existe uniquement à petite échelle avec les organes animaux (Le Ferrec et al., 2001).

En utilisant cette technique pour l'intestin, la biotransformation de certains composés a été étudiée en combinaison avec le sens d'excrétion des métabolites. Par exemple, après perfusion avec la génistéine¹, son glucuroconjugué est retrouvé à la fois du côté luminal et du côté séreux (Andlauer et al., 2000b). Plusieurs équipes ont utilisé cette méthode pour l'étude de métabolisme de phase I et II (Andlauer et al., 2000a;de Vries et al., 1989;Doherty and Pang, 2000), du transport (Sababi et al., 2001), mais également des interactions médicamenteuses (Higashikawa et al., 1999;Merino et al., 2003).

Cette technique reste difficile à mettre en place, et elle est moins attractive pour les études de métabolisme du fait d'une intégrité fonctionnelle courte (3h) et d'une reproductibilité faible (Wu et al., 1999).

¹Génistéine = Membre de la famille des isoflavones, avec des effets antioxydant et anti-angiogéniques.

2.3. Approches d'étude de métabolisme *in vitro*

2.3.1. Identification des enzymes responsables d'une réaction enzymatique

La réaction de phénotypage est le processus d'identification de l'enzyme responsable du métabolisme d'un composé donné. Plusieurs approches existent pour étudier le métabolisme *in vitro* (phénotypage), et une combinaison de méthodes est souvent nécessaire. Le métabolisme d'un médicament peut être mesuré dans différents échantillons de MFH, et les résultats obtenus sont liés à la variation de quantité ou d'activité des enzymes des échantillons individuels (Figure 7).

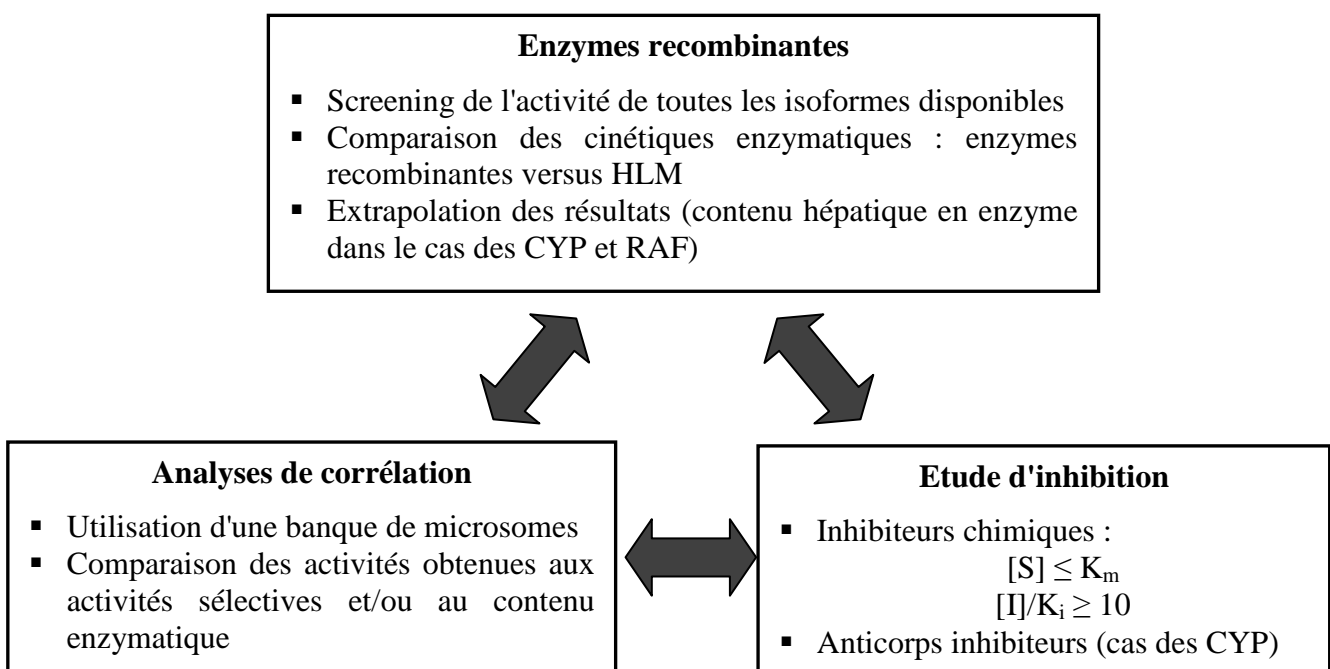


Figure 7 : Approche d'identification de l'enzyme impliquée dans une voie métabolique (Court, 2004)

2.3.1.1. Enzymes recombinantes et méthodes d'extrapolation

L'utilisation d'enzymes recombinantes permet de déterminer si une isoforme particulière est capable de métaboliser le médicament. Le substrat à tester est incubé avec chacune des isoformes individuellement et à une seule concentration.

Les enzymes recombinantes peuvent également être utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique (K_m , V_{max} , CL_{int}). En revanche, la contribution relative d'une enzyme compétente dans le métabolisme global du médicament est difficile à prévoir en se basant uniquement sur les données obtenues avec les enzymes recombinantes. Des méthodes d'extrapolation sont nécessaires pour interpréter de façon pertinente les résultats obtenus avec les enzymes recombinantes et les microsomes.

Facteur d'activité relative (RAF ; Relative Activity Factor)

Cette approche est actuellement fréquemment utilisée pour estimer la contribution relative d'une isoforme dans une voie métabolique particulière en corrigeant les différences d'activité entre enzymes recombinantes et microsomes hépatiques. La méthode RAF fut initialement proposée pour les CYP en utilisant des activités spécifiques (Crespi and Miller, 1999; Venkatakrisnan et al., 2000). Le coefficient RAF de l'isoforme (i) est estimé par l'équation (1), les deux activités étant exprimées dans la même unité :

$$RAF_i = \frac{\text{Activité des microsomes pour le substrat sonde de } i}{\text{Activité de } i \text{ recombinante pour son substrat sonde}}$$

Équation 1

Les UGT présentent un chevauchement dans la spécificité des substrats (Tukey and Strassburg, 2000) et des substrats sondes n'ont pas été identifiés pour toutes les principales UGT. Néanmoins, Toide et col. ont proposé une méthode de calcul des RAF pour les UGT. L'activité de glucuroconjugaison microsomale totale (V) peut être estimée comme la somme des activités catalytiques observées pour chaque isoforme active (V_i) exprimée dans les microsomes (Equation 2) :

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

Équation 2

Les valeurs de RAF des UGT recombinantes ont été obtenues comme les solutions d'un système d'équations, par substitution des valeurs d'activité de l'isoforme appropriée déterminées pour chaque substrat utilisé dans cette étude (Toide et al., 2004).

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

Le pourcentage de contribution relative (CR) de chaque isoforme (i) pourra alors être estimé par l'équation 3 :

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

Équation 3

Facteur d'extrapolation inter-système (ISEF ; Inter-System Extrapolation Factor)

Proctor et col. ont développé le facteur ISEF pour comparer les activités de rCYP versus microsomes hépatiques, en prenant en considération la concentration hépatique de chaque isoforme (Proctor et al., 2004) (Equation 4) :

$$ISEF_i = \frac{V_{max} MFH}{V_{max} rCYP_i \times Abondance CYP_i \text{ dans MFH}}$$

Équation 4

Plusieurs études ont validé cette approche (Dickinson et al., 2007;Hyland et al., 2008;Mills et al., 2010).

2.3.1.2. Etude d'inhibition spécifique

Une seconde approche pour la réaction de phénotypage implique des incubations menées dans des fractions subcellulaires ou éventuellement en culture cellulaire, et l'utilisation d'inhibiteurs chimiques et/ou des d'immuno-inhibiteurs sélectifs de voies enzymatiques spécifiques. De plus, la réalisation d'une batterie d'incubations avec différents inhibiteurs et en comparant les taux relatifs de métabolisme, permet d'identifier quel inhibiteur réduit significativement le métabolisme global et ainsi découvrir la voie métabolique qui contribue le plus à la clairance du composé.

Des anticorps inhibiteurs spécifiques n'ont pas été développés pour les UGT, tandis que de tels anticorps sont disponibles sur le marché pour la majorité des CYP. Toutefois, leur utilisation est peu répandue en raison du coût important engendré pour un intérêt limité par rapport aux inhibiteurs chimiques (Lu et al., 2003). Plusieurs inhibiteurs chimiques

spécifiques ont été identifiés pour les isoformes de CYP (Donato and Castell, 2003) alors que, à nouveau, peu ont été décrits pour les UGT.

Dans la plupart des cas, le substrat sonde d'une UGT est utilisé comme son inhibiteur chimique sélectif. La bilirubine, la tangerine¹, la nobiletine et la silybine² ont été utilisées pour inhiber UGT1A1 (Hagenauer et al., 2001; Sridar et al., 2004; Williams et al., 2004). L'hecogénine³ est un inhibiteur puissant et sélectif de l'UGT1A4 (Uchaipichat et al., 2006). L'acide méfénamique (Wynalda et al., 2003), l'acide niflumique (Gaganis et al., 2007) et le propofol (Hagenauer et al., 2001) ont été décrits comme inhibiteurs sélectifs de l'UGT1A9. Les inhibiteurs de l'UGT2B7 incluent des substrats alternatifs tels que la morphine (King et al., 2001). Rios et col. ont démontré que l'UGT1A1 possède plus d'un site de fixation pour substrat/inhibiteur, alors que l'UGT2B7 n'en possède qu'un seul (Rios and Tephly, 2002). Par conséquent, plusieurs inhibiteurs doivent être testés dans le cas de l'UGT1A1.

L'inhibition chimique constitue un outil de phénotypage simple et peu cher tant que les substrats inhibiteurs sont sélectifs et disponibles (Rock et al., 2008). La contribution relative d'une isoforme individuelle dans une voie métabolique peut être directement estimée en utilisant cette méthode (Rodrigues, 1999).

2.3.1.3. Test de corrélation

En utilisant la même banque de microsomes, le test de corrélation se fait entre des activités spécifiques déterminées pour chaque enzyme et les activités obtenues pour le médicament à tester. Une corrélation significative démontre l'implication de l'isoforme. Une approche additionnelle de confirmation peut être établie en corrélant les activités au contenu enzymatique quantifié par Western Blot.

Pour être pertinent, le test de corrélation doit être réalisé avec une banque de microsomes d'au moins 10 préparations individuelles (Court, 2004).

Les résultats de ce type d'étude confirment le plus souvent les résultats obtenus à partir d'autres tests (test de compétence, test d'inhibition).

¹ Tangerine = comme la nobiletine, flavonoïde isolé à partir de la peau des agrumes.

² Silybine = principal constituant actif de la silymarine et caractérisée par des propriétés anti-hépatotoxiques.

³ Hecogénine = une sapogénine utilisée dans la préparation des hormones stéroïdiennes.

2.3.2. Extrapolation *in vitro-in vivo*

L'extrapolation *in vitro-in vivo* (ivive) des activités métaboliques consiste à prédire la clairance intrinsèque (CL_{int}) d'un substrat donné et ses interactions médicamenteuses. Ces extrapolations restent semi-quantitatives compte tenu des difficultés de la prise en considération des facteurs de variabilités physiologiques (flux sanguin hépatique, fixation aux protéines plasmatiques, métabolisme extrahépatique ...).

2.3.2.1. Etude de cinétique enzymatique

La réaction de biotransformation par microsomes et enzymes recombinantes, présente rarement des cinétiques « atypiques » ou non-Michaeliennes, et ceci constitue le facteur critique dans le choix du modèle expérimental pour calculer les paramètres cinétiques et pour leur application lors de l'extrapolation *in vivo*. De même, l'activation homo- et hétérotropique, survenant suite à la présence de multiples sites de fixation de substrat et d'effecteur, doit être prise en compte dans la conception et l'interprétation des études de cinétique et d'inhibition.

Détermination des paramètres cinétiques

Le plus classique des modèles de cinétiques enzymatiques est celui de Michaelis-Menten (Figure 8.A) caractérisé par une fonction hyperbolique (Equation 5), où v est la vitesse de la réaction, S est la concentration du substrat.

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

Équation 5

Le K_m est la constante de Michaelis (K_m) décrivant l'affinité de l'enzyme, ou l'affinité apparente des microsomes pour le substrat et correspond à la concentration de substrat permettant d'obtenir la moitié de l'activité maximale (V_{max}).

Cependant, il reste important de vérifier le choix du modèle par la linéarisation de Eadie-Hofstee. Ce graphique représente (v) en fonction du rapport v/S . Dans le cas d'une cinétique Michaelienne, le graphique de Eadie-Hofstee est une droite dont la pente est égale à ($-K_m$).

Deux isoformes ou plus, avec des affinités distinctes, peuvent être impliquées dans une réaction de biotransformation. Dans de tels cas, la relation entre v et S devient « biphasique »

et correspond à la somme linéaire de deux fonctions de Michaelis-Menten (Equation 6) (Schmider et al., 1996) et le graphique de Eadie-Hofstee devient concave (Figure 8.B).

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

Équation 6

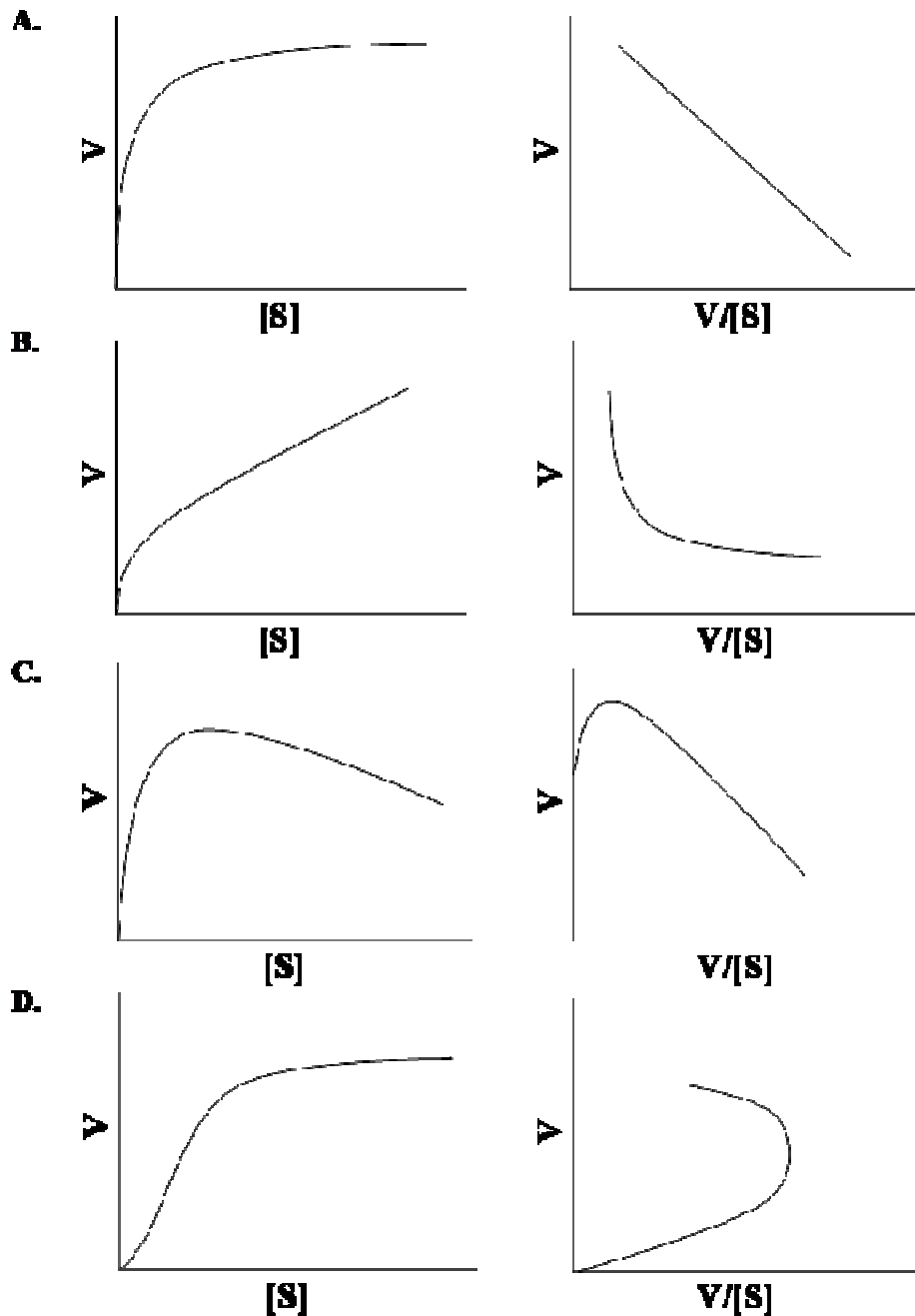


Figure 8 : La vitesse (V) de transformation du produit versus la concentration du substrat ([S]) (courbes de gauche) et la transformation de Eadie-Hofstee correspondante (courbes à droite) pour les réactions Michaéliennes à une (A) ou deux enzymes (B) ; d'auto-inhibition (C) ; et d'auto-activation (D).

Cependant, deux modèles de cinétiques atypiques s'écartant de la fonction de Michaelis-Menten peuvent se produire dans les cas suivants :

Une auto-inhibition qui donne lieu à une courbe au profil convexe (Figure 8.C), en raison d'une vitesse de biotransformation non maintenue à fortes concentrations de substrat (Houston and Kenworthy, 2000). Ce type d'inhibition peut être assimilé à une inhibition non compétitive et décrit par l'équation 7 où K_{si} est la constante décrivant l'inhibition par le substrat.

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

Équation 7

Une auto-activation qui donne lieu à une cinétique sigmoïde caractérisée par l'équation de Hill (Equation 8) où S_{50} correspond au K_m apparent et « n » au coefficient de Hill (Clarke, 1998). Le graphique de Eadie-Hofstee est alors caractérisé par un profil convexe (Figure 8.D).

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

Équation 8

2.3.2.2. Prédiction de la clairance métabolique

La clairance intrinsèque est un paramètre important pour l'extrapolation des données obtenues *in vitro* à la situation *in vivo* (Houston, 1994; Houston and Carlile, 1997). La CL_{int} est une mesure directe de l'activité enzymatique sans influence des paramètres physiologiques *in vivo*. La CL_{int} *in vitro* est exprimée par l'équation 9 (Shibata et al., 2000) :

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

Équation 9

Si la cinétique enzymatique est définie par le modèle de **Michaelis-Menten** (Equation 4) et en considérant que la concentration soit très inférieure au K_m , la CL_{int} est alors estimée par l'équation 10 :

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

Équation 10

Dans le cas d'une cinétique biphasique, la CL_{int} est estimée par l'équation 11 (Shen et al., 1997):

$$CL_{int} = \frac{V_{max1}}{K_{m1}} + \frac{V_{max2}}{K_{m2}}$$

Équation 11

Dans le cas de l'**auto-activation**, la clairance atteint le maximum à une concentration de substrat avant la saturation de l'enzyme. Ce paramètre (CL_{max}) estimée par l'équation 12 (Houston and Kenworthy, 2000), représente un équivalent fiable de la CL_{int} pour de tels systèmes enzymatiques (Witherow and Houston, 1999).

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

Équation 12

Dans le cas de l'**auto-inhibition**, la sous-estimation considérable de la V_{max} et du K_m est inévitable et l'estimation de la CL_{int} à partir d'un seul point expérimental (S inférieure à 10% de la valeur du K_m) est recommandée.

2.3.2.3. Méthode de la demi-vie *in vitro*

La CL_{int} peut également être estimée par l'approche de la « demi-vie *in vitro* », qui consiste à suivre la disparition du substrat dans le temps (Obach et al., 1997;Obach, 1999). Cette cinétique est modélisée par une équation exponentielle décroissante (Equation 13), où S_0 représente la concentration initiale du substrat et k sa constante de disparition :

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

Équation 13

La demi-vie ($T_{1/2}$) *in vitro* correspond au temps au bout duquel 50% du substrat incubé a été métabolisé (Equation 14):

$$T_{1/2} = \frac{\text{Ln}2}{k} = \frac{0,693}{k}$$

Équation 14

Si V_i correspond au volume de l'incubation (ml) et Q la quantité de microsomes (mg), la CL_{int} est alors déterminée par l'équation 15 :

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

Équation 15

Les conditions expérimentales suivantes sont nécessaires pour ce type de réaction :

- Une concentration du substrat testée inférieure au K_m ,
- L'utilisation de concentrations faibles de microsomes (< 0,5 mg/ml) ou d'hépatocytes (< $0,5 \times 10^6$ cellules/ml) afin d'éviter les phénomènes de fixation protéique du substrat, qui entraînent une sous-estimation de la CL_{int} (Jones and Houston, 2004),
- Limitation du temps d'incubation à 30 minutes pour éviter une perte d'activité enzymatique pouvant être à l'origine d'un profil bi-phasique (Jones and Houston, 2004),
- Enfin, la vérification qu'aucun métabolite n'est inhibiteur de l'enzyme active.

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

2.3.2.4. Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme

Les enzymes du métabolisme sont génétiquement régulées. La présence d'une mutation sur une enzyme peut engendrer des variants à activité catalytique importante, intermédiaire ou dans certains cas à l'abolition totale de l'activité. Par conséquent, la variabilité pharmacogénétique doit être prise en considération lors de la détermination des paramètres cinétiques (K_m , V_{max} ou CL_{int}) utilisant des microsomes individuels ou des pools. Ceci permettra de rechercher *in vitro* l'impact d'un polymorphisme sur le métabolisme et constitue une alternative ou éventuellement un préalable aux études cliniques. La contrainte est de disposer d'une banque de microsomes suffisante pour envisager l'étude de mutations intervenant avec des fréquences faibles.

2.3.2.5. Prédiction de la clairance métabolique *in vivo*

La CL_{int} du foie humain peut être estimée à partir de la CL_{int} déterminée *in vitro*, en utilisant des facteurs d'extrapolation comme : le contenu protéique microsomal (48,8 mg de protéine microsomale/g de foie) (Davies and Morris, 1993), le nombre d'hépatocytes par gramme de foie (120×10^6) (Carlile et al., 1999), le poids du foie (25,7 g/kg poids corporel) (Iwatsubo et al., 1997) ou le flux sanguin hépatique (20 mL/min/kg) (Lin and Lu, 1997).

Dans tous les cas, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des voies métaboliques, y compris extra-hépatiques. La prise en compte d'autres facteurs physiologiques comme la fixation aux protéines plasmatiques nécessite l'utilisation de modèles pharmacocinétiques *in vivo*.

2.3.3. Prédiction des interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses peuvent se produire lors de l'administration simultanée de plus d'un médicament chez le même individu, lorsque l'un des composés altère le métabolisme d'un autre. Elles sont souvent associées à des risques de toxicité ou de perte d'efficacité pharmacologique. Ces phénomènes d'interactions ont même mené au retrait du marché de plusieurs médicaments (Wienkers and Heath, 2005). Par conséquent, l'élucidation précoce d'une éventuelle interaction médicament-médicament *in vitro* peut fournir des informations utiles pour le développement clinique d'un médicament.

Il existe essentiellement deux types d'interactions enzymatiques : l'inhibition et l'induction.

2.3.3.1. Inhibitions enzymatiques

Certains composés ont la capacité de réduire l'activité catalytique d'une isoenzyme, et ainsi de provoquer une diminution de la clairance *in vivo* des substrats de cette isoforme. Les microsomes constituent le modèle le plus utilisé pour la prédiction d'une telle interaction. Les coupes tissulaires (« slices »), les hépatocytes ou les enzymes recombinantes peuvent également être utilisés.

Il existe trois mécanismes d'inhibition enzymatique : irréversible (inhibition suicide), quasi-irréversible et réversible. Parmi les inhibiteurs réversibles, on retrouve des inhibiteurs

compétitifs, non-compétitifs ou incompétitifs. Deux paramètres permettent d'évaluer le caractère inhibiteur d'une molécule : la concentration d'inhibiteur provoquant 50% d'inhibition de la vitesse de biotransformation (CI_{50}) et la constante d'inhibition K_i (affinité de l'inhibiteur).

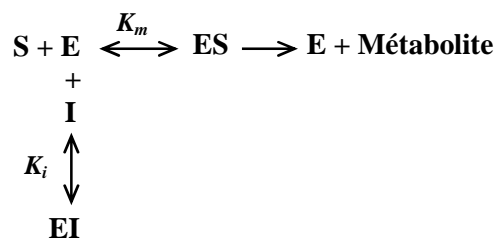
Les types d'inhibitions métaboliques les plus fréquemment observés sont les inhibitions compétitives et les inhibitions irréversibles.

Inhibition irréversible et quasi-irréversible

Les inhibiteurs irréversibles concernent les CYP et font partie de la classe d'inhibiteurs dépendants du temps. Ils peuvent (i) soit former une liaison covalente avec l'enzyme de manière irréversible (cas des inhibitions suicides) (ii) soit être des substrats de l'isoenzyme dont les métabolites forment un complexe métabolique intermédiaire qui inactive l'isoenzyme de manière quasi-irréversible. Cependant, dans les conditions physiologiques, il est presque impossible de reverser une inhibition quasi-irréversible (Venkatakrishnan and Obach, 2007) et seule la synthèse de nouvelles enzymes permet de retrouver l'activité initiale (Lin and Lu, 1998). Ces inhibitions irréversibles sont multifactorielles ; elles dépendent de la concentration d'inhibiteur, du temps d'incubation avec l'inhibiteur, et de la présence de NADPH (Zhou et al., 2005).

Inhibition par compétition

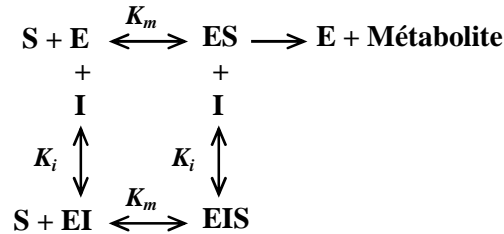
Un inhibiteur compétitif (I) présente une affinité (K_m) pour le site actif de l'enzyme (E) où se fixe normalement le substrat (S) :



Par exemple, parmi les inhibiteurs compétitifs de l'isoenzyme CYP3A4, on retrouve des antifongiques comme le kétoconazole et l'itraconazole, la testostérone ou la ciclosporine.

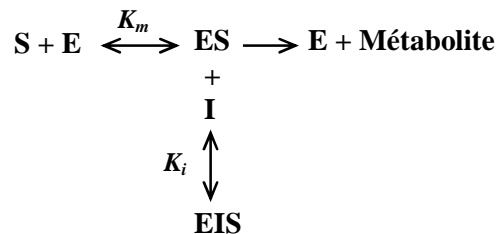
Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se fixe sur un site enzymatique différent de celui du substrat, entraînant la formation d'un complexe enzyme-substrat-inhibiteur (EIS) qui ralentit la fonction catalytique de l'enzyme.



Inhibition incompétitive

L'inhibiteur se fixe au complexe enzyme-substrat et pas à l'enzyme libre, formant un complexe enzyme-inhibiteur-substrat inactif.



La modélisation mathématique qui décrit l'impact d'un inhibiteur réversible sur la cinétique d'une réaction enzymatique dépend du type de l'inhibition (compétitive, non-compétitive ou incompétitive ; Equations 16, 17 et 18 respectivement). Le facteur $1/K_i$ représente la puissance de l'inhibiteur.

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

Équation 16

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

Équation 17

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

Équation 18

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

La transformation linéaire des cinétiques enzymatiques (représentation graphique de Dixon ou de Lineweaver-Burk) utilisée auparavant pour le choix du modèle d'inhibition et le calcul du K_i , a été supplantée par des logiciels de régression non-linéaire permettant le calcul des paramètres cinétiques avec plus de précision.

La valeur de CI_{50} est déterminée par l'analyse, à concentration fixe du substrat, de la relation entre la concentration de l'inhibiteur et la vitesse de la biotransformation du substrat. La CI_{50} est assez utile pour comparer le pouvoir inhibiteur de différentes molécules, sans connaître le mécanisme biochimique d'inhibition (von Moltke et al., 1998). Pour ce type d'étude, la concentration de substrat doit être inférieure au K_m .

2.3.3.2. Induction enzymatique

Il existe principalement deux mécanismes d'induction : l'augmentation de la transcription du gène (ex. β -naphthoflavone et UGT1A6) (Kohle et al., 2005) et la stabilisation de l'ARNm ou de l'enzyme (troléandomycine et CYP3A4) (Gonzalez, 2007). La recherche d'un effet inducteur *in vitro* ne peut se faire qu'avec un modèle conservant l'intégralité cellulaire (slices et hépatocytes). Des lignées cellulaires transfectées par le gène d'une enzyme spécifique peuvent également être utilisées (Vignati et al., 2004). L'évaluation de l'induction se fait par rapport à un contrôle, selon les critères suivants (Kremers, 2002): taux de l'ARNm messenger déterminé par PCR en temps réel, concentration de l'enzyme estimée par méthode immunochimique ou activité enzymatique.

2.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Durant ces deux dernières décennies, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) s'est avérée une puissante technique pour la caractérisation de la structure de métabolites inconnus présents dans des échantillons biologiques et leur quantification et elle est largement utilisée dans les études de métabolisme. Ces diverses applications, tant qualitatives que quantitatives, sont liées à ses caractéristiques : sensibilité et spécificité.

2.4.1. Séparation par chromatographie liquide

Dans l'étape de CL, les analytes sont dissous dans un liquide dit phase mobile, et passent ensuite à travers une colonne contenant de petites particules solides, nommée phase stationnaire. Les composés sont séparés selon leur affinité différentielle pour les deux phases. Durant ces trois dernières décennies, cette technique a connu des progrès considérables ; les séparations s'accomplissent dans des phases solides de diamètre très petit (de l'ordre du micron), avec une taille constante de particules et des pompes capables de produire de hautes pressions avec un flux uniforme. Ces technologies sont synergiques car des hautes pressions sont indispensables pour l'obtention de temps de rétention raisonnables lorsque les particules de la phase solide sont petites.

2.4.2. Détection par spectrométrie de masse

D'une manière générale, la SM consiste à produire des ions à partir de composés et à les détecter en fonction de leur rapport masse/charge (noté m/z , où m est la masse du composé et z son nombre de charges). Les informations obtenues permettent d'établir les abondances relatives des ions en fonction du rapport m/z . La détection par SM comprend principalement quatre étapes :

- Introduction de l'échantillon à analyser,
- Ionisation des molécules à analyser et leur passage en phase gazeuse,
- Séparation des ions dans l'analyseur qui sert à mesurer le rapport m/z des ions générés,
- Détection des ions et traitement du signal : le courant d'ion doit être converti en courant électrique et amplifié afin de permettre l'obtention de données exploitables *via* un traitement informatique.

2.4.2.1. Sources d'ionisation

L'instrumentation de la SM a connu des progrès et développement considérables, à savoir l'introduction d'interfaces et de sources d'ionisation robustes de types d'électronébulisation (ElectroSpray Ionisation ; ESI) (Yamashita and Fenn, 1984) ou d'ionisation chimique à

pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation ; APCI) (Horning et al., 1974). Ceci a largement contribué à l'essor du couplage et en particulier à son application plus systématique aux études de métabolisme. Ces sources permettent la détection de composés assez peu polaires à très polaires jusqu'à des masses élevées, y compris pour des composés labiles comme les métabolites conjugués. L'introduction de la source d'ionisation photonique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Photo-Ionisation ; APPI) a permis d'élargir l'utilisation de la SM à l'étude des composés très apolaires avec une sensibilité supérieure aux sources APCI (Robb et al., 2000).

Dans la mesure où la majorité des médicaments sont basiques, l'ionisation en mode positif prévaut dans les analyses pharmaceutiques. Pour les métabolites, cependant, il est important d'évaluer les deux modes d'ionisation, négatif et positif, car en règle générale le métabolisme transforme les substrats en produits plus acides. La sulfo- ou la glucuro-conjugaison d'alcools sont des exemples de biotransformation qui se détectent souvent en mode négatif uniquement.

2.4.2.2. Analyseurs de masse

Une fois les molécules ionisées, elles sont extraites de la source au fur et à mesure de leur formation et sont alors acheminées vers l'analyseur de masse. Une grande variété d'analyseurs peut être utilisée pour la caractérisation et la quantification des ions. On distingue entre autres les quadripôles (simple ou triple) (Bu et al., 2000; Zhang and Henion, 2001), les trappes d'ions (Wieboldt et al., 1998; Jorge et al., 2007) et les détecteurs à temps de vol (Time-Of-Flight ; TOF) (Clauwaert et al., 1999; Zhang and Henion, 2001). Les principales caractéristiques d'un analyseur sont :

- La **résolution**, qui caractérise la capacité à différencier deux pics proches, c'est-à-dire deux ions de rapport m/z voisins.
- La **précision sur la mesure** de m/z , qui est la capacité du SM à rendre une mesure de masse la plus proche possible de la valeur théorique. Elle est le plus souvent exprimée en « partie par million » (ppm).
- La **sensibilité**, qui reflète la quantité minimale d'échantillon détectable
- La **vitesse de balayage** qui correspond au temps consacré pour l'établissement d'un spectre dans une gamme de m/z donnée.

Le couplage de plusieurs analyseurs est possible, permettant d'obtenir des appareils hybrides tels que des spectromètres de masse de type triple-quadropole, Q-TOF ou TOF-TOF développés pour des applications SM/SM.

2.4.3. Identification et caractérisation des métabolites

2.4.3.1. Analyse en mode CL-SM

En utilisant un quadripôle simple, le mode balayage complet (*full scan*) permet de détecter tous les ions produits (y compris les métabolites) dans la gamme de m/z de l'analyseur, sans critère de sélection *à priori*. Des logiciels procèdent parallèlement à la recherche d'ions à partir de gain ou de perte de masse par rapport à la masse du produit parent (Tableau 1).

Le quadripôle peut aussi fonctionner en mode de suivi d'ions sélectionnés (Single Ion Monitoring ; SIM) qui a pour but de ne détecter que les rapports m/z sélectionnés, caractéristiques de la substance à analyser (Tableau 1), ce qui assure une meilleure sensibilité. La comparaison à un échantillon contrôle sans métabolites est indispensable pour ce type d'analyses.

Tableau 1 : Réaction métabolique et changement de masse associé (Kostiainen et al., 2003)

| Réaction enzymatique | Modification de masse (unité) |
|----------------------|-------------------------------|
| Déméthylation | -14 |
| Méthylation | +14 |
| Epoxydation | +16 |
| Acétylation | +42 |
| Sulfatation | +80 |
| Glucuroconjugaison | +176 |

2.4.3.2. Analyse en mode CL-SM en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) offre une détection plus spécifique des métabolites dans des matrices complexe. Le triple quadripôle est l'analyseur le plus fréquemment utilisé pour faire de la spectrométrie de masse en tandem. Ce système est formé de deux quadripôles en série séparés par une cellule de collision dans laquelle un gaz de collision inerte est introduit. Par impact avec ce gaz, les ions sont fragmentés. Classiquement, le premier quadripôle fonctionne comme un filtre et sélectionne un ion (m/z) d'intérêt appelé

ion précurseur ou ion parent. Après dissociation par collision, les ions fils ou fragments sont analysés par balayage dans le second quadripôle.

Le mode de suivi sélectif d'une transition ou plus (Single Reaction Monitoring ; SRM) permet de détecter un ion fragment provenant d'un ion précurseur donné. Ce dernier mode permet d'obtenir un gain en sensibilité en diminuant le bruit de fond.

Il existe aussi d'autres configurations permettant par exemple la détection des ions parents susceptibles de perdre par réaction dans la cellule de collision, un fragment neutre (mode de balayage des ions précurseurs ou perte de neutre). Ces deux derniers modes sont très appropriés pour la détection de groupements spécifiques de métabolites conjugués (Clarke et al., 2001;Kostiainen et al., 2003;Levsen et al., 2005). La fragmentation typique d'un tel métabolite est la perte d'une masse neutre correspondant au groupe conjugué et la production d'ions incluant l'aglycone et ses fragments. Par exemple, les conjugués glucuronides et sulfates peuvent être détectés en utilisant un mode d'ionisation positif et un balayage en perte de neutre (u): 176 (-C₆H₈O₆) et 80 (-SO₃), respectivement (Keski-Hynnila et al., 1999;Liu et al., 2002).

Il est aussi possible de rechercher des ions précurseurs à partir d'un ion fragment de m/z connu (product ion scan mode). Ce mode permet également la caractérisation structurale des métabolites (Clarke et al., 2001;Kostiainen et al., 2003). Perchalski et col. ont détecté des métabolites hydroxylés de la phénytoïne¹ en scannant les ions produits de l'ion précurseur à m/z 175, qui constitue un fragment spécifique à la fois pour le produit parent et les métabolites (Perchalski et al., 1982).

La spectrométrie de masse puissance n (SM², SM³..., SMⁿ), offerte en particulier par les analyseurs à trappe d'ions (ou pièges à ions), s'avère utile pour l'élucidation structurale de composés (Clarke et al., 2001;Gangl et al., 2002). Toutefois, le nombre n de cycles de fragmentation est limité par la quantité maximale d'ions qui peuvent être stockés dans le piège à ions avant la fragmentation. De ce fait, les analyses SMⁿ se font au détriment de la sensibilité.

¹Phénytoïne = un antiépileptique appartenant à la famille des hydantoïnes.

2.4.3.3. Détermination de la masse exacte

La haute résolution des détecteurs à TOF permet la mesure de la masse exacte ainsi qu'une estimation de la formule empirique des molécules inconnues (Niessen, 1998; Quintela et al., 2007; Smith et al., 2007). Les systèmes hybrides incluant un filtre quadripolaire en amont (Q-TOF) sont les plus appropriés pour l'identification et la caractérisation structurale des métabolites et sont caractérisés par leur facilité d'utilisation, leur grande vitesse d'acquisition, leur haute sensibilité et leur bonne résolution en modes SM et SM/SM (Chernushevich et al., 2001; Marquet, 2005; Pelizzi et al., 2003; Ren et al., 2008).

2.4.4. Quantification des métabolites

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

II. TRAVAUX PERSONNELS

1. Influence du polymorphisme du CYP3A5 (*CYP3A5*1/*3*) sur le métabolisme hépatique et la pharmacocinétique de l'évérolimus

Contexte et objectifs

L'évérolimus (CerticanTM), analogue structural du sirolimus, est un immunosuppresseur indiqué pour la prévention du rejet chez des patients recevant une allogreffe rénale ou cardiaque. L'évérolimus et le sirolimus sont métabolisés au niveau intestinal et hépatique par les CYP3A4, 3A5 et 2C8 (Jacobsen et al., 2001; Kuhn et al., 2001). L'influence du polymorphisme du *CYP3A5* sur la pharmacocinétique de l'évérolimus a été évaluée dans le cadre d'une seule étude en transplantation cardiaque. Cette étude n'a identifié aucune association entre le génotype du *CYP3A5* et les concentrations sanguines (normalisées par la dose) ou la dose administrée d'évérolimus (Kniepeiss et al., 2009).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié *in vitro* le rôle respectif du CYP3A4 et du CYP3A5 dans le métabolisme hépatique de l'évérolimus ainsi que l'effet du polymorphisme *CYP3A5*1/*3* sur le métabolisme de l'évérolimus *in vitro*. Parallèlement, nous avons étudié l'impact du polymorphisme *CYP3A5*1/*3* sur la pharmacocinétique de l'évérolimus chez 30 patients transplantés rénaux dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Nassim Kamar (Service de néphrologie, dialyse et transplantation, CHU Toulouse Rangueil).

Résultats

In vitro

Nous avons tout d'abord confirmé par deux approches différentes (RAF et inhibition chimique) que les CYP3A sont plus impliqués dans le métabolisme de l'évérolimus que le CYP2C8. La clairance intrinsèque de l'évérolimus par les CYP3A4 et 3A5 recombinants, exprimés ou non avec le cytochrome b₅, a été estimée par la méthode de demi-vie métabolique *in vitro*, en utilisant le tacrolimus comme contrôle. Nous avons pu montrer que le

CYP3A5 ($\pm b_5$) avait une CL_{int} plus faible pour l'évérolimus que le CYP3A4 ($\pm b_5$). L'inverse était observé pour le tacrolimus.

Aucune différence significative n'a été observée entre la CL_{int} obtenue avec le pool de MFH non expresseur ou expresseur du CYP3A5, alors que les microsomes expresseurs avaient une CL_{int} 1,75 fois plus élevée pour le tacrolimus.

In vivo

Les 30 patients transplantés rénaux inclus dans cette étude recevaient de l'évérolimus associé (n=23) ou non (n=7) au mycophénolate mofétil. Des profils de concentrations comportant un prélèvement juste avant la prise (C_0) et 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 540 et 720 min après la prise du médicament, ont été obtenus pour les 30 patients. Les patients expresseurs (n=7) et les non-expressesurs (n=23) ne présentaient aucune différence significative de besoin en dose ou d'exposition normalisée par la dose. Il serait, cependant, souhaitable d'augmenter l'effectif de cette étude. En effet, l'effectif actuel ne permet pas d'avoir la puissance nécessaire pour détecter un effet de faible intensité (probablement non cliniquement pertinent).

Conclusion

Cette étude a montré qu'à l'inverse du tacrolimus, le CYP3A4 est plus actif dans le métabolisme de l'évérolimus que le CYP3A5. Ceci pourrait expliquer en partie le fait que le polymorphisme du CYP3A5 n'ait pas d'influence sur le métabolisme hépatique de l'évérolimus et donc sur la pharmacocinétique du médicament.

Ces résultats font l'objet d'une publication actuellement soumise pour publication (article 1).

Article 1

Evidence that CYP3A5 polymorphism does not influence everolimus *in vitro* metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplants.

(Soumis à Clinical Pharmacology and Therapeutics)

2. Contribution des UGT au métabolisme de la buprénorphine et la norbuprénorphine et relation avec leur polymorphisme génétique *in vitro*

Contexte et objectifs

La buprénorphine (BUP) est un morphino-mimétique dérivé de la thébaïne. Elle agit comme un agoniste partiel des récepteurs opiacés. Elle est métabolisée rapidement au niveau hépatique par N-déalkylation en norbuprénorphine (Nor-BUP). Cette biotransformation est catalysée principalement par les CYP 3A4 et 2C8 (Picard et al., 2005). La BUP et la Nor-BUP subissent une glucuroconjugaison. Cette seconde voie de métabolisme a été très peu étudiée contrairement à la voie d'oxydation.

Ce travail avait pour objectifs :

- L'évaluation qualitative (utilisation de Supersomes) et quantitative (par l'approche RAF) de la contribution des UGT au métabolisme hépatique de la BUP et la Nor-BUP.
- L'étude de l'effet du polymorphisme génétique des principales UGT sur le métabolisme de la BUP en utilisant une banque de MFH (n=52).

Résultats

- ✓ Parmi les 6 UGT testées, seules les UGT 1A1, 1A3 et 2B7 étaient impliquées dans le métabolisme de la BUP et la Nor-BUP.
- ✓ Sur la base de l'approche RAF, la contribution de l'UGT1A1 et de l'UGT2B7 au métabolisme de la BUP a été estimée à 10 et à 41% respectivement. La glucuroconjugaison de la Nor-BUP impliquait principalement l'UGT1A3 (approximativement 63%) et l'UGT1A1 (34%) tandis que la contribution de l'UGT2B7 était très minoritaire.
- ✓ La V_{max} du métabolisme de la BUP était en moyenne diminuée de 28% dans un pool de MFH porteur de l'allèle *UGT1A1*28*. Cependant, aucune association

statistiquement significative n'a été retrouvée entre ce polymorphisme et l'activité de glucuroconjugaison de MFH individuels.

- ✓ La V_{\max} de glucuroconjugaison de la BUP était 1,7 fois plus élevée pour les pools de MFH au génotype hétérozygote (-842GA) et homozygote muté (-842AA) pour l'UGT2B7 par rapport au pool au génotype -842GG. Ces trois pools de MFH étaient porteurs du génotype sauvage de l'*UGT1A1* (*UGT1A1**1/*1). Cet effet était retrouvé de manière significative à partir d'incubation en présence de MFH individuels ($p=0,0352$).

Discussion et conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'effet du SNP G-842A de l'*UGT2B7* sur le métabolisme de la BUP est relativement modeste et qu'il dépend du génotype *UGT1A1**28.

Bien que la contribution de l'UGT1A1 soit moins importante que celle de l'UGT2B7, l'effet de son génotype semble influencer également le métabolisme de la BUP (bien que de façon non significative).

Une étude récente a montré que l'UGT2B7 interagit avec l'UGT1A1 en affectant ses propriétés cinétiques et *vice versa* (Fujiwara et al., 2010). En utilisant des systèmes d'expression hétérologues, Fujiwara et col. ont montré que la co-expression de l'UGT1A1 avec l'UGT2B7 induit une augmentation de la glucuroconjugaison de l'AZT. D'autre part, la glucuroconjugaison de l'estradiol par l'UGT1A1 est élevée en présence de l'UGT2B7 (Fujiwara et al., 2010). Les mêmes auteurs ont montré précédemment que les UGT 1A1, 1A4, 1A6 et 1A9 interagissent entre elles par des processus d'hétéro-dimérisation ayant un effet variable sur les activités enzymatiques en fonction de l'isoforme et des substrats (Fujiwara et al., 2007a;Fujiwara et al., 2007b;Nakajima et al., 2007). Le même type d'interaction est soupçonné pour l'UGT1A1 et 2B7, mais ceci reste à confirmer (Fujiwara et al., 2010). De telles interactions pourraient expliquer la complexité des relations génotype-phénotype observés dans le cadre de notre travail.

Ce travail fait l'objet d'une publication dans *Drug Metabolism and Disposition* (article 2).

Article 2

Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes.

(Drug Metabolism and Disposition. 2009 Oct;38(1):40-45)

3. Développement d'une méthode CL-SM/SM pour l'évaluation simultanée des activités de glucuroconjugaison *in vitro*

Introduction

La méthode de phénotypage dite « cocktail » ou « N-in-one » permet la mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques en utilisant un mélange de substrats sondes dans un seul test. Cette approche peut être appliquée dans le cadre d'études de métabolisme *in vitro* ou d'études cliniques (études pharmacocinétiques de phase 1). Elle constitue une méthode efficace pour réduire le nombre d'échantillons à analyser.

Cette approche est notamment utilisée pour les études de métabolisme, en particulier d'inhibition et d'induction. Plusieurs cocktails ont été développés pour les études d'inhibition des CYP utilisant des microsomes (Bu et al., 2000; Bu et al., 2001; Dierks et al., 2001; Kim et al., 2005; Testino, Jr. and Patonay, 2003; Turpeinen et al., 2005; Zientek et al., 2008). En pratique, un mélange de cinq à neuf substrats spécifiques d'enzymes et un inhibiteur sont incubés simultanément avec une seule préparation microsomale. Dans toutes ces études, les valeurs de CI_{50} déterminées à partir des incubations en cocktail étaient comparables à celles obtenues pour les incubations individuelles.

Des équipes ont montré que l'induction des CYP peut être évaluée également par cette approche en utilisant des hépatocytes, à condition qu'il n'y ait aucune interaction entre les substrats du cocktail (Dixit et al., 2007; Mohutsky et al., 2005). En dehors des microsomes et des hépatocytes, les enzymes recombinantes ont également été utilisées dans des études de type cocktail. Dierks et col. ont utilisé un cocktail de sept substrats de CYP pour déterminer l'activité de plusieurs isoformes (Dierks et al., 2001).

A notre connaissance, une seule méthode de cocktail pour les UGT a été publiée. Elle permettait la détermination des paramètres cinétiques d'enzymes recombinantes humaines, en analysant la formation des métabolites glucuroconjugués de sept substrats (Hakala et al., 2005).

Les objectifs de ce travail étaient (i) de développer une méthode de CL-SM/SM sensible et rapide pour l'analyse simultanée des métabolites glucuroconjugués produits par six UGT hépatiques (1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9 et 2B7) après incubation *in vitro* d'un cocktail de substrats sélectifs avec des microsomes et (ii) de tester l'applicabilité de cette approche pour évaluer l'effet de la buprénorphine (BUP) sur l'activité des UGT. Le choix des substrats reposait sur des données de la littérature (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des UGT et de leurs substrats spécifiques sélectionnés

| Isoforme | Substrat | Référence |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|
| UGT1A1 | Etoposide (ETO) | (Watanabe et al., 2003) |
| UGT1A3 | Lorazepam (LOR) | (Court et al., 2005) |
| UGT1A4 | Trifluopérazine (TFP) | (Uchaipichat et al., 2006) |
| UGT1A6 | Sérotonine (SER) | (Krishnaswamy et al., 2003) |
| UGT1A9 | Acide méfénamique (MEF) | (Gaganis et al., 2007) |
| UGT2B7 | Azidothymidine (AZT) | (Barbier et al., 2000) |

3.1. Matériels et Méthodes

3.1.1. Enzymes et microsomes

Les UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 exprimées dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus, ainsi qu'une préparation contrôle ont été obtenus chez BD Gentest (Woburn, MA).

Des microsomes de foie humain (n=53) ont été préparés individuellement par ultracentrifugation (Picard et al., 2004), à partir de tissus obtenus en collaboration avec Biopredic International (Rennes, France). Un pool dérivé de toutes ces préparations a été utilisé pour les expériences de mise au point et de développement de la méthode cocktail.

3.1.2. Protocole d'incubation

Les incubations contenaient soit un cocktail de substrats sondes soit les substrats individuels à des concentrations identiques. Les solutions mères de substrats ont été préparées dans le diméthylsulfoxyde et le pourcentage final de ce dernier dans l'incubation était inférieur à 0,5%

(v/v). Les microsomes ont été activés par pré-incubation avec de l'alaméthicine (50 µg/mg protéine) dans la glace pendant 15 min. Chaque échantillon contenait 0,5 mg/mL de MFH, 10 mM de MgCl₂, 0,1 M de tampon Tris-HCl (pH 7,4) et les substrats en cocktail ou individuellement dans un volume total de 125 µL. Après 5 min de pré-incubation dans un bain agité thermostaté à 37°C, la réaction a été déclenchée par l'ajout de l'UDP-GlcA (2 mM). La réaction a été arrêtée par 100 µL de méthanol glacial après 60 min d'incubation à 37°C. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 5 min afin d'éliminer les protéines microsomales. Des incubations contrôles sans microsomes ou sans UDP-GlcA sont effectuées en parallèle.

3.1.3. Détermination de la spécificité des substrats

3.1.3.1. Test de compétence

Afin d'évaluer la spécificité de chaque substrat pour son enzyme, des incubations individuelles ont été réalisées comme décrit dans le protocole d'incubation, en substituant les MFH par 0,25 mg/mL d'UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B4, 2B7 et 2B15 (Supersomes®, Gentest). La production spécifique des métabolites a été mesurée par la méthode analytique mise au point pour la méthode cocktail.

3.1.3.2. Inhibition chimique

La contribution individuelle de l'UGT1A1 et de l'UGT1A9 à la production du métabolite glucuroconjugué du MEF a été évaluée dans les MFH en utilisant l'estradiol comme inhibiteur spécifique de l'UGT1A1. L'effet de l'estradiol (25-150 µM) sur la production du métabolite glucuroconjugué du MEF et de celui de l'ETO (contrôle) a été évalué selon le schéma standard d'incubation décrit précédemment. L'estradiol était rajouté au milieu d'incubation au même temps que le substrat. Un contrôle sans inhibiteur a été réalisé en parallèle. Les vitesses de production du métabolite en présence de l'estradiol ont été comparées à celles du contrôle correspondant et le pourcentage d'inhibition a été calculé.

3.1.4. Méthode analytique

Le dosage des substrats et de leur métabolite a été réalisé grâce à une méthode de CL-SM/SM. La chromatographie était réalisée sur une colonne T3 Waters Atlantis, 5 μm (150 \times 2,1 mm), maintenue à 25°C, avec les phases mobiles A (solution aqueuse contenant 0,1% d'acide formique) et B (méthanol contenant 0,1% d'acide formique) selon le gradient linéaire suivant : 0-1 min, 3% B; 1-2 min, 3% à 10% B; 2-4 min, 20% à 40% B; 4-5 min, 40% à 70% B; 5-10 min, 70% à 90% B; 10-12 min, 90% B; 12-13 min, diminué de 90% à 3%; 13-17 min, 3% B. Le débit était de 0,2 ml/min.

Le système de détection utilisé était un spectromètre de masse en tandem QTRAPTM 4000 (Applied Biosystems) avec une source d'ionisation Turbo V, contrôlé par le logiciel Analyst 1.5. L'ionisation a été réalisée en mode positif avec une détection SM/SM en mode SRM en prenant en considération deux transitions pour chaque substrat et trois pour chaque glucuroconjugué.

3.1.5. Application du cocktail : détermination de l'effet de la buprénorphine sur l'activité des UGT

L'effet inhibiteur de la buprénorphine a été évalué sur le cocktail de substrats incubés avec les MFH. La BUP a été rajoutée au cocktail à cinq concentrations différentes (de 20 à 160 μM). Les valeurs de CI_{50} ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism (version 5.0). Chaque point représente la moyenne de deux incubations. Les activités enzymatiques en présence de BUP ont été comparées à celles d'incubations contrôles (BUP remplacée par du solvant).

3.2. Résultats

3.2.1. Développement de la méthode analytique

Les temps de rétention des différents composés ainsi que les transitions SRM suivies figurent dans le tableau 3. Un exemple de chromatogramme est présenté dans la figure 9.

Tableau 3 : Temps de rétention et transitions MRM des substrats et des glucuroconjugués étudiés.

| Analyte | Transition 1 (m/z) | Transition 2 (m/z) | Transition 3 (m/z) | Temps de rétention (min) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Glucuronide de la SER | 353/177 | 353/160 | 353/117 | 5,9 |
| SER | 177/117 | 177/77 | | 6,2 |
| Glucuronide de l'AZT | 444/127 | 444/110 | 444/268 | 8,8 |
| AZT | 268/127 | 268/110 | | 9,2 |
| Glucuronide de l'ETO | 782/229 | 782/185 | 766/185 | 9,5 |
| ETO | 590/229 | 606/229 | | 10,1 |
| TFP | 408/141 | 408/113 | | 10,2 |
| Glucuronide du LOR | 497/303 | 497/275 | 497/163 | 10,4 |
| LOR | 321/303 | 321/275 | | 10,6 |
| Glucuronide de la TFP | 584/113 | 584/141 | 584/408 | 11,8 |
| Glucuronide de MEF | 418/224 | 418/209 | 418/242 | 13,2 |
| MEF | 242/224 | 242/209 | | 14,3 |

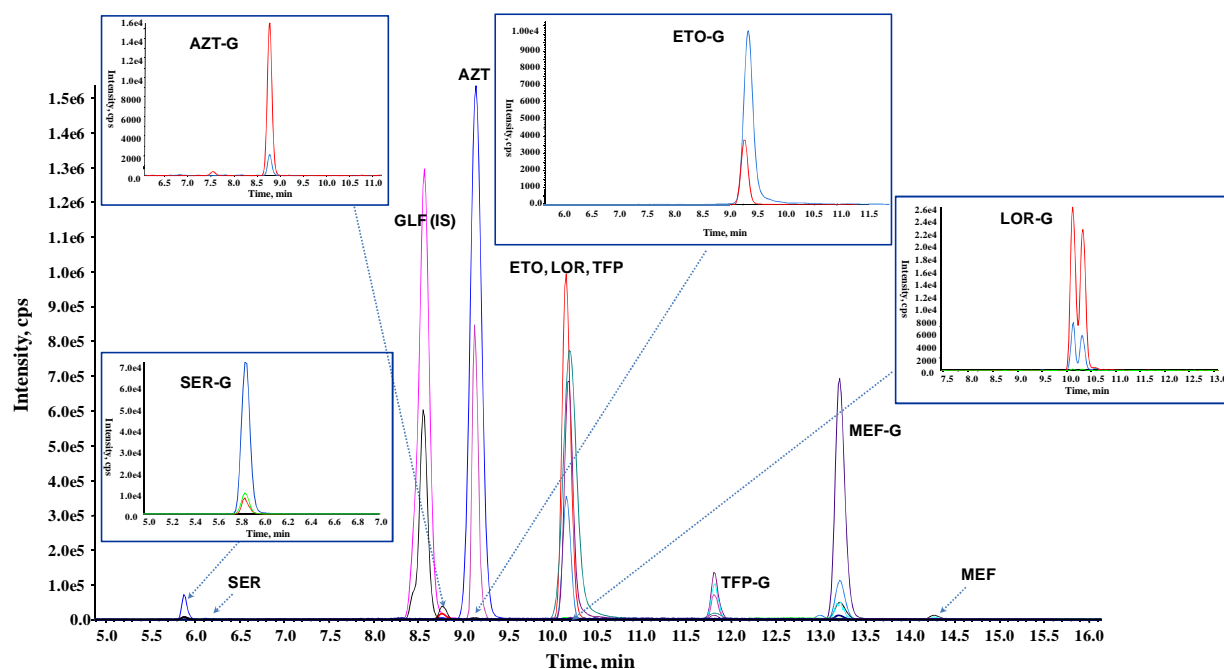


Figure 9 : Chromatogrammes d'ions extraits par CL-SM/SM. L'échantillon analysé contenait l'ensemble des 6 substrats (ETO, LOR, TFP, SER, MEF et AZT) et leur glucuroconjugué respective.

3.2.2. Spécificité des substrats

La sélection des substrats sondes a été basée sur les données de la littérature. Nous avons voulu confirmer ces données par incubation de l'ensemble des substrats avec les différentes UGT humaines recombinantes. A l'exception du MEF, chaque substrat était métabolisé exclusivement ou principalement par son enzyme spécifique. Lorsque plusieurs enzymes étaient impliquées, l'activité de l'UGT pour son substrat sonde était approximativement 5 fois plus élevée que celle des UGT secondaires (Figure 10). Par ailleurs, le LOR ne semblait pas être le substrat spécifique adéquat de l'UGT1A3 car il était métabolisé également par l'UGT1A9 et 2B7 (Figure 10.B).

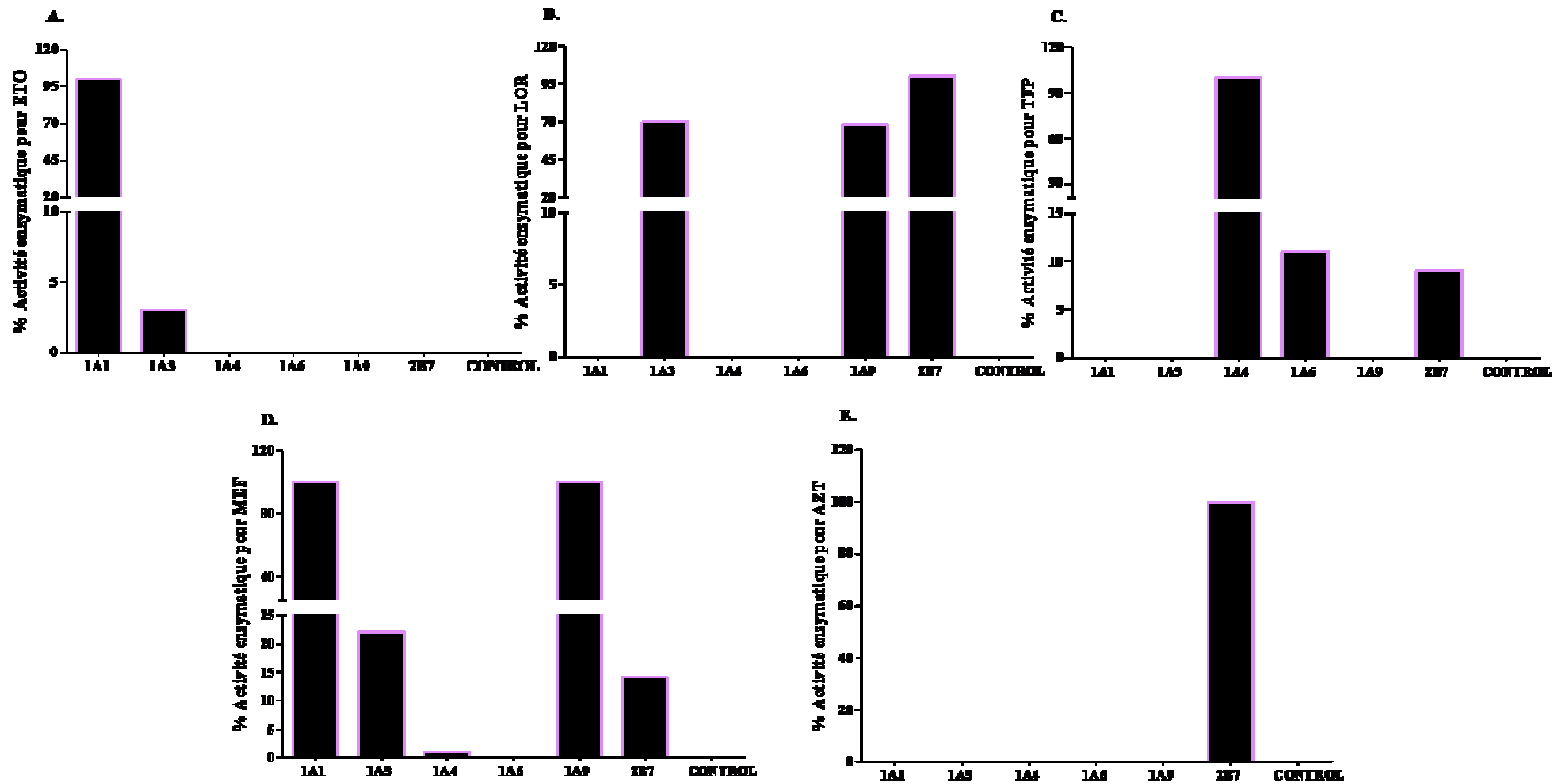


Figure 10 : Test de spécificité des substrats sélectionnés pour la méthode de cocktail. Chaque substrat a été incubé individuellement avec les six enzymes recombinantes à phénotyper par la méthode de cocktail. A) Etoposide (250 μ M), B) Lorazepam (100 μ M), C) Trifluopérazine (80 μ M), D) Acide méfénamique (140 μ M) et E) Azidothymidine (200 μ M).

Par ailleurs, l'UGT1A1 était impliquée comme l'UGT1A9 dans le métabolisme du MEF (Figure 10.D). Cependant, l'inhibition chimique de l'activité UGT1A1 microsomale par l'estradiol (inhibiteur spécifique l'UGT1A1) montrait que son implication dans le métabolisme du MEF était minoritaire dans les conditions expérimentales utilisées (Figure 11). En effet, nous avons trouvé que l'estradiol (inhibiteur spécifique de l'UGT1A1) avait un faible effet inhibiteur du métabolisme du MEF par des MFH (inhibition maximale de 35% pour une concentration de 150 μM). Dans les conditions utilisées, l'estradiol inhibait le métabolisme de l'ETO (contrôle positive, substrat de l'UGT1A1).

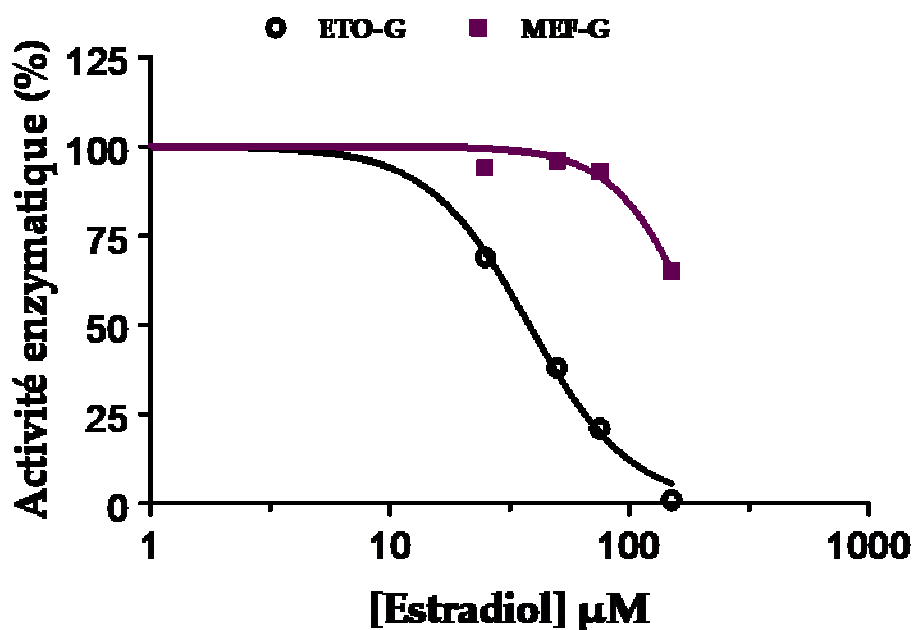


Figure 11 : Effet inhibiteur de l'estradiol (inhibiteur spécifique de l'UGT1A1) sur le métabolisme du MEF incubé seul ou avec l'ETO dans les MFH. L'inhibition de la glucuroconjugaison de l'ETO, substrat sonde de l'UGT1A1 incubé seul ou avec le MEF, a été utilisé comme un contrôle.

3.2.3. Incubation en cocktail versus incubation individuelle

Les résultats d'activités métaboliques obtenues après incubation des six substrats individuellement ou en cocktail, à trois niveaux de concentrations, ont été comparés (Figure 12). Pour les concentrations faibles et intermédiaires et pour tous les substrats à l'exception de l'AZT et la SER, l'incubation en cocktail donnait des activités de production de métabolites similaires à celles des incubations individuelles. Pour les fortes concentrations,

l'incubation en cocktail résultait en une diminution de la formation de métabolites par rapport aux incubations individuelles (Figure 12.C).

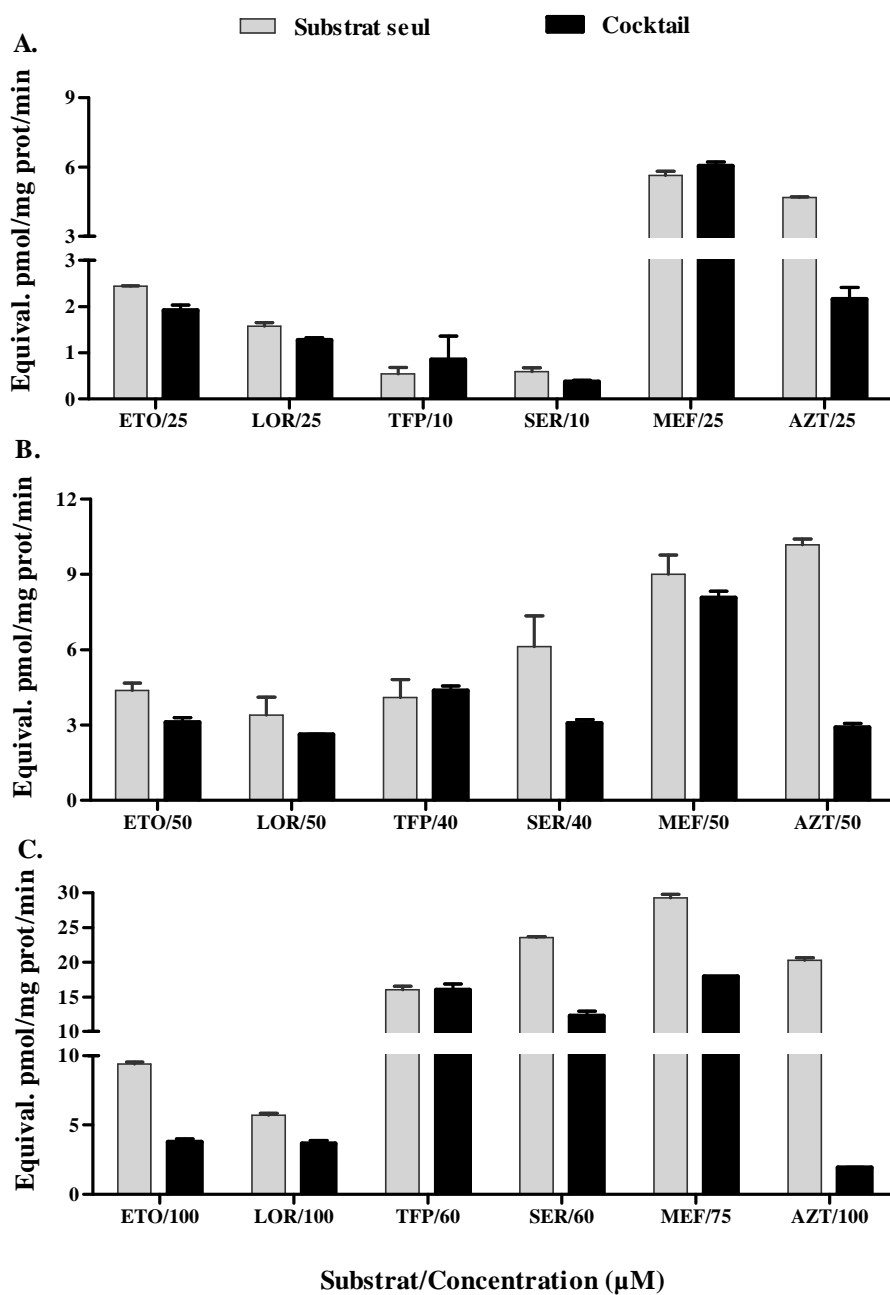


Figure 12 : Comparaison des résultats obtenus par incubation des six substrats en cocktail ou individuellement à différents niveaux de concentrations : A) faibles, B) intermédiaires et C) fortes.

Quelles que soient les concentrations des substrats utilisées, la production du glucuroconjugué de l’AZT et de la SER diminuait en présence des autres substrats. Afin d’éviter de telles interactions, les substrats ont été séparés en deux sous-cocktails (SER et AZT ; ETO, TFP et MEF) et les concentrations retenues étaient les plus faibles concentrations testées (proches du K_m), suffisantes pour la détection des glucuroconjugués. Le LOR a été exclu par la suite car il n’apparaissait pas comme un substrat spécifique à l’UGT1A3. Les incubations ont été réalisées en duplicata, 5 fois et aucune différence significative entre les incubations individuelles ou en sous-cocktail n’a été retrouvée (test de Mann Whitney) (Figure 13).

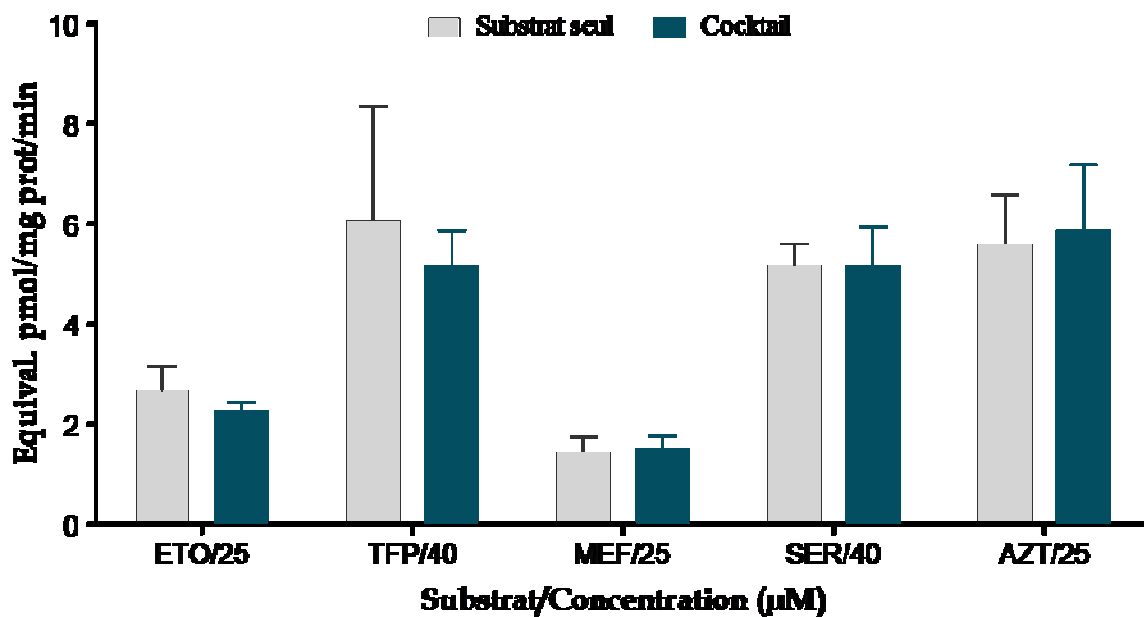


Figure 13 : Comparaison des résultats obtenus par incubation des substrats seuls ou en sous-cocktails (un sous-cocktail incluant ETO, TFP et MEF et l’autre incluant SER et AZT).

3.2.4. Application de la méthode : évaluation de l’effet inhibiteur de la buprénorphine sur l’activité des UGT hépatiques

En utilisant l’approche cocktail, nous avons montré que la BUP inhibait les activités enzymatiques des UGT2B7 ($CI_{50} = 28,4 \mu M$), UGT1A3 ($CI_{50} = 66,3 \mu M$), UGT1A4 ($CI_{50} = 85,0 \mu M$) et l’UGT1A1 ($CI_{50} = 97,0 \mu M$) (Figure 14). Les valeurs de CI_{50} pour l’activité de l’UGT1A6 et de l’UGT1A9 étaient supérieures à $200 \mu M$.

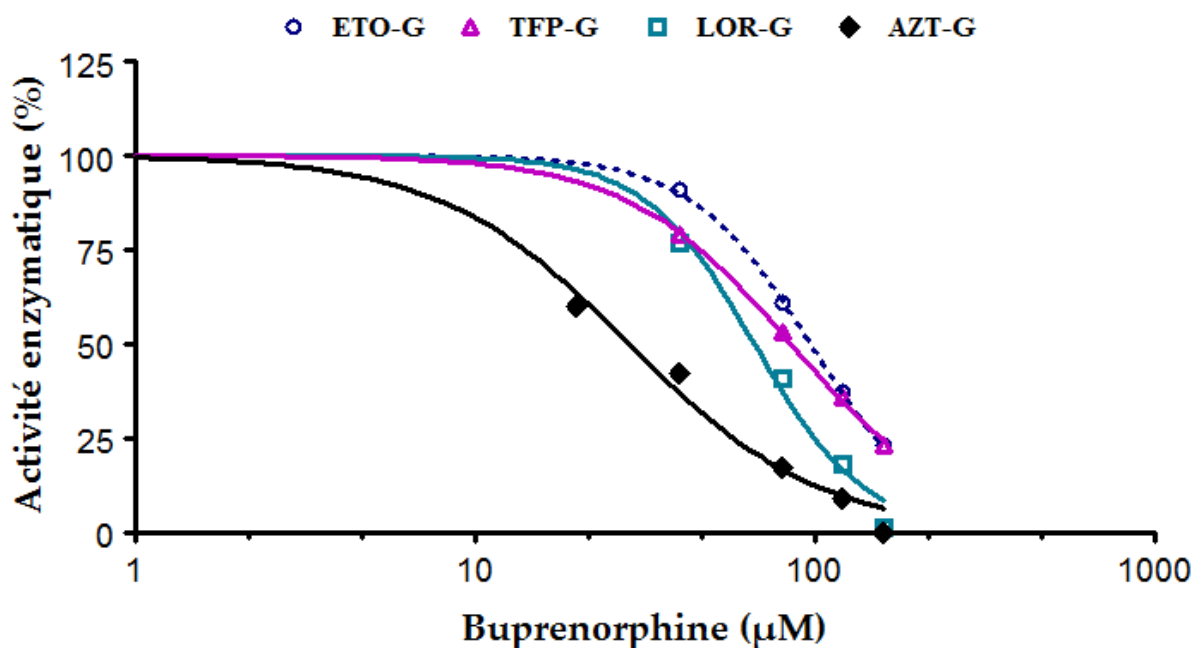


Figure 14 : Etude de l'effet inhibiteur de la buprénorphine sur l'activité des UGT hépatiques en utilisant le cocktail.

Ces résultats ont fait l'objet d'un poster présenté au congrès de l'IATDMCT « International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology » (Montréal, octobre 2009).

3.3. Discussion et conclusion

L'objectif principal de cette étude était de développer une approche cocktail *in vitro* permettant la mesure simultanée de l'activité des principales UGT hépatiques (1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9 et 2B7) après incubation d'un mélange de substrats en présence de microsomes.

Nous avons été contraints d'exclure de l'analyse l'une des UGT hépatiques (UGT1A3) car le substrat que nous avons retenu sur la base de la littérature semblait très peu spécifique. Trottier et col. ont décrit l'acide chénodéoxycholique comme un substrat spécifique à l'UGT1A3 (Trottier et al., 2006). L'introduction de ce substrat dans la méthode cocktail est cours de validation dans l'unité.

Nous avons observé que l'UGT1A1 était capable de métaboliser le MEF, pourtant décrit comme un substrat spécifique de l'UGT1A9. Par inhibition chimique et en utilisant un inhibiteur spécifique de l'UGT1A1 (estradiol), nous avons pu montrer que le rôle de

l'UGT1A1 dans le métabolisme microsomale du MEF était limité par rapport à celui de l'UGT1A9. Par ailleurs, Mano et col. ont montré que le MEF inhibait la production microsomale d'AZT-glucuronide ($CI_{50} = 0,3 \mu\text{M}$) (Mano et al., 2007). Afin d'éviter de telles interactions entre les substrats, nous avons été amenés à faire des compromis par deux approches : (i) l'utilisation de faibles concentrations des substrats ; et (ii) la séparation dans deux sous-cocktails des produits pouvant interagir. (ETO/25 μM , TFP/40 μM et MEF/25 μM ; SER/40 μM et AZT/25 μM). Le mélange des deux sous-cocktails avant l'analyse par CL-SM/SM constitue une piste pour diminuer le temps d'analyse. Cependant, une sensibilité plus importante de la méthode analytique est dans ce cas nécessaire, à cause de la dilution des analytes liée au mélange des sous-cocktails. Une amélioration du schéma d'incubation en diminuant le volume réactionnel et le volume de solvant utilisé pour l'arrêt de la réaction enzymatique peut également être une solution. Ceci est actuellement étudié dans l'unité.

La méthode mise au point nous a permis d'évaluer l'effet inhibiteur de la BUP sur les activités des principales UGT hépatiques. Les valeurs de CI_{50} obtenues montrent que l'activité de l'UGT2B7 est la plus affectée. Ceci semble logique puisque c'est la principale enzyme impliquée dans le métabolisme de la BUP.

En conclusion, nous avons montré la faisabilité de l'approche cocktail pour l'étude des enzymes de la famille des UGT et ceci malgré le chevauchement de la spécificité des substrats. Ces résultats restent cependant préliminaires. Des améliorations sont en effet en cours de validation dans l'unité. Par ailleurs, une étape de validation analytique et de la reproductibilité des résultats de phénotypage est nécessaire.

4. Etude rétrospective de l'association entre les polymorphismes des enzymes de glucuroconjugaison et des transporteurs des xénobiotiques et la survenue du cancer colorectal

En France, le cancer colorectal (CCR) se situe au troisième rang des cancers dans la population avec près de 39 000 cas diagnostiqués chaque année et au 2^{ème} rang des décès par cancer avec près de 17 000 décès annuels.

A l'inverse des formes familiales de CCR, graves mais peu fréquentes et dont les gènes de susceptibilité sont parfaitement connus, la forme classique sporadique de CCR (95% des cas) a une origine principalement liée au mode et à la qualité de vie.

Les facteurs génétiques et environnementaux contribuent à la pathogénèse, et les interactions gène-environnement peuvent moduler le risque du cancer. Des polymorphismes dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme et le transport de carcinogènes ingérés peuvent affecter le risque de cancer. Certaines de ces associations ont déjà été décrites dans la revue de littérature de ce mémoire.

L'objectif de ce travail était d'étudier de façon exploratoire l'influence des polymorphismes génétiques des UGT intestinales et de deux transporteurs d'efflux (la P-gp et MRP2) sur la prédisposition au CCR.

4.1. Matériels et Méthodes

4.1.1. Sujets de l'étude

Ce travail reposait sur une étude rétrospective de type cas-témoins. Des prélèvements de tissus non cancéreux inclus en paraffine provenant de 200 patients atteints de CCR (cas) et de 200 patients atteints de cancer rénal (considérés comme témoins dans le cadre de cette étude) ont été obtenus en collaboration avec la tumorothèque du CHU de Limoges. Le deuxième

groupe de témoins était constitué de volontaires sains (VS). Ces derniers (n=183) ont été choisis parmi 572 sujets sans diagnostic de CCR au moment de l'inclusion (patients ayant bénéficié d'un contrôle endoscopique) entre Septembre 1995 et Mars 2000. Ces patients avaient été inclus dans l'étude GEADE, ayant été précédemment décrite en détail (Lievre et al., 2006). Ces témoins ont été appariés à des sujets atteints de CCR sur l'âge (à trois ans près) et sur le sexe.

4.1.2. Echantillons d'ADN et analyse génétique

L'ADN génomique des échantillons tissulaires a été extrait à l'aide d'un kit Qiagen (QIAamp DNA Mini kit) suivant les instructions du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf, France).

L'ADN génomique des individus inclus dans l'étude GEADE avait été préalablement extrait à partir de sang total. La quantité d'ADN disponible était cependant insuffisante pour la réalisation de l'ensemble des analyses prévues dans ce projet. Pour pallier ce problème, les échantillons d'ADN ont été soumis à une amplification « génome entier » à l'aide du kit REPLI-g Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les ADN ont été ensuite génotypés pour les polymorphismes sélectionnés (Tableau 4), par discrimination allélique Taqman® (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System ; Applied-Biosystems, Courtaboeuf, France). Les couples d'amorces et les sondes fluorescentes ont été obtenus auprès d'Applied-Biosystems.

Tableau 4 : Liste des polymorphismes génétiques analysés

| Détoxification des xénobiotiques | Gène | Variant nucléotidique | Variant protéique | Identifiant SNP |
|----------------------------------|---------------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Enzymes de phase II (UGT) | <i>UGT1A6</i> | c.552A>C | p.Arg184Ser | rs1105879 |
| | <i>UGT1A7</i> | c.622T>C | p.Try208Arg | rs11692021 |
| | <i>UGT1A8</i> | c.518C>G | p.Ala173Gly | rs1042597 |
| | <i>UGT1A9</i> | c.-440T>C | - | rs2741045 |
| | <i>UGT2B7</i> | c.-842A>G | - | rs7438135 |
| Transporteurs d'efflux | <i>ABCB1</i> | c.1236C>T | p.Gly412Gly | rs1128503 |
| | <i>ABCB1</i> | c.2677G>T | p.Ala893Thr | rs2032582 |
| | <i>ABCB1</i> | c.3435C>T | p.Ile1145Ile | rs1045642 |
| | <i>ABCC2</i> | g.-24C>T | - | rs717620 |
| | <i>ABCC2</i> | c.1249G>A | p.Val417Ile | rs2273697 |
| | <i>ABCC2</i> | c.3972C>T | p.Ile1324Ile | rs3740066 |

4.1.3. Analyses statistiques

Pour vérifier si la distribution des allèles était conforme à la distribution théorique de Hardy-Weinberg, les fréquences observées et théoriques des génotypes ont été comparées par un test du Chi² avec un niveau de significativité fixé à 5%.

La régression logistique testant l'association des polymorphismes avec le CCR a été réalisée avec le logiciel Thesias (<http://genecanvas.ecgene.net>), conçu pour étudier les relations entre un phénotype qualitatif (ou quantitatif), des polymorphismes (SNP et haplotype) et des covariables quantitatives ou qualitatives. Le seuil de significativité a été fixé à 0,0045 pour tenir compte de la réalisation de tests multiples (Correction de Bonferroni pour 11 analyses indépendantes).

4.2. Résultats

4.2.1. Démographie

La moyenne d'âge et le sexe ratio étant différents entre les sujets atteints de CCR et les sujets atteints de CR, il a donc été nécessaire de procéder, de façon secondaire, à un appariement sur ces deux facteurs. L'analyse statistique des données a été réalisée sur un nombre plus restreint d'échantillons d'ADN (141 provenant de patients atteints de CCR et 141 provenant de patients atteints de CR), du fait de ces appariements. La différence d'âge entre un cas et le témoin apparié était de ± 3 ans. Dans ces deux nouveaux groupes, l'âge moyen des cas était de 67 ± 11 ans, celui des témoins de 67 ± 10 ans et le sexe ratio de 1:1,1 dans les deux groupes (68 femmes/73 hommes).

Les volontaires sains de l'étude GEADE ont été appariés avec les sujets atteints de CCR sur le sexe et l'âge (à trois ans près). Ainsi, chaque groupe était constitué de 93 femmes et 90 hommes, avec un âge moyen de 70 ± 11 ans.

4.2.2. Analyse génotypique

Le résultat des analyses pour chaque polymorphisme figure dans les tableaux 5 et 6. Les allèles variants du gène *ABCB1* en position 2677 (rs2032582) et 3435 (rs1045642) étaient significativement moins fréquents chez les sujets atteints de CCR que chez les sujets atteints de CR (0,31 vs. 0,45 ; 0,38 vs. 0,52, respectivement). Le risque associé à la présence de ces allèles variants (OR [IC_{95%}]) était de 0,60 [0,43 - 0,83] ($p=0,001779$) pour le rs2032582 et de

0,59 [0,42 - 0,82] ($p=0,001808$) pour le rs1045642. Le SNP en position 1236 du gène *ABCB1* montrait également une tendance à une association avec le CCR, mais elle n'est pas significative après correction de Bonferroni.

En revanche, aucune différence statistiquement significative entre les cas et sujets atteints de CR n'a été observée pour les autres SNP analysés.

Tableau 5 : Analyse univariée de l'association entre les polymorphismes sélectionnés et le cancer colorectal. Résultats obtenus suite à la comparaison des cas aux témoins atteints de cancer rénal.

| Gène | Identifiant SNP | Fréquence de l'allèle minoritaire | | OR (IC 95%) | Valeur de p |
|---------------|------------------|-----------------------------------|-------------|---------------------------|-----------------|
| | | CR (n=141) | CCR (n=141) | | |
| <i>UGT1A6</i> | rs1105879 | 0,37 | 0,36 | 0,98 [0,69 - 1,41] | 0,93 |
| <i>UGT1A7</i> | rs11692021 | 0,42 | 0,43 | 1,03 [0,74 - 1,45] | 0,85 |
| <i>UGT1A8</i> | rs1042597 | 0,24 | 0,20 | 0,80 [0,53 - 1,19] | 0,27 |
| <i>UGT1A9</i> | rs2741045 | 0,69 | 0,68 | 1,02 [0,70 - 1,49] | 0,92 |
| <i>UGT2B7</i> | rs7438135 | 0,51 | 0,51 | 1,00 [0,71 - 1,40] | - |
| <i>ABCB1</i> | rs1128503 | 0,44 | 0,34 | 0,64 [0,45 - 0,90] | 0,010014 |
| <i>ABCB1</i> | rs2032582 | 0,45 | 0,31 | 0,60 [0,43 - 0,83] | 0,001779 |
| <i>ABCB1</i> | rs1045642 | 0,52 | 0,38 | 0,59 [0,42 - 0,82] | 0,001808 |
| <i>ABCC2</i> | rs717620 | 0,23 | 0,26 | 1,17 [0,79 - 1,71] | 0,44 |
| <i>ABCC2</i> | rs2273697 | 0,29 | 0,22 | 0,70 [0,48 - 1,02] | 0,07 |
| <i>ABCC2</i> | rs3740066 | 0,38 | 0,41 | 1,15 [0,81 - 1,63] | 0,43 |

Par ailleurs, une association significative entre le risque de CCR et le SNP C1236T (rs1128503) (OR [IC_{95%}] = 0,46 [0,34 - 0,62], $p=0,000001$) ainsi qu'une tendance pour le SNP C3435T (rs1045642 ; $p=0,02$) ont été retrouvées en comparant les cas aux témoins de l'étude GEADE (Tableau 6). Les résultats de génotypage du SNP G2677T n'étaient pas satisfaisants pour permettre l'étude de ce polymorphisme. Ceci est probablement dû à une mauvaise qualité de la séquence nucléotidique incluant ce SNP après amplification génome entier.

Le variant allélique du SNP *UGT1A8**2 (rs1042597) et du SNP rs717620 du gène *ABCC2* présentaient également une tendance à l'association avec le CCR. Aucune autre association n'a été identifiée pour le reste des polymorphismes étudiés.

Tableau 6 : Analyse univariée de l'association entre les polymorphismes sélectionnés et le cancer colorectal. Résultats obtenus suite à la comparaison des cas aux volontaires sains.

| Gène | Identifiant SNP | Fréquence de l'allèle minoritaire | | | OR (IC 95%) | Valeur de p |
|---------------|------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|---------------------------|-----------------|
| | | n | VS | CCR | | |
| <i>UGT1A6</i> | rs1105879 | 179 | 0,32 | 0,36 | 1,22 [0,88 - 1,67] | 0,23 |
| <i>UGT1A7</i> | rs11692021 | 178 | 0,39 | 0,42 | 1,13 [0,85 - 1,51] | 0,38 |
| <i>UGT1A8</i> | rs1042597 | 177 | 0,3 | 0,22 | 0,71 [0,51 - 0,97] | 0,03 |
| <i>UGT1A9</i> | rs2741045 | 179 | 0,67 | 0,69 | 0,91 [0,67 - 1,23] | 0,54 |
| <i>UGT2B7</i> | rs7438135 | 176 | 0,42 | 0,47 | 1,23 [0,92 - 1,64] | 0,16 |
| <i>ABCB1</i> | rs1128503 | 181 | 0,45 | 0,35 | 0,46 [0,34 - 0,62] | 0,000001 |
| <i>ABCB1</i> | rs1045642 | 181 | 0,49 | 0,41 | 0,70 [0,52 - 0,96] | 0,02 |
| <i>ABCC2</i> | rs717620 | 175 | 0,19 | 0,26 | 1,41 [1,02 - 1,96] | 0,04 |
| <i>ABCC2</i> | rs2273697 | 179 | 0,23 | 0,22 | 0,97 [0,69 - 1,37] | 0,86 |
| <i>ABCC2</i> | rs3740066 | 180 | 0,34 | 0,41 | 1,30 [0,98 - 1,73] | 0,07 |

4.2.3. Analyse haplotypique

Le déséquilibre de liaison entre les mutations d'un même gène (*ABCC2* ou *ABCB1*) a été étudié à l'aide du logiciel Thesias. Les trois mutations du gène *ABCB1* étaient en fort déséquilibre de liaison dans chaque groupe de patients. Pour les SNPs du gène *ABCC2*, seuls les SNPs C-24T et C3972T étaient en déséquilibre de liaison. Aucune liaison entre G1249A et C-24T ou C3972T n'a été observée.

L'haplotype triplement muté du gène *ABCB1* TTT était plus représenté chez les témoins atteints de CR que chez les cas (0,40 versus 0,28, OR [IC_{95%}] = 0,57 [0,39 – 0,82], p=0,0024). Aucune association n'a été retrouvée entre les haplotypes di- ou tri-allélique du gène *ABCC2* et le CCR en comparant les cas aux sujets atteints de CR.

Par ailleurs, l'analyse haplotypique a révélé une association entre les haplotypes di-allélique -24T/3972T (OR [IC_{95%}] = 1,85 [1,28 – 2,68], p=0,0011) ou tri-allélique -24T/1249G/3972T (OR [IC_{95%}] = 1,96 [1,31 – 2,93], p=0,0010) du gène *ABCC2* et le risque de CCR par comparaison des cas aux VS.

4.3. Discussion et perspectives

Dans cette étude rétrospective cas-témoins, nous avons étudié l'influence des polymorphismes d'UGT et de transporteurs d'efflux (MDR1 et MRP2) à localisation

intestinale sur le risque de développement de CCR. L'hypothèse de départ reposait sur le rôle de ces deux systèmes dans la détoxification des carcinogènes.

Une attention particulière a été accordée au SNP C3435T du gène *ABCB1* à cause de son effet supposé sur l'expression et la fonction de la P-gp (Hoffmeyer et al., 2000). Des résultats contradictoires avaient été rapportés. Il a été initialement montré que des lignées cellulaires exprimant la P-gp mutée à la position 3435 ne présentent pas d'altération d'expression à la surface cellulaire ou de fonction de transport par rapport à des cellules exprimant la version sauvage de la protéine (Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Salama et al., 2006). Deux autres études ont montré que le SNP C3435T n'a aucun effet sur l'expression de la P-gp dans le placenta (Hitzl et al., 2004; Tanabe et al., 2001). Cependant, le SNP C3435T a été associé à une surexpression de l'ARNm de la P-gp dans des biopsies duodénales de volontaires sains japonais (Nakamura et al., 2002) et les sujets porteurs du génotype 3435TT présentaient de plus faibles concentrations de différents médicaments par rapport aux sujets non porteurs (Kim et al., 2001b; Sakaeda et al., 2001). L'effet exact de ce polymorphisme reste donc non élucidé.

Dans notre étude, les individus porteurs de l'allèle 2677T ou de l'allèle 3435T sont moins représentés dans la population atteinte de CCR que dans celle atteinte de CR. La même tendance était observée pour l'allèle 1236T. De plus, par comparaison des cas à des VS, nous retrouvions que le SNP C1236T était significativement associé au risque de CCR alors qu'une tendance à la même association était observée pour les SNPs C3435T et G2677T.

Des résultats similaires aux nôtres concernant le SNP C3435T ont été obtenus récemment dans le cadre d'une étude prospective dans une population Danoise (Andersen et al., 2009). Andersen et col. (2009) montrent, en effet, que les porteurs de l'allèle variant 3435T ont un risque diminué de CCR par rapport aux porteurs homozygotes de l'allèle de référence (OR [IC95%] = 0,71 [0,5 – 1,0]). Les auteurs ont, par ailleurs, mis en évidence une interaction entre le risque lié à la consommation de viande rouge grillée et le génotype d'*ABCB1* : les porteurs de l'allèle sauvage avaient un risque lié à la consommation de viande augmenté alors que ce n'était pas le cas pour les porteurs de l'allèle variant. La P-gp pourrait donc jouer un rôle important chez les consommateurs de viande.

Des études ont suggéré que le SNP synonyme C3435T induit un changement de conformation de la P-gp suite à la modification de la cinétique de traduction ribosomale (Fung and Gottesman, 2009; Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Sharp et al., 1986). Kimchi-Sarfaty et col. ont

montré également que l'haplotype incluant le SNP C3435T induit une modification de la spécificité des substrats transportés : le transport de la vérapamil est altéré mais pas celui du sirolimus (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). D'autres données ont montré également que la corrélation entre le génotype *ABCB1* et le phénotype ne peut être expliquée que par une analyse haplotypique (Haenisch et al., 2007; Kim et al., 2001b; Pauli-Magnus and Kroetz, 2004). Comme les SNPs C1236T et C3435T sont des polymorphismes synonymes, il est improbable qu'ils altèrent le taux d'expression et l'activité de la protéine directement (Pauli-Magnus and Kroetz, 2004). Ces deux SNP sont fortement liés au SNP G2677T, qui semble être corrélé à l'activité de la P-gp. Plusieurs études ont en effet rapporté que le variant 2677T présente une activité d'efflux plus élevée que la forme sauvage de la P-gp (Haenisch et al., 2007; Kim et al., 2001b; Tang et al., 2002). Ces résultats suggèrent que l'analyse d'haplotype peut fournir une explication rationnelle aux divergences susmentionnées.

Dans notre étude, nous retrouvons le déséquilibre de liaison bien connu entre les 3 SNPs du gène *ABCB1*. Nous avons donc analysé l'effet des haplotypes sur la prédisposition au CCR. Les résultats montrent que l'haplotype triplement muté 1236T/32677T/3435T est moins présent chez les cas que chez les sujets atteints de CR. Les porteurs de cet haplotype pourraient donc effluer de plus efficacement certaines substances carcinogènes par rapport aux non porteurs, ce qui constituerait un facteur protecteur vis-à-vis du cancer colorectal.

Concernant la protéine MRP2, des études récentes *in vivo* ont montré que la présence de l'allèle 3972T du gène *ABCC2* est associée à un risque plus élevé de choléstase hépatique gravidique (Sookoian et al., 2008) et à une prédisposition élevée au cholangiocarcinome probablement à cause de la biodisponibilité importante des carcinogènes environnementaux (Hoblinger et al., 2009). Cependant, le SNP C3972T est une mutation synonyme, qui seule, ne semble pas pouvoir altérer le niveau d'expression ou l'activité de la protéine. Haenisch et col. ont rapporté que le SNP C-24T est associé à une faible expression d'ARNm de MRP2 dans le cortex rénal et à une activité réduite du promoteur du gène, évaluée à l'aide d'un test « gène rapporteur » (Haenisch et al., 2007). Une étude récente a rapporté que le variant -24T n'affectait pas significativement la stabilité de l'ARNm de la protéine (Laechelt et al., 2010). Dans notre étude, les variants -24T et 3972T montraient des tendances à une association au risque de CCR par comparaison des cas aux VS. Un déséquilibre de liaison marqué entre les SNPs C-24T et C3972T a été retrouvé, mais il n'y avait pas de liaison entre les SNPs G1249A et C-24T ou C3972T (Itoda et al., 2002; Suzuki and Sugiyama, 2002). Nous avons donc

analysé l'effet des haplotypes sur le CCR. Les résultats obtenus montrent que l'haplotype di-allélique -24T/3972T ($p=0,0011$) et tri-allélique -24T/1249G/3972T ($p=0,0010$) était plus fréquent chez les cas que chez les témoins. Bien qu'ils n'aient pas été identifiés comme tels par comparaison des cas aux témoins atteints de CR, ces haplotypes pourraient constituer un facteur de risque supplémentaire de CCR. Laechelt et col. (2010) ont montré que des cellules HEK293T/17 transfectées avec l'haplotype -24T/1249G/3972T présentait une diminution significative de l'expression protéique de MRP2 par rapport aux cellules transfectées avec l'haplotype sauvage (Laechelt et al., 2010). La vitesse d'efflux *in vitro* d'une sonde fluorescente (glutathion-méthylfluoresceine) était également diminuée et la biodisponibilité du talinolol chez 24 volontaires sains caucasiens étaient également modifiée (Laechelt et al., 2010). Ces résultats suggèrent que le SNP C-24T, associé au C3972T, peut être impliqué dans la régulation de l'expression et de l'activité de MRP2.

Il est important de souligner que l'effet de l'haplotype *ABCC2* n'apparaît que lors de la comparaison des cas aux VS. Ceci pourrait être interpréter par le fait que comme pour le CCR, des facteurs environnementaux, impliquant probablement les mêmes mécanismes de détoxification, sont également associés au développement de CR (Brauch et al., 1999; Bruning et al., 2003; Dhote et al., 2000). On pourrait donc supposer que les variations génétiques d'*ABCC2* peuvent être également associées à la prédisposition du CR. Ceci pourrait être confirmé par comparaison des sujets atteints de CR à des VS.

Nous n'avons identifié aucune association entre les polymorphismes d'UGT étudiés et le CCR. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, le SNP *UGT1A7*3* n'était pas associé au CCR dans notre étude. En 2002, Strassburg et col. ont décrit une association significative ($p<0,001$) entre le CCR (78 cas/210 témoins) et la présence du variant allélique *UGT1A7*3* (OR 2,8 ; IC_{95%} [1,6-4,7]) (Strassburg et al., 2002). Dans une seconde étude sur 371 cas et 415 VS étudiant également l'*UGT1A1*, l'*UGT1A6* et l'*UGT1A8*, après ajustement sur l'âge et le sexe, l'association entre le CCR et l'allèle *UGT1A7*3* a été confirmée (OR=2,4 ; IC_{95%} [1,3-4,6]) et une influence plus modérée du génotype de l'*UGT1A6* (allèle *2 et/ou *3) a également été constatée (OR=1,5 ; IC_{95%} [1,03-2,3]) (van der Logt et al., 2004). Tang et col. ont également décrit que la présence à la fois des variants *UGT1A1*6* et *UGT1A7*3* augmentait l'incidence du CCR chez les sujets taiwanais (Tang et al., 2005). Deux autres études ont retrouvé cette association avec l'*UGT1A7*3* après avoir stratifié les données sur l'exposition aux amines hétérocycliques (Butler et al., 2005) ou la consommation d'alcool ou

de tabac (Chen et al., 2006). Sur la base de ces données, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de ces polymorphismes en prenant en considération les facteurs environnementaux (alimentation, tabac, alcool), en plus de l'âge et du sexe.

Une étude prospective multicentrique est cours de réalisation dans notre équipe pour valider les résultats décrits dans la partie rétrospective. Cette étude complémentaire va inclure 300 sujets atteints de CCR et 300 VS appariés sur l'âge, le sexe et le centre de recrutement. Elle vise à prendre en considération au-delà des facteurs génétiques identifiés lors de l'étude rétrospective, des facteurs environnementaux (consommation de viande, d'alcool et de tabac). A terme, sur la base des résultats obtenus, ce projet pourrait participer à l'amélioration des stratégies de dépistage du CCR en permettant l'identification précoce de populations à risque.

CONCLUSION ET DISCUSSION

GENERALE

Le décodage intégral du génome humain fait entrevoir des perspectives passionnantes. La pharmacogénétique représente un des domaines s'ouvrant à une exploitation à large échelle de ces nouvelles connaissances. D'une manière générale, la pharmacogénétique étudie la composante génétique de la variabilité de réponse aux médicaments. Les polymorphismes étudiés concernent, dans une grande majorité de cas, les enzymes du métabolisme de phase I ou II et les transporteurs des médicaments. Ces mêmes protéines participent plus généralement au devenir des xénobiotiques dans l'organisme. Leurs polymorphismes peuvent donc avoir un rôle physiopathologique, indépendamment de la prise de médicaments.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur l'étude de différents aspects des relations génotype-phénotype des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques. Une part importante de notre travail de thèse a été consacrée à la mise en place de modèles d'étude *in vitro* de ces relations. Nous avons notamment constitué une double banque de microsomes hépatiques et d'ADN humains permettant d'étudier *in vitro* la variabilité génétique du métabolisme des médicaments. Cette banque compte à l'heure actuelle plus de 80 préparations. Nous avons également réalisé une banque similaire de 30 préparations intestinales.

Dans le cadre de cette thèse, deux études visant à analyser l'effet de polymorphismes génétiques sur le métabolisme de médicaments ont été réalisées :

L'étude de l'effet du polymorphisme CYP3A5*3 sur le métabolisme de l'évérolimus : cette étude a l'avantage, comparée à celle de Kniepeiss et col. (la seule actuellement publiée à ce sujet) (Kniepeiss et al., 2009), de prendre en considération des données obtenues *in vitro* et *in vivo*. Cette double approche a permis d'étudier le rôle exact du CYP3A5 et de son polymorphisme d'expression dans le métabolisme hépatique de la molécule en dehors des mécanismes mis en jeu dans son absorption ou son élimination et en l'absence d'interactions

médicamenteuses. Elle a permis de montrer que le CYP3A4 est plus impliqué dans le métabolisme de l'évérolimus que le CYP3A5 (alors que l'inverse est vrai pour le tacrolimus). Cette étude a, en revanche, la limite d'avoir utilisé, dans sa partie clinique, un nombre faible de patients, ce qui impose la contrainte, lors d'études pharmacogénétiques de n'étudier que les polymorphismes les plus fréquents. L'effet de l'interaction entre différents polymorphismes incluant par exemple le *CYP3A4*1B* et ceux des transporteurs d'efflux (*ABCB1* et/ou *ABCC2*) avec le *CYP3A5*3*, ne peut être écarté.

L'effet de certaines interactions médicamenteuses dans la modulation des différences phénotypiques ne peut être négligé et exclu également.

D'autre part, l'effet du polymorphisme sur la pharmacocinétique de l'évérolimus lorsqu'il est associé à un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) reste à étudier. Picard et col. ont en effet montré que l'effet du génotype *CYP3A5* sur le métabolisme hépatique *in vitro* du sirolimus n'est révélé et significatif qu'en présence de la ciclosporine, qui inhibe préférentiellement l'activité CYP3A4 (Picard et al., 2007).

L'étude de l'effet du polymorphisme des UGT sur le métabolisme de la buprénorphine :

Cette étude réalisée *in vitro* nous a permis d'étudier les relations génotype-phénotype concernant les enzymes de métabolisme de phase II de la BUP. Le polymorphisme du promoteur de l'*UGT2B7* était associé à une augmentation de la V_{max} de glucuroconjugaison de la BUP. Gaulier et col. ont suggéré, dans le cadre d'une étude préliminaire, que le polymorphisme *CYP3A4*1B* pourrait être associé à une augmentation du métabolisme de la BUP (Gaulier et al., 2007). L'effet combiné des polymorphismes des UGT et des CYP reste à étudier pour mieux comprendre la variabilité génétique de la pharmacocinétique de la BUP et les effets secondaires ou les différences de réponse qu'elle peut induire. Comme pour l'évérolimus, les deux approches complémentaires *in vitro-in vivo* pourraient être exploitées dans cette étude. Sur la base des résultats obtenus, une individualisation de la dose administrée ou un choix objectif du traitement de substitution (remplacement de la BUP par autre traitement) pourraient être envisagés.

Grâce aux progrès qu'ont connus les techniques de biologie moléculaire et la multiplication des études de pharmacogénétique, des tests génétiques sont actuellement à disposition pour permettre d'éviter des échecs thérapeutiques ou de mieux appréhender les risques d'accidents médicamenteux. Dans un avenir proche, la pharmacogénétique constituera sans doute un

préalable à la mise sur marché d'un grand nombre de nouvelles molécules thérapeutiques, au même titre que les études de toxicité ou de pharmacocinétique.

Il est important de souligner que l'étude du métabolisme et le phénotypage *in vitro* constitue une étape nécessaire pour comprendre et mieux cerner, à petite échelle, les mécanismes pharmacogénétiques et les interactions médicamenteuses qui peuvent avoir lieu *in vivo*. Nous avons pu également constater l'importance des outils analytiques dans les études de métabolisme. La spectrométrie de masse, en particulier, avec sa grande sensibilité, sa rapidité et sa spécificité nous a permis d'identifier et de doser de multiples molécules à partir de quantité infimes d'échantillons. Dans le cadre de cette thèse, nous avons exploité les potentialités de cet outil pour mettre en place une **méthode permettant la détermination simultanée de l'activité microsomale de cinq UGT hépatiques**. Une telle méthode pourrait être particulièrement utile pour compléter les connaissances actuelles sur les relations génotype-phénotype des UGT ou encore pour étudier le potentiel inhibiteur de médicament, comme nous l'avons fait pour la BUP. Des améliorations, en cours de validation, ont été apportées à cette méthode et sa validation est en cours.

Enfin, nous avons travaillé sur une des implications physiopathologiques des enzymes de métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques. Nous avons réalisé **une étude rétrospective de l'association entre les polymorphismes des enzymes de glucuroconjugaison et des transporteurs des xénobiotiques et la survenue du cancer colorectal**. Nous avons pu montrer que les trois polymorphismes du gène *ABCB1* (C1236T, G2677T et C3435T) ainsi que son haplotype triplement muté sont significativement associés à risque plus faible de cancer colorectal. Nous retrouvons également pour la première fois une association entre ce cancer et certains haplotypes du gène *ABCC2*. La validation de ces résultats par une étude prospective de type cas-témoins prenant en compte des facteurs environnementaux est en cours. Nous espérons que la validation des relations génotype-phénotype observées permettra, à terme, l'amélioration des outils de dépistage précoce du cancer. La recherche de ces variants génétiques pourrait en effet permettre l'identification d'individus « à risque ». Par ailleurs, nous espérons que ces résultats aideront à comprendre les mécanismes qui initient la cascade d'événements qui mène au cancer.

Il est intéressant de constater que des protéines, principalement étudiées pour leur rôle dans le métabolisme des médicaments peuvent avoir des implications physiopathologiques. Ce

domaine, proche de la pharmacogénétique est sans doute à rattacher à l'oncogénétique qui inclue également la caractérisation de génétique des tumeurs pour des gènes codant pour des enzymes de métabolisme et de transporteurs de médicaments, permettant de cibler les traitements.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acuna G, Foernzler D, Leong D, Rabbia M, Smit R, Dorflinger E, Gasser R, Hoh J, Ott J, Borroni E, To Z, Thompson A, Li J, Hashimoto L and Lindpaintner K (2002) Pharmacogenetic Analysis of Adverse Drug Effect Reveals Genetic Variant for Susceptibility to Liver Toxicity. *Pharmacogenomics J* 2:327-334.

Allikmets R, Schriml L M, Hutchinson A, Romano-Spica V and Dean M (1998) A Human Placenta-Specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *Cancer Res* 58:5337-5339.

Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan G O, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans D A and McLeod H L (2001) MDR1 Pharmacogenetics: Frequency of the C3435T Mutation in Exon 26 Is Significantly Influenced by Ethnicity. *Pharmacogenetics* 11:217-221.

Andersen V, Ostergaard M, Christensen J, Overvad K, Tjonneland A and Vogel U (2009) Polymorphisms in the Xenobiotic Transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and Interaction With Meat Intake in Relation to Risk of Colorectal Cancer in a Danish Prospective Case-Cohort Study. *BMC Cancer* 9:407.

Andlauer W, Kolb J and Furst P (2000a) Absorption and Metabolism of Genistin in the Isolated Rat Small Intestine. *FEBS Lett* 475:127-130.

Andlauer W, Kolb J and Furst P (2000b) Isoflavones From Tofu Are Absorbed and Metabolized in the Isolated Rat Small Intestine. *J Nutr* 130:3021-3027.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouet S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34:75-83.

Araki J, Kobayashi Y, Iwasa M, Urawa N, Gabazza E C, Taguchi O, Kaito M and Adachi Y (2005) Polymorphism of UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 Gene: a Possible New Risk Factor for Lung Cancer. *Eur J Cancer* 41:2360-2365.

Ayrton A and Morgan P (2001) Role of Transport Proteins in Drug Absorption, Distribution and Excretion. *Xenobiotica* 31:469-497.

Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle L A and Ross D D (2001) Promoter Characterization and Genomic Organization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (ATP-Binding Cassette Transporter G2) Gene. *Biochim Biophys Acta* 1520:234-241.

Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green M D, Tephly T R, Hum D W and Belanger A (2000) 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) Is Glucuronidated by Human UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). *Drug Metab Dispos* 28:497-502.

Belanger A, Hum D W, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D and Dubois S (1998) Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 301-310.

Bernard O and Guillemette C (2004) The Main Role of UGT1A9 in the Hepatic Metabolism of Mycophenolic Acid and the Effects of Naturally Occurring Variants. *Drug Metab Dispos* 32:775-778.

Bernard O, Tojcic J, Journault K, Perusse L and Guillemette C (2006) Influence of Nonsynonymous Polymorphisms of UGT1A8 and UGT2B7 Metabolizing Enzymes on the Formation of Phenolic and Acyl Glucuronides of Mycophenolic Acid. *Drug Metab Dispos* 34:1539-1545.

Bigler J, Whitton J, Lampe J W, Fosdick L, Bostick R M and Potter J D (2001) CYP2C9 and UGT1A6 Genotypes Modulate the Protective Effect of Aspirin on Colon Adenoma Risk. *Cancer Res* 61:3566-3569.

Bock KW (1991) Roles of UDP-Glucuronosyltransferases in Chemical Carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26:129-150.

Bosch TM, Kjellberg L M, Bouwers A, Koeleman B P, Schellens J H, Beijnen J H, Smits P H and Meijerman I (2005) Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in the ABCG2 Gene in a Dutch Population. *Am J Pharmacogenomics* 5:123-131.

Brandon EF, Raap C D, Meijerman I, Beijnen J H and Schellens J H (2003) An Update on in Vitro Test Methods in Human Hepatic Drug Biotransformation Research: Pros and Cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 189:233-246.

Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, Robey R, Pommier Y, Fojo T and Bates S E (1999) Camptothecin Resistance: Role of the ATP-Binding Cassette (ABC), Mitoxantrone-Resistance Half-Transporter (MXR), and Potential for Glucuronidation in MXR-Expressing Cells. *Cancer Res* 59:5938-5946.

Brauch H, Weirich G, Hornauer M A, Storkel S, Wohl T and Bruning T (1999) Trichloroethylene Exposure and Specific Somatic Mutations in Patients With Renal Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91:854-861.

Bruning T, Pesch B, Wiesenhutter B, Rabstein S, Lammert M, Baumuller A and Bolt H M (2003) Renal Cell Cancer Risk and Occupational Exposure to Trichloroethylene: Results of a Consecutive Case-Control Study in Arnsberg, Germany. *Am J Ind Med* 43:274-285.

Bu HZ, Knuth K, Magis L and Teitelbaum P (2000) High-Throughput Cytochrome P450 Inhibition Screening Via Cassette Probe-Dosing Strategy. IV. Validation of a Direct Injection on-Line Guard Cartridge Extraction/Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous CYP3A4, 2D6 and 2E1 Inhibition Assessment. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1943-1948.

Bu HZ, Magis L, Knuth K and Teitelbaum P (2001) High-Throughput Cytochrome P450 (CYP) Inhibition Screening Via a Cassette Probe-Dosing Strategy. VI. Simultaneous Evaluation of Inhibition Potential of Drugs on Human Hepatic Isozymes CYP2A6, 3A4, 2C9, 2D6 and 2E1. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:741-748.

Buchman AL, Paine M F, Wallin A and Ludington S S (2005) A Higher Dose Requirement of Tacrolimus in Active Crohn's Disease May Be Related to a High Intestinal P-Glycoprotein Content. *Dig Dis Sci* 50:2312-2315.

Burckart GJ, Hutchinson I V and Zeevi A (2006) Pharmacogenomics and Lung Transplantation: Clinical Implications. *Pharmacogenomics J* 6:301-310.

Butler LM, Duguay Y, Millikan R C, Sinha R, Gagne J F, Sandler R S and Guillemette C (2005) Joint Effects Between UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 Genotype and Dietary Carcinogen Exposure on Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1626-1632.

Carlile DJ, Hakooz N, Bayliss M K and Houston J B (1999) Microsomal Prediction of in Vivo Clearance of CYP2C9 Substrates in Humans. *Br J Clin Pharmacol* 47:625-635.

Cattaneo D, Bitto A, Baldelli S, Cortinovis M, Gotti E, Perico N and Remuzzi G (2008) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Drug Interaction Between Rosiglitazone and Mycophenolate Mofetil in Kidney Transplantation: a Case Report. *Transplantation* 85:921-922.

Chan AT, Tranah G J, Giovannucci E L, Hunter D J and Fuchs C S (2005) Genetic Variants in the UGT1A6 Enzyme, Aspirin Use, and the Risk of Colorectal Adenoma. *J Natl Cancer Inst* 97:457-460.

Chen K, Jin M, Zhu Y, Jiang Q, Yu W, Ma X and Yao K (2006) Genetic Polymorphisms of the Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase 1A7 and Colorectal Cancer Risk in Relation to Cigarette Smoking and Alcohol Drinking in a Chinese Population. *J Gastroenterol Hepatol* 21:1036-1041.

Chernushevich IV, Loboda A V and Thomson B A (2001) An Introduction to Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom* 36:849-865.

Chu XY, Strauss J R, Mariano M A, Li J, Newton D J, Cai X, Wang R W, Yabut J, Hartley D P, Evans D C and Evers R (2006) Characterization of Mice Lacking the Multidrug Resistance Protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther* 317:579-589.

Ciotti M, Marrone A, Potter C and Owens I S (1997) Genetic Polymorphism in the Human UGT1A6 (Planar Phenol) UDP-Glucuronosyltransferase: Pharmacological Implications. *Pharmacogenetics* 7:485-495.

Clarke NJ, Rindgen D, Korfmacher W A and Cox K A (2001) Systematic LC/MS Metabolite Identification in Drug Discovery. *Anal Chem* 73:430A-439A.

Clarke SE (1998) In Vitro Assessment of Human Cytochrome P450. *Xenobiotica* 28:1167-1202.

Clauwaert KM, Van Bocxlaer J F, Major H J, Claereboudt J A, Lambert W E, Van den Eeckhout E M, Van Peteghem C H and De Leenheer A P (1999) Investigation of the Quantitative Properties of the Quadrupole Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer With Electrospray Ionisation Using 3,4-Methylenedioxymethamphetamine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:1540-1545.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach J H, Mackie J E, Grant C E, Almquist K C, Stewart A J, Kurz E U, Duncan A M and Deeley R G (1992) Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* 258:1650-1654.

Collier AC, Keelan J A, Van Zijl P E, Paxton J W, Mitchell M D and Tingle M D (2004) Human Placental Glucuronidation and Transport of 3'Azido-3'-Deoxythymidine and Uridine Diphosphate Glucuronic Acid. *Drug Metab Dispos* 32:813-820.

Colombo S, Soranzo N, Rotger M, Sprenger R, Bleiber G, Furrer H, Buclin T, Goldstein D, Decosterd L and Telenti A (2005) Influence of ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2 Haplotypes on the Cellular Exposure of Nelfinavir in Vivo. *Pharmacogenet Genomics* 15:599-608.

Court MH (2004) In vitro identification of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) involved in drug metabolism, in *Optimization in Drug Discovery* (Yan Z and Caldwell GW eds) pp 185-202.

Crespi CL and Miller V P (1999) The Use of Heterologously Expressed Drug Metabolizing Enzymes--State of the Art and Prospects for the Future. *Pharmacol Ther* 84:121-131.

Davies B and Morris T (1993) Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharm Res* 10:1093-1095.

de Graaf IA, Van Meijeren C E, Pektas F and Koster H J (2002) Comparison of in Vitro Preparations for Semi-Quantitative Prediction of in Vivo Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos* 30:1129-1136.

de Jong FA, Marsh S, Mathijssen R H, King C, Verweij J, Sparreboom A and McLeod H L (2004) ABCG2 Pharmacogenetics: Ethnic Differences in Allele Frequency and Assessment of Influence on Irinotecan Disposition. *Clin Cancer Res* 10:5889-5894.

de Vries MH, Hofman G A, Koster A S and Noordhoek J (1989) Systemic Intestinal Metabolism of 1-Naphthol. A Study in the Isolated Vascularly Perfused Rat Small Intestine. *Drug Metab Dispos* 17:573-578.

Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res* 11:1156-1166.

Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B and Vidal-Trecan G (2000) Risk Factors for Adult Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review and Implications for Prevention. *BJU Int* 86:20-27.

Dickinson GL, Rezaee S, Proctor N J, Lennard M S, Tucker G T and Rostami-Hodjegan A (2007) Incorporating in Vitro Information on Drug Metabolism into Clinical Trial Simulations to Assess the Effect of CYP2D6 Polymorphism on Pharmacokinetics and

Pharmacodynamics: Dextromethorphan As a Model Application. *J Clin Pharmacol* 47:175-186.

Dierks EA, Stams K R, Lim H K, Cornelius G, Zhang H and Ball S E (2001) A Method for the Simultaneous Evaluation of the Activities of Seven Major Human Drug-Metabolizing Cytochrome P450s Using an in Vitro Cocktail of Probe Substrates and Fast Gradient Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab Dispos* 29:23-29.

Dixit V, Hariparsad N, Desai P and Unadkat J D (2007) In Vitro LC-MS Cocktail Assays to Simultaneously Determine Human Cytochrome P450 Activities. *Biopharm Drug Dispos* 28:257-262.

Djebli N, Picard N, Rerolle J P, Le M Y and Marquet P (2007) Influence of the UGT2B7 Promoter Region and Exon 2 Polymorphisms and Comedications on Acyl-MPAG Production in Vitro and in Adult Renal Transplant Patients. *Pharmacogenet Genomics* 17:321-330.

Djebli N, Rousseau A, Hoizey G, Rerolle J P, Toupance O, Le Meur Y and Marquet P (2006) Sirolimus population pharmacokinetic/pharmacogenetic analysis and bayesian modelling in kidney transplant recipients. *Clin. Pharmacokinet.* 45:1135-1148.

Doherty MM and Pang K S (2000) Route-Dependent Metabolism of Morphine in the Vascularly Perfused Rat Small Intestine Preparation. *Pharm Res* 17:291-298.

Donato MT and Castell J V (2003) Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism: Focus on in Vitro Studies. *Clin Pharmacokinet* 42:153-178.

Doostdar H, Duthie S J, Burke M D, Melvin W T and Grant M H (1988) The Influence of Culture Medium Composition on Drug Metabolising Enzyme Activities of the Human Liver Derived Hep G2 Cell Line. *FEBS Lett* 241:15-18.

Douillard JY, Cunningham D, Roth A D, Navarro M, James R D, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L and Rougier P (2000) Irinotecan Combined With Fluorouracil Compared With Fluorouracil Alone As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: a Multicentre Randomised Trial. *Lancet* 355:1041-1047.

Doyle LA and Ross D D (2003) Multidrug Resistance Mediated by the Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22:7340-7358.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi A K and Ross D D (1998) A Multidrug Resistance Transporter From Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15665-15670.

Duguay Y, McGrath M, Lepine J, Gagne J F, Hankinson S E, Colditz G A, Hunter D J, Plante M, Tetu B, Belanger A, Guillemette C and De V, I (2004) The Functional UGT1A1 Promoter Polymorphism Decreases Endometrial Cancer Risk. *Cancer Res* 64:1202-1207.

Edwards RJ, Price R J, Watts P S, Renwick A B, Tredger J M, Boobis A R and Lake B G (2003) Induction of Cytochrome P450 Enzymes in Cultured Precision-Cut Human Liver Slices. *Drug Metab Dispos* 31:282-288.

Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, He X, Ross D D and Beck W T (2004) Identification of a Novel Estrogen Response Element in the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Gene. *Cancer Res* 64:1247-1251.

Ehmer U, Vogel A, Schutte J K, Krone B, Manns M P and Strassburg C P (2004) Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 39:970-977.

Ekins S (1996) Past, Present, and Future Applications of Precision-Cut Liver Slices for in Vitro Xenobiotic Metabolism. *Drug Metab Rev* 28:591-623.

Ekins S, Mäenpää J and Wrighton S A (1999) In vitro metabolism: Subcellular fractions, in *Handbook of Drug Metabolism* (T.F.Woolf ed) pp 363-399.

Ekins S, Ring B J, Grace J, McRobie-Belle D J and Wrighton S A (2000) Present and Future in Vitro Approaches for Drug Metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44:313-324.

Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A and Ronnblom A (2007) Efflux Transporters in Ulcerative Colitis: Decreased Expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis* 13:291-297.

Fahmi OA, Boldt S, Kish M, Obach R S and Tremaine L M (2008) Prediction of Drug-Drug Interactions From in Vitro Induction Data: Application of the Relative Induction Score Approach Using Cryopreserved Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 36:1971-1974.

Floyd MD, Gervasini G, Masica A L, Mayo G, George A L, Jr., Bhat K, Kim R B and Wilkinson G R (2003) Genotype-Phenotype Associations for Common CYP3A4 and CYP3A5 Variants in the Basal and Induced Metabolism of Midazolam in European- and African-American Men and Women. *Pharmacogenetics* 13:595-606.

Folprecht G and Kohne C H (2004) The Role of New Agents in the Treatment of Colorectal Cancer. *Oncology* 66:1-17.

Fujimoto N, Kiura K, Takigawa N, Fujiwara Y, Toyooka S, Umemura S, Tabata M, Ueoka H and Tanimoto M (2010) Triplet Chemotherapy With Cisplatin, Docetaxel, and Irinotecan for Patients With Recurrent or Refractory Non-Small Cell Lung Cancer. *Acta Med Okayama* 64:33-37.

Fujiwara R, Nakajima M, Oda S, Yamanaka H, Ikushiro S, Sakaki T and Yokoi T (2010) Interactions Between Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and UGT1A Enzymes. *J Pharm Sci* 99:442-454.

Fujiwara R, Nakajima M, Yamanaka H, Katoh M and Yokoi T (2007a) Interactions Between Human UGT1A1, UGT1A4, and UGT1A6 Affect Their Enzymatic Activities. *Drug Metab Dispos* 35:1781-1787.

Fujiwara R, Nakajima M, Yamanaka H, Nakamura A, Katoh M, Ikushiro S, Sakaki T and Yokoi T (2007b) Effects of Coexpression of UGT1A9 on Enzymatic Activities of Human UGT1A Isoforms. *Drug Metab Dispos* 35:747-757.

Fung KL and Gottesman M M (2009) A Synonymous Polymorphism in a Common MDR1 (ABCB1) Haplotype Shapes Protein Function. *Biochim Biophys Acta* 1794:860-871.

Gaganis P, Miners J O and Knights K M (2007) Glucuronidation of Fenamates: Kinetic Studies Using Human Kidney Cortical Microsomes and Recombinant UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 and 2B7. *Biochem Pharmacol* 73:1683-1691.

Gangl E, Utkin I, Gerber N and Vouros P (2002) Structural Elucidation of Metabolites of Ritonavir and Indinavir by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 974:91-101.

Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro R M, Garcia-Gamito F J, Gullsten H, Raunio H and Agundez J A (2002) CYP3A4 Variant Alleles in White Individuals With Low CYP3A4 Enzyme Activity. *Clin Pharmacol Ther* 71:196-204.

Gasser R, Funk C, Matzinger P, Klemisch W and Viger-Chougnat A (1999) Use of Transgenic Cell Lines in Mechanistic Studies of Drug Metabolism. *Toxicology in Vitro* 13:625-632.

Gaulier, J. M., Bouanani, S., Ricordel, I., Mura, P., Brunet, B., Bidaud, M., Moulisma, M., Parant, F., Nacache, L., Pelissier, A. L., Lachatre, G., and Marquet, P. Recherche d'une contribution pharmacogénétique aux décès observés à la suite de l'administration, licite ou illicite, de buprénorphine haut dosage : résultats d'une étude préliminaire multicentrique. XV^{ème} Congrès Annuel de la Societe Francaise de Toxicologie Analytique. Annales de Toxicologie Analytique XIX, 179-180. 2007.

Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann C J, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe H G, Brinkmann U, Klenk H P, Kleine K, Meyer U A and Wojnowski L (2001) Genomic Organization of the Human CYP3A Locus: Identification of a New, Inducible CYP3A Gene. *Pharmacogenetics* 11:111-121.

Gomez-Lechon MJ, Castell J V and Donato M T (2007) Hepatocytes--the Choice to Investigate Drug Metabolism and Toxicity in Man: in Vitro Variability As a Reflection of in Vivo. *Chem Biol Interact* 168:30-50.

Gomez-Lechon MJ, Donato T, Jover R, Rodriguez C, Ponsoda X, Glaise D, Castell J V and Guguen-Guillouzo C (2001) Expression and Induction of a Large Set of Drug-Metabolizing Enzymes by the Highly Differentiated Human Hepatoma Cell Line BC2. *Eur J Biochem* 268:1448-1459.

Gonzalez FJ (2007) The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos* 35:1-8.

Gorski JC, Hall S D, Jones D R, Vandenbranden M and Wrighton S A (1994) Regioselective Biotransformation of Midazolam by Members of the Human Cytochrome P450 3A (CYP3A) Subfamily. *Biochem Pharmacol* 47:1643-1653.

Gorski JC, Vannaprasaht S, Hamman M A, Ambrosius W T, Bruce M A, Haehner-Daniels B and Hall S D (2003) The Effect of Age, Sex, and Rifampin Administration on Intestinal and Hepatic Cytochrome P450 3A Activity. *Clin Pharmacol Ther* 74:275-287.

- Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K and Inui K (2002) C3435T Polymorphism in the MDR1 Gene Affects the Enterocyte Expression Level of CYP3A4 Rather Than Pgp in Recipients of Living-Donor Liver Transplantation. *Pharmacogenetics* 12:451-457.
- Gottesman MM (2002) Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Med* 53:615-627.
- Green MD, King C D, Mojarrabi B, Mackenzie P I and Tephly T R (1998) Glucuronidation of Amines and Other Xenobiotics Catalyzed by Expressed Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 26:507-512.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le S J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C and Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655-15660.
- Guengerich FP (1997) Comparisons of Catalytic Selectivity of Cytochrome P450 Subfamily Enzymes From Different Species. *Chem Biol Interact* 106:161-182.
- Guillemette C, Millikan R C, Newman B and Housman D E (2000) Genetic Polymorphisms in Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferase 1A1 and Association With Breast Cancer Among African Americans. *Cancer Res* 60:950-956.
- Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A and Guyomard C (1999) Survival and Function of Isolated Hepatocytes After Cryopreservation. *Chem Biol Interact* 121:7-16.
- Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck C J, Dazert P, Siegmund W, Kroemer H K, Warzok R W and Cascorbi I (2007) Influence of Polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and Protein Expression in Normal and Cancerous Kidney Cortex. *Pharmacogenomics J* 7:56-65.
- Hagenauer B, Salamon A, Thalhammer T, Kunert O, Haslinger E, Klingler P, Senderowicz A M, Sausville E A and Jager W (2001) In Vitro Glucuronidation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol by Rat and Human Liver Microsomes: Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases 1A1 and 1A9. *Drug Metab Dispos* 29:407-414.
- Hakala K S, Suchanova B, Luukkanen L, Ketola R A, Finel M and Kostiaainen R (2005) Rapid simultaneous determination of metabolic clearance of multiple compounds catalyzed in vitro by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Anal. Biochem.* 341:105-112.
- Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M and Raunio H (1998) Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes in the Human Feto-Placental Unit: Role in Intrauterine Toxicity. *Crit Rev Toxicol* 28:35-72.
- Hall SD, Thummel K E, Watkins P B, Lown K S, Benet L Z, Paine M F, Mayo R R, Turgeon D K, Bailey D G, Fontana R J and Wrighton S A (1999) Molecular and Physical Mechanisms of First-Pass Extraction. *Drug Metab Dispos* 27:161-166.
- Han JY, Lim H S, Yoo Y K, Shin E S, Park Y H, Lee S Y, Lee J E, Lee D H, Kim H T and Lee J S (2007) Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 Polymorphisms With Irinotecan-Pharmacokinetics and Clinical Outcome in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer* 110:138-147.

Hellmold H, Rylander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M and Gustafsson J A (1998) Characterization of Cytochrome P450 Enzymes in Human Breast Tissue From Reduction Mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab* 83:886-895.

Hesselink DA, van Schaik R H, van der Heiden I P, van der Werf M, Gregoor P J, Lindemans J, Weimar W and van G T (2003) Genetic Polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 Genes and Pharmacokinetics of the Calcineurin Inhibitors Cyclosporine and Tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 74:245-254.

Hewitt NJ, Lechon M J, Houston J B, Hallifax D, Brown H S, Maurel P, Kenna J G, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li A P, LeCluyse E, Groothuis G M and Hengstler J G (2007) Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies. *Drug Metab Rev* 39:159-234.

Higashikawa F, Murakami T, Kaneda T, Kato A and Takano M (1999) Dose-Dependent Intestinal and Hepatic First-Pass Metabolism of Midazolam, a Cytochrome P450 3A Substrate With Differently Modulated Enzyme Activity in Rats. *J Pharm Pharmacol* 51:67-72.

Higgins CF (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.

Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A L and Karlsson J (2007) Expression of Thirty-Six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metab Dispos* 35:1333-1340.

Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy S I, Kishikawa Y, Matsuura M, Agatsuma Y, Inoue T and Mizugaki M (2002) Allele and Genotype Frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese Population. *Eur J Clin Pharmacol* 58:417-421.

Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm M F and Schwab M (2004) Variable Expression of P-Glycoprotein in the Human Placenta and Its Association With Mutations of the Multidrug Resistance 1 Gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 14:309-318.

Ho GT, Nimmo E R, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott I D and Satsangi J (2005) Allelic Variations of the Multidrug Resistance Gene Determine Susceptibility and Disease Behavior in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 128:288-296.

Hoblinger A, Grunhage F, Sauerbruch T and Lammert F (2009) Association of the C.3972C>T Variant of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Gene (MRP2/ABCC2) With Susceptibility to Bile Duct Cancer. *Digestion* 80:36-39.

Hoffmeyer S, Burk O, von R O, Arnold H P, Brockmoller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional Polymorphisms of the Human Multidrug-Resistance Gene: Multiple Sequence Variations and Correlation of One Allele With P-Glycoprotein Expression and Activity in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473-3478.

Holthe M, Rakvag T N, Klepstad P, Idle J R, Kaasa S, Krokan H E and Skorpen F (2003) 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* 3:17-26.

Hopper E, Belinsky M G, Zeng H, Tosolini A, Testa J R and Kruh G D (2001) Analysis of the Structure and Expression Pattern of MRP7 (ABCC10), a New Member of the MRP Subfamily. *Cancer Lett* 162:181-191.

Horning EC, Carroll D I, Dzidic I, Haegele K D, Horning M G and Stillwell R N (1974) Atmospheric Pressure Ionization (API) Mass Spectrometry. Solvent-Mediated Ionization of Samples Introduced in Solution and in a Liquid Chromatograph Effluent Stream. *J Chromatogr Sci* 12:725-729.

Hosokawa S, Tagaya O, Mikami T, Nozaki Y, Kawaguchi A, Yamatsu K and Shamoto M (1992) A New Rat Mutant With Chronic Conjugated Hyperbilirubinemia and Renal Glomerular Lesions. *Lab Anim Sci* 42:27-34.

Houston JB (1994) Utility of in Vitro Drug Metabolism Data in Predicting in Vivo Metabolic Clearance. *Biochem Pharmacol* 47:1469-1479.

Houston JB and Carlile D J (1997) Prediction of Hepatic Clearance From Microsomes, Hepatocytes, and Liver Slices. *Drug Metab Rev* 29:891-922.

Houston JB and Kenworthy K E (2000) In Vitro-in Vivo Scaling of CYP Kinetic Data Not Consistent With the Classical Michaelis-Menten Model. *Drug Metab Dispos* 28:246-254.

Huang YH, Galijatovic A, Nguyen N, Geske D, Beaton D, Green J, Green M, Peters W H and Tukey R H (2002) Identification and Functional Characterization of UDP-Glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* 12:287-297.

Hubner RA, Muir K R, Liu J F, Logan R F, Grainge M, Armitage N, Shepherd V, Popat S and Houlston R S (2006) Genetic Variants of UGT1A6 Influence Risk of Colorectal Adenoma Recurrence. *Clin Cancer Res* 12:6585-6589.

Huls M, Brown C D, Windass A S, Sayer R, van den Heuvel J J, Heemskerk S, Russel F G and Masereeuw R (2008) The Breast Cancer Resistance Protein Transporter ABCG2 Is Expressed in the Human Kidney Proximal Tubule Apical Membrane. *Kidney Int* 73:220-225.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He Y Q, Klein K, Nuessler A C, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert J R, Zanger U M and Wojnowski L (2001) The Genetic Determinants of the CYP3A5 Polymorphism. *Pharmacogenetics* 11:773-779.

Hutt AJ, Caldwell J and Smith R L (1986) The Metabolism of Aspirin in Man: a Population Study. *Xenobiotica* 16:239-249.

Hyland R, Dickins M, Collins C, Jones H and Jones B (2008) Maraviroc: in Vitro Assessment of Drug-Drug Interaction Potential. *Br J Clin Pharmacol* 66:498-507.

- Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y and Sugimoto Y (2002) C421A Polymorphism in the Human Breast Cancer Resistance Protein Gene Is Associated With Low Expression of Q141K Protein and Low-Level Drug Resistance. *Mol Cancer Ther* 1:611-616.
- Innocenti F and Ratain M J (2003) Irinotecan Treatment in Cancer Patients With UGT1A1 Polymorphisms. *Oncology (Williston Park)* 17:52-55.
- Innocenti F, Undevia S D, Iyer L, Chen P X, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin C M, Vokes E E and Ratain M J (2004) Genetic Variants in the UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Gene Predict the Risk of Severe Neutropenia of Irinotecan. *J Clin Oncol* 22:1382-1388.
- Innocenti F, Vokes E E and Ratain M J (2006) Irinogenetics: What Is the Right Star? *J Clin Oncol* 24:2221-2224.
- Inoue K, Miura M, Satoh S, Kagaya H, Saito M, Habuchi T and Suzuki T (2007) Influence of UGT1A7 and UGT1A9 Intronic I399 Genetic Polymorphisms on Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in Japanese Renal Transplant Recipients. *Ther Drug Monit* 29:299-304.
- Ioannides C (1999) Effect of Diet and Nutrition on the Expression of Cytochromes P450. *Xenobiotica* 29:109-154.
- Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S and Otsubo K (2001) Polymorphism of the ABC Transporter Genes, MDR1, MRP1 and MRP2/CMOAT, in Healthy Japanese Subjects. *Pharmacogenetics* 11:175-184.
- Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S, Sai K, Nagano M, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S and Sawada J J (2002) Polymorphisms in the ABCC2 (CMOAT/MRP2) Gene Found in 72 Established Cell Lines Derived From Japanese Individuals: an Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in the 5'-Untranslated Region and Exon 28. *Drug Metab Dispos* 30:363-364.
- Iwai M, Maruo Y, Ito M, Yamamoto K, Sato H and Takeuchi Y (2004) Six Novel UDP-Glucuronosyltransferase (UGT1A3) Polymorphisms With Varying Activity. *J Hum Genet* 49:123-128.
- Iwatsubo T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green C E, Tyson C A, Yokoi T, Kamataki T and Sugiyama Y (1997) Prediction of in Vivo Hepatic Metabolic Clearance of YM796 From in Vitro Data by Use of Human Liver Microsomes and Recombinant P-450 Isozymes. *J Pharmacol Exp Ther* 282:909-919.
- Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris R E, Benet L Z and Christians U (2001) Comparison of the in Vitro Metabolism of the Macrolide Immunosuppressants Sirolimus and RAD. *Transplant Proc* 33:514-515.
- Jansen PL, van Klinken J W, van G M, Ottenhoff R and Elferink R P (1993) Preserved Organic Anion Transport in Mutant TR- Rats With a Hepatobiliary Secretion Defect. *Am J Physiol* 265:G445-G452.

Johnson BM, Zhang P, Schuetz J D and Brouwer K L (2006) Characterization of Transport Protein Expression in Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp) 2-Deficient Rats. *Drug Metab Dispos* 34:556-562.

Johnson LA, Oetting W S, Basu S, Prausa S, Matas A and Jacobson P A (2008) Pharmacogenetic Effect of the UGT Polymorphisms on Mycophenolate Is Modified by Calcineurin Inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 64:1047-1056.

Jones HM and Houston J B (2004) Substrate Depletion Approach for Determining in Vitro Metabolic Clearance: Time Dependencies in Hepatocyte and Microsomal Incubations. *Drug Metab Dispos* 32:973-982.

Jorge I, Casas E M, Villar M, Ortega-Perez I, Lopez-Ferrer D, Martinez-Ruiz A, Carrera M, Marina A, Martinez P, Serrano H, Canas B, Were F, Gallardo J M, Lamas S, Redondo J M, Garcia-Dorado D and Vazquez J (2007) High-Sensitivity Analysis of Specific Peptides in Complex Samples by Selected MS/MS Ion Monitoring and Linear Ion Trap Mass Spectrometry: Application to Biological Studies. *J Mass Spectrom* 42:1391-1403.

Josse R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul J M, Guguen-Guillouzo C and Guillouzo A (2008) Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* 36:1111-1118.

Jounaidi Y, Hyrilles V, Gervot L and Maurel P (1996) Detection of CYP3A5 Allelic Variant: a Candidate for the Polymorphic Expression of the Protein? *Biochem Biophys Res Commun* 221:466-470.

Juliano RL and Ling V (1976) A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.

Kagaya H, Inoue K, Miura M, Satoh S, Saito M, Tada H, Habuchi T and Suzuki T (2007) Influence of UGT1A8 and UGT2B7 Genetic Polymorphisms on Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in Japanese Renal Transplant Recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 63:279-288.

Kajiji S, Talbot F, Grizzuti K, Van Dyke-Phillips V, Agresti M, Safa A R and Gros P (1993) Functional Analysis of P-Glycoprotein Mutants Identifies Predicted Transmembrane Domain 11 As a Putative Drug Binding Site. *Biochemistry* 32:4185-4194.

Kanebratt KP and Andersson T B (2008) Evaluation of HepaRG Cells As an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies. *Drug Metab Dispos* 36:1444-1452.

Kasai N, Sakaki T, Shinkyō R, Ikushiro S, Iyanagi T, Ohta M and Inouye K (2005) Metabolism of 26,26,26,27,27,27-F6-1 Alpha,23S,25-Trihydroxyvitamin D3 by Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 33:102-107.

Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H and Sato K (1991) Intracellular Roles of SN-38, a Metabolite of the Camptothecin Derivative CPT-11, in the Antitumor Effect of CPT-11. *Cancer Res* 51:4187-4191.

Keski-Hynn̄ila H, Luukkanen L, Taskinen J and Kostianen R (1999) Mass Spectrometric and Tandem Mass Spectrometric Behavior of Nitrocatechol Glucuronides: a Comparison of

Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 10:537-545.

Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston J B and Galetin A (2009) Prediction of Drug Clearance by Glucuronidation From in Vitro Data: Use of Combined Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase Cofactors in Alamethicin-Activated Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos* 37:82-89.

Kim MJ, Kim H, Cha I J, Park J S, Shon J H, Liu K H and Shin J G (2005) High-Throughput Screening of Inhibitory Potential of Nine Cytochrome P450 Enzymes in Vitro Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:2651-2658.

Kim RB, Leake B F, Choo E F, Dresser G K, Kubba S V, Schwarz U I, Taylor A, Xie H G, McKinsey J, Zhou S, Lan L B, Schuetz J D, Schuetz E G and Wilkinson G R (2001a) Identification of Functionally Variant MDR1 Alleles Among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70:189-199.

Kim RB, Leake B F, Choo E F, Dresser G K, Kubba S V, Schwarz U I, Taylor A, Xie H G, McKinsey J, Zhou S, Lan L B, Schuetz J D, Schuetz E G and Wilkinson G R (2001b) Identification of Functionally Variant MDR1 Alleles Among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70:189-199.

Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, Sauna Z E, Calcagno A M, Ambudkar S V and Gottesman M M (2007) A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 315:525-528.

King C, Tang W, Ngui J, Tephly T and Braun M (2001) Characterization of Rat and Human UDP-Glucuronosyltransferases Responsible for the in Vitro Glucuronidation of Diclofenac. *Toxicol Sci* 61:49-53.

King CD, Rios G R, Assouline J A and Tephly T R (1999) Expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the Human Brain and Identification of 5-Hydroxytryptamine As a Substrate. *Arch Biochem Biophys* 365:156-162.

Kniepeiss D, Renner W, Trummer O, Wagner D, Wasler A, Khoschsorur G A, Truschnig-Wilders M and Tscheliessnigg K H (2009) The Role of CYP3A5 Genotypes in Dose Requirements of Tacrolimus and Everolimus After Heart Transplantation. *Clin Transplant*.

Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K and Sugiyama Y (2005) Functional Assessment of ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms to Protein Expression in Human Placenta. *Drug Metab Dispos* 33:94-101.

Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U and Wojnowski L (2002) Interindividual Variability and Tissue-Specificity in the Expression of Cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 30:1108-1114.

Kohle C, Badary O A, Nill K, Bock-Hennig B S and Bock K W (2005) Serotonin Glucuronidation by Ah Receptor- and Oxidative Stress-Inducible Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 Cells. *Biochem Pharmacol* 69:1397-1402.

Kolars JC, Awni W M, Merion R M and Watkins P B (1991) First-Pass Metabolism of Cyclosporin by the Gut. *Lancet* 338:1488-1490.

Kong SY, Ki C S, Yoo B C and Kim J W (2008) UGT1A7 Haplotype Is Associated With an Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Carriers. *Cancer Sci* 99:340-344.

Konig J, Rost D, Cui Y and Keppler D (1999) Characterization of the Human Multidrug Resistance Protein Isoform MRP3 Localized to the Basolateral Hepatocyte Membrane. *Hepatology* 29:1156-1163.

Kool M, de H M, Scheffer G L, Scheper R J, van Eijk M J, Juijn J A, Baas F and Borst P (1997) Analysis of Expression of CMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-Associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 57:3537-3547.

Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T and Auriola S (2003) Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization-Mass Spectrometry in Drug Metabolism Studies. *J Mass Spectrom* 38:357-372.

Kremers P (2002) Can Drug-Drug Interactions Be Predicted From in Vitro Studies? *ScientificWorldJournal* 2:751-766.

Krishnamurthy P, Ross D D, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer K E, Sarkadi B, Sorrentino B P and Schuetz J D (2004) The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival Through Interactions With Heme. *J Biol Chem* 279:24218-24225.

Krishnaswamy S, Duan S X, von Moltke L L, Greenblatt D J and Court MH (2003) Validation of Serotonin (5-Hydroxytryptamine) As an in Vitro Substrate Probe for Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A6. *Drug Metab Dispos* 31:133-139.

Krishnaswamy S, Hao Q, Al-Rohaimi A, Hesse L M, von Moltke L L, Greenblatt D J and Court MH (2005) UDP Glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 Pharmacogenetics: II. Functional Impact of the Three Most Common Nonsynonymous UGT1A6 Polymorphisms (S7A, T181A, and R184S). *J Pharmacol Exp Ther* 313:1340-1346.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins P B, Daly A, Wrighton S A, Hall S D, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski M S and Schuetz E (2001) Sequence Diversity in CYP3A Promoters and Characterization of the Genetic Basis of Polymorphic CYP3A5 Expression. *Nat Genet* 27:383-391.

Kuhn B, Jacobsen W, Christians U, Benet L Z and Kollman P A (2001) Metabolism of Sirolimus and Its Derivative Everolimus by Cytochrome P450 3A4: Insights From Docking, Molecular Dynamics, and Quantum Chemical Calculations. *J Med Chem* 44:2027-2034.

Kumar GN, Dykstra J, Roberts E M, Jayanti V K, Hickman D, Uchic J, Yao Y, Surber B, Thomas S and Granneman G R (1999) Potent Inhibition of the Cytochrome P-450 3A-Mediated Human Liver Microsomal Metabolism of a Novel HIV Protease Inhibitor by Ritonavir: A Positive Drug-Drug Interaction. *Drug Metab Dispos* 27:902-908.

- Kuypers DR, de J H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K and Vanrenterghem Y (2007) CYP3A5 and CYP3A4 but Not MDR1 Single-Nucleotide Polymorphisms Determine Long-Term Tacrolimus Disposition and Drug-Related Nephrotoxicity in Renal Recipients. *Clin Pharmacol Ther* 82:711-725.
- Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S and Vanrenterghem Y (2005) 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* 78:351-361.
- Laechelt S, Turrini E, Ruehmkorf A, Siegmund W, Cascorbi I and Haenisch S (2010) Impact of ABCC2 Haplotypes on Transcriptional and Posttranscriptional Gene Regulation and Function. *Pharmacogenomics J*.
- Lamba JK, Lin Y S, Schuetz E G and Thummel K E (2002) Genetic Contribution to Variable Human CYP3A-Mediated Metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1271-1294.
- Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W and Schmitz G (2004) Loss of Detoxification in Inflammatory Bowel Disease: Dysregulation of Pregnane X Receptor Target Genes. *Gastroenterology* 127:26-40.
- Lankisch TO, Schulz C, Zwingers T, Erichsen T J, Manns M P, Heinemann V and Strassburg C P (2008) Gilbert's Syndrome and Irinotecan Toxicity: Combination With UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 Variants Increases Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:695-701.
- Lauer B, Tuschl G, Kling M and Mueller S O (2009) Species-Specific Toxicity of Diclofenac and Troglitazone in Primary Human and Rat Hepatocytes. *Chem Biol Interact* 179:17-24.
- Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guillou F, Rousset M, Rubas W and Scarino M L (2001) In Vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* 29:649-668.
- Le Meur Y, Djebli N, Szelag J C, Hoizey G, Toupance O, Rerolle J P, Marquet P (2006) CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clin.Pharmacol.Ther.*80:51-60.
- Lee SS, Kim S Y, Kim W Y, Thi-Le H, Yoon Y R, Yea S S and Shin J G (2005) MDR1 Genetic Polymorphisms and Comparison of MDR1 Haplotype Profiles in Korean and Vietnamese Populations. *Ther Drug Monit* 27:531-535.
- Lemahieu WP, Maes B D, Verbeke K and Vanrenterghem Y F (2004) Alterations of CYP3A4 and P-Glycoprotein Activity in Vivo With Time in Renal Graft Recipients. *Kidney Int* 66:433-440.
- Leslie EM, Deeley R G and Cole S P (2005) Multidrug Resistance Proteins: Role of P-Glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in Tissue Defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:216-237.

Levesque E, Beaulieu M, Green M D, Tephly T R, Belanger A and Hum D W (1997) Isolation and Characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-Glucuronosyltransferase Encoded by a Polymorphic Gene. *Pharmacogenetics* 7:317-325.

Levesque E, Delage R, Benoit-Biancamano M O, Caron P, Bernard O, Couture F and Guillemette C (2007) The Impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetic Profile of Mycophenolic Acid After a Single Oral Dose in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 81:392-400.

Levsen K, Schiebel H M, Behnke B, Dotzer R, Dreher W, Elend M and Thiele H (2005) Structure Elucidation of Phase II Metabolites by Tandem Mass Spectrometry: an Overview. *J Chromatogr A* 1067:55-72.

Lewis DF, Ioannides C and Parke D V (1998) Cytochromes P450 and Species Differences in Xenobiotic Metabolism and Activation of Carcinogen. *Environ Health Perspect* 106:633-641.

Lewis DF and Pratt J M (1998) The P450 Catalytic Cycle and Oxygenation Mechanism. *Drug Metab Rev* 30:739-786.

Li AP, Lu C, Brent J A, Pham C, Fackett A, Ruegg C E and Silber P M (1999) Cryopreserved Human Hepatocytes: Characterization of Drug-Metabolizing Enzyme Activities and Applications in Higher Throughput Screening Assays for Hepatotoxicity, Metabolic Stability, and Drug-Drug Interaction Potential. *Chem Biol Interact* 121:17-35.

Lievre A, Milet J, Carayol J, Le C D, Milan C, Pariente A, Nalet B, Lafon J, Faivre J, Bonithon-Kopp C, Olschwang S, Bonaiti-Pellie C and Laurent-Puig P (2006) Genetic Polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 Gene Promoter and Risk of Colorectal Adenoma. *BMC Cancer* 6:270.

Lin JH, Chiba M and Baillie T A (1999) Is the Role of the Small Intestine in First-Pass Metabolism Overemphasized? *Pharmacol Rev* 51:135-158.

Lin JH and Lu A Y (1997) Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharmacol Rev* 49:403-449.

Lin JH and Lu A Y (1998) Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 35:361-390.

Lin YS, Dowling A L, Quigley S D, Farin F M, Zhang J, Lamba J, Schuetz E G and Thummel K E (2002) Co-Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Contribution to Hepatic and Intestinal Midazolam Metabolism. *Mol Pharmacol* 62:162-172.

Litman T, Druley T E, Stein W D and Bates S E (2001) From MDR to MXR: New Understanding of Multidrug Resistance Systems, Their Properties and Clinical Significance. *Cell Mol Life Sci* 58:931-959.

Liu DQ, Xia Y Q and Bakhtiar R (2002) Use of a Liquid Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry/Triple Quadrupole Mass Spectrometry System for Metabolite Identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1330-1336.

Loo TW and Clarke D M (1994) Mutations to Amino Acids Located in Predicted Transmembrane Segment 6 (TM6) Modulate the Activity and Substrate Specificity of Human P-Glycoprotein. *Biochemistry* 33:14049-14057.

Lown KS, Bailey D G, Fontana R J, Janardan S K, Adair C H, Fortlage L A, Brown M B, Guo W and Watkins P B (1997) Grapefruit Juice Increases Felodipine Oral Availability in Humans by Decreasing Intestinal CYP3A Protein Expression. *J Clin Invest* 99:2545-2553.

Lu AY, Wang R W and Lin J H (2003) Cytochrome P450 in Vitro Reaction Phenotyping: a Re-Evaluation of Approaches Used for P450 Isoform Identification. *Drug Metab Dispos* 31:345-350.

Macphee I A, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter N D, Johnston A, Goldberg L, Holt D W (2002) Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 74:1486-1489.

Macphee I A, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter N D, Johnston A, Goldberg L, Holt D W (2004) The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 4:914-919.

Macphee I A, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter N D, Johnston A, Goldberg L, Holt D W (2005) Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 79:499-502.

Maezono S, Sugimoto K, Sakamoto K, Ohmori M, Hishikawa S, Mizuta K, Kawarasaki H, Watanabe Y and Fujimura A (2005) Elevated Blood Concentrations of Calcineurin Inhibitors During Diarrheal Episode in Pediatric Liver Transplant Recipients: Involvement of the Suppression of Intestinal Cytochrome P450 3A and P-Glycoprotein. *Pediatr Transplant* 9:315-323.

Maher JM, Cherrington N J, Slitt A L and Klaassen C D (2006) Tissue Distribution and Induction of the Rat Multidrug Resistance-Associated Proteins 5 and 6. *Life Sci* 78:2219-2225.

Mackenzie P I, Bock K W, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners J O, Owens I S, Nebert D W (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet.Genomics* 15:677-685.

Mackenzie P I, Rogers A, Treloar J, Jorgensen B R, Miners J O and Meech R (2008) Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *J.Biol.Chem.* 52:205-210.

Maliapaard M, Scheffer G L, Faneyte I F, van Gastelen M A, Pijnenborg A C, Schinkel A H, van de Vijver M J, Scheper R J and Schellens J H (2001) Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res* 61:3458-3464.

Mandlekar S, Hong J L and Kong A N (2006) Modulation of Metabolic Enzymes by Dietary Phytochemicals: a Review of Mechanisms Underlying Beneficial Versus Unfavorable Effects. *Curr Drug Metab* 7:661-675.

Mano Y, Usui T and Kamimura H (2007) Inhibitory Potential of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 in Human Liver Microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 63:211-216.

Mao Q and Unadkat J D (2005) Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport. *AAPS J* 7:E118-E133.

Marquet P (2005) Théorie Et Instrumentation Des Techniques De LC-MS Et LC-MS/MS Applicables à La Toxicologie. *Annales de Toxicologie Analytique* 5-12.

Materna V and Lage H (2003) Homozygous Mutation Arg768Trp in the ABC-Transporter Encoding Gene MRP2/CMOAT/ABCC2 Causes Dubin-Johnson Syndrome in a Caucasian Patient. *J Hum Genet* 48:484-486.

McGreavey LE, Turner F, Smith G, Boylan K, Timothy B D, Forman D, Roland W C and Barrett J H (2005) No Evidence That Polymorphisms in CYP2C8, CYP2C9, UGT1A6, PPARdelta and PPARgamma Act As Modifiers of the Protective Effect of Regular NSAID Use on the Risk of Colorectal Carcinoma. *Pharmacogenet Genomics* 15:713-721.

Merino G, Molina A J, Garcia J L, Pulido M M, Prieto J G and Alvarez A I (2003) Intestinal Elimination of Albendazole Sulfoxide: Pharmacokinetic Effects of Inhibitors. *Int J Pharm* 263:123-132.

Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, Cascorbi I and Kroemer H K (2005) Variable Expression of MRP2 (ABCC2) in Human Placenta: Influence of Gestational Age and Cellular Differentiation. *Drug Metab Dispos* 33:896-904.

Mills BM, Zaya M J, Walters R R, Feenstra K L, White J A, Gagne J and Locuson C W (2010) Current Cytochrome P450 Phenotyping Methods Applied to Metabolic Drug-Drug Interaction Prediction in Dogs. *Drug Metab Dispos* 38:396-404.

Mirski SE, Gerlach J H and Cole S P (1987) Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. *Cancer Res* 47:2594-2598.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T and Bates S E (1999) Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-Resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes. *Cancer Res* 59:8-13.

Mizuarai S, Aozasa N and Kotani H (2004) Single Nucleotide Polymorphisms Result in Impaired Membrane Localization and Reduced Atpase Activity in Multidrug Transporter ABCG2. *Int J Cancer* 109:238-246.

Mohutsky MA, Petullo D M and Wrighton S A (2005) The Use of a Substrate Cassette Strategy to Improve the Capacity and Throughput of Cytochrome P450 Induction Studies in Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 33:920-923.

Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H and Takeuchi Y (2005) UDP-Glucuronosyltransferase 1A4 Polymorphisms in a Japanese Population and Kinetics of Clozapine Glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 33:672-675.

Mouly SJ, Matheny C, Paine M F, Smith G, Lamba J, Lamba V, Pusek S N, Schuetz E G, Stewart P W and Watkins P B (2005) Variation in Oral Clearance of Saquinavir Is Predicted by CYP3A5*1 Genotype but Not by Enterocyte Content of Cytochrome P450 3A5. *Clin Pharmacol Ther* 78:605-618.

Nagar S, Zalatoris J J and Blanchard R L (2004) Human UGT1A6 Pharmacogenetics: Identification of a Novel SNP, Characterization of Allele Frequencies and Functional Analysis of Recombinant Allozymes in Human Liver Tissue and in Cultured Cells. *Pharmacogenetics* 14:487-499.

Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R, Katoh M and Yokoi T (2007) Stereoselective Glucuronidation of 5-(4'-Hydroxyphenyl)-5-Phenylhydantoin by Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1, UGT1A9, and UGT2B15: Effects of UGT-UGT Interactions. *Drug Metab Dispos* 35:1679-1686.

Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M and Okumura K (2002) Effect of the Mutation (C3435T) at Exon 26 of the MDR1 Gene on Expression Level of MDR1 Messenger Ribonucleic Acid in Duodenal Enterocytes of Healthy Japanese Subjects. *Clin Pharmacol Ther* 71:297-303.

Nakamura A, Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R, Yokoi T (2008) Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab Dispos* 8:1461-1464.

Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond F A, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A and Pichette V (2007) Down-Regulation of Intestinal Drug Transporters in Chronic Renal Failure in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 320:978-985.

Nelson DR (2006) Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 320:1-10.

Nies AT and Keppler D (2007) The Apical Conjugate Efflux Pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453:643-659.

Niessen WM (1998) Advances in Instrumentation in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Related Liquid-Introduction Techniques. *J Chromatogr A* 794:407-435.

Nowell SA, Massengill J S, Williams S, Radominska-Pandya A, Tephly T R, Cheng Z, Strassburg C P, Tukey R H, MacLeod S L, Lang N P and Kadlubar F F (1999) Glucuronidation of 2-Hydroxyamino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4, 5-b]Pyridine by Human Microsomal UDP-Glucuronosyltransferases: Identification of Specific UGT1A Family Isoforms Involved. *Carcinogenesis* 20:1107-1114.

Obach RS (1999) Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs From Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of in Vitro Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metab Dispos* 27:1350-1359.

Obach RS, Baxter J G, Liston T E, Silber B M, Jones B C, MacIntyre F, Rance D J and Wastall P (1997) The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters From Preclinical and in Vitro Metabolism Data. *J Pharmacol Exp Ther* 283:46-58.

Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns M P and Strassburg C P (2003) UDP Glucuronosyltransferase (UGT1A7) Gene Polymorphisms Increase the Risk of Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 124:1802-1808.

Ohno,S.; Nakajin,S. (2009) Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* 37:32-40.

Olson KC, Dellinger R W, Zhong Q, Sun D, Amin S, Spratt T E and Lazarus P (2009) Functional Characterization of Low-Prevalence Missense Polymorphisms in the UDP-Glucuronosyltransferase 1A9 Gene. *Drug Metab Dispos* 37:1999-2007.

Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park B K and Pirmohamed M (2005) Relationship Between the C3435T and G2677T(A) Polymorphisms in the ABCB1 Gene and P-Glycoprotein Expression in Human Liver. *Br J Clin Pharmacol* 59:365-370.

Ozawa S, Soyama A, Saeki M, Fukushima-Uesaka H, Itoda M, Koyano S, Sai K, Ohno Y, Saito Y and Sawada J (2004) Ethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:83-95.

Paine MF, Hart H L, Ludington S S, Haining R L, Rettie A E and Zeldin D C (2006) The Human Intestinal Cytochrome P450 "Pie". *Drug Metab Dispos* 34:880-886.

Paine MF, Khalighi M, Fisher J M, Shen D D, Kunze K L, Marsh C L, Perkins J D and Thummel K E (1997) Characterization of Interintestinal and Intraintestinal Variations in Human CYP3A-Dependent Metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1552-1562.

Paine MF, Shen D D, Kunze K L, Perkins J D, Marsh C L, McVicar J P, Barr D M, Gillies B S and Thummel K E (1996) First-Pass Metabolism of Midazolam by the Human Intestine. *Clin Pharmacol Ther* 60:14-24.

Pauli-Magnus C and Kroetz D L (2004) Functional Implications of Genetic Polymorphisms in the Multidrug Resistance Gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res* 21:904-913.

Pelizzi N, Puccini P, Riccardi B, Acerbi D and Catinella S (2003) Characterization of Ganstigmine Metabolites in Hepatocytes by Low- and High-Resolution Mass Spectrometry Coupled With Liquid Chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:1691-1698.

Pelkonen O, Kaltiala E H, Larmi T K and Karki N T (1974) Cytochrome P-450-Linked Monooxygenase System and Drug-Induced Spectral Interactions in Human Liver Microsomes. *Chem Biol Interact* 9:205-216.

Perchalski RJ, Yost R A and Wilder B J (1982) Structural Elucidation of Drug Metabolites by Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal Chem* 54:1466-1471.

- Peters WH, te Morsche R H and Roelofs H M (2003) Combined Polymorphisms in UDP-Glucuronosyltransferases 1A1 and 1A6: Implications for Patients With Gilbert's Syndrome. *J Hepatol* 38:3-8.
- Picard N, Cresteil T, Djebli N and Marquet P (2005) In Vitro Metabolism Study of Buprenorphine: Evidence for New Metabolic Pathways. *Drug Metab Dispos* 33:689-695.
- Picard N, Cresteil T, Premaud A and Marquet P (2004) Characterization of a Phase 1 Metabolite of Mycophenolic Acid Produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 26:600-608.
- Picard N, Djebli N, Sauvage F L and Marquet P (2007) Metabolism of sirolimus in the presence or absence of cyclosporine by genotyped human liver microsomes and recombinant cytochromes P450 3A4 and 3A5. *Drug Metab Dispos* 35:350-355.
- Piepoli A, Gentile A, Valvano M R, Barana D, Oliani C, Cotugno R, Quitadamo M, Andriulli A and Perri F (2006) Lack of Association Between UGT1A7, UGT1A9, ARP, SPINK1 and CFTR Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer in Italian Patients. *World J Gastroenterol* 12:6343-6348.
- Prime-Chapman HM, Fearn R A, Cooper A E, Moore V and Hirst B H (2004) Differential Multidrug Resistance-Associated Protein 1 Through 6 Isoform Expression and Function in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311:476-484.
- Proctor NJ, Tucker G T and Rostami-Hodjegan A (2004) Predicting Drug Clearance From Recombinantly Expressed CYPs: Intersystem Extrapolation Factors. *Xenobiotica* 34:151-178.
- Prueksaritanont T, Subramanian R, Fang X, Ma B, Qiu Y, Lin J H, Pearson P G and Baillie T A (2002) Glucuronidation of Statins in Animals and Humans: a Novel Mechanism of Statin Lactonization. *Drug Metab Dispos* 30:505-512.
- Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, Zhong L J, Liang H Q, Ma C L, Zhang L and Zhong M K (2008) Association of MDR1, CYP3A4*18B, and CYP3A5*3 Polymorphisms With Cyclosporine Pharmacokinetics in Chinese Renal Transplant Recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 64:1069-1084.
- Quintela O, Andrenyak D M, Hoggan A M and Crouch D J (2007) A Validated Method for the Detection of Delta 9-Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy- Delta 9-Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid Samples by Liquid Chromatography Coupled With Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 31:157-164.
- Ramirez J, Liu W, Mirkov S, Desai A A, Chen P, Das S, Innocenti F and Ratain M J (2007) Lack of Association Between Common Polymorphisms in UGT1A9 and Gene Expression and Activity. *Drug Metab Dispos* 35:2149-2153.
- Ren L, Bi K, Gong P, Cheng W, Song Z, Fang L and Chen X (2008) Characterization of the in Vivo and in Vitro Metabolic Profile of PAC-1 Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 876:47-53.
- Rios GR and Tephly T R (2002) Inhibition and Active Sites of UDP-Glucuronosyltransferases 2B7 and 1A1. *Drug Metab Dispos* 30:1364-1367.

Ripp SL, Mills J B, Fahmi O A, Trevena K A, Liras J L, Maurer T S and de Morais S M (2006) Use of Immortalized Human Hepatocytes to Predict the Magnitude of Clinical Drug-Drug Interactions Caused by CYP3A4 Induction. *Drug Metab Dispos* 34:1742-1748.

Ritter JK, Crawford J M and Owens I S (1991) Cloning of Two Human Liver Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase cDNAs With Expression in COS-1 Cells. *J Biol Chem* 266:1043-1047.

Rivory LP, Qin H, Clarke S J, Eris J, Duggin G, Ray E, Trent R J and Bishop J F (2000) Frequency of Cytochrome P450 3A4 Variant Genotype in Transplant Population and Lack of Association With Cyclosporin Clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 56:395-398.

Robb DB, Covey T R and Bruins A P (2000) Atmospheric Pressure Photoionization: an Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 72:3653-3659.

Rocchi E, Khodjakov A, Volk E L, Yang C H, Litman T, Bates S E and Schneider E (2000) The Product of the ABC Half-Transporter Gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) Is Expressed in the Plasma Membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271:42-46.

Rock DA, Foti R S and Pearson J T (2008) The Combination of Chemical and Antibody Inhibitors for Superior P450 3A Inhibition in Reaction Phenotyping Studies. *Drug Metab Dispos* 36:2410-2413.

Rodrigues AD (1999) Integrated Cytochrome P450 Reaction Phenotyping: Attempting to Bridge the Gap Between cDNA-Expressed Cytochromes P450 and Native Human Liver Microsomes. *Biochem Pharmacol* 57:465-480.

Rodrigues AD and Wong S L (1997) Application of Human Liver Microsomes in Metabolism-Based Drug-Drug Interactions: in Vitro-in Vivo Correlations and the Abbott Laboratories Experience. *Adv Pharmacol* 43:65-101.

Rost D, Mahner S, Sugiyama Y and Stremmel W (2002) Expression and Localization of the Multidrug Resistance-Associated Protein 3 in Rat Small and Large Intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G720-G726.

Ruckpaul, K. and Rein, H. Cytochrome P450, Structural and Functional Relationships. 1984.

Sababi M, Borga O and Hultkvist-Bengtsson U (2001) The Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Regional Absorption of Digoxin in Rats. *Eur J Pharm Sci* 14:21-27.

Sai K, Saito Y, Itoda M, Fukushima-Uesaka H, Nishimaki-Mogami T, Ozawa S, Maekawa K, Kurose K, Kaniwa N, Kawamoto M, Kamatani N, Shirao K, Hamaguchi T, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Yamada Y, Tamura T, Yoshida T, Minami H, Matsumura Y, Ohtsu A, Saijo N and Sawada J (2008) Genetic Variations and Haplotypes of ABCG2 Encoding MRP2 in a Japanese Population. *Drug Metab Pharmacokinet* 23:139-147.

Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Hirai M, Kasuga M and Okumura K (2001) MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics of Digoxin After Single Oral Administration in Healthy Japanese Subjects. *Pharm Res* 18:1400-1404.

Sanchez-Fructuoso AI, Maestro M L, Calvo N, Viudarreta M, Perez-Flores I, Veganzone S, De I O, V, Ortega D, Arroyo M and Barrientos A (2009) The Prevalence of Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) Gene Promoter Region Single-Nucleotide Polymorphisms T-275A and C-2152T and Its Influence on Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in Stable Renal Transplant Patients. *Transplant Proc* 41:2313-2316.

Sandanaraj E, Jada S R, Shu X, Lim R, Lee S C, Zhou Q, Zhou S, Goh B C and Chowbay B (2008) Influence of UGT1A9 Intronic I399C>T Polymorphism on SN-38 Glucuronidation in Asian Cancer Patients. *Pharmacogenomics J* 8:174-185.

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller V P, Zheng W, Raunio H, Crespi C L and Gonzalez F J (2000) CYP3A4 Allelic Variants With Amino Acid Substitutions in Exons 7 and 12: Evidence for an Allelic Variant With Altered Catalytic Activity. *Clin Pharmacol Ther* 67:48-56.

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger J D, Lathrop G M, Bell J I and Jewell D P (1996) Two Stage Genome-Wide Search in Inflammatory Bowel Disease Provides Evidence for Susceptibility Loci on Chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 14:199-202.

Sawyer MB, Innocenti F, Das S, Cheng C, Ramirez J, Pantle-Fisher F H, Wright C, Badner J, Pei D, Boyett J M, Cook E Jr and Ratain M J (2003) A Pharmacogenetic Study of Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase 2B7 in Patients Receiving Morphine. *Clin Pharmacol Ther* 73:566-574.

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger U M and Schwab M (2001) Frequency of C3435T Polymorphism of MDR1 Gene in African People. *Lancet* 358:383-384.

Schenkman JB, Frey I, Remmer H and Estabrook R W (1967) Sex Differences in Drug Metabolism by Rat Liver Microsomes. *Mol Pharmacol* 3:516-525.

Schmider J, Greenblatt D J, Harmatz J S and Shader R I (1996) Enzyme Kinetic Modelling As a Tool to Analyse the Behaviour of Cytochrome P450 Catalysed Reactions: Application to Amitriptyline N-Demethylation. *Br J Clin Pharmacol* 41:593-604.

Schuetz JD, Kauma S and Guzelian P S (1993) Identification of the Fetal Liver Cytochrome CYP3A7 in Human Endometrium and Placenta. *J Clin Invest* 92:1018-1024.

Schwardz, D. Rotational motion and membrane topology of the microsomal cytochrome P450 system

as analyzed by saturation transfer EPR. *Frontiers in Biotransformation* , 94-137. 1991.

Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Bjorquist A and Ungell A L (2006) Variability in MRNA Expression of ABC- and SLC-Transporters in Human Intestinal Cells: Comparison Between Human Segments and Caco-2 Cells. *Eur J Pharm Sci* 28:291-299.

Sharp PM, Tuohy T M and Mosurski K R (1986) Codon Usage in Yeast: Cluster Analysis Clearly Differentiates Highly and Lowly Expressed Genes. *Nucleic Acids Res* 14:5125-5143.

Shen DD, Kunze K L and Thummel K E (1997) Enzyme-Catalyzed Processes of First-Pass Hepatic and Intestinal Drug Extraction. *Adv Drug Deliv Rev* 27:99-127.

Shibata Y, Takahashi H and Ishii Y (2000) A Convenient in Vitro Screening Method for Predicting in Vivo Drug Metabolic Clearance Using Isolated Hepatocytes Suspended in Serum. *Drug Metab Dispos* 28:1518-1523.

Singh R, Srivastava A, Kapoor R, Sharma K and Mittal D (2009) Impact of CYP3A5 and CYP3A4 Gene Polymorphisms on Dose Requirement of Calcineurin Inhibitors, Cyclosporine and Tacrolimus, in Renal Allograft Recipients of North India. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380:169-177.

Smith DA (1991) Species Differences in Metabolism and Pharmacokinetics: Are We Close to an Understanding? *Drug Metab Rev* 23:355-373.

Smith G, Stubbins M J, Harries L W and Wolf C R (1998) Molecular Genetics of the Human Cytochrome P450 Monooxygenase Superfamily. *Xenobiotica* 28:1129-1165.

Smith ML, Vorce S P, Holler J M, Shimomura E, Magluilo J, Jacobs A J and Huestis M A (2007) Modern Instrumental Methods in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol* 31:237-29A.

Sookoian S, Castano G, Burgueno A, Gianotti T F and Pirola C J (2008) Association of the Multidrug-Resistance-Associated Protein Gene (ABCC2) Variants With Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *J Hepatol* 48:125-132.

Sparks R, Ulrich C M, Bigler J, Tworoger S S, Yasui Y, Rajan K B, Porter P, Stanczyk F Z, Ballard-Barbash R, Yuan X, Lin M G, McVarish L, Aiello E J and McTiernan A (2004) UDP-Glucuronosyltransferase and Sulfotransferase Polymorphisms, Sex Hormone Concentrations, and Tumor Receptor Status in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res* 6:R488-R498.

Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S, Ahluwalia R, Obach R, Principe P, Twelves C, Verweij J and McLeod H L (2004) Diflomotecan Pharmacokinetics in Relation to ABCG2 421C>A Genotype. *Clin Pharmacol Ther* 76:38-44.

Sparreboom A, Loos W J, Burger H, Sissung T M, Verweij J, Figg W D, Nooter K and Gelderblom H (2005) Effect of ABCG2 Genotype on the Oral Bioavailability of Topotecan. *Cancer Biol Ther* 4:650-658.

Sridar C, Goosen T C, Kent U M, Williams J A and Hollenberg P F (2004) Silybin Inactivates Cytochromes P450 3A4 and 2C9 and Inhibits Major Hepatic Glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 32:587-594.

Staud F and Pavek P (2005) Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 37:720-725.

Stier A (1976) Lipid Structure and Drug Metabolizing Enzymes. *Biochem Pharmacol* 25:109-113.

- Strassburg CP, Manns MP, and Tukey RH (1997) Differential down-regulation of the UDPglucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res* 57:2979–2985.
- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey R H and Manns M P (2000) Polymorphic Gene Regulation and Interindividual Variation of UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Human Small Intestine. *J Biol Chem* 275:36164-36171.
- Strassburg C P, Vogel A, Kneip S, Tukey R H and Manns M P (2002) Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 50:851-856.
- Stucker I, Lorient M A, N'koutchou G, Cenee S, Bodin L, Mulot C, Gelu-Simeon M, Pelletier L, Bronowicki J P, Degos F, Beaune P, Laurent-Puig P, Hemon D, Trinchet J C and Pelletier G (2007) UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A7 Genetic Polymorphisms in Hepatocellular Carcinoma: a Differential Impact According to Seropositivity of HBV or HCV Markers? *BMC Cancer* 7:214.
- Sun D, Chen G, Dellinger R W, Duncan K, Fang J L and Lazarus P (2006a) Characterization of Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen Glucuronidation by Human UGT1A4 Variants. *Breast Cancer Res* 8:R50.
- Sun H, Frassetto L and Benet L Z (2006b) Effects of Renal Failure on Drug Transport and Metabolism. *Pharmacol Ther* 109:1-11.
- Suzuki H and Sugiyama Y (2002) Single Nucleotide Polymorphisms in Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2/ABCC2): Its Impact on Drug Disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1311-1331.
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjoström B, Lundgren B and Artursson P (2001) Correlation of Gene Expression of Ten Drug Efflux Proteins of the ATP-Binding Cassette Transporter Family in Normal Human Jejunum and in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299:164-170.
- Takano M, Yumoto R and Murakami T (2006) Expression and Function of Efflux Drug Transporters in the Intestine. *Pharmacol Ther* 109:137-161.
- Tamaro I, Genazzani A, Canonico P and Grosa G (2009) Lack of in Vitro Interactions Using Human Liver Microsomes Between Rabeprazole and Anticancer Drugs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 34:19-26.
- Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz J D, Swoboda K J, Ptacek L J, Rosier M, Dean M and Allikmets R (2001) Two New Genes From the Human ATP-Binding Cassette Transporter Superfamily, ABCC11 and ABCC12, Tandemly Duplicated on Chromosome 16q12. *Gene* 273:89-96.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N and Otsubo K (2001) Expression of P-Glycoprotein in Human Placenta: Relation to Genetic Polymorphism of the Multidrug Resistance (MDR)-1 Gene. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1137-1143.

Tang K, Ngoi S M, Gwee P C, Chua J M, Lee E J, Chong S S and Lee C G (2002) Distinct Haplotype Profiles and Strong Linkage Disequilibrium at the MDR1 Multidrug Transporter Gene Locus in Three Ethnic Asian Populations. *Pharmacogenetics* 12:437-450.

Tang KS, Chiu H F, Chen H H, Eng H L, Tsai C J, Teng H C and Huang C S (2005) Link Between Colorectal Cancer and Polymorphisms in the Uridine-Diphosphoglucuronosyltransferase 1A7 and 1A1 Genes. *World J Gastroenterol* 11:3250-3254.

Testino SA, Jr. and Patonay G (2003) High-Throughput Inhibition Screening of Major Human Cytochrome P450 Enzymes Using an in Vitro Cocktail and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 30:1459-1467.

Thibaudeau J, Lepine J, Tojcic J, Duguay Y, Pelletier G, Plante M, Brisson J, Tetu B, Jacob S, Perusse L, Belanger A and Guillemette C (2006) Characterization of Common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 Variants With Different Capacities to Inactivate Mutagenic 4-Hydroxylated Metabolites of Estradiol and Estrone. *Cancer Res* 66:125-133.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman M M, Pastan I and Willingham M C (1987) Cellular Localization of the Multidrug-Resistance Gene Product P-Glycoprotein in Normal Human Tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7735-7738.

Toide K, Terauchi Y, Fujii T, Yamazaki H and Kamataki T (2004) Uridine Diphosphate Sugar-Selective Conjugation of an Aldose Reductase Inhibitor (AS-3201) by UDP-Glucuronosyltransferase 2B Subfamily in Human Liver Microsomes. *Biochem Pharmacol* 67:1269-1278.

Trottier J, Verreault M, Grepper S, Monte D, Belanger J, Kaeding J, Caron P, Inaba T T and Barbier O (2006) Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)1A3 Enzyme Conjugates Chenodeoxycholic Acid in the Liver. *Hepatology* 44:1158-1170.

Tukey RH, Strassburg C P and Mackenzie P I (2002) Pharmacogenomics of Human UDP-Glucuronosyltransferases and Irinotecan Toxicity. *Mol Pharmacol* 62:446-450.

Turgeon D, Carrier J S, Levesque E, Hum D W and Belanger A (2001) Relative Enzymatic Activity, Protein Stability, and Tissue Distribution of Human Steroid-Metabolizing UGT2B Subfamily Members. *Endocrinology* 142:778-787.

Turpeinen M, Uusitalo J, Jalonen J and Pelkonen O (2005) Multiple P450 Substrates in a Single Run: Rapid and Comprehensive in Vitro Interaction Assay. *Eur J Pharm Sci* 24:123-132.

Tuschl G, Lauer B and Mueller S O (2008) Primary Hepatocytes As a Model to Analyze Species-Specific Toxicity and Drug Metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:855-870.

Uchaipichat V, Mackenzie P I, Elliot D J and Miners J O (2006) Selectivity of Substrate (Trifluoperazine) and Inhibitor (Amitriptyline, Androsterone, Canrenoic Acid, Hecogenin, Phenylbutazone, Quinidine, Quinine, and Sulfinpyrazone) "Probes" for Human Udp-Glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 34:449-456.

Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y, Inui K. (2006) Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet.Genomics* 16:119-127.

van Agteren M, Armstrong V W, van Schaik R H, de Fijter H, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers D, Pisarski P, Le Meur Y, van der Werf M, Mamelok R D, Oellerich M and van Gelder T (2008) AcylMPAG Plasma Concentrations and Mycophenolic Acid-Related Side Effects in Patients Undergoing Renal Transplantation Are Not Related to the UGT2B7-840G>A Gene Polymorphism. *Ther Drug Monit* 30:439-444.

van de Kerkhof EG, de Graaf I A, Ungell A L and Groothuis G M (2008) Induction of Metabolism and Transport in Human Intestine: Validation of Precision-Cut Slices As a Tool to Study Induction of Drug Metabolism in Human Intestine in Vitro. *Drug Metab Dispos* 36:604-613.

van de Kerkhof EG, Ungell A L, Sjoberg A K, de Jager M H, Hilgendorf C, de Graaf I A and Groothuis G M (2006) Innovative Methods to Study Human Intestinal Drug Metabolism in Vitro: Precision-Cut Slices Compared With Ussing Chamber Preparations. *Drug Metab Dispos* 34:1893-1902.

van der Logt EM, Bergevoet S M, Roelofs H M, Van H Z, te Morsche R H, Wobbes T, de Kok J B, Nagengast F M and Peters W H (2004) Genetic Polymorphisms in UDP-Glucuronosyltransferases and Glutathione S-Transferases and Colorectal Cancer Risk. *Carcinogenesis* 25:2407-2415.

van der Logt EM, te Morsche R H, Groenendaal N, Roelofs H M, de M M, van der Stappen J W, Nagengast F M and Peters W H (2009) Genetic Polymorphism in UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 and Colorectal Cancer Risk. *Oncol Res* 17:323-329.

van Schaik RH, de Wildt S N, van Iperen N M, Uitterlinden A G, van den Anker J N and Lindemans J (2000) CYP3A4-V Polymorphism Detection by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Its Allelic Frequency Among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* 46:1834-1836.

van Schaik RH, van A M, de Fijter J W, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, Kuypers D, Le M Y, van der Werf M, Mamelok R and van G T (2009) UGT1A9 -275T>A/-2152C>T Polymorphisms Correlate With Low MPA Exposure and Acute Rejection in MMF/Tacrolimus-Treated Kidney Transplant Patients. *Clin Pharmacol Ther* 86:319-327.

Veldman RJ, Sietsma H, Klappe K, Hoekstra D and Kok J W (1999) Inhibition of P-Glycoprotein Activity and Chemosensitization of Multidrug-Resistant Ovarian Carcinoma 2780AD Cells by Hexanoylglucosylceramide. *Biochem Biophys Res Commun* 266:492-496.

Venkatakrishnan K and Obach R S (2007) Drug-Drug Interactions Via Mechanism-Based Cytochrome P450 Inactivation: Points to Consider for Risk Assessment From in Vitro Data and Clinical Pharmacologic Evaluation. *Curr Drug Metab* 8:449-462.

Venkatakrishnan K, von Moltke L L, Court MH, Harmatz J S, Crespi C L and Greenblatt D J (2000) Comparison Between Cytochrome P450 (CYP) Content and Relative Activity Approaches to Scaling From CDNA-Expressed CYPs to Human Liver Microsomes: Ratios of

Accessory Proteins As Sources of Discrepancies Between the Approaches. *Drug Metab Dispos* 28:1493-1504.

Verlaan M, Drenth J P, Truninger K, Koudova M, Schulz H U, Bargetzi M, Kunzli B, Friess H, Cerny M, Kage A, Landt O, te Morsche R H, Rosendahl J, Luck W, Nickel R, Halangk J, Becker M, Macek M, Jr., Jansen J B and Witt H (2005) Polymorphisms of UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 Are Not Involved in Pancreatic Diseases. *J Med Genet* 42:e62.

Vickers AE, Fischer V, Connors S, Fisher R L, Baldeck J P, Maurer G and Brendel K (1992) Cyclosporin A Metabolism in Human Liver, Kidney, and Intestine Slices. Comparison to Rat and Dog Slices and Human Cell Lines. *Drug Metab Dispos* 20:802-809.

Vignati LA, Bogni A, Grossi P and Monshouwer M (2004) A Human and Mouse Pregnane X Receptor Reporter Gene Assay in Combination With Cytotoxicity Measurements As a Tool to Evaluate Species-Specific CYP3A Induction. *Toxicology* 199:23-33.

Villeneuve L, Girard H, Fortier L C, Gagne J F and Guillemette C (2003) Novel Functional Polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 Glucuronidating Enzymes in Caucasian and African-American Subjects and Their Impact on the Metabolism of 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin and Flavopiridol Anticancer Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 307:117-128.

Vogel A, Kneip S, Barut A, Ehmer U, Tukey R H, Manns M P and Strassburg C P (2001) Genetic Link of Hepatocellular Carcinoma With Polymorphisms of the UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A7 Gene. *Gastroenterology* 121:1136-1144.

Von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M and Armstrong V W (2001) 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* 47:1048-1052.

von Moltke LL, Greenblatt D J, Schmider J, Wright C E, Harmatz J S and Shader R I (1998) In Vitro Approaches to Predicting Drug Interactions in Vivo. *Biochem Pharmacol* 55:113-122.

von Richter O, Greiner B, Fromm M F, Fraser R, Omari T, Barclay M L, Dent J, Somogyi A A and Eichelbaum M (2001) Determination of in Vivo Absorption, Metabolism, and Transport of Drugs by the Human Intestinal Wall and Liver With a Novel Perfusion Technique. *Clin Pharmacol Ther* 70:217-227.

Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Shiina S, Kawabe T, Ito Y M and Omata M (2004) UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 Genetic Polymorphisms Are Associated With Hepatocellular Carcinoma in Japanese Patients With Hepatitis C Virus Infection. *Clin Cancer Res* 10:2441-2446.

Watanabe Y, Nakajima M, Ohashi N, Kume T and Yokoi T (2003) Glucuronidation of Etoposide in Human Liver Microsomes Is Specifically Catalyzed by UDP-Glucuronosyltransferase 1A1. *Drug Metab Dispos* 31:589-595.

Waterman, M. R. Cytochrome P450: cellular distribution and structural considerations. *Current Opinion in Structural Biology* , 384-387. 1992.

- Wen X, Walle U K and Walle T (2005) 5,7-Dimethoxyflavone Downregulates CYP1A1 Expression and Benzo[a]Pyrene-Induced DNA Binding in Hep G2 Cells. *Carcinogenesis* 26:803-809.
- Wieboldt R, Campbell D A and Henion J (1998) Quantitative Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Determination of Orlistat in Plasma With a Quadrupole Ion Trap. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 708:121-129.
- Wiener D, Doerge D R, Fang J L, Upadhyaya P and Lazarus P (2004a) Characterization of N-Glucuronidation of the Lung Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL) in Human Liver: Importance of UDP-Glucuronosyltransferase 1A4. *Drug Metab Dispos* 32:72-79.
- Wiener D, Fang J L, Dossett N and Lazarus P (2004b) Correlation Between UDP-Glucuronosyltransferase Genotypes and 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Glucuronidation Phenotype in Human Liver Microsomes. *Cancer Res* 64:1190-1196.
- Wienkers LC and Heath T G (2005) Predicting in Vivo Drug Interactions From in Vitro Drug Discovery Data. *Nat Rev Drug Discov* 4:825-833.
- Wilkening S, Stahl F and Bader A (2003) Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line Hepg2 With Regard to Their Biotransformation Properties. *Drug Metab Dispos* 31:1035-1042.
- Wilkinson GR (1996) Cytochrome P4503A (CYP3A) Metabolism: Prediction of in Vivo Activity in Humans. *J Pharmacokinet Biopharm* 24:475-490.
- Williams JA, Hurst S I, Bauman J, Jones B C, Hyland R, Gibbs J P, Obach R S and Ball S E (2003) Reaction Phenotyping in Drug Discovery: Moving Forward With Confidence? *Curr Drug Metab* 4:527-534.
- Williams JA, Hyland R, Jones B C, Smith D A, Hurst S, Goosen T C, Peterkin V, Koup J R and Ball S E (2004) Drug-Drug Interactions for UDP-Glucuronosyltransferase Substrates: a Pharmacokinetic Explanation for Typically Observed Low Exposure (AUC_i/AUC) Ratios. *Drug Metab Dispos* 32:1201-1208.
- Williams JA, Martin F L, Muir G H, Hewer A, Grover P L and Phillips D H (2000) Metabolic Activation of Carcinogens and Expression of Various Cytochromes P450 in Human Prostate Tissue. *Carcinogenesis* 21:1683-1689.
- Witherow LE and Houston J B (1999) Sigmoidal Kinetics of CYP3A Substrates: an Approach for Scaling Dextromethorphan Metabolism in Hepatic Microsomes and Isolated Hepatocytes to Predict in Vivo Clearance in Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 290:58-65.
- Woillard J B, Rerolle J P, Picard N, Rousseau A, Drouet M, Munteanu E, Essig, Marquet P and Le Meur Y (2010) Risk of diarrhea in a long-term cohort of renal transplant patients given mycophenolate mofetil: the significant role of the *UGT1A8*2* variant allele. *Br J Clin Pharmacol* 69:675-683.
- Wolff T and Strecker M (1992) Endogenous and Exogenous Factors Modifying the Activity of Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes. *Exp Toxicol Pathol* 44:263-271.

Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D and Burchell B (1993) Drug and Xenobiotic Glucuronidation Catalysed by Cloned Human Liver UDP-Glucuronosyltransferases Stably Expressed in Tissue Culture Cell Lines. *Toxicology* 82:119-129.

Wu CY, Benet L Z, Hebert M F, Gupta S K, Rowland M, Gomez D Y and Wacher V J (1995) Differentiation of Absorption and First-Pass Gut and Hepatic Metabolism in Humans: Studies With Cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 58:492-497.

Wu WN, McKown L A, Yorgey K A and Pritchard J F (1999) In Vitro Metabolic Products of RWJ-34130, an Antiarrhythmic Agent, in Rat Liver Preparations. *J Pharm Biomed Anal* 20:687-695.

Wynalda MA, Wynalda K M, Amore B M, Fagerness P E and Wienkers L C (2003) Characterization of Bropiramine O-Glucuronidation in Human Liver Microsomes. *Xenobiotica* 33:999-1011.

Yamashita M and Fenn J B (1984) Negative Ion Production With the Electrospray Ion Source. *J Phys Chem* 88:4671-4675.

Yang J, Tucker G T and Rostami-Hodjegan A (2004) Cytochrome P450 3A Expression and Activity in the Human Small Intestine. *Clin Pharmacol Ther* 76:391.

Yang JW, Lee P H, Hutchinson I V, Pravica V, Shah T and Min D I (2009) Genetic Polymorphisms of MRP2 and UGT2B7 and Gastrointestinal Symptoms in Renal Transplant Recipients Taking Mycophenolic Acid. *Ther Drug Monit* 31:542-548.

Yates C R, Zhang W, Song P, Li S, Gaber A O, Kotb M, Honaker M R (2003) The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 43:555-564.

Yokooji T, Murakami T, Yumoto R, Nagai J and Takano M (2007) Site-Specific Bidirectional Efflux of 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathione, a Substrate of Multidrug Resistance-Associated Proteins, in Rat Intestine and Caco-2 Cells. *J Pharm Pharmacol* 59:513-520.

Zhang DW, Gu H M, Vasa M, Muredda M, Cole S P and Deeley R G (2003) Characterization of the Role of Polar Amino Acid Residues Within Predicted Transmembrane Helix 17 in Determining the Substrate Specificity of Multidrug Resistance Protein 3. *Biochemistry* 42:9989-10000.

Zhang H and Henion J (2001) Comparison Between Liquid Chromatography-Time of-Flight Mass Spectrometry and Selected Reaction Monitoring Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Quantitative Determination of Idoxifene in Human Plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757:151-159.

Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J and Kaminsky L S (1999) Characterization of Human Small Intestinal Cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27:804-809.

Zhang X, Collins K I and Greenberger L M (1995) Functional Evidence That Transmembrane 12 and the Loop Between Transmembrane 11 and 12 Form Part of the Drug-Binding Domain in P-Glycoprotein Encoded by MDR1. *J Biol Chem* 270:5441-5448.

Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, Boyle G, Law Y, Miller S, Lamba J and Burckart G J (2003) Tacrolimus Dosing in Pediatric Heart Transplant Patients Is Related to CYP3A5 and MDR1 Gene Polymorphisms. *Am J Transplant* 3:477-483.

Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith B P, Webber S, Ristich J, Dauber J, Iacono A, Grgurich W, Zaldonis D, McDade K, Zhang J and Burckart G J (2004) Tacrolimus Dosing in Adult Lung Transplant Patients Is Related to Cytochrome P4503A5 Gene Polymorphism. *J Clin Pharmacol* 44:135-140.

Zheng Z, Fang J L and Lazarus P (2002) Glucuronidation: an Important Mechanism for Detoxification of Benzo[a]Pyrene Metabolites in Aerodigestive Tract Tissues. *Drug Metab Dispos* 30:397-403.

Zhou S, Yung C S, Cher G B, Chan E, Duan W, Huang M and McLeod H L (2005) Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs. *Clin Pharmacokinet* 44:279-304.

Zientek M, Miller H, Smith D, Dunklee M B, Heinle L, Thurston A, Lee C, Hyland R, Fahmi O and Burdette D (2008) Development of an in Vitro Drug-Drug Interaction Assay to Simultaneously Monitor Five Cytochrome P450 Isoforms and Performance Assessment Using Drug Library Compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58:206-214.