

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE Bio-Santé**

**FACULTE de MEDECINE**

**INSERM UMR-S850**

**Année : 2010**

**Thèse N° [   ]**

**Thèse**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline : Pharmacologie**

**présentée et soutenue par**

**Olivier GENSBURGER**

**le 7 Juillet 2010**

**ETUDE PHARMACOGENETIQUE ET  
PHARMACODYNAMIQUE DE LA CIBLE DE L'ACIDE  
MYCOPHENOLIQUE : L'INOSINE MONOPHOSPHATE  
DESHYDROGENASE DE TYPE II**

**Thèse dirigée par : Pr. Pierre MARQUET et Dr. Nicolas PICARD**

**JURY :**

**Rapporteurs**

Dr. Delphine ALLORGE, Maître de Conférences-Praticien hospitalier (Université de Lille)

Dr. Chantal LEGUELLEC, Maître de Conférences-Praticien hospitalier (Université de Tours)

**Membres**

Pr. Laurent BECQUEMONT, Professeur-Praticien Hospitalier (Université de Paris-Sud)

Pr. André GUILLOUZO, Professeur-Praticien Hospitalier (Université de Rennes 2)

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

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

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier Pierre Marquet et Nicolas Picard pour m'avoir fait confiance en m'acceptant au sein de l'équipe, pour m'avoir encadré et soutenu durant ces 4 ans et pour avoir partagé avec moi leurs connaissances et leur savoir faire.

Je remercie également Chantal le Guellec et Delphine Allorge d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse et les remercie également pour leurs commentaires avisés m'ayant permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je remercie Monsieur le Professeur Laurent Becquemont et Monsieur le Professeur André Guillouzo d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, c'est un honneur que de vous compter parmi les membres de ce jury.

Je remercie également toute l'équipe de l'unité Inserm UMR-S850 de m'avoir accompagné et supporté durant ces 4 ans : Annick Rousseau et Louis Gastinel qui m'ont prodigué de précieux conseils de par leur grande expérience ; Jean-Hervé Comte et François-Ludovic Sauvage qui m'ont été d'une aide précieuse sur le plan technique ; Patricia Festa pour sa gentillesse et son soutien moral ; Aurélie Prémaud pour avoir été une des premières à m'intégrer au sein du groupe ; et tous mes collègues thésards qui m'ont amicalement épaulé : Nassim, Khaled, Koukeb, Dorra, Belkacem, Anne-laure, Gyasi, Virginie, Fabien, Laure et Jana. Une pensée particulière pour Jean-Baptiste qui m'a vraiment été d'un grand secours concernant les statistiques.

J'exprime également mes remerciements à Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre et à tous les membres de l'équipe du service pharmacologie et toxicologie du CHU pour leur participation à mes travaux de recherche, sans quoi la réalisation de l'ensemble de mes expériences n'aurait pas pu se faire.

Merci également à Marie Claire Baclet sans qui la partie concernant le séquençage n'aurait pas été possible.

Je tiens à saluer l'aimable collaboration de Yannick Le Meur ainsi que celle de l'équipe hollandaise de Ten Van Gelder et Ron Van Schaik, ayant permis la publication de mon deuxième article.

Je remercie également ma famille et mes amis limougeaux et grenoblois pour m'avoir épaulé et soutenu durant ces 4 ans et particulièrement durant cette étape finale que représente la rédaction. Je remercie notamment particulièrement ma mère pour sa relecture du manuscrit et pour avoir toujours été à mes côtés, mon père qui a enfin réussi à croire en moi et mon petit frère Robin pour sa présence au cours de ces derniers mois.

Enfin, une pensée pour Florian qui nous a quittés trop tôt.

## RESUME

L'Acide Mycophénolique (AMP) est un immunosuppresseur communément utilisé en transplantation. Sa cible est l'inosine monophosphate deshydrogénase IMPDH de type I et II, la seconde isoforme étant impliquée dans la voie de synthèse *de novo* des bases puriques de l'ADN indispensables à la prolifération lymphocytaire. Le but des présents travaux était (i) d'étudier l'effet inhibiteur des métabolites de l'AMP sur cette enzyme ; (ii) de rechercher et d'étudier l'effet des polymorphismes génétiques de l'IMPDH I et de l'IMPDH II sur la réponse au traitement ; (iii) d'optimiser les méthodes existantes de mesure de l'activité *ex-vivo* de l'enzyme.

L'activité inhibitrice potentielle des métabolites de l'AMP (AMP-acyl-glucuronide ; AMPaG et AMP-phényl-glucuronide ; AMPG) a été étudiée *in-vitro* à l'aide d'une enzyme recombinante purifiée (rhIMPDH II). Les résultats ont ensuite été extrapolés à la situation *in vivo* au moyen d'une étude d'accumulation intracellulaire des métabolites dans une lignée lymphoblastoïde humaine (JURKAT). Cette étude a montré que, bien que l'AMPaG possède une activité inhibitrice de l'IMPDH de même nature que celle de l'AMP, elle est probablement négligeable dans les conditions d'utilisation thérapeutique du médicament, du fait d'une affinité moindre que celle de l'AMP pour l'enzyme, de concentrations plasmatiques très inférieures en conditions thérapeutiques et d'une pénétration faible dans les lymphocytes.

Nous avons également séquencé le gène codant pour l'IMPDH II chez 80 patients transplantés rénaux pour tenter d'identifier de nouveaux polymorphismes, sans succès. En revanche, plusieurs polymorphismes décrits dans la littérature ou publiés dans la base NCBI n'ont pas été retrouvés. Nous avons également génotypé 5 SNP de l'*IMPDH I* et *II* décrits dans la littérature comme ayant un effet potentiel sur la pharmacodynamie de l'AMP afin de les intégrer à une analyse statistique multivariée, prenant également en compte les variables démographiques et pharmacocinétiques de plus de 450 patients transplantés. Cette analyse a montré que seul le SNP rs2278294 de l'IMPDH I était significativement associé à une diminution de l'incidence du rejet aigu, ainsi qu'à une fréquence accrue de leucopénies.

Le troisième objectif de cette thèse était de transposer et d'optimiser une méthode de dosage de l'activité de l'IMPDH basée sur la mesure par CHLP-UV de l'XMP produit *ex-vivo* par incubation d'un lysat de PBMC de patients en présence l'IMP et du NAD<sup>+</sup> en excès. 324

prélèvements provenant de cinétiques complètes de 27 patients transplantés rénaux ont été analysés. La méthode de standardisation des résultats utilisant la concentration protéique de l'échantillon s'est avérée inadaptée. Une méthode de standardisation alternative par la concentration d'ADN de l'échantillon a été mise au point, mais n'a également pas présenté de résultats satisfaisants. Une technique de standardisation par la concentration intralymphocytaire d'Adénosine Mono-phosphate publiée entre temps pourra être envisagée pour améliorer ces résultats.

Ces travaux ont permis de remettre en question l'éventuel intérêt du dosage de l'AMPaG dans le cadre du suivi thérapeutique de l'AMP. Ils ont également permis de confirmer qu'un polymorphisme de l'*IMPDH I* affecte la réponse au médicament, contrairement aux polymorphismes de l'*IMPDH II*. Pour analyser plus en détail les facteurs de variabilité de la réponse au traitement, la méthode de mesure de l'activité *IMPDH ex-vivo* reste à optimiser.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	- 17 -
<b><u>PARTIE 1 : .....</u></b>	<b><u>- 20 -</u></b>
<b><u>ETAT DE L'ART - REVUE DE LITTERATURE .....</u></b>	<b><u>- 20 -</u></b>
I. LE MYCOPHENOLATE EN TRANSPLANTATION:.....	- 21 -
A. Origine, indications, et formes commerciales : .....	- 21 -
B. Mécanisme d'action.....	- 22 -
C. La pharmacocinétique de l'AMP.....	- 25 -
1. Absorption et biodisponibilité orale .....	- 25 -
2. Distribution.....	- 26 -
3. Métabolisme .....	- 27 -
4. Elimination .....	- 28 -
D. Effets indésirables .....	- 29 -
1. Hématologiques : .....	- 29 -
2. Infectieux : .....	- 29 -
3. Gastro-intestinaux : .....	- 30 -
4. Le Rejet Aigu .....	- 31 -
E. Les traitements associés.....	- 32 -
1. Les inhibiteurs de la calcineurine : .....	- 32 -
2. Les inhibiteurs de la mTOR .....	- 33 -
3. Les corticostéroïdes .....	- 33 -
4. Le traitement d'induction .....	- 34 -

F. Les sources de variabilité PK/PD de l'AMP :	- 34 -
1. La fonction rénale :	- 34 -
2. Le régime alimentaire :	- 35 -
3. L'origine ethnique :	- 35 -
4. Le sexe :	- 36 -
5. L'albuminémie :	- 36 -
6. La durée post-transplantation chez les transplantés rénaux :	- 36 -
7. Les interactions avec les différents traitements associés:	- 37 -
G. Le suivi thérapeutique (STP).....	- 38 -
1. Généralités.....	- 38 -
2. Le STP du Mycophénolate :	- 39 -
a. Détermination de l'exposition à l'AMP :	- 39 -
b. Les arguments en faveur du STP :	- 40 -
c. Les études cliniques prospectives comparant le STP et l'administration à dose fixe du MMF:.....	- 42 -
d. Conclusions sur le STP du MMF .....	- 44 -
H. Méthodes de dosage :	- 45 -
1. Kits commerciaux :	- 45 -
2. Méthode CLHP/UV ou CLHP/MS et MS/MS :	- 45 -
II. L'INOSINE MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE (IMPDH) :.....	- 46 -
A. Généralités :	- 46 -
B. Génétique de l'IMPDH.....	- 51 -
1. Introduction :	- 51 -
2. Généralités sur les promoteurs et les facteurs de transcription:	- 51 -

3. Régulation transcriptionnelle : .....	- 52 -
a. De l'IMPDH I.....	- 53 -
b. De l'IMPDH II : .....	- 54 -
c. Implication de l'expression de l' <i>IMPDH I</i> et <i>II</i> chez les patients transplantés traités par MMF : .....	- 57 -
C. Les méthodes de dosage de l'activité IMPDH : .....	- 60 -
III. PHARMACOGENETIQUE DE L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE :.....	- 63 -
A. Protéines et polymorphismes génétiques d'intérêt.....	- 63 -
1. Les enzymes de glucurono-conjugaison (UGT).....	- 63 -
a. L'UGT1A9 .....	- 63 -
b. L'UGT1A8 .....	- 65 -
c. L'UGT2B7.....	- 66 -
2. Les protéines de transport transmembranaires .....	- 67 -
a. Les OATP .....	- 67 -
b. MRP2.....	- 68 -
3. L'IMPDH : .....	- 69 -
a. L'IMPDH I : .....	- 69 -
b. L'IMPDH II :.....	- 70 -
B. Conclusions et perspectives.....	- 76 -
<b><u>PARTIE 2 : .....</u></b>	<b>- 77 -</b>
<b><u>TRAVAUX PERSONNELS .....</u></b>	<b>- 77 -</b>
I. Etude approfondie de l'effet des métabolites du Mycophénolate sur l'activité IMPDH II (Article 1) .....	- 78 -



A. Introduction .....	- 78 -
B. Méthodes .....	- 78 -
C. Résumé des résultats obtenus .....	- 79 -
D. Conclusions et perspectives .....	- 79 -
II. Polymorphismes de l'IMPDH et conséquences sur la pharmacodynamie de l'AMP (Article 2).....	- 90 -
A. Contexte et objectifs.....	- 90 -
B. Méthodes .....	- 90 -
C. Résumé des résultats obtenus .....	- 91 -
D. Discussion, conclusion et perspectives .....	- 92 -
III. Mesure de l'activité IMPDH : .....	- 119 -
A. Introduction .....	- 119 -
B. Matériel et Méthodes .....	- 120 -
1. Echantillons sanguins, séparation et lyse des PBMC :.....	- 120 -
2. Incubation pour la réaction enzymatique : .....	- 120 -
3. Dosage du XMP par CHLP-UV :.....	- 121 -
4. Quantification de la concentration protéique : .....	- 121 -
5. Quantification de la concentration d'ADN à partir du lysat cellulaire : .....	- 121 -
6. Calcul de l'activité IMPDH standardisée .....	- 122 -
7. Comparaison statistique de la valeur d'activité IMPDH moyenne pré-transplantation et à T0h .....	- 122 -
C. Résultats .....	- 122 -
D. Discussion, conclusion .....	- 124 -
E. Perspectives .....	- 125 -

PARTIE 3 : .....- 131 -

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....- 131 -

IV. Discussion générale et perspectives : ..... - 132 -

V. Conclusion : ..... - 138 -

RÉFÉRENCES ..... - 139 -

## LISTE DES ABREVIATIONS

AMP : Acide MycoPhénolique

AMPaG : AMP-acyl-Glucuronide

AMPG : AMP-Phényl-Glucuronide

Amp/Ampc : Adénosine monophosphate/Amp cyclique

BPAR : Biopsy Proven Acute Rejection

CBS : Cystathionine Beta-Synthase

CI<sub>50</sub> : Concentration Inhibitrice 50%

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMV : CytoMégaloVirus

CS : CorticoStéroïdes

CsA : Cicolsporine A

dGTP/GDP : desoxyribo-GDP/GTP

GDP : Guanosine DiPhospahte

GMP : Guanosine MonoPhosphate

GTP : Guanosine TriPhosphate

CRE/CREB : Cyclic Amp Response Element/Binding

FAM : Fréquence de l'Allèle Minoritaire

HGPRT : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase

IATDMCT : International Association of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology

IL : Interleukine

IMP : Inosine MonoPhosphate

IMPDH : Inosine MonoPhosphate DésHydrogénase (rhIMPDH = recombinante human IMPDH)

ICN : Inhibiteur de la CalciNeurine

INF- $\gamma$  : Interféron - gamma

IS : ImmunoSuppresseur

$k_{cat}$  : Coefficient catalitique

$K_i$  : Constante d'inhibition

$K_m$  : Constante de Michaelis

KO : Knocked Out

MMF : Mycophénolate MoFétil

MRP<sub>2</sub> : Multidrug Resistance Protein 2

MS et MS/MS : Mass Spectrometry et tandem mass spectrometry

mTOR : mammalian Target Of Rapamicin

NFAT : Nuclear Factor of Activated lymphocytes T

NAD<sup>+</sup>/NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)

OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides

OR : Odd Ratio

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR/-SSCP : Polymerase Chain Reaction /- Single Strand Conformational Polymorphism

PD : Pharmacodynamique

PK : Pharmacocinétique

PNP : Purine Nucleoside Phosphatase

RAPB : Rejet Aigu Prouvé par Biopsie

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SP1 : Specificity protein 1

SSC : Surface Sous la Courbe

STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor - alpha

UGT : UDP-GlucuronosylTransferase

UTR : UnTranslated Region

XMP : Xanthosine MonoPhosphate



## LISTE DES FIGURES

- Figure I.1 : Formule chimique du Mycophénolate MoFétil (MMF, Cellcept®) du Mycophénolate sodique (Myfortic®) et de la forme active du médicament, l'Acide MycoPhénolique (AMP)..... - 21 -
- Figure I.2 : Représentation schématique des deux voies de synthèse des purines : Voie de sauvetage ou de sauvegarde et voie *de novo*. (PNP : Purine Nucleoside Phosphatase ; IMP : Inosine MonoPhosphate ; GMP/GDP/GTP : Guanosine MonoPhosphate/DiPhospahte/TriPhosphate ; dGTP/GDP : desoxyribo-GDP/GTP ; HGPRT : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase, IMPDH : Inosine MonoPhosphate DeHydrogenase.) (Source : Drugs Fut 2000, 25(8): 809)..... - 24 -
- Figure I.3 : Mode d'action de l'IMPDH et inhibition par l'AMP. (Source : JBC 2005, 280(12) : 11295) ..... - 25 -
- Figure I.4 : Représentation schématique du métabolisme du MMF. UGT: UDP-Glucuronosyl-Transférases; MRP2: Multidrug Resistance Protein; OATP: Organic Anion Transporting Polypeptides. (Source : Barraclough KA et al. Pharmacogenomics 2010) ..... - 28 -
- Figure I.5 : Mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine ..... - 32 -
- Figure II.1 : Résultat du blast de la séquence de l'IMPDH I (NP\_001136045.1) contre la base de données Refseq avec l'espèce homo sapiens comme paramètre d'exclusion sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>..... - 47 -
- Figure II.2 : Domaines conservés dans les 2 isoformes des protéines IMPDH I et II (disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) : Elles possèdent toutes les 2 deux domaines structuraux (un domaine de fixation TIM-phosphate et un domaine CBS (cystathionine beta-synthase) ) et une région fonctionnelle comprenant les sites actifs. .... - 50 -
- Figure II.3 : Structure quaternaire 3D de l'IMPDH II tétramérisée en présence de deux analogues de ses co-substrats : le SAD (Analogue dinucléotidique du NAD, en rouge (A)) et le 6-Cl-IMP (Analogue non oxydable de l'IMP, en vert (B)). ..... - 50 -
- Figure II.4 : représentation schématique du facteur de transcription SP1 contenant 3 motifs en doigts de zinc. .... - 54 -

Figure II.5 : Représentation schématique du promoteur du gène de l'IMPDH II : la flèche représente le site d'initiation de la transcription ; la boîte verte représente la TATA box, les boîtes rouges symbolisent les séquences cis-activatrices et la bleue la séquence cis-inhibitrice. Selon les articles de Zimmerman et col. (Zimmermann AG et col. 1995 ; Zimmermann AG et col. 1997). ..... - 57 -

Figure III.1 : Activité IMPDH moyenne obtenue à l'aide de cinétiques de 27 patients transplantés rénaux ou hépatiques. .... - 128 -

Figure III.2 : Activité IMPDH obtenue à partir de la cinétique complète d'un patient, standardisée par la concentration en protéines. .... - 128 -

Figure III.3 : Gamme étalon de : A. La concentration d'ADN ; B. Du nombre de cellules en fonction de l'absorption à 530 nm. .... - 129 -

Figure III.4 : Activité IMPDH obtenue à partir de la cinétique complète du patient 6.1 standardisée par la concentration en ADN. .... - 130 -

## **LISTE DES TABLEAUX**

III-1 Tableau récapitulatif de l'ensemble des SNP présentés dans ce chapitre ayant au moins un effet décrit dans la littérature : ..... - 74 -

Tableau IV-1 : Résumé des effets des SNP de l'*IMPDH I* et/ou *II* présentés dans la littérature :  
.....- 136 -



# INTRODUCTION

La notion de transplantation est loin d'être nouvelle à l'échelle de l'humanité. Les premières gravures représentant des scènes de greffes datent du 3<sup>ème</sup> siècle après JC. Il faudra néanmoins attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle, pour que, ce qui ne relevait alors que du fantasme collectif, soit réellement envisagé par le corps médical. C'est vers 1906 que les premières greffes d'organes ont lieu, elles se soldent toutes par des échecs et la mort du patient dans les quelques jours suivant l'intervention, le concept du « non-soi » et de l'immunité n'étant pas encore connu. Il faut attendre les travaux du russe Serguey Voronoy dans les années 30 pour voir apparaître la notion de rejet. Puis, il faut attendre les années 50 pour que celui-ci soit attribué à une réaction de défense immunitaire du patient. C'est alors que naît le concept de l'immunosuppression, consistant à affaiblir la barrière immunitaire du patient afin d'empêcher le développement d'une réaction immunologique contre le greffon.

Les premières techniques d'immunosuppression consistent en une irradiation importante de l'individu ; cependant les effets secondaires lourds de la radioactivité font qu'elle est rapidement abandonnée au profit d'une immunosuppression chimique. Les cortico-stéroïdes sont la première classe de médicaments immunosuppresseurs à être utilisés, la cortisone ayant montré empiriquement une amélioration des conditions de survie du greffon. La fin des années 50 voit apparaître le premier immunosuppresseur anti-prolifératif : l'azathioprine. Cette molécule a pour fonction d'inhiber la prolifération lymphocytaire et ainsi de diminuer la réponse immunitaire du patient traité. La découverte de la ciclosporine dans les années 70 fait faire un bon en avant à la transplantation, en augmentant la durée de vie du greffon, tout en diminuant les risques d'effets indésirables (notamment l'hémo-toxicité) observés avec l'azathioprine. Cette nouvelle molécule reste pendant plus de 20 ans la plus utilisée en matière d'immunosuppression. En 1995, le tacrolimus, un analogue fonctionnel de la ciclosporine est mis sur le marché. C'est en 1996 que le mycophénolate mofetil (MMF), prodrogue de l'acide mycophénolique, fait son apparition. Comme l'azathioprine il inhibe la division lymphocytaire grâce à son activité sur une enzyme : l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). Présentant moins d'effets indésirables que son ancêtre, le MMF supplante peu à peu l'azathioprine. Les années 2000 voient la naissance d'une nouvelle classe d'immunosuppresseurs, celle des inhibiteurs de la mTOR (mammalian target of rapamycin). On y trouve le sirolimus ainsi que l'évérolimus. A l'heure actuelle, le traitement

immunosuppresseur prescrit à un patient repose classiquement sur une association de ces différentes classes de médicaments.

Cependant, bien que d'énormes progrès aient été faits, la variabilité inter-individuelle de la réponse au traitement peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques ou de toxicité. C'est dans ce contexte que la notion de suivi thérapeutique pharmacologique (STP) voit le jour : cette discipline a pour principe d'adapter la dose de médicament administrée à un patient en prenant en compte ses caractéristiques individuelles pouvant influencer la réponse au traitement. Celui-ci a d'ailleurs été imposé par les recommandations officielles du résumé des caractéristiques du produit (RCP) pour la ciclosporine grâce à plusieurs études cliniques ayant démontré son efficacité. Concernant le MMF l'intérêt de son STP est encore débattu à l'heure actuelle, les conclusions des études cliniques comparatives entre dose fixe et STP pour le MMF étant contradictoires.

C'est encore dans les années 2000, avec l'essor et la démocratisation des techniques de génétique moderne, que la pharmacologie a connu l'avènement d'une nouvelle discipline : la pharmacogénétique. En effet, les techniques actuelles étant plus précises, plus rapides et permettant l'utilisation du haut débit, les cliniciens ont pu s'intéresser au profil génétique du patient, pouvant parfois expliquer une partie de la variabilité inter-individuelle de la réponse au traitement immunosuppresseur. C'est par exemple le cas des enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament, certains de leurs polymorphismes entraînant une élimination plus rapide ou au contraire plus lente de la molécule active. Ceci entraîne naturellement une variation de l'exposition du patient au traitement et de ce fait, une variabilité inter-individuelle de la réponse à celui-ci. Il est également logique d'imaginer des observations similaires pour des variations du gène codant pour la cible du médicament, celles-ci pouvant induire une modification de l'action exercée par le traitement.

C'est dans l'optique d'une meilleure connaissance de la cible de l'AMP que nos travaux de thèse se sont intéressés à l'étude approfondie de l'IMPDH. Ils ont été décomposés en trois parties.

La première concerne l'étude de l'effet des métabolites de l'AMP sur l'IMPDH II. En effet, les résultats des études divergent à ce sujet, en particulier à propos de l'activité inhibitrice potentielle de l'AMPaG. Nous avons consacré toute une partie de nos recherches à clarifier ce point afin de tenter de conclure sur l'importance que pourrait avoir le dosage des métabolites de l'AMP dans le cadre du STP du MMF.

La deuxième partie de ces travaux de thèse porte sur l'étude pharmacogénétique de l'ensemble des mutations de l'IMPDH I et II ayant un effet potentiel sur la réponse au traitement par l'AMP. En effet, là aussi les études présentent des conclusions divergeantes au sujet de l'implication des variations génétiques des deux isoformes de l'IMPDH dans la réponse au traitement par MMF. C'est pourquoi, après avoir tenté d'identifier de nouveaux SNP via le séquençage de l'*IMPDH II* chez 80 patients, nous avons génotypé l'ensemble des SNP décrits comme ayant une influence sur la réponse au traitement sur une cohorte de plus de 400 patients. Puis avons intégré ces génotypes dans une analyse multivariée afin de connaître plus précisément leurs implications dans la survenue de RAPB et d'effets indésirables chez les patients transplantés traités par MMF.

Lors d'une troisième partie nous nous sommes intéressés à la mise en place et l'optimisation d'une technique de mesure de l'activité de l'IMPDH. Cette partie a pour objectif, à terme, de pouvoir utiliser cette variable comme marqueur de l'efficacité du traitement par MMF.

L'objectif à long terme de l'ensemble de ces travaux est une meilleure connaissance de la cible du médicament afin de savoir dans quelle mesure elle est à prendre en considération lors de la pratique du STP de l'AMP d'un point de vue pharmacodynamique et pharmacogénétique.

**PARTIE 1 :**

**ETAT DE L'ART - REVUE DE LITTERATURE**

# I. LE MYCOPHENOLATE EN TRANSPLANTATION:

## A. Origine, indications, et formes commerciales :

L'acide MycoPhénolique (AMP) (Figure I.1) est le produit de fermentation de plusieurs souches de *Penicillium* (Bullingham RE et col., 1998). Il a comme propriété de diminuer les défenses immunitaires du patient, propriété appelée immunosuppressive, permettant une meilleure tolérance au « non-soi ». Il est donc utilisé pour prévenir les rejets de greffes chez les patients transplantés. Il existe deux formes médicamenteuses sur le marché. La plus ancienne est le Mycophénolate MoFétil (MMF) commercialisé par Roche™ sous le nom de Cellcept®. Il est administré sous forme d'une pro-drogue inactive (l'AMP morpholinoéthyl-ester). Rapidement clivé en AMP actif par les estérases intestinales il est ensuite absorbé au niveau du tracus digestif. Une autre forme délivrée au moyen d'un comprimé gastro-résistant afin de limiter les effets indésirables gastriques du MMF a fait son apparition plus tardivement. C'est sous la forme de mycophénolate sodique (Myfortic®) que l'AMP est administré. Son enrobage gastro-résistant permet une absorption plus tardive dans le tube digestif. Il est libéré directement sous sa forme active au niveau de l'intestin grêle.

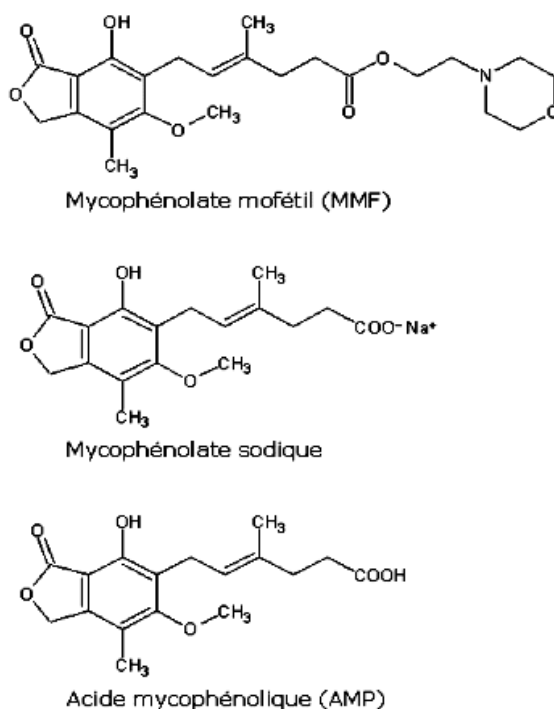


Figure I.1 : Formule chimique du Mycophénolate MoFétile (MMF, Cellcept®) du Mycophénolate sodique (Myfortic®) et de la forme active du médicament, l'Acide MycoPhénolique (AMP)

L'AMP est principalement utilisé en transplantation rénale, mais également en transplantation hépatique, pulmonaire et cardiaque. Il est la plupart du temps associé à au moins une autre classe d'immunosuppresseur : soit celle des inhibiteurs de la calcineurine (ICN) tels que la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus, soit celle des inhibiteurs de la mTOR comme l'everolimus et le sirolimus. De plus, lors des premiers jours et mois suivant la greffe, le traitement immunosuppresseur est généralement renforcé par un traitement d'induction et un traitement par corticostéroïdes. Les traitements associés seront détaillés dans un prochain paragraphe.

## **B. Mécanisme d'action**

L'action immunosuppressive de l'AMP est essentiellement attribuée à sa capacité à inhiber l'Inosine MonoPhosphate DésHydrogénase (IMPDH) (Allison AC et Eugui EM, 2000; Nowak I et Shaw LM, 1997; Ransom JT, 1995). L'IMPDH permet l'oxydation de l'Inosine MonoPhosphate (IMP) en Xanthosine MonoPhosphate (XMP) à l'aide d'un cofacteur : le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) (Hager PW et col., 1995). Nous détaillerons cette enzyme et son mode d'action dans un prochain chapitre. Cette réaction est l'étape limitante de la voie de synthèse *de novo* des bases puriques (Figure I.2) (Gu JJ et col., 2000; Wang W et Hedstrom L, 1997) indispensables à la réplication de l'ADN, mais également nécessaire à certaines voies de signalisation intracellulaires, impliquant les protéines G par exemple (Traynor J, 2010). Une cellule normale possède deux moyens de renouveler son pool de bases puriques, la voie *de novo* que nous venons d'évoquer et la voie de sauvegarde ou de sauvetage permettant le recyclage des purines non utilisées (Figure I.2) (Allison AC et Eugui EM, 1993; Natsumeda Y et col., 1984). Les lymphocytes matures sont dépourvus de cette dernière, ils sont donc dépendants de la voie *de novo* et de ce fait de l'activité de l'IMPDH (Allison AC et Eugui EM, 1993; Gu JJ et col., 2000). De plus, il existe 2 isoformes de l'IMPDH, l'isoforme I est ubiquitaire et impliquée dans diverses voies de signalisation tandis que l'isoforme II est préférentiellement surexprimée dans les cellules peu différenciées avec une forte activité mitogène, comme les cellules lymphoïdes primaires (Nagai M et col., 1991). L'AMP inhibe l'IMPDH de manière compétitive et réversible et présente une affinité plus élevée pour l'isoforme II : il se fixe sur le complexe enzyme-produit lorsque celui-ci est formé empêchant ainsi la libération de l'XMP (Figure I.3). L'effet de l'AMP est dirigé spécifiquement contre le système immunitaire du fait de la plus grande

affinité de ce médicament pour l'IMPDH II et de l'expression préférentielle de cette dernière dans les lymphocytes. Il a donc pour effet de priver les lymphocytes de bases puriques indispensables à la réplication de leur ADN, ainsi il limite leur prolifération. De plus, à cette inhibition de la prolifération viennent s'ajouter d'autres effets moins bien décrits tels que l'inhibition de la production d'anticorps, de la glycosylation et de l'expression de certaines molécules d'adhésion, et également de la prolifération des cellules musculaires lisses (Allison AC et Eugui EM, 2000; Gummert JF et col., 2000; Ransom JT, 1995; Sollinger HW, 2004).

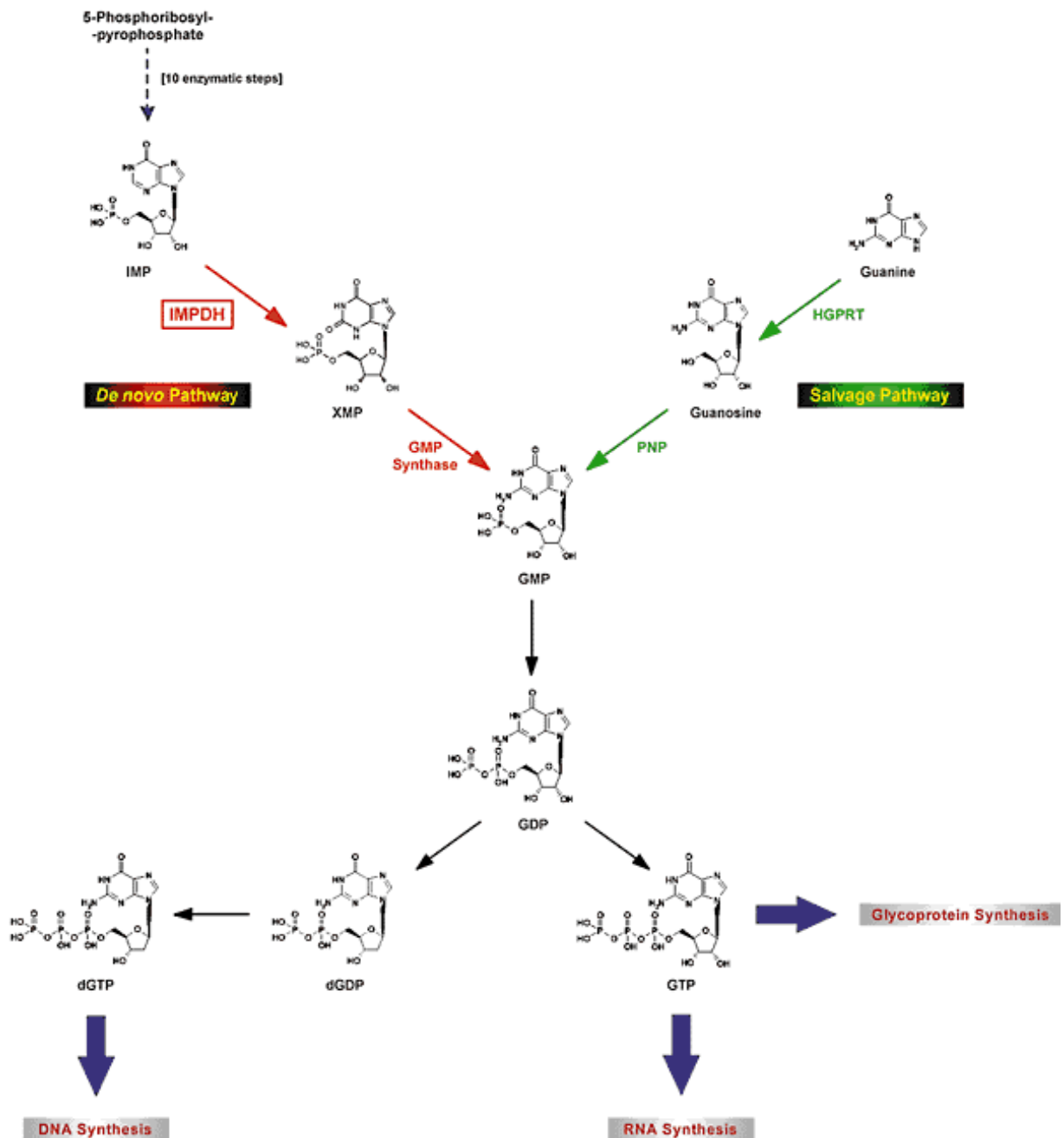


Figure I.2 : Représentation schématique des deux voies de synthèse des purines : Voie de sauvegarde ou de sauvegarde et voie *de novo*. (PNP : Purine Nucleoside Phosphatase ; IMP : Inosine MonoPhosphate ; GMP/GDP/GTP : Guanosine MonoPhosphate/DiPhosphate/TriPhosphate ; dGTP/GDP : desoxyribo-GDP/GTP ; HGPRT : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase, IMPDH : Inosine MonoPhosphate DeHydrogenase.) (Source : Drugs Fut 2000, 25(8): 809)



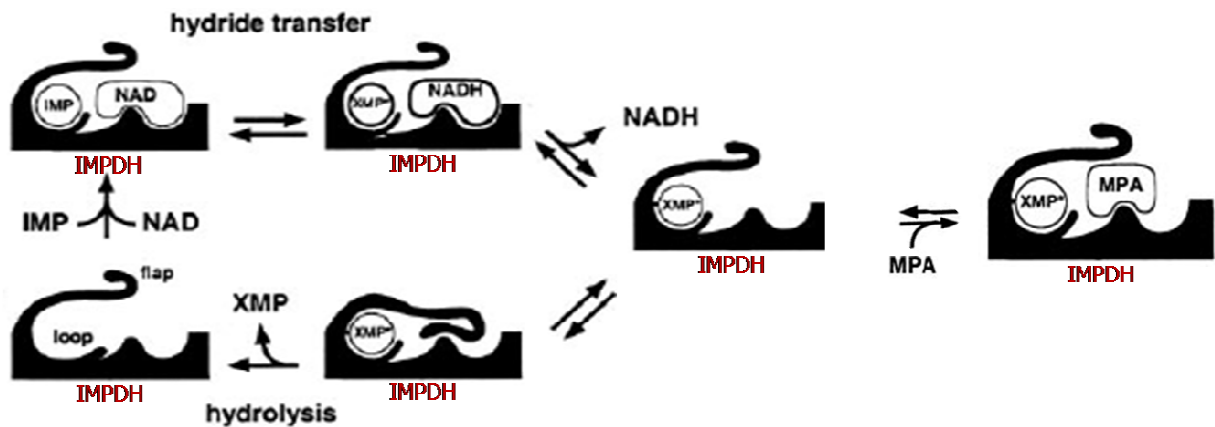


Figure I.3 : Mode d'action de l'IMPDH et inhibition par l'AMP. (Source : JBC 2005, 280(12) : 11295)

L'administration du MMF en transplantation rénale se fait par voie orale dans les 72 heures suivant la greffe. La posologie recommandée était à l'origine de 2 à 3 g/jour en 2 prises. Cependant, après trois grandes études cliniques multicentriques internationales (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger HW, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996) visant à comparer des doses fixes de 2g/jour et de 3g/jour, il a été démontré que la dose de 3g/jour augmentait significativement les effets indésirables sans réduire l'incidence de rejet aigu. La posologie de 2g/jour est celle recommandée car présentant le meilleur rapport bénéfice/risque.

En transplantation hépatique, le MMF est administré par voie intraveineuse durant les quatre premiers jours post-greffe puis par voie orale. La dose recommandée est de 1,5 g deux fois par jour.

Concernant la transplantation cardiaque, la dose recommandée est de 3 g/jour à raison de deux prises de 1,5 g. Le traitement doit être initié durant les 5 jours suivant l'opération.

## C. La pharmacocinétique de l'AMP

### 1. Absorption et biodisponibilité orale

L'absorption de l'acide mycophénolique est très rapide et débute juste après l'administration orale. Le MMF est déstérifié au niveau du tube digestif proximal grâce aux estérases gastriques et à celles présentes dans l'intestin grêle puis, plus tardivement, par les estérases sanguines et hépatiques (Lee WA et col., 1990). Deux études différentes, l'une chez des volontaires sains (Bullingham R et col., 1996) l'autre chez des patients transplantés cardiaques (Armstrong VW et col., 2005), ont montré que le MMF est indétectable dans le

plasma quelle que soit la période après l'administration orale du médicament. Lorsque le MMF est administré par injection intraveineuse, il n'est plus détectable dans le plasma après 10 à 30 minutes (Armstrong VW et col., 2001; Armstrong VW et col., 2005; Bullingham R et col., 1996). En ce qui concerne la forme sodique de l'AMP une étude *in vitro* a montré qu'à pH = 5,0, correspondant au pH de l'estomac, la forme sodique reste stable mais dès son arrivée dans l'intestin grêle sa solubilité devient très importante (Arns W et col., 2005). L'absorption de l'AMP (sous la forme sodique ou MMF) est estimée à plus de 90% par les deux fabricants respectifs (*Myfortic prescribing information* et *CellCept complete product information* disponible en ligne : [www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/myfortic.pdf](http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/myfortic.pdf) et <http://www.gene.com/gene/products/information/cellcept/pdf/pi.pdf> respectivement).

Concernant la biodisponibilité orale de l'AMP, l'étude de Bullingham R et col. l'a évaluée à 94% en se basant sur une comparaison entre la  $SSC_{0-24h}$  d'AMP administrée par injection intraveineuse et une administration orale chez 12 volontaires sains. Une biodisponibilité similaire (95%) a été observée chez 9 transplantés cardiaques par l'équipe d'Armstrong et col. en utilisant la même méthode de comparaison mais en se basant sur une  $SSC_{0-12h}$  d'AMP. Une biodisponibilité plus faible ( $\approx 80\%$ ) a été rapportée par deux études différentes chez des patients transplantés rénaux (Braun KP et col., 2002; Pescovitz MD et col., 2000).

## 2. Distribution

Il a été démontré que plus de 99% de l'AMP présent dans le sang total se trouve dans la fraction plasmatique ce qui indique qu'il convient de quantifier l'AMP dans le plasma ou le sérum (Langman LJ et col., 1994; Nowak I et Shaw LM, 1995). Chez les patients ayant une fonction rénale et hépatique normale, plusieurs études ont montré que 97 à 99% de l'AMP plasmatique était lié à l'albumine (Bullingham RE et col., 1996; Ensom MH et col., 2002; Nowak I et Shaw LM, 1995; Weber LT et col., 1998). De plus, une étude de Nowak I et col. a démontré que cette liaison était indépendante de la concentration du médicament (Nowak I et Shaw LM, 1995). La même équipe a aussi démontré *in vitro* que seule la fraction libre d'AMP exerce son action sur l'IMPDH (Nowak I et Shaw LM, 1997).

Cependant la fraction liée à l'albumine peut diminuer sous certaines conditions. Premièrement, le principal métabolite glucuroconjugué de l'AMP (l'AMP-phenylglucuronide ; AMPG) possède également une forte affinité pour l'albumine (Bullingham RE et col., 1998) et peut donc entrer en compétition avec l'AMP. Deuxièmement la fonction rénale, hépatique et l'albuminémie du patient sont autant de facteurs qui peuvent

modifier la fraction liée d'AMP et d'AMPG (Atcheson BA et col., 2004; Johnson AG et col., 1999; Kaplan B et col., 1999; Shaw LM et col., 1998; van Hest RM et col., 2005; van Hest RM et col., 2006; Weber LT et col., 1998).

L'équipe de Nowak I et col. (Nowak I et Shaw LM, 1995) a étudié *in vitro* l'impact de la co-médication sur la fraction libre d'AMP mais n'a pas mis en évidence de variation en présence de concentration thérapeutique de warfarine, de digoxine, de phénytoïne, de ciclosporine, de tacrolimus ou de prednisone. Néanmoins, une augmentation de la fraction libre d'AMP d'un facteur de 6 à 8 fut observée en présence de concentrations croissantes de salicylate de sodium. Une autre étude *ex vivo* en transplantation rénale n'a pas mis en évidence de variation de la fraction libre d'AMP entre les patients co-traités au tacrolimus et ceux co-traités à la ciclosporine (Atcheson BA et col., 2005).

Des études de pharmacocinétique de population ont rapporté des volumes de distribution apparent dans le compartiment central de 36L chez les patients transplantés stables (Le Guellec C et col., 2004) et de 98L chez les patients greffés *de novo* (Shum B et col., 2003).

### 3. Métabolisme

L'AMP est principalement métabolisé par les Uridine Diphosphate glucuronosyltransferases (UGT) au niveau gastro-intestinal, hépatique et rénal. Le métabolite majeur de l'AMP est un glucuronoconjugué inactif l'AMPG. Ce métabolite majoritaire ne possède pas d'activité inhibitrice de l'IMPDH II (Bullingham RE et col., 1998; Shipkova M et col., 1999). Il est principalement produit par l'UGT1A9, mais aussi, dans une moindre mesure, par l'UGT1A8 (Bowalgaha K et Miners JO, 2001; Picard N et col., 2005). Ce métabolite participe à la pharmacocinétique de l'AMP, en étant excrété par la bile puis réabsorbé sous forme d'AMP au niveau intestinal, l'AMPG étant hydrolysé par la flore intestinale puis réabsorbé sous forme d'AMP actif. Ce phénomène de cycle entéro-hépatique explique en partie l'apparition, chez certains patients, d'un deuxième pic plasmatique 6 à 12H après ingestion du médicament (Bullingham R et col., 1996). Ce phénomène contribuerait à environ 40% de l'exposition à l'AMP (entre 10 et 60%) (Bullingham RE et col., 1996). La figure I.4 nous présente un schéma du métabolisme principal du MMF et des enzymes impliquées.

Il existe d'autres métabolites minoritaires de phase II comme l'AMP-phenyl-glucoside également inactif (Schütz E et col., 1999) ou encore l'AMP- Acyl-glucuronide- (AMPaG) (Schütz E et col., 1999; Shipkova M et col., 1999). Ce dernier est produit par

l'UGT2B7 et possède une activité inhibitrice de l'IMPDH II cependant son mécanisme d'inhibition (Armstrong VW et col., 2004) ainsi que son implication potentielle dans l'efficacité du traitement au MMF sont encore peu clairs (Shipkova M et col., 2001). Nous avons étudié *in vitro* l'influence de ce métabolite sur l'activité catalytique de l'IMPDH II. Cette étude a fait l'objet d'un article que nous présenterons dans la partie travaux personnels.

Il existe également un métabolite de phase I produit par les cytochromes P450 3A (Shipkova M et col., 1999). Il a été identifié comme étant le 6-O-desmethyl-AMP (DM-AMP) et il est également glucuroconjugué (Picard N et col., 2004).

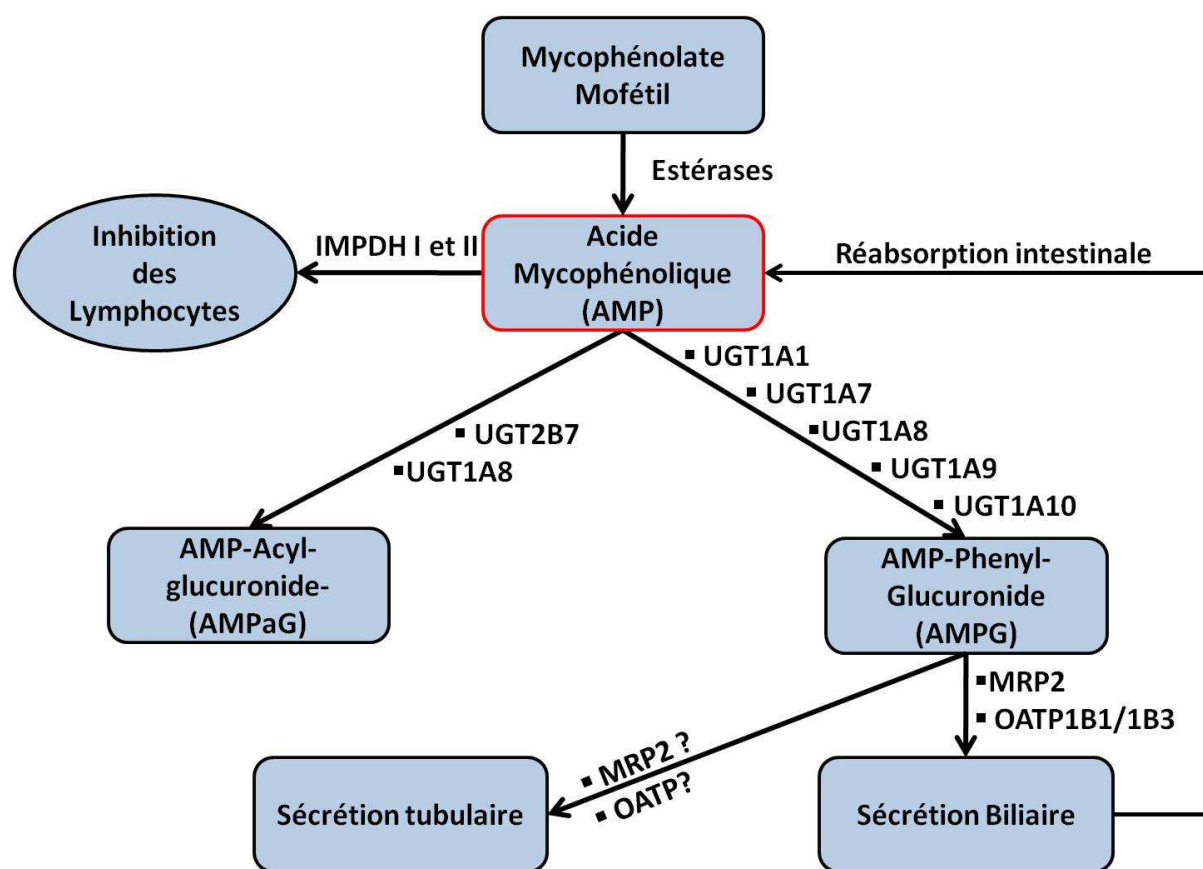


Figure I.4 : Représentation schématique du métabolisme du MMF. UGT: UDP-Glucuronosyl-Transférases; MRP2: Multidrug Resistance Protein; OATP: Organic Anion Transporting Polypeptides. (Source : Barraclough KA et al. Pharmacogenomics 2010)

#### 4. Elimination

Une étude à l'aide d'AMP radiomarqué a montré que 93% de l'AMP ingéré était éliminé par voie urinaire et 6% par voie fécale (Bullingham RE et col., 1998). 87% de la fraction urinaire se retrouve sous forme d'AMPG. On note également un faible pourcentage d'AMP et d'AMPaG. La sécrétion tubulaire d'AMPG et d'AMPaG semble impliquer la

protéine MRP2. Cette protéine serait également responsable de l'excrétion biliaire d'AMPG (Hesselink DA et van Gelder T., 2005; Kobayashi M et col., 2004; Kuypers DR et col., 2005).

## **D. Effets indésirables**

Il existe trois grandes études cliniques parues dans les années 90 visant à comparer les traitements utilisés à l'époque avec le MMF (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger HW, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996). Celles-ci avaient pour objet de comparer le rapport efficacité de prévention du rejet/effets indésirables du MMF à celui de l'azathiopine (qui était à l'époque le traitement immunosuppresseur le plus utilisé) ou à celui d'un placebo. Ces études étaient randomisées, contrôlées et en double aveugle. Les effets indésirables imputables au MMF étaient d'ordre hématologique, infectieux et digestif. La fonction thérapeutique du MMF étant d'éviter les épisodes de rejets de greffe, nous présenterons également ici une définition du rejet aigu prouvé par biopsie (RAPB).

### **1. Hématologiques :**

Un des effets secondaires les plus fréquents du mycophénolate mofetil est la leucopénie, dans certains cas associée à une thrombocytopénie et à une anémie. Il a été démontré dans plusieurs études que les patients souffrant de troubles hématologiques avaient une  $SSC_{0-12h}$  ou une concentration résiduelle ou encore une fraction libre d'AMP significativement plus élevée que ceux n'ayant pas présenté ces effets indésirables (Atcheson BA et col., 2005; Kuypers DR et col., 2004; Lu YP et col., 2004; Mourad M et col., 2001; Mudge DW et col., 2004; Tredger JM et col., 2004). De plus, les 3 études comparant le MMF à l'azathiopine (immunosuppresseur appartenant à la même classe que le MMF et communément utilisé avant la mise sur le marché de ce dernier) ou à l'utilisation d'un placebo ont également rapporté des troubles hématologiques imputables à l'utilisation du MMF, en particulier à la dose de 3g/jour (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger HW, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996).

### **2. Infectieux :**

L'effet immunosuppresseur du MMF est associé à l'apparition de diverses infections opportunistes. Le risque infectieux concerne notamment l'infection par le cytomégalovirus

(CMV) et des infections virales, fongiques ou bactériennes. L'étude de l'équipe de Tredger JM et col. (Tredger JM et col., 2004) fait état d'une concentration résiduelle d'AMP plus élevée chez les patients présentant des infections virales, fongiques ou bactériennes. Cette observation a également été faite par plusieurs autres équipes comme celle de Smak Gregoor PJ et col. (Smak Gregoor PJ et col., 1998) ou encore Lu YP et col. (Lu YP et col., 2004). Ces études rapportent des infections associées à une concentration résiduelle d'AMP plus élevée que chez les patients non touchés par ce type d'effets secondaires. Une fraction libre d'AMP élevée a également été associée à l'apparition d'infections opportunistes (Atcheson BA et col., 2005; Mourad M et col., 2001; Weber LT et col., 2002). Les trois grandes études prospectives citées en introduction de ce paragraphe, rapportent également des troubles infectieux liés à l'utilisation du MMF, notamment à la dose de 3g/jour. L'étude Européenne fait état d'une augmentation de l'apparition d'infections invasives à CMV d'un facteur 2 chez les patients recevant une dose de 3 g/jour en comparaison avec les deux autres groupes de patients étudiés (traités respectivement par une dose journalière de MMF de 2g/jour ou par placebo). (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995). L'équipe de Meulen et col. a également mis en évidence une augmentation du développement d'infections opportunistes à CMV et au virus de l'herpes chez les patients transplantés rénaux traités par MMF par rapport aux patients sous placebo. Chaque groupe de patients recevait de la ciclosporine et de la prednisone en cotraitement (Meulen CG et col., 2000). Les études américaines et tricontinentales ont également rapporté des résultats similaires concernant l'augmentation des infections opportunistes chez les patients traités par MMF (Sollinger HW, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996).

### **3. Gastro-intestinaux :**

Le MMF est à l'origine de plusieurs troubles digestifs. Les plus fréquemment retrouvés sont : des diarrhées, nausées, vomissements, douleurs abdominales, constipation et dyspepsie. Cependant ces effets indésirables ont des critères plus subjectifs et sont dépendants de l'appréciation du clinicien et du patient traité. De plus, leur apparition a souvent une cause multifactorielle liée à l'environnement, à l'alimentation et aux prédispositions du patient, c'est pourquoi il est difficile de les relier directement à l'exposition et à la dose de MMF ingérée. Néanmoins, l'apparition de diarrhées et de vomissements était plus fréquente chez les patients traités par du MMF que chez les patients sous azathioprine ou sous placebo dans les trois grandes études prospectives (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger HW, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation

Study Group, 1996). De plus, quelques études ont tenté d'établir une relation dose de MMF/trouble gastrique. Par exemple le rapport d'un cas isolé Mudge DW et col. (Mudge DW et col., 2004) montre l'apparition de troubles digestifs sévères chez un patient ayant une fraction libre d'AMP très supérieure à la moyenne. L'article de revue de Behrend M et col. (Behrend M, 2001) qui s'est intéressée spécifiquement aux troubles digestifs associés à l'AMP émet l'hypothèse d'une relation entre la concentration locale d'AMP et les troubles gastro-intestinaux. Il se pourrait donc que celle-ci ait un effet au niveau de l'épithélium digestif, indépendante de la concentration systémique, qui provoquerait l'apparition d'irritations localisées. Une étude récente conduite au laboratoire confirme en partie ces résultats puisqu'elle fait état d'une diminution significative de la survenue d'épisodes de diarrhée chez les patients ayant une exposition locale aux métabolites de l'AMP amoindrie via une diminution de leur excrétion biliaire chez les patients sous CsA ou une diminution de leur production intestinale chez les individus porteurs du SNP UGT1A8\*2 (Woillard JB et col., 2010). Il pourrait donc s'agir d'une toxicité locale des métabolites de l'AMP et non de l'AMP lui-même.

#### **4. Le Rejet Aigu**

Le rejet est un désordre inflammatoire systémique, dont plusieurs symptômes sont dus à la libération des cytokines. L'expression de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'INF- $\gamma$  augmente le développement infiltrat interstitiel typique. Quatre-vingt-dix pour cent des rejets aigus sont à médiation cellulaire et peuvent être traités facilement, en revanche, les rejets aigus à médiation humorale (rejets où les anticorps anti-greffon sont prédominants) sont beaucoup plus difficiles à traiter. Le patient, lors d'un épisode de rejet, développe une réaction immunitaire contre le greffon. S'il n'est pas traité à temps, le rejet aigu peut entraîner un rejet chronique voir même un épisode de perte du greffon. Il existe donc une méthode pour détecter ces épisodes de rejet aigu à l'aide d'une biopsie prélevée sur le greffon, laquelle est soumise à une étude hysto-cytologique utilisant la classification de banff (Racusen LC et col., 1999). Lorsque ce test s'avère positif, on parle de rejet aigu prouvé par biopsie (RAPB).

## E. Les traitements associés

### 1. Les inhibiteurs de la calcineurine :

La calcineurine (aussi appelée phosphatase 2B) est une enzyme qui, par le biais d'une déphosphorylation, active la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated lymphocytes T). Celui-ci initie la transcription des gènes de plusieurs cytokines impliquées dans l'activation des lymphocytes ; il déclenche notamment la production d'IL-2 (interleukine de type 2) qui joue un rôle clé dans l'activation des lymphocytes. Les inhibiteurs de la calcineurine exercent donc leur activité immunosuppressive par le biais de cette phosphatase. La rendant inactive, ils bloquent la déphosphorylation de NFAT et ainsi inhibent la cascade de signalisation nécessaire à l'activation des lymphocytes (Figure I.4) (Clipstone NA et Crabtree GR, 1992).

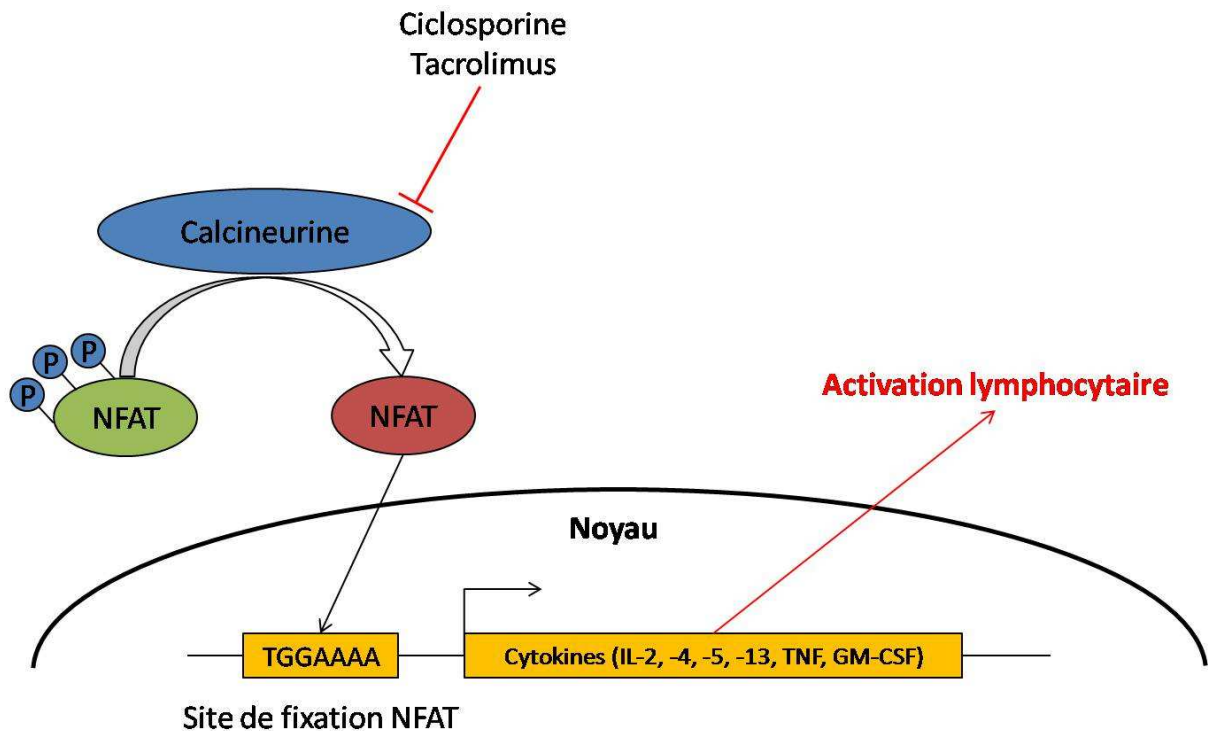


Figure I.5 : Mode d'action des inhibiteurs de la calcineurine

La cyclosporine A se lie à un récepteur intracellulaire (la cyclophiline) et ce complexe ligand-récepteur inhibe la calcineurine. Le Tacrolimus se lie à un autre récepteur (FKBP12) et inhibe également la calcineurine. Ces deux médicaments appelés inhibiteurs de calcineurine ont donc le même mécanisme d'activité immunosuppressive mais leur toxicité est différente car leurs récepteurs n'ont pas la même expression dans les différents tissus. Ces



deux médicaments ayant une pharmacocinétique complexe et étant responsables de nombreux effets indésirables, ils sont également soumis au suivi thérapeutique.

Classiquement, les patients greffés recevant du MMF sont co-traités avec un inhibiteur de la calcineurine.

## **2. Les inhibiteurs de la mTOR**

La mTOR (Mammalian target of rapamicin) est une protéine au centre d'une voie de signalisation contrôlant la multiplication cellulaire. Elle est notamment impliquée dans la cascade de réponses déclenchées par la fixation de l'IL-2 à son récepteur IL-2R. Cette voie de signalisation induit la multiplication des lymphocytes T. Les inhibiteurs de la mTOR que sont le sirolimus (Rapamycine) et l'évérolimus se fixent sur la protéine FKBP12 empêchant la formation du complexe d'activation de la mTOR et ainsi inhibant la division lymphocytaire induite par l'IL-2 (Saemann MD et col., 2009).

## **3. Les corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes (CS) possèdent de nombreux effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs (Adcock IM et Ito K, 2000). Les plus utilisés en transplantation sont la prednisone et la prednisolone. Ils ont comme fonctions principales la stabilisation des membranes des lysosomes, l'inhibition de la synthèse de prostaglandines et la réduction du taux d'histamine et de bradykinine. Les CS, de par leur hydrophobicité, traversent la membrane et se lient à des récepteurs cytoplasmiques spécifiques. Les récepteurs ainsi activés s'homo- ou s'hétéro-dimérisent formant ainsi un complexe transloqué au niveau nucléaire afin d'activer ou d'inhiber la transcription de certains gènes via des séquences promotrices *cis*-régulatrices. La prednisone et la prednisolone permettent ainsi la réduction de production de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Il en résulte une diminution de l'activation et de la prolifération lymphocytaire. Ils ont également un effet sur la fonction des monocytes et des macrophages.

Aujourd'hui, avec l'utilisation croissante du mycophénolate, les CS sont utilisés lors des phases précoces post-transplantation et de nombreuses études ont mis en évidence l'intérêt de la réduction et de l'arrêt progressif des CS dans les 3 à 6 premiers mois post-greffe. Cela permet la réduction des effets secondaires liés à leur utilisation entraînant une faible augmentation de l'apparition de rejet aigu mais ne réduisant pas la survie à long terme du greffon (Boletis JN et col., 2001; Budde K et col., 2002; Matl I et col., 2000; Ratcliffe PJ et

col., 1993; Ratcliffe PJ et col., 1996; Sola E et col., 2002). Ils sont également utilisés en cas d'épisode de rejet aigu.

#### **4. Le traitement d'induction**

Pour éviter les rejets précoces il convient d'utiliser un traitement complémentaire afin de réduire au maximum les défenses immunitaires lors de la greffe. On parle alors de traitement d'induction. Il existe principalement deux types de traitement d'induction différents, les anticorps déplétifs et non déplétifs. La première classe tend à réduire le nombre de leucocytes, tandis que l'autre a uniquement une action inhibitrice sur la fonction lymphocytaire.

### **F. Les sources de variabilité PK/PD de l'AMP :**

Plusieurs études ont montré une augmentation du risque de rejet aigu prouvé par biopsies (RAPB) chez les patients présentant une faible exposition à l'AMP. Il a donc été proposé une fenêtre thérapeutique pour l'exposition à l'AMP, la  $SSC_{0-12h}$  devant être comprise entre 30 et 60  $mg.h.l^{-1}$  (Hale MD et col., 1998; Shaw LM et col., 2000; van Gelder T et col., 1999). Il a été démontré que la fenêtre thérapeutique était loin d'être atteinte chez tous les patients lors d'une administration à dose fixe comme le préconise actuellement le résumé des caractéristiques du produit (RCP). Certaines études font état d'une variabilité d'exposition entre les patients traités par une dose fixe pouvant atteindre un facteur 10 et étant influencée par la co-médication (Hesselink DA et col., 2005; Shaw LM et col., 2000; Shaw LM et col., 2003; van Hest RM et col., 2005). Il est donc important de connaître les paramètres influençant la pharmacocinétique de l'AMP.

#### **1. La fonction rénale :**

Comme nous l'avons vu, l'élimination de l'AMP et notamment de ses métabolites comme l'AMPG se fait majoritairement par voie urinaire. Il est donc logique qu'une altération de la fonction rénale ait des conséquences sur la pharmacocinétique de l'AMP. L'équipe de Johnson HJ et col. a montré que, chez certains patients, une filtration glomérulaire inférieure à 25 ml/min entraîne une accumulation d'AMPG 3 à 6 fois supérieure à celle observée chez les patients ayant une fonction rénale physiologique (Johnson HJ et col., 1998). L'accumulation d'AMPG dans le plasma entraîne un déplacement de l'équilibre entre la fraction libre d'AMP et la fraction liée à l'albumine par compétition entre l'AMP et l'AMPG (Johnson HJ et col.,

1998; Meier-Kriesche HU et col., 2000; Nowak I et Shaw LM, 1995; Shaw LM et col., 2000; Weber LT et col., 1999). Une urémie élevée participe aussi à l'augmentation de la fraction libre d'AMP en réduisant sa fixation à l'albumine par compétition entre l'urée et l'AMP. Selon l'étude de Meier-Kriesche et col. (Meier-Kriesche HU et col., 2000) une urémie élevée diminuerait d'un facteur 2 la fraction d'AMP liée à l'albumine en absence d'AMPG. La fraction libre d'AMP est d'1 à 2% chez les patients ayant une fonction rénale normale tandis qu'elle pourrait atteindre 7% en cas d'insuffisance rénale (Meier-Kriesche HU et col., 2000; Mudge DW et col., 2004; Shaw LM et col., 2000; Weber LT et col., 1999). La fonction rénale est donc un facteur important de variabilité de réponse au traitement puisqu'un défaut de celle-ci fait varier de manière significative la fraction libre d'AMP responsable de l'effet du médicament (voir paragraphe II.B.6.b.).

## **2. Le régime alimentaire :**

Il existe peu d'études ayant comparé la pharmacocinétique du mycophénolate en fonction du régime alimentaire. L'équipe de Bullingham R et col. (Bullingham R et col., 1996) n'a observé aucune différence de la  $SSC_{0-12h}$  de l'AMP entre les patients ayant consommé une nourriture grasse et ceux à jeun ; les 2 groupes ayant reçu une dose unique de MMF de 2g par jour. Néanmoins, la  $C_{max}$  d'AMP était 25% plus faible chez les patients non à jeun ; de plus, ils présentaient une  $C_{max}$  et une  $SSC_{0-12h}$  d'AMPG plus importante. Il faut tout de même nuancer ces résultats qui proviennent d'une étude comprenant seulement 10 patients. Les RCP du MMF ou du mycophénolate sodique, préconisent tout de même l'utilisation du médicament à jeun. Concernant le MMF il est précisé que cette recommandation s'applique lors des phases précoces post-transplantation, chez les patients stables, le MMF peut être administré pendant les repas si nécessaire.

## **3. L'origine ethnique :**

Il y a une dizaine d'années deux études ont observé un taux de rejet aigu plus important chez les Afro-américains que chez les Caucasiens, les deux groupes ethniques recevant chacun une dose fixe de MMF de 2 g/jour (Neylan JF, 1997; Schweitzer EJ et col., 1998). Suite à ces observations, deux autres études se sont intéressées aux éventuelles différences pharmacocinétiques entre Caucasiens et Afro-américains (Pescovitz MD et col., 2003; Shaw LM et col., 2000). Aucune de ces deux études n'a pu mettre en évidence une différence significative entre les deux populations que ce soit au niveau de la clairance ou de la fraction libre d'AMP.

#### **4. Le sexe :**

Sur trois études de pharmacocinétique de population visant à évaluer l'influence du sexe sur la pharmacocinétique de l'AMP deux n'ont rapporté aucune différence entre les femmes et les hommes (Le Guellec C et col., 2004; Staatz CE et col., 2005). La troisième fait état d'une différence significative de clairance de l'AMP (11% plus faible chez les hommes) (van Hest RM et col., 2004). Une quatrième étude comparant le ratio moyen AMP/AMPG entre les hommes et les femmes sur une cohorte de 100 transplantés rénaux a également montré un ratio AMP/AMPG supérieur chez les hommes (Morissette P et col., 2001). Cette dernière étude émet l'hypothèse que les œstrogènes pourraient entrer en compétition avec l'AMP lors de son métabolisme via les UGT ce qui expliquerait un métabolisme de ce dernier plus lent chez les femmes.

#### **5. L'albuminémie :**

Nous avons déjà évoqué l'importance de l'albumine plasmatique régissant le ratio concentration libre/concentration liée de l'AMP, la fraction libre étant seule responsable de l'effet du médicament. Il est donc logique que l'albuminémie joue un rôle important dans la pharmacocinétique de cet immunosuppresseur. Une étude *in-vitro* a montré qu'une réduction de moitié de la concentration plasmatique d'albumine entraînait une augmentation de la fraction libre d'AMP d'un facteur 2,2, ce résultat n'a néanmoins pas été extrapolé à la situation *in vivo* (Nowak I et Shaw LM, 1995). De plus, plusieurs études *in vivo* ont également rapporté une augmentation significative de la fraction libre d'AMP chez les patients présentant une hypoalbuminémie (Atcheson BA et col., 2005; Weber LT et col., 1998; Weber LT et col., 1999). Par exemple, l'équipe d'Atcheson BA a montré une augmentation significative de la concentration libre d'AMP à partir d'une concentration plasmatique d'albumine inférieure à 31 g/l (la concentration physiologique moyenne étant d'environ 40 g/l) (Atcheson BA et col., 2004).

#### **6. La durée post-transplantation chez les transplantés rénaux :**

Les transplantés rénaux sont un cas particulier en ce qui concerne la pharmacocinétique de l'AMP. Il existe une période post transplantation où la fonction rénale n'est pas encore totalement rétablie. L'état stable du greffon est généralement atteint entre 3 et 6 mois post greffe. Or nous avons déjà montré l'importance de la fonction rénale dans la pharmacocinétique de l'AMP, il est donc normal que la pharmacocinétique de celui-ci soit

différente chez les patient récemment transplantés et chez les patients stables. Plusieurs études ont rapporté des variations de l'ordre de 30 à 50% de la  $SSC_{0-12h}$  moyenne, celles-ci étant plus faibles durant les périodes précoces (Bullingham R et col., 1996; Hale MD et col., 1998; Oellerich M et col., 2000). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces observations : la fonction rénale diminuée en période précoce post-transplantation, l'hypo albuminémie, mais aussi la réduction des traitements associés, notamment les CS qui sont fortement réduits voire même absents en période stable et dont l'effet inducteur sur la glucuroconjugaison diminue progressivement.

## **7. Les interactions avec les différents traitements associés:**

La pharmacocinétique de l'AMP est également influencée par le type de traitement associé utilisé. Des études ont montré que la pharmacocinétique de l'AMP variait selon l'ICN utilisé. La combinaison entre l'AMP et la ciclosporine diminue la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP, en comparaison à l'utilisation d'AMP seul ou combiné avec le tacrolimus ou le sirolimus (Buchler M et col., 2005; Picard N et col., 2006; Smak Gregoor PJ et col., 1999). La première hypothèse qui fut émise pour expliquer cette différence était que le tacrolimus avait un effet inhibiteur sur la glucuronidation de l'AMP. Ceci impliquerait une diminution du métabolisme de l'AMP et donc une augmentation de sa concentration sanguine (Hubner GI et col., 1999; Zucker K et col., 1997; Zucker K et col., 1999). Cependant cette hypothèse n'était pas en accord avec le fait que cette différence de pharmacocinétique de l'AMP soit aussi observable en l'absence d'ICN par rapport à une co-médication sous ciclosporine. De plus, l'observation de l'absence fréquente de deuxième pic de concentration d'AMP sous ciclosporine (voir paragraphe II.B.6.c) par rapport aux patients sous tacrolimus ou sirolimus (Brown NW et col., 2002; Hubner GI et col., 1999; Kaplan B et col., 2005; Picard N et col., 2006; Pou L et col., 2001) a permis d'émettre une autre hypothèse. Il est maintenant admis que ce phénomène est lié à une inhibition par la ciclosporine de l'excrétion biliaire d'AMPG via la protéine MRP2 (Deters M et col., 2005; Hesselink DA et col., 2005; Kobayashi M et col., 2004; van Gelder T et col., 2001). Cela conduirait à une réduction du cycle entéro-hépatique de l'AMPG et donc à une moindre réabsorption d'AMP réduisant son exposition systémique (voir paragraphe I.C.3) (Filler G et col., 2000; Hesselink DA et col., 2005; Kobayashi M et col., 2004; Shipkova M et col., 2001; van Gelder T et col., 2001).

Les corticostéroïdes sont également utilisés en association avec l'AMP. L'étude de Cattaneo D. et col. a pu mettre en évidence une augmentation de l'exposition à l'AMP corrélée avec la diminution progressive de l'utilisation des CS en comparaison avec des

patients chez lesquels on garde une même dose de CS tout au long du suivi de 21 mois. L'hypothèse émise dans cette étude est que les CS auraient une fonction inductrice des UGT ce qui augmenterait la clairance de l'AMP. D'autres études qui confirmeraient ou infirmeraient ce résultat sont cependant nécessaires pour avoir une meilleure idée de l'impact des CS sur la pharmacocinétique de l'AMP (Cattaneo D et col., 2002).

## **G. Le suivi thérapeutique (STP)**

### **1. Généralités**

Il a été défini par l'IATDMCT (Association Internationale de Suivi Thérapeutique et de Toxicologie Clinique) comme étant une spécialité clinique pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose des médicaments pour lesquels le bénéfice clinique du STP a été démontré dans la population générale ou dans une population particulière. Le STP prend en compte les paramètres connus pour avoir une influence sur la concentration sanguine du médicament *a priori* tels que :

- Certains paramètres démographiques ayant un impact démontré comme l'âge, le sexe et le régime alimentaire des patients.
- Certains paramètres cliniques comme le mode d'administration, la forme galénique ainsi que la posologie.
- Le génotype des protéines responsables du métabolisme et de l'absorption.
- La présence d'interactions médicamenteuses.

Mais, le STP repose avant tout sur une mesure permettant d'évaluer l'exposition du patient au médicament. Il peut s'agir d'un dosage sanguin du médicament et/ou de ses métabolites ou encore d'un paramètre biologique directement relié à l'effet de la molécule.

En pratique le STP n'est utile que pour des traitements de longue durée et ayant des effets indésirables lourds ou pour lesquels le risque d'inefficacité est grand. Il est évident que, pour des raisons pratiques et économiques, il est impossible de pratiquer le STP sur des traitements ne répondant pas à ces caractéristiques. On considère le STP comme utile lorsque le traitement répond aux critères suivants :

- Relation concentration-effet pharmacologique meilleure que la relation dose-effet
- Relation dose-concentration présentant une forte variabilité inter-individuelle
- Zone thérapeutique étroite
- Réponse pharmacologique difficilement accessible

Il est également préférable que sa variabilité intra-individuelle pharmacocinétique à court terme soit faible ou modérée.

## **2. Le STP du Mycophénolate :**

Le RCP du MMF ne mentionne pas la nécessité d'un STP et prévoit une administration à dose fixe. Néanmoins, plusieurs études récentes ont tenté de démontrer l'utilité du STP du MMF, mais avec plus ou moins de succès. A l'heure actuelle, son intérêt est encore controversé, il est pourtant régulièrement utilisé en clinique. Comme le présente l'éditorial de Van Gelder (van Gelder T, 2005) la forte variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie du MMF sont pourtant en faveur de celui-ci. Nous avons déjà détaillé les facteurs responsables de la variabilité pharmacocinétique, nous allons maintenant nous intéresser aux méthodes de détermination de l'exposition au médicament ainsi qu'aux études qui ont amené à s'interroger sur l'éventuelle efficacité du STP du MMF par rapport à l'utilisation d'une dose fixe.

### **a. Détermination de l'exposition à l'AMP :**

Il est admis que la  $SSC_{0-12h}$  est le meilleur index d'exposition au MMF. Cette  $SSC_{0-12h}$  est le reflet de l'exposition totale du patient à l'AMP durant les 12 premières heures après ingestion du médicament. Cette valeur est donc bien plus précise qu'une simple valeur de concentration résiduelle et/ou maximale puisqu'elle rend compte de l'exposition à l'AMP dans le temps et non à un instant donné. Cependant, la détermination de la  $SSC_{0-12h}$  nécessite un trop grand nombre de prélèvements sanguins durant les 12 premières heures suivant l'administration du médicament et elle n'est donc pas réalisable en pratique clinique. Il a donc fallu mettre en place des stratégies d'estimation de cette  $SSC_{0-12h}$  visant à réduire le nombre de prélèvements nécessaires afin d'aboutir à une estimation la plus fiable possible.

Une de ces stratégies consiste à estimer la  $SSC_{0-12h}$  à l'aide d'un prélèvement unique. Plusieurs études ont montré que cette stratégie présentait un biais trop important pour être pertinente (Kuypers DR et col., 2003; Le Guellec C et col., 2002; Pawinski T et col., 2002).

Une autre stratégie consiste à estimer la  $SSC_{0-12h}$  à partir d'un nombre limité de prélèvements (généralement entre 2 et 4). Pour cela, deux méthodes peuvent être utilisées : la méthode par régression linéaire multiple et la méthode Bayésienne. La méthode d'estimation basée sur l'équation de régression présente de meilleurs résultats que la stratégie de prélèvement unique réduisant le biais tout en augmentant la précision. Un nombre minimum de 2 à 3 prélèvements est nécessaire, ceux-ci devant être préférentiellement effectués pendant les

2 premières heures après la prise du traitement (Kuypers DR et col., 2003; Pawinski T et col., 2002; Ting LS et col., 2006; Weber LT et col., 1999). Un prélèvement additionnel entre 3h et 6h post-dose permet d'augmenter la précision de l'estimation (David-Neto E et col., 2003; Filler G, 2004; Muller H et col., 2007; Zhou PJ et col., 2007; Zicheng Y et col., 2007). De nombreuses équations ont été développées dans les différents centres de transplantation, néanmoins une des limites de cette méthode est qu'une équation développée pour une population donnée présente souvent des résultats médiocres sur une population différente (Filler G, 2004; Fleming DH et col., 2006). L'autre limite étant que les horaires de prélèvements doivent être scrupuleusement respectés pour avoir une estimation correcte de la  $SSC_{0-12h}$  ce qui n'est pas toujours évident en pratique clinique.

Une troisième stratégie permet d'approximer la  $SSC_{0-12h}$  au moyen d'un estimateur bayésien. Celui-ci est basé sur les caractéristiques pharmacocinétiques de la population en plus des données de concentration sanguine issues de 3 prélèvements sanguins. Plusieurs modèles mathématiques validés ont été décrits dans la littérature (Le Guellec C et col., 2004; Payen S et col., 2005; Prémaud A et col., 2005). Cette méthode présente moins de biais que la méthode par régression linéaire multiple et est plus tolérante aux variations dans les horaires de prélèvement. Elle permet également d'obtenir le tracé estimé de la cinétique individuelle du patient et ainsi de vérifier l'ajustement correct de cette courbe aux points expérimentaux inclus dans le calcul.

#### **b. Les arguments en faveur du STP :**

Outre la forte variabilité pharmacocinétique intra- et inter-individuelle que nous avons déjà largement évoquée, ce sont les études ayant mis en évidence une relation entre la concentration plasmatique d'AMP et la survenue d'effets indésirables et/ou de rejets aigus qui ont renforcé l'intérêt croissant des cliniciens pour le STP de l'AMP. Une des premières études sur ce sujet est celle conduite au Japon par l'équipe de Takahashi K et col. (Takahashi K et col., 1995). Elle fut la première à montrer une relation entre la  $SSC_{0-12h}$  de l'AMP et l'incidence des rejets aigus. En effet, chez 32 patients greffés rénaux, ceux ayant une  $SSC_{0-12h}$  d'AMP supérieure à  $40\mu\text{g.h/ml}$  ne présentaient pas de signes de rejet. L'étude de Nicholls (Nicholls AJ, 1998) a également montré une relation entre  $SSC_{0-12h}$  d'AMP faible et incidence de rejet chez 41 transplantés rénaux. L'équipe de Hale MD et col. (Hale MD et col., 1998) a confirmé l'existence d'une relation entre la  $SSC_{0-12h}$  de l'AMP et l'incidence de rejet aigu lors d'une étude randomisée sur 156 patients greffés rénaux répartis en trois groupes selon la valeur cible de leur  $SSC_{0-12h}$ . L'étude de Shaw LM et col. (Shaw LM et col., 2000) a, quant à



elle, démontré l'existence d'une fenêtre thérapeutique de la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP comprise entre 30 mg.h/l et 60 mg.h/l. En effet ils ont montré que l'incidence de rejets aigus était inférieure à 10% lorsque que la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP se trouvait comprise entre ces 2 valeurs seuils. De nombreuses autres études ont également montré cette relation entre  $SSC_{0-12h}$  d'AMP faible et rejet aigu. Comme par exemple celle de Weber LT et col. (Weber LT et col., 2002) montrant également l'existence d'une valeur seuil de la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP chez 45 enfants transplantés. Une  $SSC_{0-12h}$  inférieure à 33,8 mg.h/l permettrait de prédire un rejet aigu avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 64%.

Il existe également plusieurs études montrant une relation entre la concentration résiduelle d'AMP et la survenue de rejets aigus (Krumme B et col., 1998; Lu YP et col., 2004; Tredger JM et col., 2004; Yamani MH et col., 2000). Une faible concentration résiduelle d'AMP augmenterait le risque de rejet aigu de manière significative. Certaines études proposent une valeur seuil de la concentration résiduelle d'AMP de 2 µg/ml pour prévenir le rejet aigu (Krumme B et col., 1998; Meiser BM et col., 1999; Yamani MH et col., 2000). Néanmoins, dans l'étude de Yamani et col. ayant pris en compte plusieurs périodes post-transplantation, on ne retrouve plus d'influence significative de cette concentration résiduelle d'AMP sur l'incidence des rejets aigus après un an post-greffe (Yamani MH et col., 2000).

En plus de la relation concentration d'AMP/incidence de rejets aigus certains auteurs ont également montré une relation entre concentration d'AMP et effets indésirables. Cependant cette relation semble moins évidente que celle observée avec les rejets. Cela peut s'expliquer par le fait que les effets indésirables, notamment digestifs, relèvent de critères subjectifs dépendant aussi bien du clinicien que du patient lui-même et résultant probablement en partie d'une toxicité locale directe, indépendante de la concentration plasmatique. L'étude de Van Gelder et col. (van Gelder T et col., 1999) n'a, par exemple, trouvé aucune relation statistiquement significative entre les concentrations plasmatiques d'AMP (que ce soit la  $SSC_{0-12H}$ , la  $C_{max}$  ou la concentration résiduelle) et la survenue d'effets indésirables digestifs ou hématologiques. Cependant, plusieurs autres études sont parvenues à la conclusion inverse et trouvent une relation significative entre l'apparition d'effets indésirables digestifs et/ou hématologiques et la concentration plasmatique d'AMP (Dubrey SW et col., 1999; Mourad M et col., 2001; Oellerich M et col., 2000; Smak Gregoor PJ et col., 1998). L'équipe de Kuypers DR et col. a rapporté une  $SSC_{0-12h}$  d'AMP significativement plus élevée chez les patients ayant présenté une leucopénie (à M3 :  $SSC_{0-12h}$  d'AMP de 61,4 ( $\pm$  30,9) mg.h/L contre 42,3 ( $\pm$  25,3) mg.h/L ; à M12 : 84,4 ( $\pm$  45,6) mg.h/L contre 44,2 ( $\pm$  21,9) mg.h/L; Kuypers DR et col., 2004). Cette même équipe a confirmé l'existence d'une valeur plafond de la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP

permettant de réduire le risque d'effets indésirables de l'AMP. Il s'agit d'une valeur de  $SSC_{0.12H}$  de 60 mg.h/L qu'il convient de ne pas dépasser pour limiter l'apparition de leucopénies (Kuypers DR et col., 2004). Cette valeur est identique à celle proposée par l'équipe de Shaw et col. (Shaw LM et col., 2000) comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. D'autres études démontrent également une relation significative entre la survenue d'effets indésirables et une concentration résiduelle d'AMP élevée. En effet, chez 147 patients transplantés hépatiques, l'équipe de Tredger et col. (Tredger JM et col., 2004) a montré une augmentation d'un facteur 3 du risque de développer une leucopénie et/ou une infection chez les patients ayant une concentration résiduelle d'AMP comprise entre 3 et 4 mg/l. Chez les patients ayant une concentration résiduelle d'AMP supérieure à 4 mg/L cette augmentation du risque était de même ordre concernant les infections (facteur 3) et encore plus importante pour les leucopénies (facteur 5,5). Cette même équipe a donc suggéré un seuil maximum pour la concentration résiduelle d'AMP de 3,5 mg/l afin de prévenir certains effets secondaires. Les équipes de Smak Gregoor PJ et col. et de Lu YP et col. ont également présenté des résultats similaires chez des patients transplantés rénaux (Lu YP et col., 2006; Smak Gregoor PJ et col., 1998). Il existe également des études ayant montré une relation entre une fraction libre élevée d'AMP et la survenue de leucopénies ou d'anémies (Atcheson BA et col., 2005; Cattaneo D et col., 2001; Weber LT et col., 2002).

Il y a donc de nombreuses études ayant montré une relation entre la concentration d'AMP et l'apparition de rejet aigu ou d'effets indésirables, ce qui, combiné à la forte variabilité pharmacocinétique intra et inter-individuelle, amène à s'intéresser de plus près au suivi thérapeutique pour l'AMP. C'est pourquoi il est nécessaire de conduire des études cliniques visant à comparer l'efficacité de l'AMP chez des patients traités à dose fixe et chez des patients bénéficiant d'une adaptation de posologie.

### **c. Les études cliniques prospectives comparant le STP et l'administration à dose fixe du MMF:**

Seules trois études prospectives, randomisées ont évalué l'intérêt du STP du MMF en comparant un groupe de patients bénéficiant du STP et un autre recevant un traitement à dose fixe.

L'étude « Fixed-Dose Concentration-Controlled Trial » (FDCC, NCT00166244) menée par l'équipe de Van Gelder et col. comprenait 901 patients transplantés rénaux répartis en deux groupes : l'un recevant une dose fixe de MMF (n=452), l'autre étant soumis au STP (n=449). Aucune différence démographique ou physiologique n'était observable entre les 2

groupes. Tous les patients de l'étude n'ont pas reçu le même traitement associé au MMF, certains étaient co-traités par la CsA (54%) et les autres par le tacrolimus (46%). Seulement 46% des patients inclus dans l'étude ont reçu un traitement d'induction. Cependant, la proportion de patients recevant chacun des différents traitements associés étaient similaire dans les deux groupes (van Gelder T et col., 2008). Aucune différence en terme d'incidence des rejets ou de l'échec du traitement (évalué à partir d'un critère composite incluant : RAPB, perte du greffon, arrêt du MMF ou décès) n'a pu être observée entre les deux groupes lors de cette étude. L'estimation de la  $SSC_{0-12h}$  au cours de cette étude a été réalisée à l'aide d'équations de régressions sur la base de la concentration sanguine en AMP à trois différents temps après la prise :  $T_0$ ,  $T_{30min}$  et  $T_{2h}$  (voir paragraphe I.G.2.a). Cependant, selon les auteurs, il semblerait que les recommandations d'ajustement de la dose n'aient pas été suffisamment suivies dans le groupe de patients bénéficiant du STP. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative de l'efficacité du traitement entre le régime à dose fixe et celui à dose adaptée (van Gelder T et col., 2008). Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cette absence de différence significative. Celle émise par les auteurs est que les recommandations d'adaptation de posologie dans le groupe « controlled concentration » n'ont pas toujours été scrupuleusement respectées par les cliniciens notamment lorsqu'il s'agissait de doses jugées trop importantes. Cela pourrait en partie expliquer pourquoi, lors des périodes précoces les plus propices à la survenue de rejets, 62 des 147 patients du groupe bénéficiant du STP n'ayant pas atteint une  $SSC_{0-12h}$  supérieure à 30 mg.h/l au jour 3 post-transplantation n'avaient toujours pas atteint ce seuil minimum au jour 10. Une autre hypothèse pourrait être émise concernant la méthode d'estimation de la  $SSC_{0-12h}$  à l'aide d'une équation de régression, car, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, cette méthode présente des limites en comparaison avec la méthode basée sur un estimateur bayésien. Il a néanmoins été confirmé, par cette présente étude, la relation étroite entre l'incidence de rejet et la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP durant les périodes précoces post-transplantation (van Gelder T et col., 2008). Une étude rétrospective publiée en mars 2010 et basée sur les données issues de la même étude a permis de confirmer l'importance, chez les patients présentant un risque important de rejet aigu, d'être au dessus du seuil de  $SSC_{0-12h}$  de 30 mg.h/l dès le troisième jour post-transplantation pour prévenir des épisodes de rejet (van Gelder T et col., 2010).

L'étude Opticept (NCT00087581) conduite aux USA par Gaston et col. présente des résultats similaires à ceux de l'étude FDCC. Elle montre une tendance à la diminution du risque de rejet aigu chez les individus bénéficiant du STP mais ne parvient pas à démontrer significativement les effets positifs de l'adaptation de posologie. Les auteurs précisent que

l'hétérogénéité de la population, notamment au niveau de l'ICN utilisé comme co-traitement mais aussi au niveau de la méthode d'estimation de l'exposition au médicament, introduisait un biais trop important pour permettre une conclusion définitive.

La troisième étude clinique multicentrique visant à comparer un groupe de patients bénéficiant du STP et un autre recevant une dose fixe fut conduite par Le Meur Y et col. Les groupes étaient composés de 65 patients adultes recevant tous, en plus du MMF, un traitement d'induction (20 mg de Basiliximab à J0 et J4), des corticostéroïdes (arrêtés progressivement si possible) ainsi que de la ciclosporine avec une adaptation de posologie sur la base du  $C_0$  (Le Meur Y et col., 2007). Les deux groupes de patients ont reçu une dose fixe de 2g de MMF par jour jusqu'au jour 7, puis les concentrations plasmatiques d'AMP ont été mesurées pour tous les groupes à l'aide d'une technique CLHP-UV décrite dans un prochain paragraphe (II.H.2) et la  $SSC_{0-12h}$  évaluée par méthode Bayésienne. Pour le groupe bénéficiant du STP, les ajustements de posologie ont été réalisés par méthode bayésienne pour atteindre une cible d'environ 40mg.h/l. Les résultats de cette étude étaient en faveur du STP, en effet, le groupe bénéficiant du STP présentait significativement moins d'échecs du traitement (30% contre 47%,  $p=0,03$ ). Cette différence étant uniquement attribuable aux épisodes de rejets aigus, moins fréquents dans le groupe bénéficiant du STP durant l'année de suivi de l'étude. De plus, une analyse multivariée prenant en compte les différents paramètres potentiellement impliqués dans cette différence a permis de mettre en évidence que seule l'appartenance au groupe STP était significativement associée à l'incidence du rejet aigu ( $p=0,017$ ). Concernant les effets secondaires précédemment décrits, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux groupes. Les conclusions de cette étude sont donc, contrairement à l'étude FDCC (van Gelder T et col., 2008), en faveur d'une réduction significative d'échecs du traitement grâce au STP (Le Meur Y et col., 2007).

#### **d. Conclusions sur le STP du MMF**

Comme nous venons de le voir, il existe donc de nombreux arguments en faveur du STP du MMF telles que la forte variabilité pharmacocinétique intra- et inter- individuelle ainsi que la réduction d'apparition d'effets secondaires et de rejets aigus chez les patients ayant une  $SSC_{0-12h}$  d'AMP comprise dans la fenêtre thérapeutique de 30 à 60 mg.h/l. Cependant la divergence des résultats des deux études cliniques comparant dose fixe et ajustée ne permettent pas de conclure, avec certitude, à une amélioration de l'efficacité du traitement grâce au STP. Néanmoins, il est d'ores et déjà fortement utilisé en clinique, en

particulier chez les patients à risques, c'est-à-dire ceux ayant déjà présenté un épisode de rejet ou des effets indésirables ou encore les patients ayant une fonction rénale altérée.

## **H. Méthodes de dosage :**

### **1. Kits commerciaux :**

Il existe deux kits commerciaux qui permettent de mesurer la concentration plasmatique d'AMP chez les patients. Le kit EMIT (Dade-Behring) est basé sur une méthode immunochimique, il a été mis en évidence une surestimation de la concentration d'AMP par ce kit, attribué à la réaction croisée de l'AMPaG (Schutz E et col., 1998; Shipkova M et col., 1999). Le kit TMPA (Roche Diagnostics®) utilise le dosage d'un des produits de réaction de l'enzyme cible de l'AMP, le NADH. La diminution de la concentration de NADH formée étant le reflet d'une inhibition de l'enzyme par l'AMP, celle-ci permet donc d'estimer la concentration d'AMP présente dans l'échantillon en référence à une courbe de calibration.

### **2. Méthode CLHP/UV ou CLHP/MS et MS/MS :**

Il existe plusieurs méthodes de dosage de l'AMP par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à une détection UV ou à une détection par spectrométrie de masse (MS) (Atcheson B et col., 2004; Shipkova M et col., 1998; Streit F et col., 2004). Une méthode CLPH couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été développée et validée au sein du laboratoire. Elle est sensible, reproductible, et facilement réalisable en clinique (Prémaud A et col., 2004).

## II. L'INOSINE MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE (IMPDH) :

### A. Généralités :

Comme nous l'avons déjà décrit brièvement dans le chapitre consacré au mode d'action du MMF, l'IMPDH est une enzyme catalysant la formation du Xantosine MonoPhosphate (XMP) à partir d'Inosine MonoPhosphate (IMP) et d'un cofacteur, le Nicotineamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) (Figure I.3). C'est une réaction permettant le renouvellement des bases puriques via la voie dite *de novo* indispensable à la prolifération lymphocytaire (Figure I.2), c'est d'ailleurs pour cette raison que cette protéine est hautement conservée au cours de l'évolution. Pour s'en convaincre il suffit d'utiliser un logiciel d'alignement de séquences tel que Blast disponible en ligne sur le site de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ce type d'application permet de comparer la séquence d'un gène ou d'une protéine (ici l'IMPDH I humaine) à une base de données contenant toutes les séquences connues des gènes (ou protéines) de toutes les espèces référencées. La figure II.1 est une capture d'écran du résultat en image de cet alignement de séquences, nous y retrouvons en haut la représentation schématique de la séquence de l'IMPDH I ainsi que le code couleur correspondant au score d'appariement (plus il est élevé, plus les séquences présentent d'homologies). Chaque segment représenté sous la séquence testée correspond à une protéine comportant des homologies de séquence avec la protéine testée, toutes espèces confondues. La longueur et la couleur de ces segments nous indique la taille (relative à la taille de la protéine testée) de la séquence commune et le pourcentage d'homologie par rapport à la séquence utilisée comme référence. Nous pouvons constater sur la figure II.1 que de nombreux organismes, autres que l'homme, possèdent au moins une isoforme de protéine ayant un score d'appariement élevé avec l'IMPDH I humaine (Natsumeda Y et Carr SF, 1993; numéro d'accès NP\_001136045.1) partageant elle aussi une forte homologie avec l'isoforme II humaine (84% ; NP\_000875.2). Parmi celles-ci on trouve plusieurs protéines identifiées chez diverses espèces plus ou moins proches de l'homme tel que *Bos taurus* (98% d'homologie), *Mus musculus* (98% d'homologie), *Monodelphis domestica* (96% d'homologie), *Canis lupus familiaris* (96% d'homologie), *Macaca mulatta* (94% d'homologie) ou encore *Xenopus tropicalis* (92% d'homologie) (Colby TD et col., 1999). Mais nous retrouvons également des protéines homologues de

l'IMPDH I humaine chez des espèces beaucoup plus lointaines sur un plan génétique, comme par exemple :

- la plante *Arabidopsis thaliana* possédant aussi une IMPDH présentant 46% d'homologie avec l'IMPDH I humaine, le domaine actif étant fortement conservé.
- la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui possède 4 isoformes d'une protéine semblable à l'IMPDH au niveau fonctionnel toutes présentant une homologie avec l'IMPDH humaine supérieure à 60%.
- la bactérie *E coli* qui présente une seule isoforme de l'IMPDH avec une homologie de 41% par rapport à l'isoforme I humaine, la majeure partie des acides aminés communs se trouvant au niveau du domaine fonctionnel de la protéine.

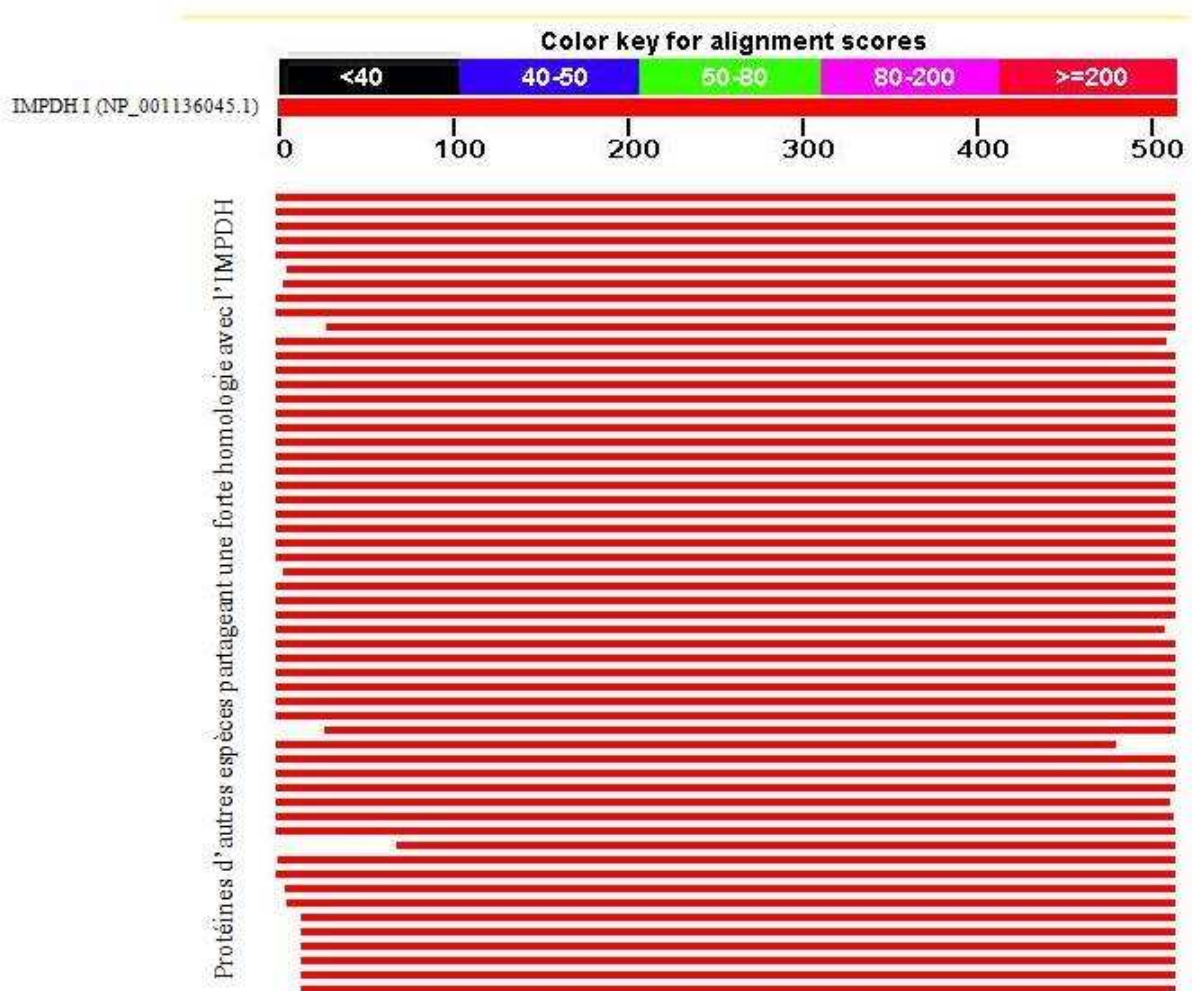


Figure II.1 : Résultat du blast de la séquence de l'IMPDH I (NP\_001136045.1) contre la base de données Refseq avec l'espèce homo sapiens comme paramètre d'exclusion sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

De plus, une étude chez des souris Knocked-Out (KO : ce qui signifie inactivation totale d'un gène) pour le gène de l'*IMPDH II* a démontré l'importance de celui-ci puisque son absence provoquait une létalité embryonnaire précoce (Gu JJ et col., 2000). Il apparaît donc que cette protéine possède une fonction vitale pour la survie de la cellule (et, le cas échéant, de l'individu) ce qui explique sa forte conservation au cours de l'évolution et le faible nombre de variants fonctionnels décrits dans la littérature.

Chez l'homme, il existe deux isoformes de l'*IMPDH* : I et II, toutes deux composées de 514 aa, partageant entre elles 84% d'homologie de séquence et ayant une masse de 56kDa (Carr SF et col., 1993; Collart FR et Huberman E, 1988; Hager PW et col., 1995; Natsumeda Y et col., 1990). Ces deux protéines possèdent les mêmes domaines conservés (figure II.2) : Deux domaines structuraux TIM et CDS qui permettent le repliement et l'homotétramérisation de la protéine et un domaine fonctionnel qui catalyse la réaction d'oxydation de l'IMP en XMP (Figure I.2). L'*IMPDH* est active sous forme d'homotétramère dont la structure cristallographique (Figure II.3) a été publiée par Sintchak MD et col. puis par Colby DT et col. (Colby TD et col., 1999; Sintchak MD et col., 1996).

Les 2 isoformes sont codées par 2 gènes distincts chacun sur un chromosome différent (Collart FR et Huberman E, 1988; Natsumeda Y et col., 1990). Le gène codant pour l'*IMPDH I* est localisé sur le chromosome 7 (7q31.3-q32) celui codant pour l'*IMPDH II* se trouvant sur le chromosome 3 (3p21.2) (Glesne DA et col., 1993; Gu JJ et col., 1994; Kost-Alimova MV et col., 1998). Ces deux gènes sont composés de 14 exons fortement conservés (Glesne DA et col., 1993; Glesne DA et Huberman E, 1994). Le gène de l'*IMPDH I* est sujet à épissage alternatif et possède ainsi plusieurs transcrits connus (isoformes a à g), différant selon le type de tissus. L'*IMPDH II* ne possède qu'un transcrit connu à ce jour. L'*IMPDH I* est exprimée de manière constitutive dans tout type de tissus. Il a par contre été démontré que le gène de l'*IMPDH II* était spécifiquement activé dans les cellules ayant une forte activité mitogénique (Collart FR et col., 1992; Nagai M et col., 1991; Nagai M et col., 1992; Zimmermann AG et col., 1995; Zimmermann AG et col., 1997) et qu'à l'inverse, sa production était fortement réduite lorsque les cellules entraient en phase de différenciation (Collart FR et col., 1992; Nagai M et col., 1991; Nagai M et col., 1992). L'*IMPDH* est donc une cible intéressante en pharmacologie puisqu'elle est spécifique de la division cellulaire. Elle est utilisée comme cible pour traiter divers types de pathologies telles que certains cancers (Collart FR et col., 1992; Floryk D et Thompson TC, 2008) ou les maladies auto-immunes (Ratcliffe AJ, 2006). Mais ce qui rend cette enzyme encore plus intéressante pour l'immunosuppression c'est le fait que les lymphocytes soient incapables de recycler les bases



puriques via la voie dite de sauvetage ou de sauvegarde (Figure I.2) (Allison AC et col., 1975; Eugui EM et col., 1991; Eugui EM et col., 1991). Ils sont donc dépendants de la voie *de novo* pour produire les purines nécessaires à la réplication de leur ADN (Eugui EM et col., 1991; Eugui EM et col., 1991). Par conséquent, l'inhibition de l'IMPDH II (fortement surexprimée lors des phases de division cellulaire, comme nous venons de le voir) entraîne l'inhibition de la multiplication des lymphocytes et réduit donc l'immunité cellulaire du patient traité par ce type de médicament (Natsumeda Y et Carr SF, 1993).

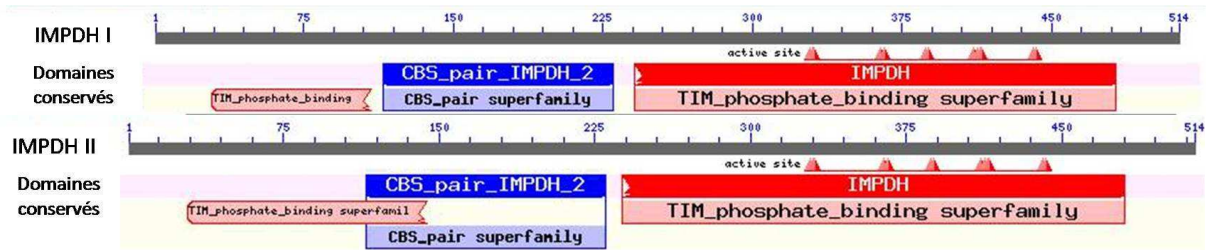


Figure II.2 : Domaines conservés dans les 2 isoformes des protéines IMPDH I et II (disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) : Elles possèdent toutes les 2 deux domaines structuraux (un domaine de fixation TIM-phosphate et un domaine CBS (cystathionine beta-synthase) ) et une région fonctionnelle comprenant les sites actifs.

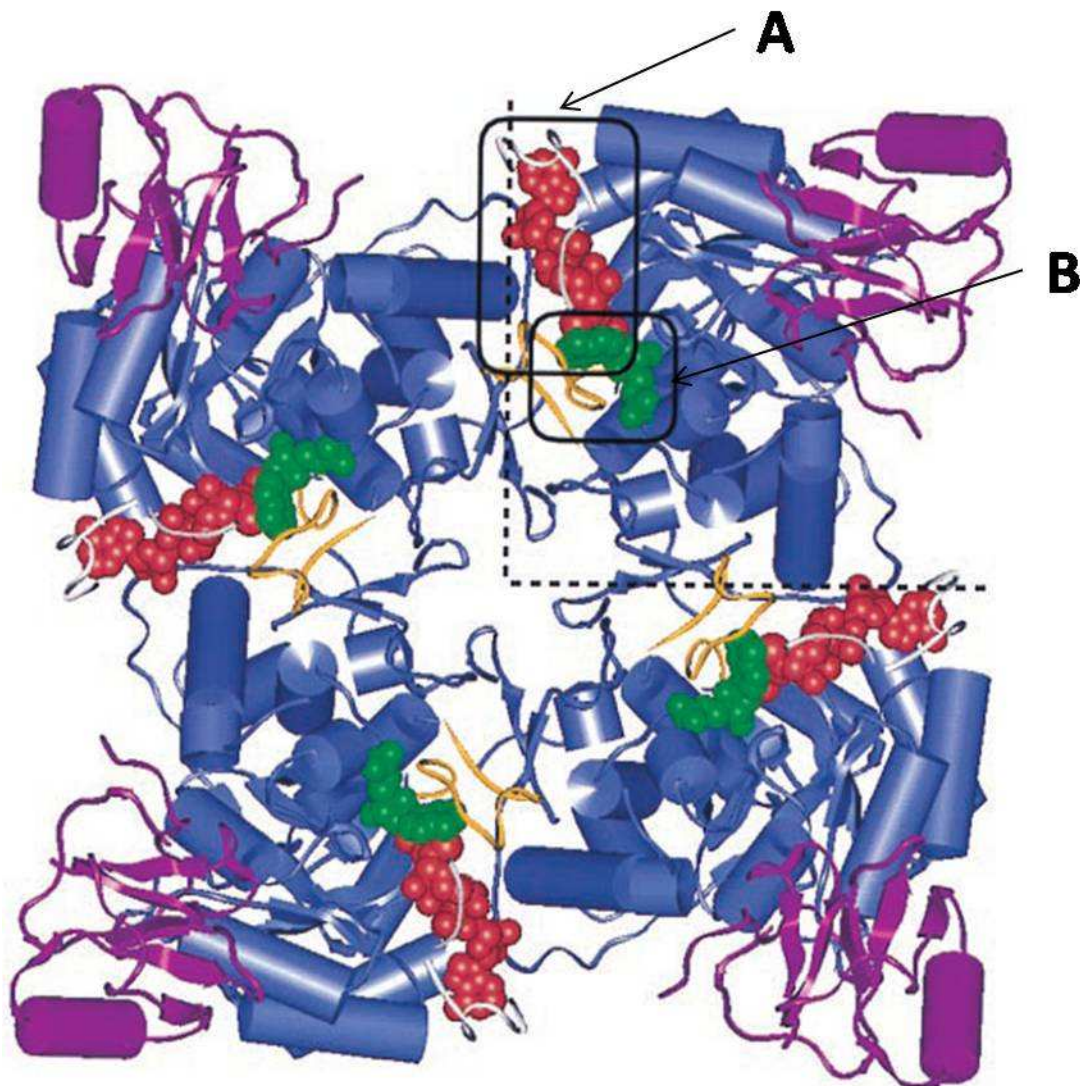


Figure II.3 : Structure quaternaire 3D de l'IMPDH II tétramérisée en présence de deux analogues de ses co-substrats : le SAD (Analogue dinucléotidique du NAD, en rouge (A)) et le 6-Cl-IMP (Analogue non oxydable de l'IMP, en vert (B)).

## B. Génétique de l'IMPDH

### 1. Introduction :

Nous savons que la prolifération lymphocytaire est sous la dépendance de l'IMPDH étant l'enzyme clé de l'étape limitante de la voie de synthèse *de novo* des bases puriques, il paraît donc intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation génétique de cette enzyme. Une cellule dispose de trois mécanismes distincts pour augmenter ou diminuer le pool d'ARNm d'un gène donné et donc la traduction de la protéine codée par ce gène :

- soit une induction/inhibition de la transcription du gène via le couple séquences *cis*-régulatrice/facteur *trans*-régulateurs (c'est ce qu'on appelle la régulation transcriptionnelle).
- soit une régulation dite « post-transcriptionnelle » qui consiste à augmenter/réduire la stabilité de l'ARNm via des protéines stabilisatrices ou des RNases.
- soit l'utilisation de micro-ARN (miARN), répresseurs post-transcriptionnels.

Tous ces types de régulations ont pour effet direct une augmentation ou une diminution de la production de la protéine codée par cet ARNm (Hargrove JL et Schmidt FH, 1989). Après avoir fait un bref rappel sur la notion de promoteur et de facteur de transcription, nous allons nous intéresser au cours de cette partie consacrée à la génétique de l'IMPDH : (i) aux études fondamentales décrivant la régulation des deux gènes codants pour les deux isoformes de l'IMPDH, (ii) à l'implication de cette régulation dans la réponse au traitement par l'AMP.

### 2. Généralités sur les promoteurs et les facteurs de transcription:

Tous les gènes, pour pouvoir être transcrits en ARNm puis traduits en protéine, sont sous le contrôle d'une région d'ADN appelé promoteur. On distingue deux types de séquences promotrices : celles dites constitutives qui permettent la transcription basale d'un gène et celles qui permettent une régulation spécifique selon le tissu, l'état de la cellule ou encore son besoin en tel ou tel nutriment.

Les promoteurs constitutifs sont ubiquitaires, chez l'homme ils sont toujours situés à environ une cinquantaine de paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) d'un gène et comportent toujours une séquence TATA (appelé TATAbox). Celle-ci est

reconnue par des facteurs de transcription généraux (famille des TFII) formant un complexe qui est indispensable à la fixation de l'ARN polymérase de type II nécessaire à la transcription du gène en ARNm : ce complexe formé des facteurs de transcription généraux et de la polymérase de type II est appelé complexe basal de transcription.

Sur certains gènes on trouve, en plus du promoteur constitutif, d'autres séquences promotrices pouvant être beaucoup plus éloignées du site d'initiation de la traduction. Ces promoteurs sont dits spécifiques et comportent divers motifs pouvant être reconnus par des facteurs de transcriptions, eux aussi spécifiques. Ces séquences sont appelées *cis*-régulatrices par opposition aux facteurs de transcription nommés facteurs *trans*-régulateurs. On peut trouver l'ensemble des séquences *cis*-régulatrices connues à ce jour sur le site : <http://www.cisred.org/> et l'ensemble des facteurs de transcription sur le site : [www.transcriptionfactor.org](http://www.transcriptionfactor.org). Ces séquences promotrices spécifiques ont pour rôle de moduler l'expression d'un gène en fonction de l'environnement et des besoins de la cellule par l'intermédiaire des facteurs de transcription ; elles peuvent être activatrices ou inhibitrices de la transcription (aussi appelées enhanceurs ou silencers).

Les facteurs de transcriptions sont classables en trois catégories :

- Les facteurs généraux dont nous venons d'évoquer l'importance.
- Les facteurs généraux et spécifiques de séquences, ils sont eux aussi ubiquitaires mais spécifiques d'une séquence particulière (comme le facteur Sp1 qui reconnaît les régions riches en GC et active la transcription des promoteurs contenant ce type de séquences). Certains sont inductibles d'autres sont transcrits de manière constitutive.
- Les facteurs spécifiques et inductibles qui ne sont présents que dans certains types de cellules et sont finement régulés (eux aussi sous contrôle de leurs propres promoteurs spécifiques). Ils reconnaissent une séquence *cis*-régulatrice ou se lient à d'autres facteurs de transcription.

### **3. Régulation transcriptionnelle :**

Une des premières études à s'être intéressée à la régulation transcriptionnelle de l'*IMPDH* dans une population de lymphocytes est celle de Dayton JS et col.. Les auteurs ont montré que, 72H après stimulation chimique (Phorbol-Myristate-Acetate (PMA) et ionomycine) des lymphocytes T, l'activité *IMPDH* était augmentée d'un facteur 15. De plus

ils ont montré que la transcription des deux isoformes de l'*IMPDH* était fortement augmentée lors de l'activation lymphocytaire. Enfin, l'ajout de GTP en excès semble avoir un effet négatif sur la transcription des 2 gènes de l'*IMPDH* ce qui laisse supposer un rétro-contrôle négatif du gène par le produit final de la cascade de réaction dont l'*IMPDH* est l'étape limitante (Dayton JS et col., 1994). Ce type de rétro-contrôle est couramment retrouvé en génétique : cela permet à la cellule de limiter la transcription d'un gène, et par là même la perte d'énergie que cela implique, lorsqu'il ne lui est pas utile ; le produit de l'enzyme codée par ce gène étant déjà présent en quantité suffisante. On peut citer ici en exemple un des premiers gènes pour lequel ce phénomène a été observé : celui codant pour la bêta-galactosidase chez *E. Coli* contrôlé négativement par l'augmentation de la concentration intracellulaire d'Ampc, directement liée à la présence de glucose en concentration suffisante (Pastan I et col., 1971). Le glucose étant le produit final de la cascade de réaction initiée par la bêta-galactosidase.

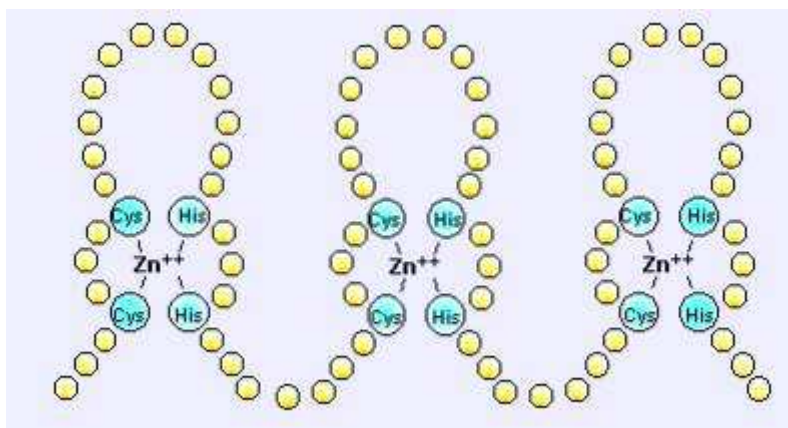
#### a. De l'*IMPDH I*

L'équipe de Gu JJ et col. a montré que la transcription de l'*IMPDH I* est régulée par 3 promoteurs distincts conduisant à 3 ARNm de taille différente. Le promoteur appelé P3 pourrait, selon Gu JJ et col., être responsable de l'expression basale du gène entraînant l'expression d'un transcrit de 2.5 kb. Ce promoteur P3 contient de nombreux sites de fixation des facteurs généraux et spécifiques SP1 (Specific protein 1) et AP2 (Activator Protein 2), mais également plusieurs sites de fixation des facteurs spécifiques NGF1-A/Erg1 (Nerve Growth Factor 1/ETS (E twenty six) related gene1). Ils sont tous potentiellement impliqués dans la réponse à l'activation lymphocytaire (Gu JJ et col., 1997).

Le promoteur P2 code lui pour un transcrit de 2.7 kb difficilement distinguable de celui de 2.5 kb sur un gel d'agarose. Néanmoins, il contient des régions riches en GC potentiellement reconnues par les facteurs de transcription spécifiques et/ou généraux et spécifiques, comportant des motifs doigts de zinc (Figure II.4). Il pourrait donc être également impliqué dans la régulation tissulaire de l'*IMPDH I* (Gu JJ et col., 1997).

Le promoteur P1 entraîne la transcription d'un ARNm de 4 kb, cet ARNm a été initialement découvert dans les lymphocytes périphériques sanguins (LPS) et son expression est fortement augmentée lors de l'activation des lymphocytes T (de même que le transcrit induit par le promoteur P3). De plus ce promoteur P1 présente un site de fixation du facteur de transcription général et spécifique NFkB (Nuclear Factor kappa B) connu pour être impliqué dans la régulation de nombreux gènes suite à l'activation des lymphocytes B et T et/ou en

réponse aux cytokines inflammatoires (Baldwin AS, Jr., 1996). Ce promoteur pourrait donc également être impliqué dans la transcription spécifique de l'*IMPDH I* lors de l'activation lymphocytaire. L'*IMPDH I* semble donc être régulée de façon complexe et différente selon les tissus, grâce à la présence de 3 promoteurs contenant tous des séquences consensus de fixation à des facteurs spécifiques *trans*-régulateurs. Cependant, il n'existe pas suffisamment de données à ce jour pour connaître plus précisément l'implication de ces différents promoteurs dans la régulation tissulaire du gène de l'*IMPDH I*.



**Figure II.4 : représentation schématique du facteur de transcription SP1 contenant 3 motifs en doigts de zinc.**

### **b. De l'*IMPDH II* :**

Le site d'initiation de la transcription du gène de l'*IMPDH II* a été identifié par Zimmermann AG et col. et se trouve en position -50 par rapport à l'origine de traduction (ATG) définie comme référence (+1) (Zimmermann AG et col., 1995). La même équipe a également identifié 7 sites *cis*-régulateurs putatifs présents sur les 200 bp en 5' du site d'initiation de la traduction à l'aide d'une analyse *in silico*. Celle-ci a permis de rechercher les séquences de fixation spécifiques des régulateurs de la transcription en comparant la séquence de 1500 pb en amont du +1 du gène de l'*IMPDH II* à une base de données comportant toutes les séquences *cis*-régulatrices connues. On y trouve une TATA box en position -74, deux sites de fixation putatif du facteur de transcription AP2 en position -133 et -163, deux sites putatifs de fixation de la protéine CREB (pour cAMP Responsive Element Binding) en position -89 à -94 et -114 à -121 respectivement, et trois sites de fixation putatifs du facteur SP1 en position -137, -149 et -167 (Zimmermann AG et col., 1995). La TATA box est le site de fixation classique de l'ARN polymérase de type II responsable de la transcription de l'ADN en ARNm. La protéine SP1 possède un motif en doigt de zinc (Figure II.4) qui reconnaît spécifiquement les zones riches en GC. C'est un facteur de transcription général et spécifique

ubiquitaire favorisant la stabilisation de l'ARN polymérase de type II sur le gène cible et donc l'initiation de sa transcription. Le motif *cis*-régulateur CRE (pour cAMP responsive element) permet la fixation de la protéine CREB qui est dépendante de la concentration cellulaire en Amp cyclique (Ampc) pour être activée. L'Ampc est un messager second notamment impliqué dans la cascade de signalisation de la mitose, la présence de ces 2 sites CRE pourrait jouer un rôle dans l'activation du gène lors des phases de division cellulaire.

La même équipe a ensuite vérifié que cette région promotrice était fonctionnelle en la clonant dans un vecteur en 5' d'un gène rapporteur : la bêta-galactosidase. Le vecteur contenant les 1500 pb en aval du +1 de traduction du gène de l'*IMPDH II* présentait une activité bêta-galactosidase 200 fois supérieure à celle du vecteur vide ; le vecteur contenant 466 pb de la région promotrice de l'*IMPDH II* induisant une activité bêta-galactosidase 70 fois supérieure au vecteur vide (Zimmermann AG et col., 1995). Cette région comporte donc bien une séquence promotrice fonctionnelle. De plus, lors de la même étude, l'équipe de Zimmermann et col. a également montré que cette région promotrice était fortement active dans les lymphocytes T activés par un stimulus induisant leur prolifération (Zimmermann AG et col., 1995). Enfin, Zimmermann et col. ont également mis en évidence une fixation *in vitro* de facteurs de transcription sur les 500 pb en 5' du site d'initiation de la traduction (+1) à l'aide de la technique DNase I footprint (Zimmermann AG et col., 1995). Cette technique dite « d'empreintes de pieds » consiste à digérer l'ADN à analyser à l'aide de la DNase I. Celle-ci étant incapable de digérer les zones protégées par un facteur de transcription fixé à l'ADN, elle laisse une empreinte sur les positions où sont fixées ces protéines (Leblanc B et Moss T, 2009).

Lors d'une deuxième étude, l'équipe de Zimmermann et col. s'est intéressée plus précisément à la régulation transcriptionnelle impliquée dans l'augmentation du pool d'ARNm de l'*IMPDH II* lors de l'activation des lymphocytes T mise en évidence par plusieurs études (Collart FR et col., 1992; Konno Y et col., 1991; Nagai M et col., 1991; Nagai M et col., 1992). L'équipe de Zimmermann et col. a réussi à démontrer que la régulation du pool d'ARNm de l'*IMPDH II* se déroulait au niveau transcriptionnel et non post transcriptionnel. Ils ont, pour cela, constaté l'absence de variation de la demi-vie de l'ARNm de l'*IMPDH II* à différents temps après activation (0h, 3h 24h et 48h) sur une population de lymphocytes primaires ce qui démontre bien l'absence de variation de stabilité de l'ARNm et donc l'absence de régulation post-traductionnelle en réponse à une activation lymphocytaire. Ils ont, par ailleurs, constaté l'augmentation de la concentration de cet ARNm pendant les 24 premières heures après activation, suivie d'une diminution entre 24 et 48h post-activation

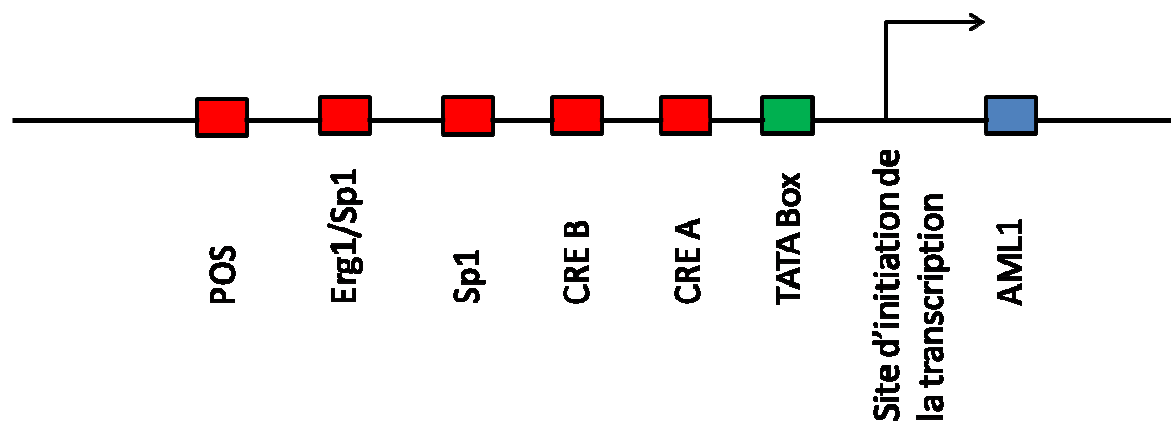
(Zimmermann AG et col., 1997). Ce résultat est en faveur d'une régulation au niveau transcriptionnel, tout comme la présence de séquences *cis*-régulatrices actives en 5' du gène de l'*IMPDH II*, mises en évidence à l'aide de la technique de l'hypersensibilité à la DNase I (Zimmermann AG et col., 1997). Cette technique permet d'identifier les zones de chromatine peu denses où l'ADN a la possibilité de s'ouvrir en simple brin afin de permettre la fixation de facteurs de transcription. En effet, la DNase I ne dégradant que l'ADN simple brin, les zones sensibles à cette enzyme sont des régions où la chromatine présente un faible taux d'enroulement. Ces régions présentant un faible taux d'enroulement permettent l'ouverture de l'ADN double brin rendant possible l'initiation de la transcription d'un gène, la polymérase de type II se fixant uniquement à l'ADN simple brin (Gregory RI et col., 2001).

De plus, l'équipe de Zimmermann et col. a également révélé l'existence d'une séquence *cis*-régulatrice supplémentaire non présente dans la base de données des sites putatifs de fixation des facteurs de transcription. Il s'agit d'un palindrome octamérique de séquence CGCATGCG en position -193 à -200pb nommé POS pour « palindromic octamer sequence » elle aussi non digérée par la DNase I, et donc en contact avec un facteur potentiellement *trans*-régulateur. Ils ont également détecté la présence d'un site AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1) sur la séquence 5' UTR du gène (position -42) (Zimmermann AG J Biol Chem 1997). La même équipe a ensuite testé la fonctionnalité de ces sites *cis*-régulateurs à l'aide de plusieurs constructions plasmidiques contenant la séquence promotrice du gène de l'*IMPDH II* en regard d'un gène rapporteur et portant chacune une mutation d'une des séquences potentiellement reconnues par les facteurs de transcription. L'étude de l'expression relative du gène rapporteur dans les différentes constructions par rapport au plasmide contrôle non muté a permis de mettre en évidence l'effet régulateur négatif de la région AML1 ainsi que l'effet activateur des régions CRE A+B, Erg1/Sp1 et POS sur la transcription du gène de l'*IMPDH II* (Zimmermann AG et col., 1997). Afin de mieux visualiser le promoteur de l'*IMPDH II* nous l'avons représenté schématiquement sur la figure II.5.

Outre cette étude approfondie de la séquence promotrice en elle-même, il a également été montré que la transcription de l'*IMPDH II* était régulée négativement par la présence de GMP (Catapano CV et col., 1995; Glesne DA et col., 1991). Cela confirme l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle dépendante de l'état de la cellule : en phase répllicative elle a besoin de beaucoup de GMP pour dupliquer son ADN ; elle active donc la transcription du gène de l'*IMPDH II*. Ceci est particulièrement vrai pour les lymphocytes qui sont dépendants de la voie *de novo* pour produire les bases puriques nécessaires à la répllication de leur ADN. Il apparaît alors intéressant d'étudier l'effet du traitement par AMP



sur la transcription du gène puisqu'en inhibant l'activité IMPDH celui-ci prive la cellule de bases puriques et donc de GMP. Il existe donc peut-être un lien entre la concentration cellulaire d'AMP et le taux de transcription des gènes de l'IMPDH, et si un tel lien existe, il pourrait alors être intéressant d'utiliser le taux de transcription de l'IMPDH comme marqueur de l'efficacité du traitement par MMF.



**Figure II.5 : Représentation schématique du promoteur du gène de l'IMPDH II : la flèche représente le site d'initiation de la transcription ; la boîte verte représente la TATA box, les boîtes rouges symbolisent les séquences cis-activatrices et la bleue la séquence cis-inhibitrice. Selon les articles de Zimmerman et col. (Zimmermann AG et col. 1995 ; Zimmermann AG et col. 1997).**

### **c. Implication de l'expression de l'IMPDH I et II chez les patients transplantés traités par MMF :**

Le but des études présentées dans ce paragraphe était de tenter d'utiliser le taux de transcription des gènes de l'IMPDH comme marqueur des variations de la pharmacocinétique du MMF. Et, si celui-ci s'avère être un bon marqueur, de chercher un lien significatif entre taux de transcription et la survenue de rejets aigus.

L'équipe de Sanquer S et col. est la première à avoir étudié l'expression des gènes des deux isoformes de l'IMPDH chez des patients transplantés (Sanquer S et col., 2008). Lors de cette étude ils ont confirmé que l'activité IMPDH était augmentée chez les patients transplantés rénaux stables (à partir de M3 post-transplantation) traités par MMF. La même équipe avait déjà publié cette observation lors d'une précédente étude (Sanquer S et col., 1999). Les auteurs démontrent que cette augmentation de l'activité IMPDH chez les patients stables est associée à l'augmentation de la transcription des deux gènes de l'IMPDH dans les

cellules sanguines mononucléées (Sanquer S et col., 2008). Ils ont également rapporté une augmentation de la transcription de l'*IMPDH I* durant les trois premiers mois post greffe (Sanquer S et col., 2008). Grâce à une expérience permettant de comparer l'expression de chaque isoforme de ces deux gènes dans les lymphocytes et dans les monocytes, les auteurs ont pu mettre en évidence que l'augmentation de l'expression de l'*IMPDH I* concerne préférentiellement les monocytes tandis que celle de l'*IMPDH II* est équivalente dans les deux types cellulaires étudiés (Sanquer S et col., 2008). Cette même étude a également démontré que l'augmentation de l'activité IMPDH précédemment observée chez les patients transplantés en réponse au pic de concentration d'AMP peut être expliquée par l'augmentation de la transcription des deux isoformes de l'IMPDH dans les cellules mononucléées sanguines et non dans les érythrocytes comme il en avait été fait l'hypothèse lors de précédentes études (Griesmacher A et col., 2000; Sanquer S et col., 1999; Weigel G et col., 2001). Cependant les résultats de cette étude sont à prendre au conditionnel car, comme le soulignent les auteurs eux-mêmes, la difficulté à isoler les ARNm provenant des cellules sanguines d'un patient ne leur a pas permis d'émettre des conclusions définitives à ce propos. Il serait nécessaire de reproduire ce type d'expérience sur un échantillon plus important.

Une autre étude de Bremer S et col. rapporte une activation significative de la transcription de l'*IMPDH I* dans le sang total, les cellules CD4<sup>+</sup> et les réticulocytes, immédiatement après l'initiation du traitement immunosuppresseur. L'*IMPDH II* présente quant à elle une diminution de transcription passagère dans les cellules issues du sang total ainsi que dans les réticulocytes en réponse à l'initiation du traitement (Bremer S et col., 2008). Ce même gène est, en revanche, activé dans les cellules CD4<sup>+</sup>. Concernant la deuxième semaine post-transplantation les auteurs rapportent une tendance en ce qui concerne l'activité transcriptionnelle des deux isoformes de l'*IMPDH*; elle serait plus importante dans les réticulocytes des patients traités par AMP par rapport au groupe témoin. Néanmoins, les auteurs concluent eux-mêmes qu'il faudrait une étude complémentaire randomisée plus importante pour pouvoir avoir la certitude que cette tendance à l'activation de l'expression des deux isoformes l'*IMPDH* soit bien attribuable à l'AMP (Bremer S et col., 2008). Cependant, aucune variation de l'expression d'une des deux isoformes de l'*IMPDH* entre les patients recevant ou non de l'AMP n'a pu être observée dans les cellules CD4<sup>+</sup> durant cette deuxième semaine post-transplantation.

L'étude de Sombogaard et col. (Sombogaard F et col., 2009) sur un échantillon de plus de 70 patients montre une augmentation de l'expression du gène de l'*IMPDH I* dans les PBMC au cours du temps suivant la transplantation, ce qui est en accord avec les résultats

décrits par les équipes de Bremer S et col. et de Sanquer S et col. (Bremer S et col., 2008; Sanquer S et col., 2008). Ils ont également mis en évidence une augmentation similaire de l'expression de l'*IMPDH II* au cours du temps suivant la transplantation.

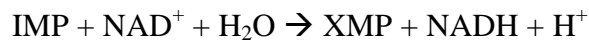
Ces effets observés sur la transcription des deux gènes de l'*IMPDH* pourraient, selon les auteurs des différentes études présentées ici, être la résultante d'une dérégulation du cycle cellulaire et de la régulation globale de la transcription induite par la dose initiale importante de cortico-stéroïdes administrée lors de l'induction du traitement immunosuppresseur (Bremer S et col., 2008; Czock D et col., 2005, Sombogaard F et col., 2009). Sombogaard et col. (Sombogaard F et col., 2009) proposent une autre hypothèse permettant d'expliquer cette induction de la transcription des gènes de l'*IMPDH* induite par le traitement à l'AMP : il pourrait s'agir de la régulation du gène par le GMP intracellulaire (décrite dans la littérature par Glesne DA et col., 1991). En effet, l'AMP exerce son action directement sur les enzymes *IMPDH I* et *II* en empêchant la libération du produit de réactions de celles-ci, ceci entraînant une diminution du taux de GMP cytoplasmique. Or, il a été montré que la régulation de la transcription des gènes de l'*IMPDH* était sous le contrôle de cette concentration.

De plus, lors de l'étude de Sanquer S et col., une augmentation drastique de la transcription (X20) de l'*IMPDH I* a été observée dans le cas de deux patients ayant présenté un épisode de rejet aigu. L'augmentation importante du pool d'ARNm de l'*IMPDH I* durant les premiers mois post-transplantation pourrait donc servir de marqueur précoce de la survenue d'épisode de rejet. D'autres études avaient également constaté une association significative entre l'augmentation de l'expression de l'*IMPDH II* dans les cellules CD4<sup>+</sup> en période pré-greffe et l'augmentation de l'incidence de rejets aigus (Bremer S et col., 2008; Glander P et col., 2004). Partant de ces observations, l'équipe de Sombogaard et col. a voulu confirmer ou infirmer la relation entre fort taux d'expression des gènes de l'*IMPDH* et apparition de rejet aigu. Les auteurs ont pu mettre en évidence une tendance montrant un taux d'ARNm des deux gènes de l'*IMPDH* pré-transplantation plus important chez les patients ayant présenté un épisode de rejet aigu. Cependant le biais important présent dans cette étude du fait de la forte instabilité des échantillons d'ARN ayant entraîné l'absence de données complètes pour chacun des patients ne permet pas de conclure avec certitude sur une éventuelle relation entre taux d'ARNm d'*IMPDH* pré-transplantation et incidence de rejets aigus. Il existe donc des pistes laissant imaginer qu'il serait possible de se servir du taux de transcription des gènes de l'*IMPDH* comme marqueur précoce du rejet, mais il est nécessaire de confirmer ces observations par des études complémentaires.

## C. Les méthodes de dosage de l'activité IMPDH :

Dans le cadre du STP du MMF il est intéressant de pouvoir mesurer un paramètre autre que la concentration sanguine d'AMP. C'est dans ce contexte que les premières études permettant de quantifier l'activité IMPDH ont vu le jour. En effet, l'IMPDH étant la cible du mycophénolate, l'activité de celle-ci donne un bon indice sur l'efficacité du traitement.

La première étude à ce sujet est celle de l'équipe de Balzarini et col. publiée en 1992 (Balzarini J et De CE, 1992). La méthode décrite dans cette publication est basée sur le fait que la réaction d'oxydation catalysée par l'enzyme est équimolaire et qu'elle correspond à l'équation :



Quantifier la vitesse de disparition d'un des substrats ou celle de la formation d'un des produits suffit donc à évaluer l'activité enzymatique de l'IMPDH. Balzarini et col. ont basé leur méthode sur la quantification d'un isotope radio-marqué de l'hydrogène ( $^3\text{H}$ ) relargué dans le milieu réactionnel grâce à l'utilisation de substrats tritiés. Au cours de cette étude, deux substrats radio-marqués au tritium ont été testés : l'[2,8- $^3\text{H}$ ]hypoxanthine ([2,8- $^3\text{H}$ ]Hx) et l'[2,8- $^3\text{H}$ ]inosine ([2,8- $^3\text{H}$ ]Ino), tous deux analogues de l'IMP. Le [2,8- $^3\text{H}$ ]Hx présentait des résultats plus reproductibles, notamment en présence d'inhibiteur de l'IMPDH (Balzarini J et De CE, 1992). Cette méthode est efficace et reproductible, néanmoins l'utilisation de la radioactivité étant de plus en plus sévèrement encadrée cela rend difficile l'utilisation de cette technique en clinique. C'est pourquoi il était nécessaire de développer une méthode alternative ne faisant pas intervenir la radioactivité. Cette méthode fut néanmoins utilisée lors de certaines études sur l'activité IMPDH et sa relation avec la concentration en AMP (Langman LJ et col., 1995; Langman LJ et col., 1996; Langman LJ et col., 1997).

L'équipe d'Albrecht et col. fut la première à proposer une quantification de l'activité IMPDH à l'aide d'une méthode alternative à la radioactivité. Celle-ci est basée sur la quantification de la formation du XMP à l'aide d'une Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) couplée à une détection UV. Cette technique est réalisée sur les cellules du sang total à partir d'un prélèvement sanguin sur lequel le plasma est préalablement retiré à l'aide d'une centrifugation. Les cellules sont ensuite lysées puis incubées 30 minutes dans un

tampon phosphate à 37°C et à pH 7,4 (température et pH optimaux pour l'activité de l'IMPDH) en présence des deux co-substrats de l'enzyme en excès. La réaction est ensuite stoppée à l'aide d'acide chlorhydrique puis le XMP est dosé par CHLP-UV. Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de moles d'XMP formées par seconde et standardisées par le volume de sang total utilisé. Cette technique présente de bons résultats et une bonne sensibilité, cependant, la standardisation par le volume de sang total utilisé entraîne une variabilité inter-individu très importante (Albrecht W et col., 2000). C'est pourquoi l'équipe de Glander et col. propose une amélioration de la technique à l'aide de deux moyens, le premier étant d'isoler les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) le second étant de standardiser les résultats à l'aide d'un dosage de protéines (Glander P et col., 2001). Les PBMC sont isolés à l'aide de la technique du ficoll à partir d'échantillons sanguins, le reste de la méthode est basé sur le même principe : incubation du lysat cellulaire dans un tampon phosphate contenant les 2 co-substrats en excès puis dosage du XMP formé par CLHP-UV. La différence, outre la méthode de standardisation, avec la méthode de dosage proposée par Albrecht et col. réside dans la procédure d'élution : Albrecht et col. utilisent un gradient ionique tandis que Glander et col. préconisent une élution isocratique ce qui permet de réduire le temps nécessaire à la procédure de dosage (Glander P et col., 2001). Cependant la limite de cette méthode vient de la procédure de standardisation, en effet, les érythrocytes contenant une concentration élevée d'hémoglobine et une relativement faible activité IMPDH, la présence d'une contamination des PBMC par quelques érythrocytes entraîne une variabilité très importante des résultats obtenus par cette méthode. C'est pourquoi, quelques années plus tard, la même équipe propose une optimisation de sa méthode (Glander P et col., 2009). Il est toujours question de doser l'activité IMPDH dans les PBMC à l'aide d'une mesure de la formation de XMP par CLHP-UV, mais la standardisation est faite sur la base de l'Amp présent dans le milieu. Cette molécule est ubiquitaire et sa concentration intracellulaire est à peu près constante ce qui permet d'avoir des résultats plus comparables entre les individus. Grâce à cette nouvelle méthode de standardisation l'équipe de Glander et col. a pu mettre en évidence l'absence de variabilité due à une contamination érythrocytaire pouvant aller jusqu'à un taux de  $10^8$  érythrocytes pour  $10^7$  PBMC. La contamination usuelle étant généralement inférieure à  $3.10^7$  érythrocytes pour  $10^7$  PBMC, cette nouvelle méthode permet une comparaison entre les différents patients bien plus précise que la méthode précédente. C'est à ce jour la méthode de dosage de l'activité IMPDH la plus répandue. Il existe également une autre méthode proposée par l'équipe de Vethe NL et col. basée sur une optimisation de la technique décrite par Albrecht et col. (Albrecht W et col., 2000; Vethe NT et Bergan S, 2006)

elle présente cependant les mêmes limites que cette dernière étant basée sur une standardisation par le nombre de cellules. Celui-ci étant soumis à une forte variabilité technique et interindividuelle il offre une comparaison insuffisante entre les échantillons.

Il existe également une méthode validée et publiée par l'équipe de Bremer S et col. permettant de déterminer le taux d'expression des gènes de l'*IMPDH I* et *II* (Bremer S et col., 2007). Cette méthode est basée sur une technique de quantification relative par PCR en temps réel. Elle est sensible et reproductible cependant, une augmentation ou une diminution de la transcription d'un gène n'est pas forcément reflétée par une augmentation ou une diminution de la protéine codée par celui-ci. Elle ne peut donc pas être utilisée pour quantifier l'activité IMPDH car, comme un certain nombre de gènes, il est probable que l'ARNm soit soumis à des modifications post-transcriptionnelles ayant une influence sur la traduction de celui-ci.

Lors de mes travaux de thèse nous avons tenté d'optimiser la méthode de dosage de l'activité publiée par Glander et col. (Glander P et col., 2001) en essayant de valider la standardisation des résultats de dosage du XMP par l'ADN génomique présent dans le lysat cellulaire. Nos conclusions à ce sujet seront présentées dans la 3<sup>ème</sup> partie de la section « travaux personnels ».

# III. PHARMACOGENETIQUE DE L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE :

## A. Protéines et polymorphismes génétiques d'intérêt

Dans cette partie nous nous intéresserons à l'ensemble des polymorphismes génétiques impliqués dans la pharmacogénétique du MMF. Un tableau récapitulatif des résultats des études décrites ci-après sera présent à la fin de ce chapitre (Tableau III.1).

### 1. Les enzymes de glucurono-conjugaison (UGT)

L'AMP est métabolisé en AMPG par les UGT intestinales et hépatiques (Bullingham 1998). L'influence des différents polymorphismes connus des UGT a, de ce fait, été étudiée puisque elles sont impliquées dans la production d'AMPG et donc dans le métabolisme de l'AMP. Nous nous intéresserons ici à l'influence de ces différents polymorphismes.

#### a. L'UGT1A9

Une étude de Girard H et col. (Girard H et col., 2004) a mis en évidence l'influence de deux SNPs (T-275A et C-2152T) de l'*UGT1A9* situés au niveau du promoteur du gène. L'étude *in vitro* de ces deux SNPs à l'aide de microsomes hépatiques humains a rapporté une glucuroconjugaison de l'AMP 2,1 fois supérieure et une expression de l'enzyme plus élevée chez les porteurs de l'un de ces 2 polymorphismes (Girard H et col., 2004). L'équipe de Kuypers DR et col. (Kuypers DR et col., 2005) a montré une influence des SNPs C-2152T et T-275A de l'*UGT1A9* *in vivo*. Le fait de posséder une de ces 2 mutations entraîne une diminution significative de la  $SSC_{0-12h}$  de l'AMP d'un facteur 2 environ ( $p = 0,009$ ) (Kuypers DR et col., 2007). Cependant, lors de cette étude, cet effet semblait dose-dépendant puisqu'il n'était observé que chez les patients recevant une dose journalière de 2 g de MMF et pas chez les patients recevant une dose journalière de 1 g. Néanmoins l'équipe de Sanchez-Fructuoso AI et col. rapporte le même effet de ces SNPs sur la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP pour des patients recevant des doses faibles de MMF (Sanchez-Fructuoso AI et col., 2009). Ceci remet en cause l'hypothèse d'une association dose dépendante émise par Kuypers et col. (Kuypers DR et col., 2005). L'équipe de Van Schaik R et col. a observé un effet identique de ces deux SNPs de

l'*UGT1A9* sur la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP mais uniquement chez les patients co-traités par du tacrolimus (van Schaik RH et col., 2009). L'équipe de Johnson LA et col., quant à elle, rapporte une diminution de la concentration résiduelle d'AMP chez les patients porteurs d'un des 2 variants C-2152T ou T-275A de l'*UGT1A9* (Johnson LA et col., 2008). Cependant, à l'inverse de l'équipe de Van Schaik et col. (van Schaik RH et col., 2009), Johnson et col. n'observe un effet que chez les patients co-traités par de la ciclosporine. Toutefois, ces observations ne portaient pas sur la même variable ( $SSC_{0-12h}$  dans un cas et concentration résiduelle dans l'autre) et n'ont pas été réalisées à la même période post-transplantation. L'équipe de Baldelli S et col. ne rapporte aucun effet de ces 2 SNP (C-2152T et T-275A), néanmoins, la faible représentation des allèles mutés dans cette étude ne permet pas de tirer de conclusions satisfaisantes à ce propos (Baldelli S et col., 2007).

Par ailleurs, quelques études récentes se sont intéressées à l'influence de ces SNP (C-2152T et T-275A) sur le rejet aigu et les effets indésirables de l'AMP. L'équipe de van Schaik et col. rapporte une association significative entre la présence d'au moins un allèle muté et l'apparition de rejets aigus (OR = 13,3 ; IC<sub>95%</sub> [1,11-162,3] ;  $p < 0,05$ ) (van Schaik RH et col., 2009). L'étude de Sanchez-Fructuoso AI et col. rapporte quant à elle une augmentation de l'apparition d'effets secondaires gastro-intestinaux chez les patients porteurs des deux SNPs C-2152T et T-275A (Sanchez-Fructuoso AI et col., 2009). Aucune de ces deux associations n'a été observée lors de l'étude clinique conduite par l'équipe de Kuypers DR et col. sur une cohorte de 95 transplantés rénaux d'origine caucasienne (Kuypers DR et col., 2005).

L'équipe de Girard et col. a également mis en évidence l'influence des SNPs C-440T et T-331C de l'*UGT1A9* (en déséquilibre complet de liaison) sur la glucuroconjugaison de l'AMP ; l'*UGT* portant l'allèle muté (-440T/-331C) aurait une activité de glucuroconjugaison de l'AMP plus importante que celle portant l'allèle sauvage (Girard H et col., 2004). L'équipe de Baldelli S et col. (Baldelli S et col., 2007) a également montré un effet de cette *UGT* mutée (-440T/-331C) *in vivo* sur une cohorte de 40 patients transplantés rénaux recevant l'association MMF-ciclosporine. Les patients porteurs de l'allèle muté présentaient une  $SSC_{0-12h}$  d'AMP significativement plus élevée que les patients porteurs de l'allèle sauvage. L'étude de Jiao Z et col. n'a, en revanche, montré aucun effet de ces SNPs sur une cohorte de 42 volontaires sains chinois, néanmoins, la faible représentation de ces SNP dans cette population (FAM = 2,4%) pourrait être la cause de cet absence de résultat significatif (Jiao Z et col., 2008).

Toujours lors de la même étude *in vitro* conduite au moyen de microsomes hépatiques, l'équipe de Girard H et col. a mis en évidence qu'un autre SNP de la région



promotrice de l'*UGT1A9* (T-1887G) augmentait significativement la glucuroconjugaison de l'AMP (Girard H et col., 2004). Aucune des études cliniques ayant testé l'influence de ce SNP sur la pharmacocinétique de l'AMP n'a pu mettre en évidence de relation significative (Baldelli S et col., 2007; Jiao Z et col., 2007; Jiao Z et col., 2008).

Une autre étude *in vitro* utilisant des microsomes hépatiques humains a montré que l'allèle *UGT1A9*\*3 (T98C) était responsable d'une diminution de la clairance intrinsèque de production d'AMPG (Bernard O et Guillemette C, 2004). Les résultats des études cliniques ayant étudié ce SNP sont unanimes. Il a pour effet d'augmenter la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP que ce soit chez des volontaires sains (Levesque E et col., 2007) ou chez des patients transplantés rénaux en période précoce post transplantation (J7) (Kuypers DR et col., 2005) ainsi qu'en période stable (M12), quel que soit l'ICN utilisé (ciclosporine ou tacrolimus) (van Schaik RH et col., 2009). Il est néanmoins à noter que ce SNP présente une fréquence extrêmement faible dans la population. L'étude de Van Schaik n'a trouvé aucune association entre ce SNP et sur le risque de rejet aigu ou d'effets indésirables (leucopénie ou troubles gastro-intestinaux) (van Schaik RH et col., 2009).

Aucune étude clinique, autre que celles déjà évoquées, n'a à ce jour étudié l'influence des polymorphismes de l'*UGT1A9* sur la réponse au traitement par AMP.

## **b. L'UGT1A8**

L'allèle *UGT1A8*\*3 (G830A) est responsable d'une diminution d'un facteur 5 de la vitesse de métabolisme de l'AMP (Bernard O et Guillemette C, 2004). Une étude *in vitro* réalisée par la même équipe avec des cellules (HEK : *Human Embryonic Kidney cells*) transfectées avec différents variants du gène de l'*UGT1A8* (\*2, \*3 ; \*5 ; \*7 ; \*8 et \*9) a permis de mettre en évidence une diminution de la production d'AMPG de l'ordre de 3 à 80 fois en comparaison à des cellules HEK transfectées avec l'*UGT1A8* sauvage (Bernard O et col., 2006). Néanmoins, les 3 études cliniques s'étant intéressées à cet allèle *UGT1A8*\*3 n'ont pu mettre en évidence aucune influence sur la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP (Johnson LA et col., 2008; Levesque E et col., 2007; van Schaik RH et col., 2009). La faible fréquence de cet allèle (< 5%) ou la faible participation de cette UGT dans la métabolisation de l'AMP pourraient être responsables de cette absence de relation observable lors des études cliniques.

Il existe deux études cliniques montrant un effet de l'allèle *UGT1A8*\*2 (C518G) de cette même UGT sur la pharmacocinétique de l'AMP. Johnson LA et col. rapportent une association entre ce variant et une augmentation de la concentration résiduelle d'AMP chez des patients transplantés rénaux et pancréatiques à un mois post greffe et co-traités par du

tacrolimus (Johnson LA et col., 2008). L'équipe de Van Schaik et col. a observé, pour le même SNP, une augmentation de la SSC<sub>0-12h</sub> d'AMP chez des patients transplantés rénaux co-traités par de la ciclosporine, à 12 mois post greffe (van Schaik RH et col., 2009). L'étude *in vitro* de l'équipe de Bernard O et col. montre une réduction significative de la vitesse de formation de l'AMPaG par l'isoforme \*2 de l'UGT1A8 en comparaison à l'enzyme sauvage (\*1). Ils concluent néanmoins à une influence négligeable de l'allèle \*2 sur l'activité de l'UGT1A8 (Bernard O et col., 2006).

### c. L'UGT2B7

Il a également été montré dans l'unité que la production de l'AMPaG est sous le contrôle de l'UGT2B7 (Picard N et col., 2005). Djebli et col. ont ensuite étudié l'influence de deux polymorphismes, présents au niveau du promoteur et de l'exon 2 de l'*UGT2B7*, sur la production d'AMPaG *in vitro* à l'aide de microsomes hépatiques humains et *in vivo* sur une cohorte de 82 patients transplantés rénaux ayant des co-traitements différents (tacrolimus, sirolimus, ou ciclosporine). Il s'agit des SNPs G-842A et C802T qui sont en parfait déséquilibre de liaison inverse, c'est-à-dire que si un individu possède 1 allèle sauvage pour le SNP G-842A il possède alors un allèle muté pour le C802T et inversement. L'étude *in vitro* a permis de montrer que la production d'AMPaG était 1,25 à 1,5 fois supérieure pour les microsomes porteurs d'au moins un allèle muté comparés aux homozygotes sauvages pour le SNP du promoteur de l'*UGT2B7* (Djebli N et col., 2007). Lors de l'étude *in vivo*, cette association entre l'allèle muté et l'augmentation de production d'AMPaG fut retrouvée uniquement chez les patients co-traités par le sirolimus. Les patients recevant de la ciclosporine ou du tacrolimus en association avec le MMF ne présentaient pas de différence significative d'exposition à l'AMPaG en fonction du génotype de l'*UGT2B7*. Il apparait donc que cet haplotype de l'*UGT2B7* n'aurait une influence que chez les patients co-traités au sirolimus. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une compétition entre l'AMP et le tacrolimus (ou la ciclosporine) au niveau de la glucuroconjugaison par l'UGT2B7 (Djebli N et col., 2007). Ces deux ICN ont en effet été décrits comme des substrats de cette enzyme de façon minoritaire (Strassburg CP et col., 2001). L'équipe de Van Schaik n'a pas retrouvé d'association entre cet haplotype et l'exposition à l'AMP (van Schaik RH et col., 2009). Cependant, lors de cette étude, tous les patients étaient co-traités par du tacrolimus, or Djebli N et col. ne rapportent un effet que chez les patients co-traités par le siromimus. L'équipe de Van Agteren M et col. ne rapporte pas non plus d'association entre la pharmacocinétique de l'AMP ou de l'AMPaG et cet haplotype (van Agteren M et col., 2008). Lors de cette même

étude Agteren M et col. n'observent pas non plus d'association entre cet haplotype et la survenue de troubles gastro-intestinaux sur un échantillon de plus de 330 patients Caucasiens transplantés rénaux (van Agteren M et col., 2008). Contrairement à l'équipe de Yang JW et col. qui montre une baisse de la fréquence d'apparition de troubles gastro-intestinaux chez les individus porteurs de l'haplotype muté (Yang JW et col., 2009), les patients recrutés lors de cette étude étaient majoritairement d'origine hispanique.

## 2. Les protéines de transport transmembranaires

### a. Les OATP

Les transporteurs transmembranaires jouent également un rôle important dans la pharmacocinétique puisqu'ils contrôlent le passage (influx ou efflux) cellulaire au niveau hépatique, et intestinal. Les transporteurs d'influx ont jusqu'à présent été assez peu étudiés. C'est pourquoi, une étude récente de notre équipe s'est intéressée aux variations génétiques des transporteurs de capture présents sur la membrane sinusoidale des hépatocytes : les OATP (*Organic Anion Transporting Polypeptides*). Une étude portant sur des patients Japonais avait déjà rapporté une association entre le polymorphisme des OATP1B1 et 1B3 et la pharmacocinétique de l'AMP (Miura M et col., 2007). Picard et col. se sont intéressés aux mécanismes permettant d'expliquer cette association (Picard N et col., 2010). Les résultats de l'étude *in vitro* sur la lignée HEK293T transfectée avec les OATP1B1 et 1B3 montrent qu'ils ne prennent en charge que le métabolite majoritaire de l'AMP : l'AMPG. Or, comme nous l'avons déjà vu, l'AMPG a une influence sur la pharmacocinétique de l'AMP puisqu'il participe aux variations de la  $SSC_{0-12h}$  totale d'AMP (10 à 60%) via le cycle entéro-hépatique (voir paragraphe I.C.3). Picard et col. ont donc étudié l'influence des différents polymorphismes connus de ces deux OATP sur la pharmacocinétique de l'AMP. Le SNP T334G du gène *SLCO1B3* (codant pour la protéine OATP1B3) entraîne une réduction significative de la  $C_{max}$  et de la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP chez les patients non traités par la ciclosporine (la ciclosporine étant inhibitrice du cycle entéro-hépatique de l'AMPG). Cette association s'explique par une réduction de la capture de l'AMPG sanguin par les hépatocytes et donc par une réduction du cycle entéro-hépatique de l'AMP (Picard N et col., 2010). Aucune association significative entre le polymorphisme du gène *SLCO1B1* (codant pour la protéine OATP1B1) n'a pu être mise en évidence dans cette étude. Cela s'expliquerait par une activité modeste de cette isoforme en regard de celle de l'isoforme 1B3 (Picard N et col., 2010). La découverte de l'implication du polymorphisme des OATPs dans la

pharmacocinétique de l'AMP étant très récente, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude clinique mettant en évidence une variation des effets de l'AMP associée à l'un de ces SNPs.

## **b. MRP2**

La protéine MRP2 (codée par le gène *ABCC2*) fait également partie des transporteurs pouvant influencer la pharmacocinétique de l'AMP. Elle est présente au niveau apical des hépatocytes et pourrait également participer au cycle entéro-hépatique de l'AMP. L'étude de Naesens M et col. rapporte une association entre le SNP C-24T présent sur le promoteur du gène *ABCC2* et l'augmentation de la concentration résiduelle et de la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP chez 95 patients transplantés rénaux co-traités par tacrolimus (Naesens M et col., 2006). Cependant, plusieurs autres études n'ont pas retrouvé cette association, qu'elles soient conduites chez des patients co-traités par ciclosporine (Baldelli S et col., 2007; Kuypers DR et col., 2008; van Schaik RH et col., 2009; Zhang WX et col., 2008) ou par tacrolimus (Kuypers DR et col., 2008; Miura M et col., 2007; van Schaik RH et col., 2009).

Dans la même étude, l'équipe de Naesens M et col. a décrit un effet similaire du SNP C3972T du gène *ABCC2* à celui observé pour le SNP C-24T sur la concentration résiduelle et la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP (Naesens M et col., 2006). Cet effet de l'allèle 3972T sur la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP n'a pas été retrouvé par Van Schaik et col. dans leur étude concernant plus de 330 patients transplantés rénaux (van Schaik RH et col., 2009). Ce SNP est le seul, concernant le gène *ABCC2*, à avoir fait l'objet d'études sur son implication éventuelle dans l'apparition de troubles gastro-intestinaux. L'étude de Naesens M et col. rapporte une augmentation significative de la survenue d'épisodes de diarrhée chez les patients porteurs de l'allèle muté (Naesens M et col., 2006). Les 2 autres ne retrouvent pas d'association entre ce SNP et l'apparition de troubles gastro-intestinaux (Miura M et col., 2007; Yang JW et col., 2009).

L'étude de Zhang WX et col. est la seule à montrer un effet du SNP G1249A de *MRP2*. Les porteurs de l'allèle muté présentaient une  $SSC_{0-12h}$  d'AMPaG 1,5 fois plus élevée que les individus sauvages (Zhang WX et col., 2008). Cependant cette différence de  $SSC_{0-12h}$  d'AMPaG n'avait pas de répercussion significative sur la  $SSC_{0-12h}$  d'AMP lors de cette étude. Les deux autres études traitant de ce SNP ne trouvent également aucun effet sur la pharmacocinétique de l'AMP et n'ont pas pu confirmer l'observation de Zhang WX et col. concernant l'AMPaG n'ayant pas de données cliniques sur les concentration de ce métabolite (Baldelli S et col., 2007; Naesens M et col., 2006).

### 3. L'IMPDH :

#### a. L'IMPDH I :

Comme nous l'avons vu, le gène de l'IMPDH I permet la transcription de plusieurs ARNm codant pour des isoformes différentes. Nous nous intéresserons uniquement à l'isoforme principale au cours de ce paragraphe. Une vingtaine de variants putatifs ont été rapportés sur la base de données du NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=3614&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN%27](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=3614&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN%27)). Cependant ces variants provenant généralement de projets de séquençage à grande échelle, ils ne sont, la plupart du temps, pas associés à des données fonctionnelles. Nous nous intéresserons donc uniquement aux variants publiés dans la littérature.

Certains variants de l'*IMPDH I* sont décrits dans la littérature comme étant la cause d'une maladie autosomale-dominante : la rétinite pigmentaire (ou *retinitis pigmentosa*). C'est une maladie génétique dégénérative touchant les cellules photo-réceptrices de l'individu atteint et conduisant, à terme, à la cécité. Nous ne nous intéresserons pas non plus à ces variants, n'ayant pas d'impact connu sur la réponse au traitement par MMF.

Il n'existe actuellement qu'une seule étude ayant testé l'influence des variations génétiques de l'*IMPDH I* sur la survenue d'effets indésirables et l'incidence de rejets aigus chez les patients traités par MMF. Il s'agit de l'étude de Wang et col. (Wang J et col., 2008) durant laquelle le gène de l'*IMPDH I* a été séquençé chez 30 patients transplantés hépatiques afin d'identifier de nouveaux variants. Les polymorphismes identifiés ont été génotypés par la suite sur un échantillon de 191 patients transplantés rénaux. Cet échantillon de patients transplantés rénaux était traité par une dose ajustée de MMF utilisée en combinaison avec un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus). Le séquençage a permis de mettre en évidence deux nouveaux SNP non –synonymes au niveau des exons 10 et 15 du gène de l'*IMPDH I* en position 898 (G>A) et 1552 (G>A) et conduisant aux modifications d'acides aminées Asp301Asn et Gly519Arg respectivement. Cependant, aucun effet significatif de ces 2 SNPs n'a pu être mis en évidence que ça soit sur la production de l'enzyme, son activité ou encore sa capacité à se tétramériser et à fixer ses substrats.

15 autres SNPs introniques ou synonymes furent également observés à l'aide du séquençage. Le génotypage de ces 17 SNP sur la cohorte de 191 patients transplantés rénaux a permis de mettre en évidence une association entre 2 SNP de l'intron 7 (rs2278293 (G>A) et

rs2278294 (G>A)) et l'incidence du rejet aigu : odds ratio de 2,94 (IC<sub>95%</sub> [1,32-6,66] ; p=0,008) et 2,50 (IC<sub>95%</sub> [1,12-5,55] ; p=0,02) respectivement. Aucun des SNPs génotypés sur cet échantillon de 191 patients n'a pu être associé à une augmentation ou une diminution de l'incidence du risque de leucopénie. Selon les connaissances actuelles, il n'existe donc que 2 SNPs (rs2278293 et rs2278294) de l'*IMPDH I* ayant une influence sur l'effet du MMF chez les patients transplantés. Nous nous sommes proposé de vérifier ces conclusions au cours de ma thèse sur un échantillon de plus de 400 patients, nos conclusions à ce sujet ont fait l'objet d'un article scientifique présenté en partie « Travaux personnel » de ce manuscrit.

## **b. L'IMPDH II :**

Comme pour l'*IMPDH I* il existe un certain nombre de variants du gène de l'*IMPDH II* référencés dans la base de données du NCBI disponible en ligne à cette adresse : [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=3615&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN%27](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=3615&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN%27) . Nous ne nous intéresserons ici qu'aux variants ayant fait l'objet de publications.

La première étude portant sur les variations alléliques du gène de l'*IMPDH II* est celle de Wang J et col. (Wang J et col., 2007). Cette équipe a séquencé l'ensemble des 14 exons, les régions flanquantes introns-exons ainsi que les 300 premières bases de la région promotrice du gène sur un échantillon de 152 ADN génomiques issus de patients transplantés. Ils n'ont identifié que deux SNPs exoniques, dont un synonyme. Il s'agit des SNPs 417C>T (Phe139Phe) sur l'exon 5 et 787C>T (Leu263Phe) sur l'exon 7, tous deux présentant une fréquence de l'allèle minoritaire (FAM) d'environ 1% (1,2 et 1% respectivement). 7 SNPs introniques ont également été mis en évidence lors de cette étude et seul le SNP IVS7+10T>C (rs11706052) possédait une FAM supérieure à 10%, les autres présentaient des FAM comprises entre 0,5 et 1,9%. Nous reparlerons du SNP IVS7+10T>C (rs11706052) qui a fait l'objet d'études ultérieures sous une autre nomenclature : T3757C. Nous avons également vérifié son impact sur une population de plus de 400 patients lors de ma thèse dont les résultats seront présentés dans l'article 2 en partie « travaux personnels ». Lors de cette même étude, l'équipe de Wang et col. s'est ensuite intéressée aux conséquences fonctionnelles *in vitro* du SNP non synonyme 787C>T au moyen d'une enzyme recombinante produite par *E coli*. L'enzyme recombinante mutée présentait des paramètres cinétiques similaires à celles de l'enzyme sauvage en ce qui concerne la fixation des deux co-substrats ainsi que celle de l'AMP. Néanmoins, le coefficient catalytique ( $k_{cat}$ ) était diminué d'un facteur 10 pour l'enzyme mutée par rapport à l'enzyme sauvage, ce qui indique une diminution de la vitesse

de réaction. Cependant la pertinence de ces résultats *in vitro* devra être vérifiée *in vivo*, d'autant plus que la même équipe conclut dans une étude ultérieure qu'étant donné la rareté de ce SNP dans la population (< 0,3% sur une cohorte de 168 patients), il est peu probable qu'il ait un impact important sur l'ensemble de la population traitée au MMF (Wang J et col., 2008). Une autre étude conduite par Garat A et col. arrive à la même conclusion n'ayant pas retrouvé ce SNP sur un échantillon de 96 patients (Garat A et col., 2009). Nous traiterons également de ce SNP dans le deuxième article présenté au cours de cette thèse en partie « travaux personnels ».

Le SNP IVS7+10T>C (rs11706052) ou encore T3757C, auquel nous ferons maintenant référence à l'aide de la nomenclature rs11706052, est celui possédant la FAM la plus importante dans la population (variant de 10 à 18% selon la sous population étudiée). C'est pourquoi, bien qu'intronique donc sans effet sur la séquence directe de la protéine, il a fait l'objet de plusieurs études visant à évaluer son impact sur le traitement par MMF. Les résultats de ces études sont divergeants : Grinyo J et col. rapporte une association significative entre ce SNP et l'incidence de rejets aigus prouvés par biopsies (RAPB) chez 237 patients traités par MMF, qui serait multipliée par un facteur 3 chez les individus porteurs d'au moins un allèle variant (OR : 3,39 IC<sub>95%</sub>[1,42-8,09] ; p=0,006) (Grinyo J et col., 2008). L'étude de Wang J et col. ne trouve, quant à elle, aucune association entre ce SNP et l'incidence de RAPB sur un échantillon de 191 patients transplantés (Wang J et col., 2008). L'équipe de Sombogaard et col. rapporte une augmentation significative de l'activité IMPDH de 48% chez les patients porteurs d'au moins un allèle muté pour ce SNP, selon cette étude, ce variant serait responsable de 8% de la variabilité interindividuelle de l'activité IMPDH observée dans la population (Sombogaard F et col., 2009). Enfin, une étude très récente conduite par l'équipe de Winnicki et col. s'est également intéressée à ce SNP rs11706052 (Winnicki W et col., 2010). Les auteurs rapportent une FAM de 19% dans leur échantillon constitué de l'ADN génomique de 100 volontaires sains. Ces échantillons d'ADN génomique furent séquencés pour toute la région exonique du gène de l'*IMPDH II* ainsi que ses régions flanquantes introns/exons. Les auteurs ont ensuite sélectionné 20 échantillons sanguins issus des 100 volontaires sains (8 porteurs d'au moins un allèle variant pour le SNP rs11706052 et 12 échantillons de génotype sauvage pour ce même SNP). Les auteurs n'ont constaté, aucune différence significative de l'activité IMPDH entre les individus sauvages et ceux porteurs de l'allèle variant, contrairement à l'équipe de Sombogaard et col. (Sombogaard F et col., 2009). De plus, cette absence de différence de l'activité fut observée aussi bien en l'absence d'AMP que sur les échantillons traités avec 3 doses d'AMP (2,5 µmol/l, 10 µmol/l, et 25 µmol/l ;

Winnicki W et col., 2010). Ils rapportent néanmoins une différence significative de la prolifération lymphocytaire en présence des 2 plus fortes concentrations d'AMP testées (10 et 25  $\mu\text{mol/l}$ ) l'inhibition de la prolifération lymphocytaire après activation à la concanavaline A par l'AMP étant significativement plus efficace sur les échantillons porteurs du génotype sauvage (Winnicki W et col., 2010). Les auteurs concluent à propos du SNP rs11706052 qu'il est associé à une réduction de l'efficacité de l'AMP à inhiber la prolifération lymphocytaire. Néanmoins ils ne proposent aucune hypothèse concernant le mécanisme potentiellement impliqué dans cette réduction de l'efficacité de l'AMP (Winnicki W et col., 2010).

Lors de la même étude l'équipe de Winnicki et col. a également mis en évidence deux SNP non décrits précédemment, tous les deux sur l'exon 11 du gène de l'*IMPDH II*. Le premier se trouve en position 1333 (1333T>A) et conduit à un changement d'acide aminé dans la séquence protéique : le résidu méthionine en position 414 est remplacé par une lysine. Le second SNP est synonyme et est présent en position 1325 (1325T>C). Ces 2 SNPs ont tous deux une FAM de 1% dans la population étudiée et n'avaient encore jamais été trouvés dans les autres populations séquencées lors d'études antérieures. Les auteurs concluent donc qu'ils ne sont pas suffisamment fréquents dans la population pour avoir un impact quantifiable sur l'ensemble de la population traitée au MMF (Winnicki W et col., 2010).

Une autre étude de Mohamed F et col. s'est intéressée aux 2 SNP non synonymes référencés sur NCBI afin de vérifier ces informations issues de projets de séquençage haut-débit. Ils se sont donc proposés de génotyper les SNP rs5848860 (1591 CTT/-) et rs11557540 (1345 A/G) sur un échantillon de plus de 400 ADN génomiques humains. N'ayant trouvé aucun allèle variant pour aucun de ces deux SNPs les auteurs concluent à une erreur de séquençage (Mohamed MF et col., 2008). Par ailleurs, cette même équipe s'est également intéressée, lors de la même étude à un autre SNP présent sur NCBI (rs4974081) se trouvant dans la zone présumée promotrice du gène de l'*IMPDH II* (en position -3624 A/G). Les auteurs reportent une FAM de 21%, proche de celle publiée sur NCBI (34%). Les résultats obtenus *in silico* indiquent que ce SNP pourrait se trouver sur une séquence impliquée dans la régulation promotrice du gène, il serait donc intéressant, selon les auteurs, de l'inclure dans les études pharmacogénétiques concernant les patients traités au MMF (Mohamed MF et col., 2008). Nous avons donc décidé d'inclure ce SNP dans notre étude ayant fait l'objet du 2ème article présent en partie « travaux personnels » afin de confirmer ou d'infirmer son influence potentielle sur le traitement par MMF.

Enfin, au cours de l'étude de Garat A et col., 3 nouveaux SNPs ont été identifiés. Cette équipe a utilisé une technique de PCR-SSCP (pour Polymerase Chain Reaction – Single



Strand Conformational Polymorphism). Cette méthode consiste à amplifier par PCR une région d'intérêt (ici la séquence exonique, les régions flanquantes intron/exon et une partie du promoteur de l'*IMPDH II*) puis de faire migrer les amplicons en conformation simple brin sur un gel d'agarose. L'ADN simple brin adopte alors une structure tridimensionnelle spécifique de sa séquence, ainsi, une séquence différente de la séquence sauvage migrera différemment. Cette technique permet de sélectionner les séquences variantes afin de les soumettre à un séquençage classique, elle avait déjà été utilisée avec succès pour la recherche de variants d'autres gènes (Cauffiez C et col., 2004; Lo-Guidice JM et col., 2002; Marez D et col., 1997). L'équipe de Garat et col. a donc utilisé cette technique de PCR-SSCP sur des échantillons d'ADN génomiques provenant de 96 volontaires et a pu mettre en évidence 3 nouveaux SNPs en plus du SNP rs11706052 déjà évoqué précédemment (Garat A et col., 2009). Ils n'ont, par ailleurs, identifié aucun autre variant malgré l'utilisation de cette technique permettant la discrimination de toutes les séquences variantes. Ils n'ont notamment pas retrouvé les autres variants décrits précédemment ce qui laisse penser que la FAM de ceux-ci est inférieure à 1% dans la population testée. Concernant les 3 nouveaux SNPs, il s'agit d'une substitution au niveau du promoteur en -95 (-95C>T), d'un SNP silencieux sur l'exon 9 en position 915 (915C>G) et d'une insertion d'une Thymidine au sein du site de polyadénylation situé en 3'UTR du gène (6971Ø>T). Les FAM de ses 3 SNPs au cours de cette étude étaient respectivement de 0,5%, 0,5% et 1%. Pour les auteurs il est très peu probable que les SNPs 915C>G et 6971Ø>T aient une influence sur la réponse au traitement par le MMF, l'un étant synonyme et l'autre se trouvant en région non codante. Ils ne se sont donc intéressés qu'aux conséquences fonctionnelles du SNP -95C>T présent au niveau du promoteur du gène. Pour ce faire, des lignées cellulaires immortalisées furent transfectées par un vecteur contenant le promoteur du gène de l'*IMPDH II* sauvage ou variant en regard d'un gène rapporteur (ici la luciférase). L'activité luciférase fut alors comparée entre les deux constructions afin d'évaluer l'impact du SNP -95C>T sur l'activité transcriptionnelle du promoteur. Une réduction significative ( $p < 0,05$ ) du taux de transcription de l'ordre de 50 à 65% (selon le type cellulaire utilisée) fut observée dans les cellules transfectées à l'aide du promoteur variant en comparaison à la construction contenant le promoteur sauvage. Cette réduction du taux de transcription observée dans la construction contenant l'allèle variant de ce SNP coïncide avec le fait qu'il se trouve au sein du motif CRE(A) précédemment décrit comme étant un facteur *cis*-activateur putatif du gène de l'*IMPDH II* (Zimmermann AG et col., 1997, voir paragraphe II.B.1.b). Les auteurs concluent donc sur le fait qu'il est probable que ce SNP -95C>T ait un impact *in vivo* sur la transcription de l'*IMPDH II*. Bien que sa FAM soit trop faible (0,5%)

pour qu'il puisse avoir un intérêt majeur, il pourrait néanmoins expliquer une partie de la variabilité interindividuelle observée pour l'expression du gène de l'*IMPDH II* (Garat A et col., 2009).

**III-1 Tableau récapitulatif de l'ensemble des SNP présentés dans ce chapitre ayant au moins un effet décrit dans la littérature :**

Gène concerné	SNP	Effets <i>in vitro</i>	Effets sur la pharmacocinétique	Effets potentiels sur la réponse au traitement
<i>UGT1A9</i>	T-275A/ C-2152T	↑glucuroconjugaison de l'AMP <sup>1</sup>  ↑Expression de l'enzyme <sup>1</sup>	↓de la SSC <sub>0-12h</sub> d'AMP <sup>2,3,4</sup>  ↓[AMP] résiduelle <sup>5</sup>  Aucun effet <sup>6</sup>	↑Incidence de rejet aigu <sup>4</sup>  ↑Effets secondaires gastro-intestinaux <sup>3</sup>  Aucun effet <sup>2</sup>
	C-440T/ T-331C	↑glucuroconjugaison de l'AMP <sup>1</sup>	↑de la SSC <sub>0-12h</sub> d'AMP <sup>6</sup>  Aucun effet <sup>7</sup>	-
	T-1887G	↑glucuroconjugaison de l'AMP <sup>1</sup>	Aucune relation significative <sup>6,7,8</sup>	-
	T98C (*3)	↓ glucuroconjugaison de l'AMP <sup>9</sup>	↑de la SSC <sub>0-12h</sub> d'AMP <sup>4,10,11</sup>	Aucune relation significative <sup>4</sup>
<i>UGT1A8</i>	G830A (*3)	↓métabolisme de l'AMP <sup>9</sup>	Aucune relation significative <sup>4,5,10</sup>	-
	C518G (*2)	↓vitesse de formation de l'AMPaG <sup>9</sup>	↑de la SSC <sub>0-12h</sub> d'AMP <sup>4</sup>  ↑[AMP] résiduelle <sup>5</sup>	-
<i>UGT2B7</i>	G-842A/ C802T	↑Production d'AMPaG <sup>12</sup>	↑ Production d'AMPaG <sup>12</sup> (seulement avec sirolimus)  Aucun effet <sup>4,13</sup>	↓Troubles gastro-intestinaux <sup>14</sup> (population hispanique seulement)  Aucun effet <sup>13</sup>
<i>SLCO1B3</i>	T334G	↓ de la capture hépatique du MPAG <sup>15</sup>	↓de la SSC <sub>0-12h</sub> d'AMP <sup>15</sup>  ↓ de la C <sub>max</sub> d'AMP <sup>15</sup> (uniquement en absence de Ciclosporine)	-

<i>ABCC2</i>	C-24T	-	<p>↑ [AMP] résiduelle<sup>16</sup></p> <p>↑ de la SSC<sub>0-12h</sub> d'AMP<sup>16</sup></p> <p>→ Non retrouvé<sup>4,6,17,18,19</sup></p>	-
	C3972T	-	<p>↑ [AMP] résiduelle<sup>16</sup></p> <p>↑ de la SSC<sub>0-12h</sub> d'AMP<sup>16</sup></p> <p>→ Non retrouvé<sup>4</sup></p>	<p>↑survenue d'épisodes de diarrhée<sup>16</sup></p> <p>Aucun effet<sup>14,19</sup></p>
	G1249A	-	<p>↑ de la SSC<sub>0-12h</sub> d'AMPaG<sup>18</sup></p> <p>Aucun effet sur l'AMP<sup>6,16,18</sup></p>	-
<i>IMPDH I</i>	G898A/ G1552A	Modification de la séquence protéique <sup>20</sup>	Aucun effet <sup>20</sup>	Aucun effet <sup>20</sup>
	rs2278293 et rs2278294	-	-	↑Incidence de rejet aigu <sup>20</sup>
<i>IMPDH II</i>	C787T	Modification de la séquence protéique <sup>21</sup>  ↓K <sub>cat</sub> de l'enzyme <sup>21</sup>	Aucun effet <sup>20,22</sup> (FAM <1%)	Aucun effet <sup>20,22</sup> (FAM <1%)
	rs11706052 (T3757C)	-	<p>↑Activité IMPDH<sup>24</sup></p> <p>→ Non retrouvé<sup>25</sup></p>	<p>↑Incidence de rejet aigu<sup>23</sup></p> <p>Aucun effet<sup>20,24</sup></p>
	rs4974081	Effet putatif <i>in silico</i> <sup>26</sup>	-	-
	-95C>T	↓taux de transcription de l'enzyme <sup>22</sup>	-	-

<sup>1</sup> Girard H et col., 2004 ; <sup>2</sup> Kuypers DR et col., 2007 ; <sup>3</sup> Sanchez-Fructoso AI et col., 2009 ; <sup>4</sup> Van Schaik RH et col., 2009 ; <sup>5</sup> Johnson LA et col., 2008 ; <sup>6</sup> Baldelli S et col., 2007 ; <sup>7</sup> Jiao Z et col., 2008 ; <sup>8</sup> Jiao Z et col., 2007 ; <sup>9</sup> Bernard O et Guillermette C, 2004 ; <sup>10</sup> Levesque E et col., 2007 ; <sup>11</sup> Kuypers DR et col., 2005 ; <sup>12</sup> Djebli N et col., 2007 ; <sup>13</sup> Van Agteren M et col., 2008 ; <sup>14</sup> Yang JW et col., 2009 ; <sup>15</sup> Picard et col., 2010 ; <sup>16</sup> Naesens M et col., 2006 ; <sup>17</sup> Kuypers DR et col., 2008 ; <sup>18</sup> Zhang WX et col., 2008 ; <sup>19</sup> Miura M et col., 2007 ; <sup>20</sup> Wang J et col., 2008 ; <sup>21</sup> Wang J et col., 2007 ; <sup>22</sup> Garat A et col., 2009 ; <sup>23</sup> Grinyo J et col., 2008 ; <sup>24</sup> Sombogaard F et col., 2009 ; <sup>25</sup> Winnicki W et col., 2010 ; <sup>26</sup> Mohamed MF et col., 2008.

## B. Conclusions et perspectives

Comme nous venons de le voir, les études pharmacogénétiques concernant l'AMP sont très récentes qu'il s'agisse d'études *in vitro* sur l'effet fonctionnel des SNP décrits ou d'études cliniques *in vivo* sur leur impact au niveau de la pharmacocinétique et/ou de la pharmacodynamie de l'AMP. Les conclusions sur l'implication réelle que pourrait avoir l'utilisation de cette discipline, notamment au niveau du suivi thérapeutique de l'AMP, sont donc encore incertaines. D'autant plus que les résultats des différentes études sont parfois contradictoires. Il apparaît donc que nous manquons de données suffisamment précises pour pouvoir utiliser la pharmacogénétique en pratique clinique routinière. Il faudra multiplier les études cliniques et tenter d'y introduire le maximum de patients et de données aussi bien PK/PD que génétiques afin de s'affranchir au maximum des faux positifs et des éventuels facteurs confondants. L'objectif à moyen et à long terme est de pouvoir associer le génotype du patient aux autres paramètres cliniques permettant une meilleure adaptation de posologie ou suivi du traitement. Nous avons, lors de cette thèse, évalué l'influence de tous les SNP des gènes *IMPDH I* et *II* référencés dans la littérature comme ayant une influence sur le traitement par MMF en regroupant les données de deux grandes études cliniques. Nous espérons ainsi avoir suffisamment de données pour conclure sur l'implication du polymorphisme de ces 2 gènes sur la PK/PD de l'AMP.

**PARTIE 2 :**

**TRAVAUX PERSONNELS**

# **I. Etude approfondie de l'effet des métabolites du Mycophénolate sur l'activité IMPDH II (Article 1)**

## **A. Introduction**

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I.C.3 traitant du métabolisme de l'AMP : l'implication de ses métabolites dans la réponse du patient au traitement par le mycophénolate est encore peu claire. Il existe 2 études indiquant l'absence d'effet inhibiteur de l'AMPG sur l'IMPDH II (Bullingham et col., 1998 ; Shipkova M et col., 1999) et nous nous sommes proposés de le vérifier au cours de cette thèse. Nous nous sommes également intéressés à l'activité inhibitrice de l'AMPaG. Cette activité avait été mise en évidence (Schütz et col., 1999 ; Shipkova M et col., 1999 ; Armstrong VW et col., 2004) mais aucune étude n'avait décrit le mécanisme impliqué dans cette inhibition. Nous avons décidé de clarifier le mécanisme de cette inhibition et tenté d'extrapoler nos résultats *in vitro* à l'implication *in vivo* des métabolites à l'aide d'une étude d'accumulation dans des cellules lymphoblastoïdes T en culture.

## **B. Méthodes**

Les détails techniques et le matériel utilisé seront détaillés dans l'article 1 (**Effect of Mycophenolate Acyl-Glucuronide (AcMPAG) on Human Recombinant Type 2 Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH II)**), nous parlerons dans ce paragraphe des stratégies adoptées au cours de cette étude. Dans un premier temps nous avons travaillé *in vitro* au moyen d'incubations dans un tampon adapté à la mesure de l'activité de l'enzyme, à l'aide d'une IMPDH II recombinante humaine (rhIMPDH II). Cela nous a permis de calculer la vitesse initiale de la réaction en mesurant la concentration de produit formé (ici le NADH) en 5 minutes. Nous avons tout d'abord vérifié que cette rhIMPDH II possédait les mêmes caractéristiques cinétiques que celles précédemment décrites dans la littérature en calculant le  $K_m$  de l'enzyme pour chacun des 2 co-substrats. Nous avons également testé la stabilité de l'AMP et de ses métabolites dans le tampon utilisé lors des incubations. Nous avons ensuite estimé la concentration inhibitrice 50% ( $CI_{50}$ ) de l'AMP, l'AMPG et l'AMPaG sur l'IMPDH II. Pour l'AMP et l'AMPaG présentant une  $CI_{50}$  non nulle, nous avons ensuite calculé leurs  $K_i$

respectif et défini le mode d'inhibition impliqué à l'aide de plusieurs incubations successives avec diverses concentrations de substrats et d'inhibiteurs (voir le détail dans la partie « material and methods » de l'article 1). Enfin, nous avons testé le potentiel effet additif de différentes concentrations d'AMPaG sur l'activité de la rhIMPDH II en présence d'une concentration d'AMP correspondant à sa  $CI_{50}$ .

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des incubations *in vitro* de cellules lymphoblastoïdes T humaines (lignée JURKAT) en présence ou non des trois molécules testées afin d'estimer l'accumulation intra-cellulaire des 3 molécules. Le but était d'évaluer de façon théorique le rapport de concentration intracellulaire de ces inhibiteurs potentiels *in vivo* et, de ce fait, de pouvoir estimer si, oui ou non, les métabolites de l'AMP pourraient avoir un réel impact sur l'activité IMPDH II *in vivo*.

## C. Résumé des résultats obtenus

Les principaux résultats de cette étude sont :

- L'AMPG n'a pas d'effet inhibiteur sur la rhIMPDH II.
- L'AMPaG présente le même mécanisme d'inhibition incompétitif de la rhIMPDH II que l'AMP avec une affinité 8 fois plus faible pour l'enzyme.
- Pour voir apparaître un effet inhibiteur additif de l'AMPaG sur la rhIMPDH en présence d'AMP il faut que les deux molécules présentent un rapport de concentration minimum de 1/1.
- L'accumulation intracellulaire d'AMP dans des cellules JURKAT en culture est dix fois supérieure à celle observée pour l'AMPaG, ce qui reflète un passage de la membrane cellulaire plus important pour l'AMP que pour l'AMPaG.

L'ensemble de ces résultats est détaillé et illustré dans l'article 1 (**Effect of Mycophenolate Acyl-Glucuronide (AcMPAG) on Human Recombinant Type 2 Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH II)**).

## D. Conclusions et perspectives

Des deux métabolites testés, seul l'AMPaG possède une activité inhibitrice de la rhIMPDH II, celle-ci est de même nature que celle exercée par l'AMP avec cependant une

affinité pour l'enzyme 8 fois plus faible que l'AMP lui-même. L'effet additif de l'AMPaG sur la rhIMPDH II n'est observé qu'à partir d'un rapport de concentration de 1 pour 1, or le rapport usuel des concentrations sanguines d'AMPaG sur celles d'AMP est 5 à 10 fois plus faible. Le fait que l'accumulation intracellulaire d'AMPaG dans des cellules JURKAT soit plus faible que celle d'AMP laisse penser que le rapport de concentration AMPaG/AMP intralymphocytaire est beaucoup trop faible pour pouvoir observer un quelconque effet additionnel de l'AMPaG *in vivo* chez les patients traités par l'AMP. La concentration sanguine d'AMPaG ne devrait, par conséquent, pas intervenir dans les paramètres à prendre en compte lors de l'adaptation de posologie de l'AMP.

Afin de compléter ces travaux, il pourrait être intéressant de mesurer l'activité IMPDH à partir d'un échantillon sanguin pour observer les éventuels effets de l'AMPaG sur cette activité en présence ou non d'AMP. Ainsi nous serions encore plus proche des conditions *in vivo* réelles et nous pourrions conclure avec encore plus de certitudes sur l'absence effet additif de l'AMPaG en présence d'AMP.



## ARTICLE 1

### **Effet de l'AMP-Acyl-glucuronide (AMPaG) sur l'Inosine Monophosphate Deshydrogénase humaine recombinante de type II (rhIMPDH II)**

Gensburger O, Picard N, Marquet P.

Effect of Mycophenolate Acyl-Glucuronide (AcMPAG) on Human Recombinant Type 2

Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH II)

*Clin Chem* 2009; **55:5** 986–993

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.113936>

# **II. Polymorphismes de l'IMPDH et conséquences sur la pharmacodynamie de l'AMP (Article 2)**

## **A. Contexte et objectifs**

Comme nous l'avons vu en introduction de ce mémoire, bien que les résultats soient parfois divergents, il existe un certain nombre d'études concernant l'implication des polymorphismes des enzymes du métabolisme et des transporteurs du MMF sur sa pharmacocinétique et ses effets cliniques. En revanche, il n'existe que peu d'études pharmacogénétiques traitant du polymorphisme de l'IMPDH, cible de l'AMP. C'est pourquoi nous nous y sommes intéressés dans cette partie de ma thèse. Nous avons, dans un premier temps, tenté de mettre en évidence d'éventuels nouveaux polymorphismes de l'isoforme II de l'*IMPDH*. Dans un second temps nous avons étudié l'influence des génotypes des cinq SNP de l'*IMPDH I* et *II* décrits dans la littérature comme ayant un effet potentiel sur la pharmacodynamie de l'AMP (Wang J et col., 2007 ; Wang J et col., 2008 ; Grinyo J et col., 2008 ; Sombogaard F et col., 2009 ; Winnicki W et col., 2010 ; Mohamed F et col., 2008) en réalisant une analyse statistique multivariée intégrant des variables démographiques et pharmacocinétiques de plus de 450 patients transplantés rénaux.

L'objectif de ce travail était de confirmer ou d'infirmer les associations mises en évidence dans la littérature en prenant en compte un maximum de facteurs confondants que peuvent être l'âge, le sexe, le type de co-traitement ou encore l'exposition aux différents immunosuppresseurs.

## **B. Méthodes**

Les détails techniques et le matériel utilisé seront détaillés dans l'article 2 (**Polymorphisms in type I and II Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil**), nous présenterons ici les stratégies employées au cours de ce travail. Pour la recherche de nouveaux polymorphismes d'intérêt nous avons procédé au séquençage systématique de l'ensemble de la

séquence codante, des régions flanquantes introns/exons et d'une partie des régions non traduites 3' et 5' (3' et 5' UTR : untranslated regions) du gène de l'IMPDH II sur 80 échantillons d'ADN génomique de patients transplantés. Le séquençage a été réalisé au moyen d'une technique de PCR (polymerase chain reaction) permettant l'incorporation de nucléotides fluo-marqués (technologie BigDye ; Applied Biosystem). La lecture des séquences a été réalisée à la plateforme de séquençage du CHU et les données traitées à l'aide de logiciels informatiques (Sequencing Analysis, Applied Biosystem ; Sequencher, Gene code). Puis, nous avons génotypé (technologie TaqMan ; AB) les SNP rs2278293, rs2278294, rs4974081, rs11706052 et 787C>T sur 456 échantillons d'ADN génomique de patients issus de deux études cliniques (Apomygre ; NCT0019967 et FDCC ; NCT00166244). Le génotype de chacun de ces SNP, l'âge, le sexe, l'INC associé, sa concentration sanguine ainsi que la SSC<sub>0-12h</sub> d'AMP de chaque patient ont ensuite été utilisés comme co-variables dans une analyse statistique multivariée permettant de mettre en évidence d'éventuelles associations significatives avec la survenue d'épisodes de rejets aigus ou d'effets indésirables (leucopénie, infections).

### C. Résumé des résultats obtenus

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de nouveaux SNP de l'*IMPDH II*. Aucun allèle variant du SNP 787C>T n'a été retrouvé dans les 456 échantillons testés. Aucun des deux autres SNP de l'*IMPDH II* testés (rs4974081 et rs11706052) n'était significativement associé aux variables testées (BPAR, leucopénies, infections, CMV). Concernant l'*IMPDH I*, seul un des deux SNP testés (rs2278294) a été retenu comme une variable influençant de façon significative le risque de rejets aigus et de leucopénies. Les individus porteurs d'un allèle muté pour ce SNP avaient un risque 1,66 fois plus important de leucopénie (OR = 1,66 ; IC<sub>95%</sub> [1,11-2,48] ; p = 0,0139) et un risque diminué de moitié de présenter un épisode de rejet (OR = 0,54 ; IC<sub>95%</sub> [0,34-0,85] ; p = 0.0075).

L'ensemble de ces résultats est détaillé et illustré dans l'article 2 (**Polymorphisms in type I and II Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil**).

## D. Discussion, conclusion et perspectives

Des 5 SNP de l'*IMPDH I* et *II* testés et décrits dans la littérature comme ayant un effet potentiel sur la pharmacodynamie de l'AMP, seul le SNP rs2278294 de l'*IMPDH I* a été retenu comme variable significative lors de notre analyse multivariée. Le fait de posséder un allèle muté à cette position, diminuerait le risque de présenter un épisode de rejet et augmenterait le risque de présenter une leucopénie de manière significative.

Ces résultats viennent en partie confirmer ceux qu'avaient obtenu Wang et al (Wang J et col., 2008), qui observait également une association entre le SNP rs2278294 et le risque de rejet. L'analyse multivariée réalisée dans le cadre de notre étude prend par ailleurs en compte l'exposition des patients à l'acide mycophénolique et aux ICN, également identifiés comme des facteurs indépendants de risque de rejet.

La question en suspend concerne le mécanisme par lequel ce SNP de l'*IMPDH I* influence la réponse à l'acide mycophénolique. En effet, il est localisé en région intronique. Une étude plus approfondie de ce gène, tenant compte notamment des déséquilibres de liaison entre les polymorphismes serait donc particulièrement intéressante dans le contexte de l'amélioration du traitement par MMF.

## ARTICLE II

### **Etude des associations potentielles entre le polymorphisme des gènes de l'*IMPDH I* et *II* et l'incidence de rejets aigus ou d'effets secondaires chez les patients traités au mycophénolate mophétil.**

Olivier Gensburger, Ron H.N. van Schaik, Nicolas Picard, Yannick Le Meur, Annick Rousseau, Jean-Baptiste Woillard, Teun van Gelder, Pierre Marquet.

**Polymorphisms in type I and II Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil.**

Accepté à la publication dans *Pharmacogenet and genomics* en Juin 2010.

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833d8cf5>

### **III. Mesure de l'activité IMPDH :**

#### **A. Introduction**

A l'origine, le but de cette partie de ma thèse était de mesurer l'activité IMPDH dans des prélèvements issus de cinétiques complètes de patients transplantés rénaux et hépatiques. Cette mesure d'activité devait ensuite être mise en parallèle avec les concentrations sanguines d'AMP d'une part, les effets cliniques observés chez les patients d'autre part. En effet, comme nous l'avons déjà indiqué en introduction de cette thèse, la mesure de l'activité IMPDH pourrait être un moyen alternatif à la  $SSC_{0-12H}$  d'AMP pour évaluer l'exposition du patient au traitement.

Toutes les méthodes existantes à l'heure actuelle reposent sur le fait que la réaction catalysée par l'enzyme est équimolaire (voir paragraphe II.C). Dès lors, il suffit de mesurer la variation de concentration d'un des produits ou d'un des deux co-substrats en fonction du temps pour obtenir la vitesse de réaction de l'enzyme. La première méthode à avoir été publiée nécessitait l'utilisation d'un substrat radio-marqué au tritium ( $[2,8-^3H]$ Hyxoxanthine), analogue de l'IMP [1]. L'utilisation de la radioactivité présente des contraintes lourdes en termes d'équipement et de sécurité qui rendent cette méthode difficilement accessible à la pratique clinique routinière. Une méthode de mesure de l'activité IMPDH basée sur le dosage par CLHP-UV de XMP formé [2] a représenté la première alternative à l'utilisation de substrat radioactif. Ce dosage était effectué sur un lysat provenant de l'ensemble des cellules contenues dans le sang total et les résultats étaient standardisés par le volume de sang prélevé chez le patient. Toutefois, cette méthode présentait une forte variabilité inter-individuelle du fait de la standardisation par le volume sanguin, trop imprécise. Afin de réduire cette variabilité, Glander P et al. ont proposé des améliorations à cette technique de dosage par CLHP-UV du XMP formé [3] : la première amélioration était d'isoler les PBMC à partir du sang total à l'aide de la technique du ficoll, afin de mesurer uniquement l'activité IMPDH des cellules ciblées par le traitement par MMF ; la seconde était de standardiser les résultats à l'aide de la concentration protéique. Néanmoins, cette méthode présentait encore une variabilité interindividuelle non négligeable due à la contamination de certains échantillons par des érythrocytes lors d'une séparation imparfaite par le ficoll.

Le but de la présente étude était de transposer cette dernière technique au sein du laboratoire, puis de tenter de l'améliorer à l'aide d'une standardisation de la concentration d'XMP par la concentration en ADN du lysat cellulaire directement liée au nombre de PBMC. Pour cela, nous nous sommes inspirés d'une méthode précédemment décrite [4], basée sur la fluorescence du SYBr green, agent intercalant. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus à l'aide de ces deux méthodes de standardisation.

## **B. Matériel et Méthodes**

### **1. Echantillons sanguins, séparation et lyse des PBMC :**

Les échantillons sanguins ont été prélevés chez des patients transplantés rénaux ou hépatiques ayant tous signé un consentement éclairé pour l'utilisation de leurs prélèvements lors de protocoles de recherche. Chaque patient a fourni 12 échantillons sanguins. L'un prélevé avant la transplantation, puis 11 prélevés après transplantation, lors d'un intervalle inter-dose à l'état stable du traitement (à 1 an post-greffe), aux horaires suivants : avant la dose du matin de mycophénolate mofétil ( $T_0$ ), puis à  $T_{20\text{min}}$ ,  $T_{40\text{min}}$ ,  $T_{60\text{min}}$ ,  $T_{90\text{min}}$ ,  $T_{2\text{h}}$ ,  $T_{3\text{h}}$ ,  $T_{4\text{h}}$ ,  $T_{6\text{h}}$ ,  $T_{9\text{h}}$  et  $T_{12\text{h}}$ . A chaque temps, 5 ml de sang ont été recueillis dans des tubes avec anticoagulant (héparinate de lithium). Les cellules sanguines périphériques mononuclées (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*) ont été isolées à l'aide du kit Ficoll-Plaqué selon les recommandations du fabricant. Après comptage des cellules recueillies, celles-ci ont été re-suspendues dans un volume adéquat d'eau distillée pour obtenir une concentration d'environ  $1.10^7$  Cellules par ml et placées dans un congélateur à  $-80^\circ\text{C}$ . La lyse cellulaire était assurée par éclatement des cellules sous la pression osmotique exercée par la présence d'eau distillée ainsi que la pression physique provoquée par la congélation du liquide intracellulaire.

### **2. Incubation pour la réaction enzymatique :**

La réaction a été réalisée dans un volume total de 180  $\mu\text{l}$ , composé de 50 $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire dans 120  $\mu\text{l}$  de tampon (1 mmol/L d'IMP, 0,5 mmol/L de  $\text{NAD}^+$ , 40 mmol/L de phosphate de sodium et 100 mmol/L de chlorure de potassium à pH 7,4) et 10  $\mu\text{l}$  d'eau distillée ou d'une solution aqueuse d'AMP. Après 2h30 d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  la réaction était stoppée par addition de 20  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique glacé (4M). Les protéines ainsi précipitées sont ensuite culotées à l'aide de 2 min de centrifugation à 15 800 g. 170  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés et

ramenés à un pH neutre au moyen de 10 µl de carbonate de potassium (5M) puis stockés à -80°C jusqu'à analyse (au minimum 30 min) par CLHP-UV.

### **3. Dosage du XMP par CHLP-UV :**

La méthode utilisée était basée sur celle décrite par Glander P et col. [3], à l'exception de la colonne chromatographique, celle utilisée dans ce travail étant une colonne en acier Inertsil ODS3 5 µm (250 x 4,6 mm d.i.) (Interchim, Montluçon, France). L'élution était assurée en isocratique avec un mélange constitué d'une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 6,8 g/L tamponnée à pH 5,0 et contenant 1,6 mg/L de Hydrogénosulfate de tétra n-butyl ammonium et de méthanol dans un rapport méthanol/tampon : 88/12, (v/v). Les limites de détection et de quantification étaient de 0,1 mg/L, la méthode était linéaire pour des concentrations de XMP comprises entre 0,1 et 10 mg/L avec un coefficient de corrélation de 0,999.

### **4. Quantification de la concentration protéique :**

Un dosage de la concentration de protéines contenues dans chaque lysat cellulaire a été effectué à l'aide du kit BCA selon les recommandations du fabricant (Thermo Fisher Scientific, New-York, USA).

### **5. Quantification de la concentration d'ADN à partir du lysat cellulaire :**

500 µl de lysat cellulaire ont été mélangés à 200 µl de NaOH 1N puis soumis aux ultrasons pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été placés à température ambiante pendant la nuit puis dilués dans 500 µl de tampon potassium phosphate 1M (pH = 7,4). Une gamme de dilution en cascade (allant de 0,5 à 5 ng/l d'ADN) a été préparée en parallèle et dans les mêmes conditions. Tous les échantillons ont ensuite été dilués au dixième dans le tampon KPO<sub>4</sub> 1M pour éviter la saturation de la fluorescence. Le SYBr green (S-7525 Molecular Probes Eugene, OR, USA) a été dilué au 1/10000 extemporanément et 10 µl de cette solution pipetés dans chaque puits d'une plaque 96 noire adaptée à la fluorescence (Thermo Fisher Scientific, New-York, USA) puis laissé pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. 100 µl de solution à tester ou d'un point de la gamme ont ensuite été pipetés dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante. La fluorescence a ensuite été lue à l'aide d'un lecteur de plaque (Excitation  $\lambda = 450$  nm, lecture  $\lambda = 530$  nm, voltage 8V).



## 6. Calcul de l'activité IMPDH standardisée

Le résultat du dosage du XMP formé est obtenu en g/L. Il est rapporté en mol/L en le divisant par la masse molaire du XMP (408,17 g/mol) puis en mol/l/h en le divisant par le temps de réaction de 2,5 h. Il est enfin standardisé soit par la concentration en protéine (résultat final en nmol/h/mg de protéine) soit par la concentration en ADN (résultat final en nmol/h/mg d'ADN).

## 7. Comparaison statistique de la valeur d'activité IMPDH

### moyenne pré-transplantation et à T<sub>0h</sub>

Un test statistique de Kolmogorov-Smirnov a été effectué pour vérifier la normalité de la distribution des données à tester. La comparaison des valeurs appariées a ensuite été effectuée à l'aide du test paramétrique de Wilcoxon. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme StatView (SAS Institute, North Carolina, USA).

## C. Résultats

Dans un premier temps nous avons mesuré l'activité IMPDH pour chaque prélèvement de la cinétique complète de 11 transplantés hépatiques et 16 transplantés rénaux à l'aide de la méthode décrite par Glander P et col [3]. Le profil d'activité IMPDH moyen observé au cours des 12 premières heures après la prise de MMF était similaire à ceux reportés par les différentes études précédentes [2, 5, 6]. Il est à noter que la valeur initiale à T<sub>0h</sub> était significativement plus élevée (+0,55 nmol/h/mg de protéine en moyenne ;  $p = 0,0094$ ) que la valeur pré-transplantation quand on prenait en compte l'ensemble des activités mesurées. Cependant, après exclusion des valeurs aberrantes dues à une contamination par des globules rouges, cette différence n'était plus significative ( $p = 0,3454$ ).

L'activité IMPDH diminuait rapidement pendant la première heure après la prise de MMF, avec retour progressif à l'activité pré-dose dans les 4 heures suivantes. L'activité moyenne restait ensuite constante jusqu'à la prochaine prise de MMF.

Néanmoins, l'examen de chaque cinétique indépendamment montrait une très forte variabilité interindividuelle, se traduisant par des écarts types très importants par rapport à la courbe moyenne (figure III.1). L'analyse attentive des résultats a montré que presque tous les tubes contaminés par de l'hémoglobine donnaient des résultats aberrants. La figure III.2 présente

l'exemple d'un patient, présentant apparemment un regain d'activité IMPDH à 40 minutes puis un retour à la courbe attendue. Or, le tube contenant le lysat cellulaire de T<sub>40min</sub> était fortement contaminé par de l'hémoglobine. Notre hypothèse est que les érythrocytes ont une activité IMPDH et une concentration en protéine différentes de celles des PBMC, perturbant le rapport de l'activité IMPDH sur la concentration de protéines, qui n'est donc pas un bon moyen de standardisation.

Nous avons donc choisi d'étudier la faisabilité d'une standardisation de l'activité IMPDH par la concentration de l'ADN de l'échantillon et/ou par le nombre de cellules mesuré par le contenu en ADN, mesuré par fluorescence dans le lysat de PBMC [4]. Dans un premier temps nous avons vérifié la faisabilité de cette méthode sur un lysat obtenu par osmolarité, et non par lyse chimique comme décrit dans la méthode originale. N'ayant constaté aucune différence entre la gamme faite à partir d'une lyse physique et celle faite à partir d'une lyse chimique, toutes les expériences suivantes ont donc été faites avec une lyse par pression osmotique pour être dans les mêmes conditions que les échantillons en notre possession. Nous avons d'abord testé la méthode sur un pool de cellules lymphoïdes immortalisées en culture (lignée Jurkat) préalablement dénombré par comptage sur grille de Malassez (12.5 M de cellules) puis lysé dans les conditions définies au chapitre matériel et méthodes. Nous avons donc préparé deux gammes d'étalonnage, l'une par dilution d'un nombre connu de cellules avant hydrolyse et mesure du contenu en ADN et l'autre par dilutions successives d'une concentration connue d'ADN. Nous avons également incubé l'échantillon à tester pur et dilué au demi dans les mêmes conditions, présentées précédemment. Les deux gammes présentaient un coefficient de corrélation de  $R^2 = 0,99$  (voir figure III.3). L'absorption observée sur notre échantillon test non dilué était de 996 et de 489 pour la dilution au demi, aboutissant à une estimation de 12.8 M et 12.5 M de cellules, respectivement. La concentration d'ADN calculée pour cet échantillon était de 3,2 ng/ $\mu$ l. Nous avons ensuite testé la méthode sur des échantillons provenant de la cinétique du patient présentée en figure III.2 afin de standardiser le dosage de l'activité IMPDH par la quantité d'ADN. Les résultats (figure III.4) montrent que le point T<sub>40min</sub> (échantillon fortement contaminé par des érythrocytes) présente une surestimation plus importante que lors de la standardisation par la concentration en protéines. Ceci a été confirmé pour d'autres échantillons provenant d'autres patients.

## D. Discussion, conclusion

Pour les besoins de cette étude a été mise en place au laboratoire une méthode ex vivo de mesure de l'activité IMPDH dans le sang de patients transplantés, précédemment publiée [3]. Cette méthode nécessite l'incubation d'un lysat de PBMC avec de l'IMP et du NAD en excès et la mesure de la concentration de XMP produite par CLHP-UV. Elle suppose également la standardisation de l'activité mesurée par la concentration de protéines dans l'échantillon.

L'utilisation de cette technique pour l'analyse d'échantillons de PBMC prélevés avant la transplantation, puis lors d'un intervalle de doses de MMF sur 12h à l'état stable du traitement (un an après la transplantation) a montré que l'activité pré-dose à l'état stable du traitement n'était pas significativement différente de l'activité pré-greffe ( $p = 0,3454$ ), après exclusion des résultats faussés par une contamination hématique. Ce résultat est en accord avec la littérature puisque seules les études mesurant l'activité IMPDH dans des échantillons de sang total rapportent une différence entre l'activité pré-transplantation et celle à  $T_{0h}$ , dans le sens d'une augmentation de l'activité enzymatique résiduelle sous traitement en comparaison à l'activité pré-transplantation [2, 7]. Les études ayant travaillé sur des PBMC isolés et/ou à l'aide de la méthode de standardisation de l'activité par l'Adénosine monophosphate (Amp) ne retrouvent pas cette différence [5, 6, 8, 9].

Toutefois, la standardisation de l'activité IMPDH d'un lysat de PBMC par la concentration en protéines, telle que décrite par Glander P. et col. [3] présentait des biais trop importants dès lors que le lysat était contaminé par des érythrocytes. Ceci nous a conduits à développer une autre méthode de standardisation, basée sur la quantité d'ADN présent dans le lysat à l'aide d'une méthode de dosage par fluo-marquage inspiré d'une méthode précédemment publiée [4]. Malheureusement, cette deuxième méthode s'est avérée encore plus sensible à la contamination des échantillons par des globules rouges, probablement du fait de la présence d'IMPDH dans ces cellules anucléées (et donc dépourvues d'ADN).

Cependant, durant ces travaux, l'équipe de Berlin a publié une nouvelle méthode de standardisation de l'activité IMPDH basée sur la concentration en Amp présente dans le lysat [10]. Cette nouvelle méthode semble donner des résultats satisfaisants pour un rapport érythrocytes/PBMC pouvant aller jusqu'à 3/1. Elle présente également une bonne précision avec des coefficients de variation inférieurs à 15%. Les variations intra- et inter-séries sont également

acceptables (CV<11%). Cette méthode, que nous n'avons pas eu le temps de tester complètement, semble donc présenter de nombreux avantages et serait la meilleure actuellement pour permettre le dosage de l'activité IMPDH dans des échantillons sanguins de patients. Lors de tests préliminaires, nous avons pu vérifier la possibilité de doser l'Amp et le XMP au cours de la même analyse CLHP-UV.

## **E. Perspectives**

Maintenant que la technique de dosage de l'activité IMPDH avec standardisation par l'AMP est pratiquement au point au sein du laboratoire, il sera nécessaire de doser à nouveau toutes les cinétiques collectées afin d'étudier les relations entre concentrations plasmatiques d'AMP, activité IMPDH et effets cliniques chez des patients transplantés traités par le MMF.

## Références

- [1] Balzarini J., De Clercq E. Assay method for monitoring the inhibitory effects of antimetabolites on the activity of inosinate dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes. *Biochem J* 1992; **287** ( Pt 3):785-790.
- [2] Albrecht W, Storck M, Pfetsch E, Martin W, Abendroth D. Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Ther Drug Monit* 2000; **22**:283-294.
- [3] Glander P, Braun KP, Hambach P, Bauer S, Mai I, Roots I *et al.* Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem* 2001; **34**:543-549.
- [4] Benech H, Theodoro F, Herbert A, Page N, Schlemmer D, Pruvost A *et al.* Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal Biochem* 2004; **330**:172-174.
- [5] Vethe NT, Bergan S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4<sup>+</sup> cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit* 2006; **28**:608-613.
- [6] Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, Budde K, van der Werf M, Vulto AG *et al.* Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics* 2009; **19**:626-634.
- [7] Sanquer S, Maison P, Tomkiewicz C, Macquin-Mavier I, Legendre C, Barouki R *et al.* Expression of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II after mycophenolate mofetil treatment: a 2-year follow-up in kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **83**:328-335.
- [8] Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, Budde K, van der Werf M, Vulto AG *et al.* Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant

patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics* 2009; **19**:626-634.

[9] Glander P, Hambach P, Braun KP, Fritsche L, Giessing M, Mai I *et al.* Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**:2045-2051.

[10] Glander P, Sombogaard F, Budde K, van GT, Hambach P, Liefeldt L *et al.* Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit* 2009; **31**:351-359.

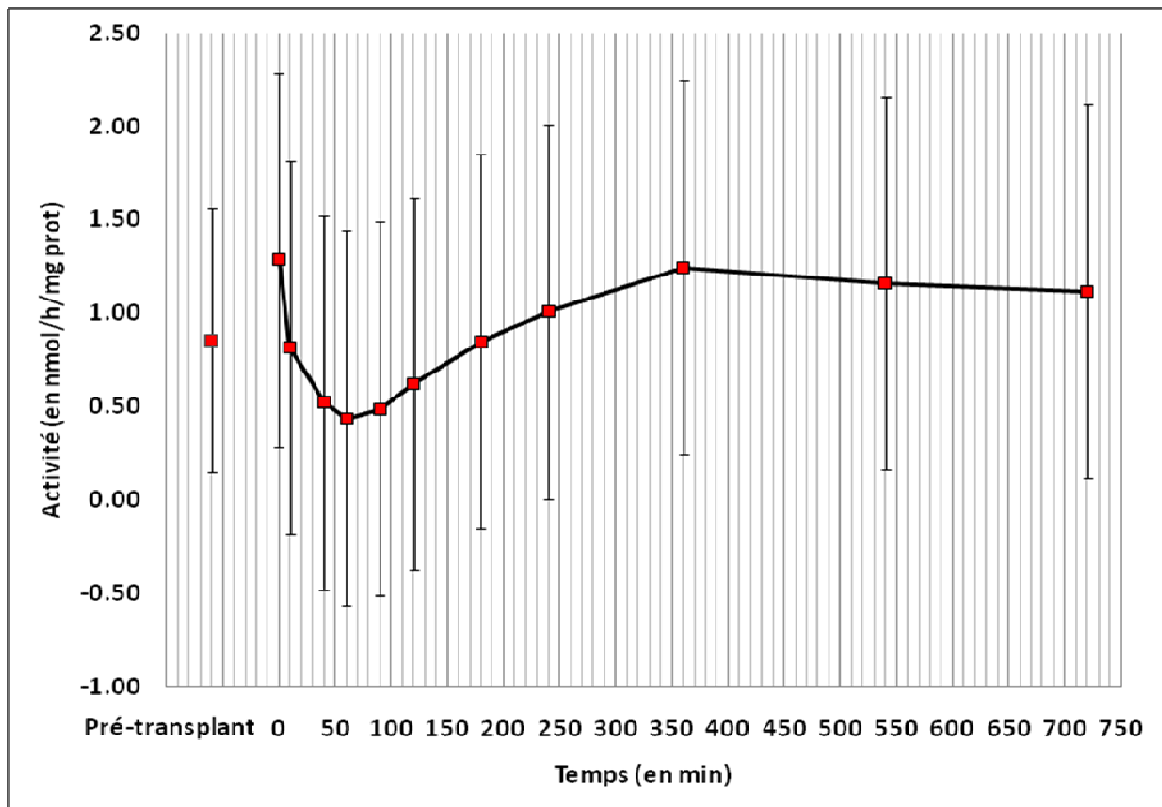


Figure III.1 : Activité IMPDH moyenne obtenue à l'aide de cinétiques de 27 patients transplantés rénaux ou hépatiques.

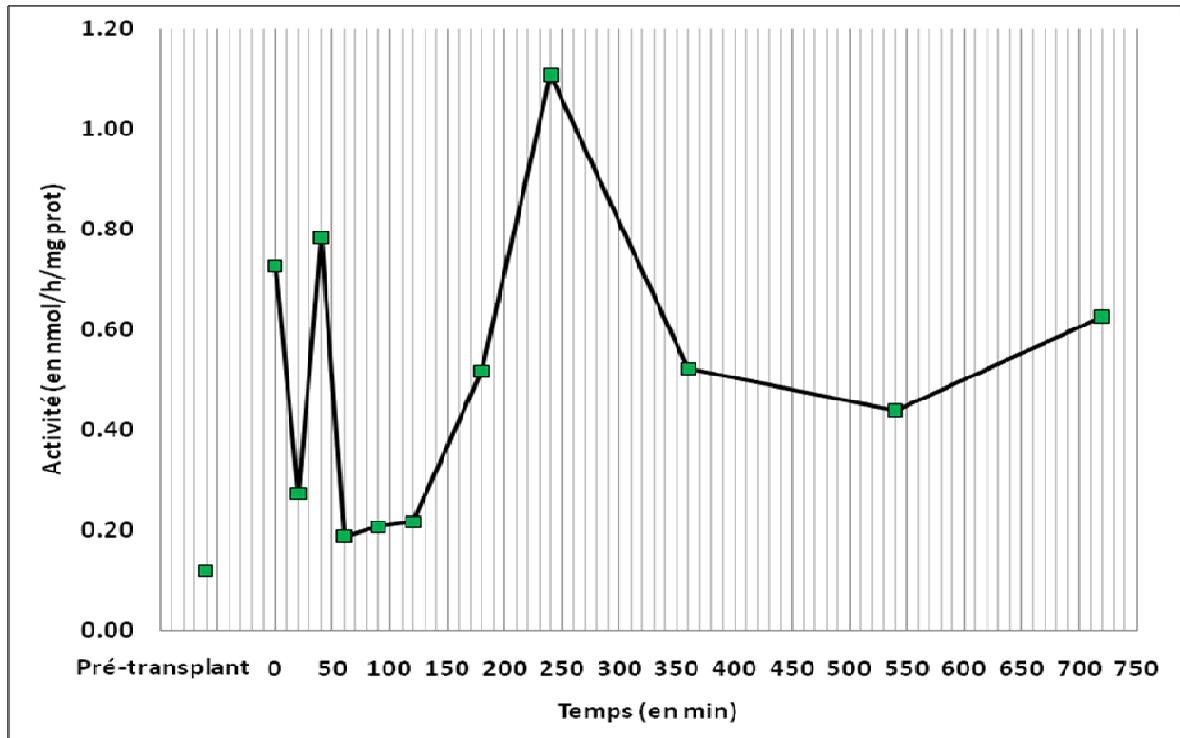


Figure III.2 : Activité IMPDH obtenue à partir de la cinétique complète d'un patient, standardisée par la concentration en protéines.

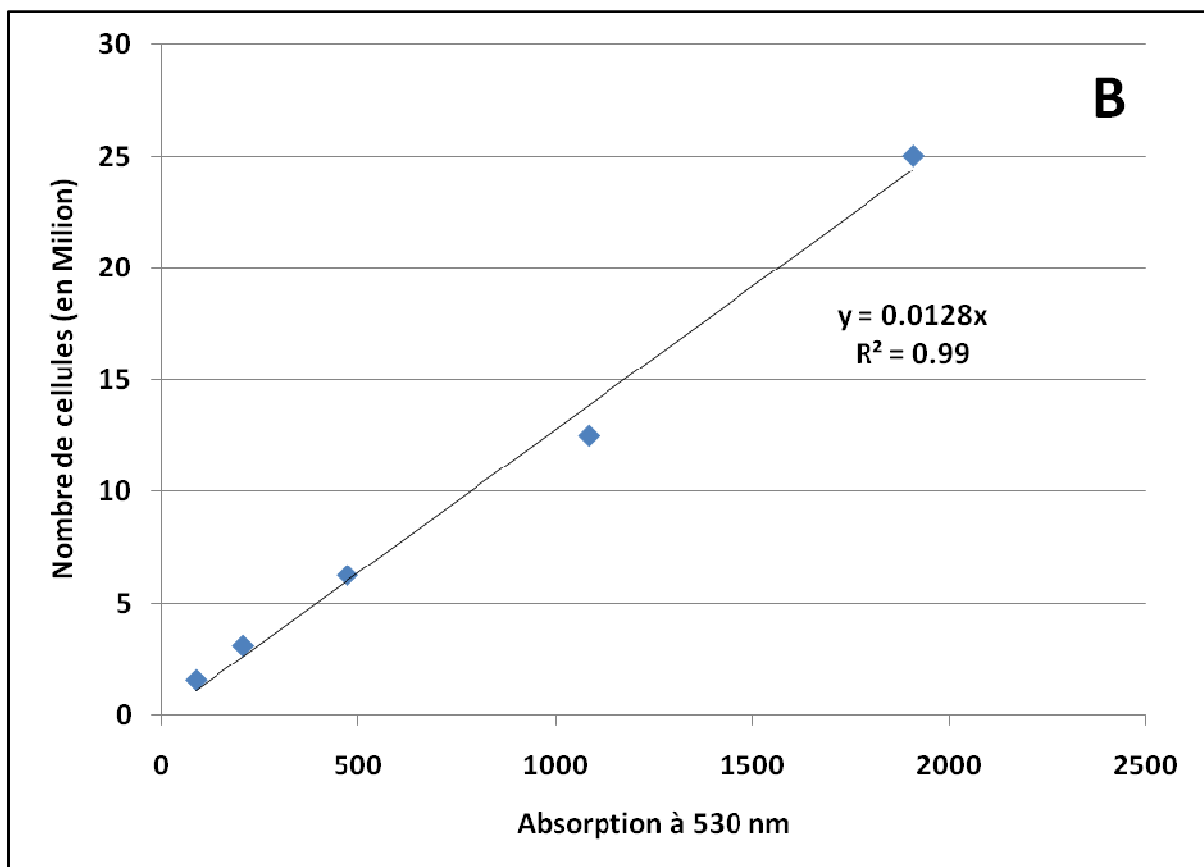
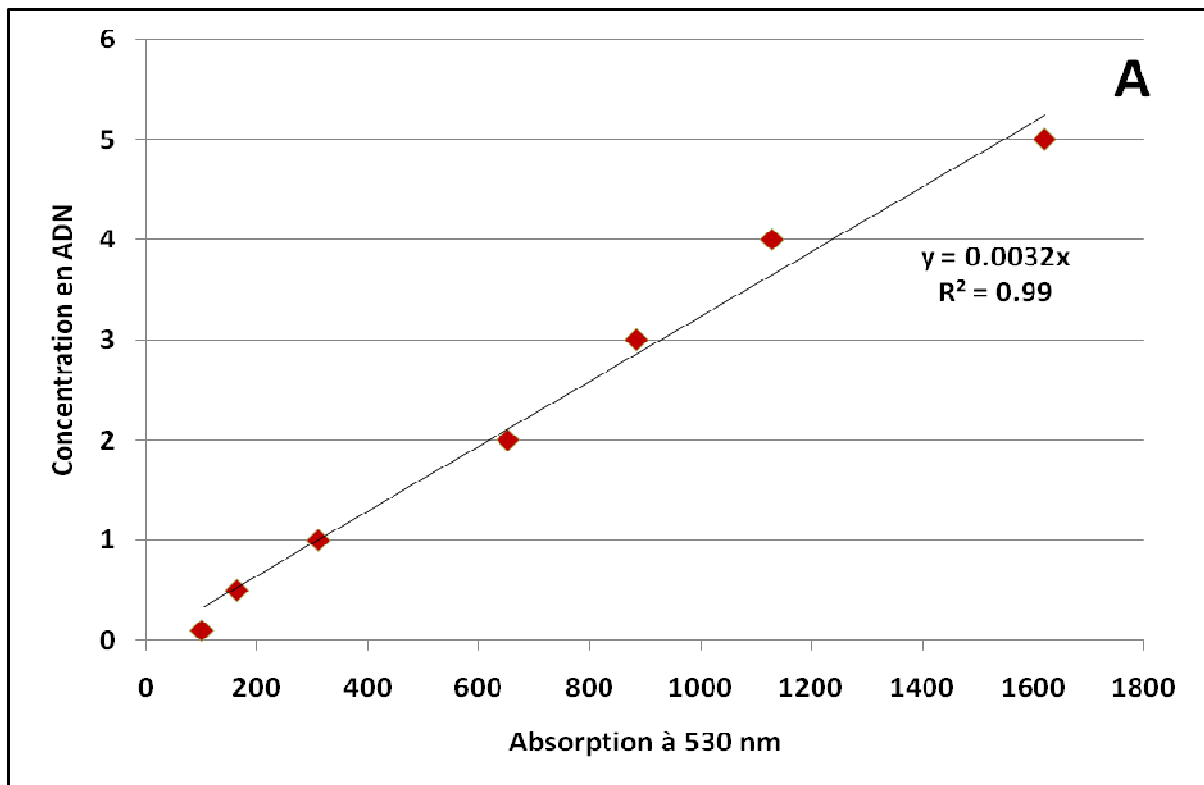
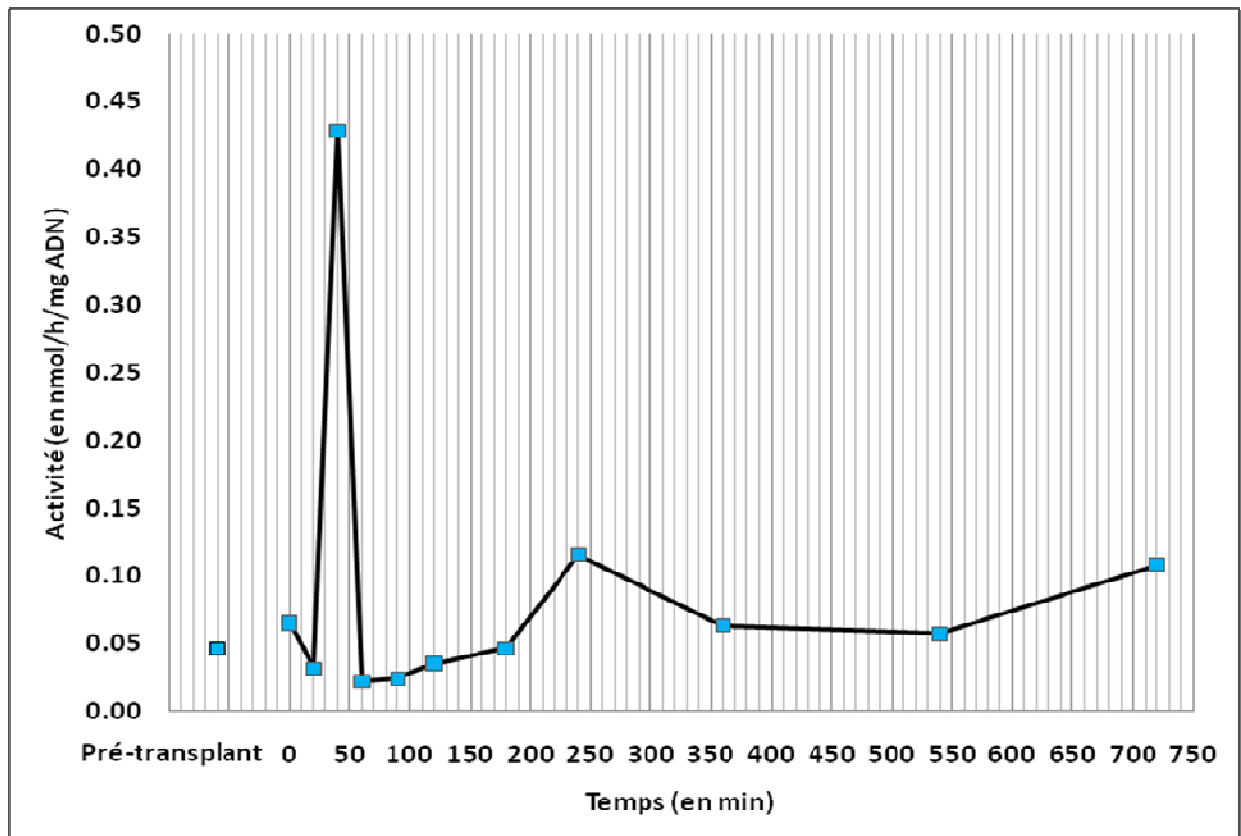


Figure III.3 : Gamme étalon de : A. La concentration d'ADN ; B. Du nombre de cellules en fonction de l'absorption à 530 nm.





**Figure III.4 : Activité IMPDH obtenue à partir de la cinétique complète du patient 6.1 standardisée par la concentration en ADN.**

**PARTIE 3 :**

**DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## IV. Discussion générale et perspectives :

Les travaux de recherche effectués pendant cette thèse ont tous eu pour objectif principal une meilleure connaissance de l'enzyme cible de l'AMP : l'IMPDH.

Dans la première partie nous nous sommes intéressés à l'activité inhibitrice des métabolites de l'AMP sur cette enzyme. Il avait déjà été rapporté dans la littérature une absence d'activité du métabolite principal l'AMPG ainsi qu'une activité inhibitrice pour un métabolite minoritaire, l'AMPaG (Bullingham RE et col., 1998; Schütz E et col., 1999; Shipkova M et col., 1999; Shipkova M et col., 1999). Cependant, pour ce dernier, le mécanisme d'inhibition exercé et son implication potentielle dans l'efficacité du traitement par AMP étaient encore peu clairs (Armstrong VW et col., 2004; Shipkova M et col., 2001). C'est pourquoi, après avoir vérifié que seul l'AMPaG possédait *in vitro* une activité inhibitrice sur l'IMPDH II, nous avons défini le mécanisme impliqué puis nous avons étudié l'impact que ce métabolite actif pourrait avoir sur l'efficacité du traitement. Le mécanisme d'inhibition s'est révélé identique à celui exercé par l'AMP : réversible et imcompétitif. Cependant, l'AMPaG possède une  $CI_{50}$  10 fois plus importante que l'AMP et une affinité pour l'enzyme 8 fois plus faible. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par l'équipe de Shipkova et col. (Armstrong VW et col., 2004; Shipkova M et col., 2001). De plus, lors de notre étude portant sur l'éventuelle additivité de l'action de l'AMPaG en présence d'AMP nous avons pu mettre en évidence son absence pour un ratio AMP/AMPaG inférieur à 1/1. Nous avons également évalué l'accumulation cellulaire respective de ces 2 molécules qui s'avère être 10 fois plus importante pour l'AMP que pour son métabolite dans des cellules lymphoblastoïdes en culture. Ceci pouvant s'expliquer par la lipophilie moindre de l'AMPaG par rapport à l'AMP qui limiterait sa diffusion passive à travers la membrane cellulaire. Le ratio plasmatique classique AMP/AMPaG est compris entre 1/2 et 1/10 chez un patient sous traitement par AMP. En émettant l'hypothèse que la membrane lymphocytaire ait une perméabilité à l'AMP et l'AMPaG similaire à celle observée sur les cellules lymphoblastoïdes en culture, on peut s'attendre à un ratio AMP/AMPaG intra-lymphocytaire de 1/20 à 1/100. Nous en concluons donc que, dans des conditions thérapeutiques normales, il est très peu probable que l'AMPaG ait un effet additif à celui exercé par l'AMP.

Les résultats de cette étude offrent des perspectives intéressantes concernant le STP de l'AMP puisqu'ils montrent que le dosage de ses métabolites n'est pas nécessaire dans le cadre de celui-ci, ce qui est un paramètre important à prendre en compte lors du choix de la méthode de

dosage de l'AMP. En effet, à l'heure actuelle, seules les méthodes utilisant la CLHP couplées à une détection UV (Shipkova M et col., 2000; Shipkova M et col., 2001) ou MS/MS (Prélaud A et col., 2004) permettent un dosage spécifique de l'AMP. Les méthodes basées sur une technique immunologique peuvent surestimer la concentration d'AMP du fait d'une réaction croisée de l'anticorps contre l'AMPaG, voir avec d'autres métabolites (Prélaud A et col., 2004), qu'il s'agisse de la technologie EMIT<sup>®</sup> (Beal JL et col., 1998; Hosotsubo H et col., 2001; Prélaud A et col., 2004; Shipkova M et col., 2000; Weber LT et col., 2002), CEDIA<sup>®</sup> (Shipkova M et col., 2010; Westley IS et col., 2006) ou, à moindre titre, Roche total MPA assay<sup>®</sup> (Brandhorst G et col., 2008; Marquet P et col., 2009). En effet, la réactivité croisée est relativement importante pour les 2 premiers (pouvant aller jusqu'à 185% et 215% selon les études, pour EMIT et CEDIA respectivement), mais beaucoup plus faible (<5% selon l'étude multicentrique parue en 2008 (Brandhorst G et col., 2008), ainsi que celle réalisée dans l'unité (Marquet P et col., 2009) avec le kit Roche total MPA assay, qui peut être considéré comme quasi-équivalent à la LC-MS/MS chez les patients transplantés rénaux (adultes ou pédiatriques) ou pulmonaires (Marquet P et col., 2009). Il est donc important de tenir compte de la méthode de dosage utilisée lors du STP effectué pour l'interprétation du résultat, ou la comparaison aux résultats antérieurs chez un même patient.

Le deuxième versant de cette thèse s'est intéressé à la pharmacogénétique de l'AMP et plus particulièrement de sa cible lymphocytaire privilégiée, l'IMPDH II et de son isoforme ubiquitaire l'IMPDH I elle aussi impliquée, dans une moindre mesure, dans la réponse au traitement par l'AMP. Les gènes codants pour ces 2 enzymes sont issus d'un seul et même gène fortement conservé au cours de l'évolution : on le retrouve avec un fort pourcentage d'homologie de séquence chez des espèces lointaines de l'homme comme par exemple *E. coli*, *S. Cerevisiae* ou encore *A. Thaliana*. C'est un phénomène connu en génétique pour des gènes porteurs d'une fonction vitale pour la survie de l'individu. En effet, une variation d'un gène entraînant une perte de sa fonction et conduisant à la mort de l'individu ne peut être transmise à la descendance ; le gène est alors qualifié de létal. C'est le cas du gène de l'*IMPDH II* chez l'homme, codant pour une protéine ayant une fonction vitale, puisque la division lymphocytaire et donc la réponse immunitaire est sous sa dépendance. La létalité de ce gène a été démontrée chez la souris où l'inactivation de celui-ci entraîne la mort de l'individu à un stade embryonnaire précoce (Gu JJ et col., 2000). C'est probablement la raison pour laquelle il n'existe que très peu de variants de l'*IMPDH II* et notamment de sa séquence codante. Les rares mutations déjà décrites sont majoritairement introniques ou synonymes. La seule mutation non-synonyme décrite par l'équipe de Wang et col.

(787C>T (Leu263Phe) ; Wang J et col., 2007) n'entraîne qu'une altération minimale de la fonction de l'enzyme. De plus, cette mutation présente une fréquence très faible au sein de la population : 1% et < 0,3% dans les 2 études de l'équipe de Wang et col. (Wang J et col., 2007; Wang J et col., 2008) ; non trouvée parmi 96 patients lors de l'étude de Garat A et col. (Garat A et col., 2009), ni lors de notre présente étude sur plus de 450 patients. Cette forte conservation du gène justifie que nous n'ayons pu identifier aucun nouveau variant de l'*IMPDH II* lors du séquençage de sa partie codante, en dépit du nombre important d'échantillons analysés (n=80).

Cependant, la rareté des mutations non synonymes sur ce gène ne signifie pas pour autant l'absence de variabilité de la séquence complète, ni l'absence de mutations synonymes. Ces dernières n'ont pas d'influence majeure sur la fonctionnalité de la protéine codée, mais elles peuvent entraîner des variations au niveau transcriptionnel, pré-traductionnel et traductionnel. Elles peuvent altérer la stabilité de l'ARNm, la fonction d'épissage de celui-ci (mutation intronique), ou encore la progression du ribosome lors d'une modification d'un codon, bien qu'il code pour le même acide aminé (mutation synonyme). Ceci explique probablement pourquoi il existe des études rapportant des effets de certains SNP de l'*IMPDH II* sur la réponse clinique du patient au traitement par l'AMP (voir le tableau 1 ci-après, récapitulant l'ensemble de ces SNP ainsi que leurs effets tels que décrits dans la littérature). L'inactivation de l'*IMPDH I* chez la souris conduit à une modification phénotypique beaucoup plus modérée que celle de l'isoforme II, ce qui peut être expliqué par le fait que l'immunité de l'individu n'est pas sous sa dépendance (Gu JJ et col., 2003). Cependant, il existe également des variants de l'*IMPDH I*, décrits dans la littérature comme étant associés à une modification de la réponse des patients au traitement par AMP (tableau 1). Lors de notre analyse multivariée prenant en compte le génotype des SNP de l'*IMPDH I* et de l'*IMPDH II*, ainsi que les paramètres démographiques et pharmacocinétiques de chacun des 456 patients testés, seul le SNP rs2278294 de l'*IMPDH I* était retenu comme variable significative. L'allèle variant de ce SNP était associé à une diminution de l'incidence de rejet aigu et à une augmentation de l'incidence de leucopénie. Ceci confirme une partie des résultats de l'équipe de Wang et col. retrouvant également une association entre ce SNP et l'incidence de rejet aigu (Wang J et col., 2008). Les autres associations présentées dans la littérature n'ont pas été confirmées lors de notre étude (tableau 1). Il reste maintenant à comprendre le mécanisme mis en jeu derrière l'association du SNP rs2278294 intronique de l'*IMPDH I* avec les effets cliniques observés au cours de cette analyse. Une étude approfondie tenant compte des déséquilibres de liaison entre les

polymorphismes de ce gène, du taux de transcription du gène et de la demi-vie de l'ARNm associé serait donc intéressante dans le cadre d'une étude pharmacogénétique du traitement par le MMF.

Le SNP 787C>T de l'*IMPDH II*, non synonyme, avait été décrit par Wang J et col. comme étant associé à l'augmentation du risque de développer un épisode de leucopénie (Wang J et col., 2007). Cependant, cette équipe n'a pas pu confirmer ce résultat lors d'une seconde étude du fait de la rareté de l'allèle variant (< 0,3% sur une cohorte de 168 patients). Nous n'avons pas retrouvé ce SNP dans notre analyse portant sur 456 patients tout comme l'équipe de Garat A et col. sur une cohorte de 96 individus (Garat A et col., 2009). Il apparaît donc que ce SNP est trop peu fréquent pour présenter un intérêt pharmacogénétique.

Le SNP rs4974081 présent sur le promoteur distal du gène de l'*IMPDH II* avait été décrit par Mohammed et col. comme ayant un effet potentiel *in silico* sur la transcription du gène (Mohamed MF et col., 2008). Toutefois, aucun effet sur la pharmacodynamie de l'AMP n'a pu être mis en évidence au cours de notre étude.

Le SNP intronique rs11706052 de l'*IMPDH II* était décrit par Grinyo et col. comme associé à une augmentation de l'incidence de rejet aigu, mais leur analyse ne prenait pas en compte des facteurs confondants tels que l'exposition à l'AMP (Grinyo J et col., 2008). Nous n'avons pas retrouvé cette association et il en est de même pour l'étude de Wang J et col. basée sur un échantillon composé d'environ 200 patients (Wang J et col., 2008). Cependant, l'étude clinique *ex-vivo* de Sombogaard F rapporte une augmentation de l'activité IMPDH chez les individus porteurs d'un allèle variant pour ce SNP (Sombogaard F et col., 2009), résultat non confirmé par l'étude de Winnicki et col. (Winnicki W et col., 2010). Il paraît donc intéressant, lors d'une future étude pharmacogénétique, d'intégrer les données d'activité IMPDH (absentes dans notre étude) à une analyse multivariée afin de pouvoir confirmer ou infirmer ce résultat.

Tableau IV-1 : Résumé des effets des SNP de l'*IMPDH I* et/ou *II* présentés dans la littérature

SNP	Association ou effet décrit dans la littérature	Dans cette Etude
<b><i>IMPDH I</i></b>		
rs2278293	↓ Rejet aigu ( <i>Wang J CTP 2008</i> )	Pas d'effet
rs2278294	↓ Rejet aigu ( <i>Wang J CTP 2008</i> )	↓ Rejet aigu ↑ Leucopénie
<b><i>IMPDH II</i></b>		
rs4974081	Effet <i>in silico</i> sur la transcription ( <i>Mohamed F Genet Testing 2008</i> ),	Pas d'effet
rs11706052	↑ Rejet aigu ( <i>Grinyo J Transpl Int 2008</i> )	
	↑ Activité IMPDH ( <i>Sombogaard F Pharmacogenet and Genomics 2009</i> )	Pas d'effet
	Pas d'effet ( <i>Wang J CTP 2008</i> )	
	Pas d'effet ( <i>Winnicki W Pharmacogenet Journal 2010</i> )	
787C>T	↑ Leucopénie ( <i>Wang J Pharmacogenet and genomics 2007</i> )	
	↓ Vitesse de réaction de l' <i>IMPDH II</i> ( <i>Wang J Pharmacogenet and genomics 2007</i> )	Pas d'effet
	Pas d'association ( <i>Garat A Genet Test Mol Biol 2009/ Wang J CTP 2008</i> )	

Le troisième volet de cette thèse avait pour objectif de transposer, au sein du laboratoire, la méthode de mesure de l'activité IMPDH décrite par l'équipe de Glander P et col. (Glander P et col., 2001) pour étudier les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de l'AMP. Celle-ci consistait à doser le XMP formé lors d'une incubation d'un lysat cellulaire avec de l'IMP et du NAD<sup>+</sup> en excès à l'aide d'une méthode de chromatographie liquide couplé à une détection UV. Après la mise au point et la validation de cette méthode, nous avons réalisé ce dosage dans 324 prélèvements provenant de cinétiques complètes de 27 patients transplantés. Cependant, nous avons pu constater que la standardisation de ces résultats de dosage par la concentration en protéines contenues dans l'échantillon, telle que décrite dans la publication nous servant de référence, n'était pas adaptée, notamment pour les échantillons fortement contaminés par des globules rouges résiduels. Nous avons donc essayé d'optimiser cette méthode à l'aide d'une standardisation par la concentration d'ADN présente dans l'échantillon, celle-ci étant le reflet du nombre de PBMC présents, puisque les hématies sont anucléées. L'ADN s'est révélé un mauvais moyen de standardisation des dosages de l'activité IMPDH dans la mesure où il majorait le biais lors d'une

contamination de l'échantillon par des érythrocytes, par rapport à la standardisation au moyen de la concentration en protéines. L'hypothèse que nous émettons est que les érythrocytes possédant une activité IMPDH mais étant dépourvus d'ADN, leur présence augmente le numérateur sans changer le dénominateur, ce qui accroît la surestimation de l'activité IMPDH lymphocytaire par rapport à la concentration protéique. Entre temps, une nouvelle méthode de standardisation de l'activité IMPDH via la concentration en Adénosine Monophosphate (Amp), apparemment plus fiable et tolérante à une contamination des échantillons par des érythrocytes, a été publiée par l'équipe de Berlin en parallèle à nos propres travaux (Glander P et col., 2009). Des tests préliminaires au laboratoire ont montré que l'Amp et le XMP pouvaient être dosés simultanément par la méthode CHLP-UV développée. Cette technique a également été utilisée avec succès lors d'une étude clinique récente (Sombogaard F et col., 2009). Il serait donc intéressant de valider cette nouvelle méthode au sein du laboratoire afin de l'utiliser pour l'étude exposition-pharmacodynamie-effets cliniques prévue dans le but d'évaluer la pertinence de l'activité IMPDH comme marqueur précoce de la survenue d'effets indésirables. Il est également envisageable d'évaluer la pertinence de la mesure de cette activité IMPDH comme biomarqueur d'efficacité du traitement par MMF, qui pourrait être utilisé pour l'adaptation de posologie du MMF. Cependant, les conditions actuelles de préparation longues et fastidieuses de l'échantillon avant dosage ne permettent pas l'utilisation de cette technique en pratique clinique de routine, notamment à cause de la phase d'isolation des PBMC par la technique du FICOLL.

Il faudrait donc envisager une autre méthode de séparation telle que la cytométrie de flux, l'extraction sélective des cellules CD4<sup>+</sup> au moyen de billes magnétiques coatées d'anticorps spécifiques, ou encore la lyse préalable des globules rouges à partir du sang total permettant l'isolement des PBMC après lavage, par exemple.



## V. Conclusion :

Ces travaux s'inscrivent dans la thématique de l'unité, à savoir la pharmacologie des immunosuppresseurs en transplantation. Ils permettent d'approfondir les connaissances pharmacodynamiques et pharmacogénétiques actuelles sur la cible d'un de ces médicaments immunosuppresseurs, l'acide mycophénolique. L'objectif général et la perspective de ce travail sont d'améliorer le STP du médicament qui, bien qu'encore sujet à controverses, est déjà pratiqué couramment dans de nombreux centres de transplantation. Notre équipe a d'ailleurs montré que le STP à l'aide d'une estimation de la  $SSC_{0-12h}$  était efficace pour la forme commerciale mofétil (Le Meur Y et col., 2007) et ce à coût neutre (Rousseau A et col., 2010). L'optimisation thérapeutique de l'acide mycophénolique est en revanche impossible pour le mycophénolate sodique du fait de sa pharmacocinétique erratique (Cattaneo D et col., 2007; de Winter BC et col., 2008).

Concernant l'adaptation pharmacogénétique du traitement, on sait aujourd'hui que certains polymorphismes de l'UGT1A9 ou de transporteurs OATP expliquent une partie de la variabilité pharmacocinétique de l'AMP (Kuypers DR et col., 2008; Miura M et col., 2007; Picard N et col., 2010; Sanchez-Fructuoso AI et col., 2009; van Schaik RH et col., 2009). Cependant, leurs effets semblent trop limités pour envisager une adaptation de posologie basée sur ces polymorphismes. Concernant la pharmacodynamie de l'AMP, nous avons démontré ici que seul le SNP rs2278294 de l'IMPDH I influençait la réponse au traitement (risque de rejet et de leucopénie). Néanmoins, des études complémentaires, notamment concernant le mécanisme associé à cet effet, sont nécessaires avant qu'il puisse être proposé comme variable d'ajustement du STP.

Reste également à prendre en compte la variabilité de l'activité IMPDH, notamment pré-transplantation, qui pourrait, selon Glander P et col., être associée à la survenue d'effets indésirables chez les patients traités par l'AMP (Glander P et col., 2004). La dernière étude de l'équipe de Sombogaard F et col. montre qu'une partie de cette variabilité de l'activité enzymatique pourrait être attribuée au SNP rs11706052 de l'IMPDH II (Sombogaard F et col., 2009), qui n'était pourtant associé à aucun des évènements cliniques pris en compte dans notre étude. Une nouvelle étude de même envergure devra être conduite en prenant en compte l'activité IMPDH afin de clarifier ce point.

## RÉFÉRENCES

- Adcock IM et Ito K, Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch.Chest Dis.*, 2000, 55(3) : 256-266
- Albrecht W, Storck M, Pfetsch E, Martin W et Abendroth D, Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Ther.Drug Monit.*, 2000, 22(3) : 283-294
- Allison AC et Eugui EM, Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplant.Proc.*, 1993, 25(3 Suppl 2) : 8-18
- Allison AC et Eugui EM, Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3) : 85-118
- Allison AC, Hovi T, Watts RW et Webster AD, Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet*, 1975, 2(7946) : 1179-1183
- Armstrong VW, Schwabe H, Schmuck B, Scholz C, Wiese C, Bonsack S et Oellerich M, The acylglucuronide of mycophenolic acid forms a specific covalent adduct with inosine monophosphate dehydrogenase 2. [Abstract]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(A99) :
- Armstrong VW, Shipkova M, Schutz E, Weber L, Tonshoff B et Oellerich M, Monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Transplant Proc.*, 2001, 33(1-2) : 1040-1043
- Armstrong VW, Tenderich G, Shipkova M, Parsa A, Koerfer R, Schroder H et Oellerich M, Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolic acid after intravenous administration and oral administration of mycophenolate mofetil to heart transplant recipients. *Ther.Drug Monit.*, 2005, 27(3) : 315-321
- Arns W, Breuer S, Choudhury S, Taccard G, Lee J, Binder V, Roettele J et Schmouder R, Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant.*, 2005, 19(2) : 199-206
- Atcheson B, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Pillans PI et Tett SE, Quantification of free mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma by liquid-chromatography using mass spectrometric and ultraviolet absorbance detection. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 2004, 799(1) : 157-163
- Atcheson BA, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, Duffull SB, Mudge DW, Pillans PI, Johnson DW et Tett SE, Free mycophenolic acid should be monitored in renal transplant recipients with hypoalbuminemia. *Ther.Drug Monit.*, 2004, 26(3) : 284-286

- Atcheson BA, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, Pillans PI et Tett SE, Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 2005, 59(3) : 271-280
- Baldelli S, Merlini S, Perico N, Nicastrì A, Cortinovis M, Gotti E, Remuzzi G et Cattaneo D, C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics.*, 2007, 8(9) : 1127-1141
- Baldwin AS, Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.*, 1996, 14(649-683
- Balzarini J et De CE, Assay method for monitoring the inhibitory effects of antimetabolites on the activity of inosinate dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes. *Biochem.J.*, 1992, 287 ( Pt 3)(785-790
- Beal JL, Jones CE, Taylor PJ et Tett SE, Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit.*, 1998, 20(6) : 685-690
- Behrend M, Adverse gastrointestinal effects of mycophenolate mofetil: aetiology, incidence and management. *Drug Saf*, 2001, 24(9) : 645-663
- Bernard O et Guillemette C, The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos.*, 2004, 32(8) : 775-778
- Bernard O, Tojic J, Journault K, Perusse L et Guillemette C, Influence of nonsynonymous polymorphisms of UGT1A8 and UGT2B7 metabolizing enzymes on the formation of phenolic and acyl glucuronides of mycophenolic acid. *Drug Metab Dispos.*, 2006, 34(9) : 1539-1545
- Boletis JN, Konstadinidou I, Chelioti H, Theodoropoulou H, Avdikou K, Kostakis A et Stathakis CP, Successful withdrawal of steroid after renal transplantation. *Transplant.Proc.*, 2001, 33(1-2) : 1231-1233
- Bowalgaha K et Miners JO, The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 2001, 52(5) : 605-609
- Brandhorst G, Marquet P et col., Multicenter evaluation of a new inosine monophosphate dehydrogenase inhibition assay for quantification of total mycophenolic acid in plasma. *Ther Drug Monit.*, 2008, 30(4) : 428-433
- Braun KP, Glander P, Hambach P, Bohler T, Waiser J, Mai I, Neumayer HH et Budde K, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate mofetil under oral and intravenous therapy. *Transplant.Proc.*, 2002, 34(5) : 1745-1747
- Bremer S, Mandla R, Vethe NT, Rasmussen I, Rootwelt H, Line PD, Midtvedt K et Bergan S, Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after transplantation and initiation of immunosuppression. *Transplantation*, 2008, 85(1) : 55-61

- Bremer S, Rootwelt H et Bergan S, Real-time PCR determination of IMPDH1 and IMPDH2 expression in blood cells. *Clin Chem.*, 2007, 53(6) : 1023-1029
- Brown NW, Aw MM, Mieli-Vergani G, Dhawan A et Tredger JM, Mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide pharmacokinetics in pediatric liver transplant recipients: effect of cyclosporine and tacrolimus comedication. *Ther.Drug Monit.*, 2002, 24(5) : 598-606
- Buchler M, Lebranchu Y et col., Higher exposure to mycophenolic acid with sirolimus than with cyclosporine cotreatment. *Clin Pharmacol Ther.*, 2005, 78(1) : 34-42
- Budde K, Hallebach G, Geissler S, Fritsche L, Diekmann F, Waiser J et Neumayer HH, Successful steroid withdrawal at the end of the 1st year after renal transplantation in mycophenolate mofetil-treated patients. *Transplant.Proc.*, 2002, 34(5) : 1700-1702
- Bullingham R, Monroe S, Nicholls A et Hale M, Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J.Clin.Pharmacol.*, 1996, 36(4) : 315-324
- Bullingham RE, Nicholls A et Hale M, Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant.Proc.*, 1996, 28(2) : 925-929
- Bullingham RE, Nicholls AJ et Kamm BR, Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin.Pharmacokinet.*, 1998, 34(6) : 429-455
- Carr SF, Papp E, Wu JC et Natsumeda Y, Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J.Biol.Chem.*, 1993, 268(36) : 27286-27290
- Catapano CV, Dayton JS, Mitchell BS et Fernandes DJ, GTP depletion induced by IMP dehydrogenase inhibitors blocks RNA-primed DNA synthesis. *Mol.Pharmacol*, 1995, 47(5) : 948-955
- Cattaneo D, Cortinovis M, Baldelli S, Bitto A, Gotti E, Remuzzi G et Perico N, Pharmacokinetics of mycophenolate sodium and comparison with the mofetil formulation in stable kidney transplant recipients. *Clin J.Am.Soc.Nephrol.*, 2007, 2(6) : 1147-1155
- Cattaneo D, Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Del Priore L, Perico N, Gotti E et Remuzzi G, Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. *Clin Transplant.*, 2001, 15(6) : 402-409
- Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Gotti E et Remuzzi G, Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int.*, 2002, 62(3) : 1060-1067
- Cauffiez C, Klinzig F et col., Human CYP4F12 genetic polymorphism: identification and functional characterization of seven variant allozymes. *Biochem.Pharmacol*, 2004, 68(12) : 2417-2425
- Clipstone NA et Crabtree GR, Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 1992, 357(6380) : 695-697

- Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD et Goldstein BM, Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A.*, 1999, 96(7) : 3531-3536
- Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL et Huberman E, Increased inosine-5'-phosphate dehydrogenase gene expression in solid tumor tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.*, 1992, 52(20) : 5826-5828
- Collart FR et Huberman E, Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs. *J.Biol.Chem.*, 1988, 263(30) : 15769-15772
- Czock D, Keller F, Rasche FM et Haussler U, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.*, 2005, 44(1) : 61-98
- David-Neto E, Pereira Araujo LM et col., Mycophenolic acid pharmacokinetics in stable pediatric renal transplantation. *Pediatr.Nephrol.*, 2003, 18(3) : 266-272
- Dayton JS, Lindsten T, Thompson CB et Mitchell BS, Effects of human T lymphocyte activation on inosine monophosphate dehydrogenase expression. *J.Immunol.*, 1994, 152(3) : 984-991
- de Winter BC, van Gelder T et col., Population pharmacokinetics of mycophenolic acid : a comparison between enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.*, 2008, 47(12) : 827-838
- Deters M, Kirchner G, Koal T, Resch K et Kaefer V, Influence of cyclosporine on the serum concentration and biliary excretion of mycophenolic acid and 7-O-mycophenolic acid glucuronide. *Ther.Drug Monit.*, 2005, 27(2) : 132-138
- Djebli N, Picard N, Rerolle JP, Le Meur Y. et Marquet P, Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and comedications on Acyl-MPAG production in vitro and in adult renal transplant patients. *Pharmacogenet.Genomics*, 2007, 17(5) : 321-330
- Dubrey SW, Holt DW et Banner N, Measurement of mycophenolate mofetil plasma levels after heart transplantation and a potential side effect of high levels. *Ther.Drug Monit.*, 1999, 21(3) : 325-326
- Ensom MH, Partovi N, Decarie D, Dumont RJ, Fradet G et Levy RD, Pharmacokinetics and protein binding of mycophenolic acid in stable lung transplant recipients. *Ther.Drug Monit.*, 2002, 24(2) : 310-314
- Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD et Allison AC, Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand.J.Immunol.*, 1991, 33(2) : 161-173
- Eugui EM, Mirkovich A et Allison AC, Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand.J.Immunol.*, 1991, 33(2) : 175-183

- European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet*, 1995, 345(8961) : 1321-1325
- Filler G, Abbreviated mycophenolic acid AUC from C0, C1, C2, and C4 is preferable in children after renal transplantation on mycophenolate mofetil and tacrolimus therapy. *Transpl.Int.*, 2004, 17(3) : 120-125
- Filler G, Zimmering M et Mai I, Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil are influenced by concomitant immunosuppression. *Pediatr.Nephrol.*, 2000, 14(2) : 100-104
- Fleming DH, Mathew BS, John GT, Chandy SJ, Manivannan J et Jeyaseelan V, A six-hour extrapolated sampling strategy for monitoring mycophenolic acid in renal transplant patients in the Indian subcontinent. *J.Postgrad.Med.*, 2006, 52(4) : 248-252
- Floryk D et Thompson TC, Antiproliferative effects of AVN944, a novel inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitor, in prostate cancer cells. *Int.J.Cancer*, 2008, 123(10) : 2294-2302
- Garat A, Cauffiez C et col., IMPDH2 genetic polymorphism: a promoter single-nucleotide polymorphism disrupts a cyclic adenosine monophosphate responsive element. *Genet.Test.Mol.Biomarkers*, 2009, 13(6) : 841-847
- Girard H, Court MH et col., Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(8) : 501-515
- Glander P, Braun KP et col., Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin.Biochem.*, 2001, 34(7) : 543-549
- Glander P, Hambach P et col., Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *Am.J.Transplant.*, 2004, 4(12) : 2045-2051
- Glander P, Sombogaard F et col., Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Ther.Drug Monit.*, 2009, 31(3) : 351-359
- Glesne DA, Collart F, Varkony T, Drabkin H et Huberman E, Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). *Genomics*, 1993, 16(1) : 274-277
- Glesne DA, Collart FR et Huberman E, Regulation of IMP dehydrogenase gene expression by its end products, guanine nucleotides. *Mol.Cell Biol.*, 1991, 11(11) : 5417-5425
- Glesne DA et Huberman E, Cloning and sequence of the human type II IMP dehydrogenase gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1994, 205(1) : 537-544
- Gregory RI, Khosla S et Feil R, Probing chromatin structure with nuclease sensitivity assays. *Methods Mol.Biol.*, 2001, 181(269-284

- Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G et Muller MM, Guanosine-5'-triphosphate increases in red blood cells of heart transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Adv.Exp Med.Biol.*, 2000, 486(139-143)
- Grinyo J, Vanrenterghem Y et col., Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl.Int.*, 2008, 21(9) : 879-891
- Gu JJ, Kaiser-Rogers K, Rao K et Mitchell BS, Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32). *Genomics*, 1994, 24(1) : 179-181
- Gu JJ, Spychala J et Mitchell BS, Regulation of the human inosine monophosphate dehydrogenase type I gene. Utilization of alternative promoters. *J.Biol.Chem.*, 1997, 272(7) : 4458-4466
- Gu JJ, Stegmann S, Gathy K, Murray R, Laliberte J, Ayscue L et Mitchell BS, Inhibition of T lymphocyte activation in mice heterozygous for loss of the IMPDH II gene. *J Clin.Invest*, 2000, 106(4) : 599-606
- Gu JJ, Tolin AK, Jain J, Huang H, Santiago L et Mitchell BS, Targeted disruption of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I gene in mice. *Mol.Cell Biol.*, 2003, 23(18) : 6702-6712
- Gummert JF, Barten MJ, van Gelder T., Billingham ME et Morris RE, Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology. *Transplantation*, 2000, 70(7) : 1038-1049
- Hager PW, Collart FR, Huberman E et Mitchell BS, Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding. *Biochem.Pharmacol*, 1995, 49(9) : 1323-1329
- Hale MD, Nicholls AJ et col., The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.*, 1998, 64(6) : 672-683
- Hargrove JL et Schmidt FH, The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J.*, 1989, 3(12) : 2360-2370
- Hesselink DA et van Gelder T., Genetic and nongenetic determinants of between-patient variability in the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Clin Pharmacol Ther.*, 2005, 78(4) : 317-321
- Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW et van Gelder T, Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2. *Am.J.Transplant.*, 2005, 5(5) : 987-994
- Hosotsubo H, Takahara S et col., Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. *Ther.Drug Monit.*, 2001, 23(6) : 669-674

- Hubner GI, Eismann R et Sziegoleit W, Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients. *Ther.Drug Monit.*, 1999, 21(5) : 536-539
- Jiao Z, Ding JJ, Shen J, Liang HQ, Zhong LJ, Wang Y, Zhong MK et Lu WY, Population pharmacokinetic modelling for enterohepatic circulation of mycophenolic acid in healthy Chinese and the influence of polymorphisms in UGT1A9. *Br.J.Clin Pharmacol*, 2008, 65(6) : 893-907
- Jiao Z, Zhong JY, Zhang M, Shi XJ, Yu YQ et Lu WY, Total and free mycophenolic acid and its 7-O-glucuronide metabolite in Chinese adult renal transplant patients: pharmacokinetics and application of limited sampling strategies. *Eur.J.Clin Pharmacol*, 2007, 63(1) : 27-37
- Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ, Jones CE, Allen J, Franzen K, Falk MC et Nicol D, The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1999, 66(5) : 492-500
- Johnson HJ, Swan SK, Heim-Duthoy KL, Nicholls AJ, Tsina I et Tarnowski T, The pharmacokinetics of a single oral dose of mycophenolate mofetil in patients with varying degrees of renal function. *Clin Pharmacol Ther.*, 1998, 63(5) : 512-518
- Johnson LA, Oetting WS, Basu S, Prausa S, Matas A et Jacobson PA, Pharmacogenetic effect of the UGT polymorphisms on mycophenolate is modified by calcineurin inhibitors. *Eur.J.Clin Pharmacol*, 2008, 64(11) : 1047-1056
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Friedman G, Mulgaonkar S, Gruber S, Korecka M, Brayman KL et Shaw LM, The effect of renal insufficiency on mycophenolic acid protein binding. *J.Clin.Pharmacol.*, 1999, 39(7) : 715-720
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Minnick P, Bastien MC, Sechaud R, Yeh CM, Balez S, Picard F et Schmouder R, Randomized calcineurin inhibitor cross over study to measure the pharmacokinetics of co-administered enteric-coated mycophenolate sodium. *Clin Transplant.*, 2005, 19(4) : 551-558
- Kobayashi M, Saitoh H, Kobayashi M, Tadano K, Takahashi Y et Hirano T, Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronide possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J.Pharmacol Exp Ther.*, 2004, 309(3) : 1029-1035
- Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K et Weber G, Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J.Biol.Chem.*, 1991, 266(1) : 506-509
- Kost-Alimova MV, Glesne DA, Huberman E et Zelenin AV, Assignment of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type 2 (IMPDH2) to human chromosome band 3p21.2 by in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.*, 1998, 82(3-4) : 145-146
- Krumme B, Wollenberg K, Kirste G et Schollmeyer P, Drug monitoring of mycophenolic acid in the early period after renal transplantation. *Transplant.Proc.*, 1998, 30(5) : 1773-1774



- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J et Vanrenterghem Y, Long-term changes in mycophenolic acid exposure in combination with tacrolimus and corticosteroids are dose dependent and not reflected by trough plasma concentration: a prospective study in 100 de novo renal allograft recipients. *J.Clin Pharmacol*, 2003, 43(8) : 866-880
- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B et Vanrenterghem Y, Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.*, 2004, 75(5) : 434-447
- Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, de Loor H, Halewijck E, Dekens M et Vanrenterghem Y, Current target ranges of mycophenolic acid exposure and drug-related adverse events: a 5-year, open-label, prospective, clinical follow-up study in renal allograft recipients. *Clin Ther.*, 2008, 30(4) : 673-683
- Kuypers DR, de JH, Naesens M, Lerut E, Verbeke K et Vanrenterghem Y, CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther.*, 2007, 82(6) : 711-725
- Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S et Vanrenterghem Y, The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.*, 2005, 78(4) : 351-361
- Kuypers DR, Verleden G, Naesens M et Vanrenterghem Y, Drug interaction between mycophenolate mofetil and rifampin: possible induction of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *Clin Pharmacol Ther.*, 2005, 78(1) : 81-88
- Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF et Yatscoff RW, Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation*, 1996, 62(5) : 666-672
- Langman LJ, LeGatt DF et Yatscoff RW, Blood distribution of mycophenolic acid. *Ther.Drug Monit.*, 1994, 16(6) : 602-607
- Langman LJ, LeGatt DF et Yatscoff RW, Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measuring IMP dehydrogenase activity. *Clin Chem.*, 1995, 41(2) : 295-299
- Langman LJ, Nakakura H, Thliveris JA, LeGatt DF et Yatscoff RW, Pharmacodynamic monitoring of mycophenolic acid in rabbit heterotopic heart transplant model. *Ther.Drug Monit.*, 1997, 19(2) : 146-152
- Le Guellec C, Bourgoin H, Buchler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P et Paintaud G, Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of mycophenolic acid concentrations in stable renal transplant patients. *Clin.Pharmacokinet.*, 2004, 43(4) : 253-266

- Le Guellec C, Buchler M, Giraudeau B, Le Meur Y, Gakoue JE, Lebranchu Y, Marquet P et Paintaud G, Simultaneous estimation of cyclosporin and mycophenolic acid areas under the curve in stable renal transplant patients using a limited sampling strategy. *Eur.J.Clin Pharmacol*, 2002, 57(11) : 805-811
- Le Meur Y, Buchler M et col., Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am.J.Transplant.*, 2007, 7(11) : 2496-2503
- Leblanc B et Moss T, DNase I footprinting. *Methods Mol.Biol.*, 2009, 543(37-47
- Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K et Nelson PH, Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm.Res.*, 1990, 7(2) : 161-166
- Levesque E, Delage R, Benoit-Biancamano MO, Caron P, Bernard O, Couture F et Guillemette C, The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphisms on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.*, 2007, 81(3) : 392-400
- Lo-Guidice JM, Allorge D, Cauffiez C, Chevalier D, Lafitte JJ, Lhermitte M et Broly F, Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 CYP4B1: evidence for a non-functional allelic variant. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(5) : 367-374
- Lu YP, Lin B, Liang MZ, Wang L, Nan F, Yu Q et Tang KS, Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in Chinese kidney transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplant.Proc.*, 2004, 36(7) : 2079-2081
- Lu YP, Zhu YC, Liang MZ, Nan F, Yu Q, Wang L, Wang J et Li YP, Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid can be used as predictor of clinical events for kidney transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplant.Proc.*, 2006, 38(7) : 2048-2050
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA et Broly F, Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*, 1997, 7(3) : 193-202
- Marquet P, Saint-Marcoux F et col., Performance of the new mycophenolate assay based on IMPDH enzymatic activity for pharmacokinetic investigations and setup of Bayesian estimators in different populations of allograft recipients. *Ther.Drug Monit.*, 2009, 31(4) : 443-450
- Matl I, Lacha J, Lodererova A, Simova M, Teplan V, Lanska V et Vitko S, Withdrawal of steroids from triple-drug therapy in kidney transplant patients. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 2000, 15(7) : 1041-1045
- Meier-Kriesche HU, Shaw LM, Korecka M et Kaplan B, Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal insufficiency. *Ther.Drug Monit.*, 2000, 22(1) : 27-30

- Meiser BM, Pfeiffer M et col., The efficacy of the combination of tacrolimus and mycophenolate mofetil for prevention of acute myocardial rejection is dependent on routine monitoring of mycophenolic acid trough acid levels. *Transplant.Proc.*, 1999, 31(1-2) : 84-87
- Miura M, Satoh S, Inoue K, Kagaya H, Saito M, Inoue T, Suzuki T et Habuchi T, Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Eur.J.Clin Pharmacol*, 2007, 63(12) : 1161-1169
- Mohamed MF, Frye RF et Langae TY, Interpopulation variation frequency of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II (IMPDH2) genetic polymorphisms. *Genet.Test.*, 2008, 12(4) : 513-516
- Morissette P, Albert C, Busque S, St-Louis G et Vinet B, In vivo higher glucuronidation of mycophenolic acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. *Ther.Drug Monit.*, 2001, 23(5) : 520-525
- Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, De Meyer M, Konig J, Schepers R, Squifflet JP et Wallemacq P, Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem.*, 2001, 47(1) : 88-94
- Mourad M, Malaise J, Chaib ED, De MM, Konig J, Schepers R, Squifflet JP et Wallemacq P, Pharmacokinetic basis for the efficient and safe use of low-dose mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus in kidney transplantation. *Clin Chem.*, 2001, 47(7) : 1241-1248
- Mudge DW, Atcheson BA, Taylor PJ, Pillans PI et Johnson DW, Severe toxicity associated with a markedly elevated mycophenolic acid free fraction in a renal transplant recipient. *Ther.Drug Monit.*, 2004, 26(4) : 453-455
- Muller H, Solari S, Zuniga C, Guerra I, Troncoso J, Ovalle R, Morente J et Pedreros C, Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in kidney transplant patients: a abbreviated sampling strategy. *Transplant.Proc.*, 2007, 39(3) : 596-599
- Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K et Vanrenterghem Y, Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation*, 2006, 82(8) : 1074-1084
- Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S et Weber G, Selective up-regulation of type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. *Cancer Res.*, 1991, 51(15) : 3886-3890
- Nagai M, Natsumeda Y et Weber G, Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.*, 1992, 52(2) : 258-261
- Natsumeda Y et Carr SF, Human type I and II IMP dehydrogenases as drug targets. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1993, 696(88-93

- Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G et Suzuki K, Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *J.Biol.Chem.*, 1990, 265(9) : 5292-5295
- Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL et Weber G, Enzymic capacities of purine de Novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, 1984, 44(6) : 2475-2479
- Neylan JF, Immunosuppressive therapy in high-risk transplant patients: dose-dependent efficacy of mycophenolate mofetil in African-American renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*, 1997, 64(9) : 1277-1282
- Nicholls AJ, Opportunities for therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for mycophenolic acid and suppression of rejection. *Clin Biochem.*, 1998, 31(5) : 329-333
- Nowak I et Shaw LM, Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin.Chem.*, 1995, 41(7) : 1011-1017
- Nowak I et Shaw LM, Effect of mycophenolic acid glucuronide on inosine monophosphate dehydrogenase activity. *Ther Drug Monit.*, 1997, 19(3) : 358-360
- Oellerich M, Shipkova M, Schutz E, Wieland E, Weber L, Tonshoff B et Armstrong VW, Pharmacokinetic and metabolic investigations of mycophenolic acid in pediatric patients after renal transplantation: implications for therapeutic drug monitoring. German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Ther.Drug Monit.*, 2000, 22(1) : 20-26
- Pawinski T, Hale M, Korecka M, Fitzsimmons WE et Shaw LM, Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult renal transplant patients treated with concomitant tacrolimus. *Clin Chem.*, 2002, 48(9) : 1497-1504
- Pastan I, Perlman RL, Emmer M, Varmus HE, DeCrombrughe B, Chen BP et Parks J, Regulation of gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP. *Recent Prog.Horm.Res.*, 1971, 27(421-432)
- Payen S, Zhang D et col., Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplant pediatric and adolescent patients. *Ther.Drug Monit.*, 2005, 27(3) : 378-388
- Pescovitz MD, Conti D et col., Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin.Transplant.*, 2000, 14(3) : 179-188
- Pescovitz MD, Guasch A et col., Equivalent pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in African-American and Caucasian male and female stable renal allograft recipients. *Am.J.Transplant.*, 2003, 3(12) : 1581-1586
- Picard N, Cresteil T, Prémaud A et Marquet P, Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther.Drug Monit.*, 2004, 26(6) : 600-608

- Picard N, Prémaud A, Rousseau A, Le Meur Y et Marquet P, A comparison of the effect of ciclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients. *Br.J.Clin Pharmacol*, 2006, 62(4) : 477-484
- Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y et Marquet P, Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos.*, 2005, 33(1) : 139-146
- Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM et Marquet P, The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.*, 2010, 87(1) : 100-108
- Pou L, Brunet M et col., Mycophenolic acid plasma concentrations: influence of comedication. *Ther.Drug Monit.*, 2001, 23(1) : 35-38
- Prémaud A, Le Meur Y, Debord J, Szelag JC, Rousseau A, Hoizey G, Toupance O et Marquet P, Maximum a posteriori bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different postgrafting periods. *Ther.Drug Monit.*, 2005, 27(3) : 354-361
- Prémaud A, Rousseau A, Le Meur Y, Lachatre G et Marquet P, Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther.Drug Monit.*, 2004, 26(6) : 609-619
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB et col. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 1999, 55: 713-723
- Ransom JT, Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit.*, 1995, 17(6) : 681-684
- Ratcliffe AJ, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.*, 2006, 9(5) : 595-605
- Ratcliffe PJ, Dudley CR, Higgins RM, Firth JD, Smith B et Morris PJ, Randomised controlled trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet*, 1996, 348(9028) : 643-648
- Ratcliffe PJ, Firth JD, Higgins RM, Smith B, Gray DW et Morris PJ, Randomized controlled trial of complete steroid withdrawal in renal transplant patients receiving triple immunosuppression. *Transplant.Proc.*, 1993, 25(1 Pt 1) : 590
- Rousseau A, Laroche ML et col., Cost-Effectiveness Analysis of Individualized Mycophenolate Mofetil Dosing in Kidney Transplant Patients in the APOMYGRE Trial. *Transplantation*, 2010, 89(10):1255-62
- Saemann MD, Haidinger M, Hecking M, Horl WH et Weichhart T, The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am.J.Transplant.*, 2009, 9(12) : 2655-2661

- Sanchez-Fructuoso AI, Maestro ML et col., The prevalence of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Transplant.Proc.*, 2009, 41(6) : 2313-2316
- Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A et Lang P, Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 65(6) : 640-648
- Sanquer S, Maison P, Tomkiewicz C, Macquin-Mavier I, Legendre C, Barouki R et Lang P, Expression of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II after mycophenolate mofetil treatment: a 2-year follow-up in kidney transplantation. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 2008, 83(2) : 328-335
- Schutz E, Shipkova M et col., Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: comparison of HPLC and immunoassay reveals new MPA metabolites. *Transplant.Proc.*, 1998, 30(4) : 1185-1187
- Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E et Oellerich M, Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin.Chem.*, 1999, 45(3) : 419-422
- Schweitzer EJ, Yoon S et col., Mycophenolate mofetil reduces the risk of acute rejection less in African-American than in Caucasian kidney recipients. *Transplantation*, 1998, 65(2) : 242-248
- Shaw LM, Kaplan B, DeNofrio D, Korecka M et Brayman KL, Pharmacokinetics and concentration-control investigations of mycophenolic acid in adults after transplantation. *Ther.Drug Monit.*, 2000, 22(1) : 14-19
- Shaw LM, Korecka M et col., Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. *J.Clin Pharmacol*, 2000, 40(6) : 624-633
- Shaw LM, Korecka M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R et Brayman KL, Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am.J.Transplant.*, 2003, 3(5) : 534-542
- Shaw LM, Mick R, Nowak I, Korecka M et Brayman KL, Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients with delayed graft function. *J.Clin.Pharmacol.*, 1998, 38(3) : 268-275
- Shipkova M, Armstrong VW, Kiehl MG, Niedmann PD, Schutz E, Oellerich M et Wieland E, Quantification of mycophenolic acid in plasma samples collected during and immediately after intravenous administration of mycophenolate mofetil. *Clin Chem.*, 2001, 47(8) : 1485-1488
- Shipkova M, Armstrong VW, Kuypers D, Perner F, Fabrizi V, Holzer H, Wieland E et Oellerich M, Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney

- transplant recipients with deteriorating renal function: preliminary report. *Ther. Drug Monit.*, 2001, 23(6) : 717-721
- Shipkova M, Armstrong VW, Schneider T, Niedmann PD, Schutz E, Wieland E et Oellerich M, Stability of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma. *Clin Chem.*, 1999, 45(1) : 127-129
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schutz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F et Oellerich M, Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br.J.Pharmacol.*, 1999, 126(5) : 1075-1082
- Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Schutz E, Wieland E, Shaw LM et Oellerich M, Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide in human plasma using a simple high-performance liquid chromatography procedure. *Clin Chem.*, 1998, 44(7) : 1481-1488
- Shipkova M, Schutz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Oellerich M et Wieland E, Determination of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in human plasma by HPLC and Emit. *Clin Chem.*, 2000, 46(3) : 365-372
- Shipkova M, Schutz E, Besenthal I, Fraunberger P et Wieland E, Investigation of the crossreactivity of mycophenolic acid glucuronide metabolites and of mycophenolate mofetil in the Cedia MPA assay. *Ther. Drug Monit.*, 2010, 32(1) : 79-85
- Shipkova M, Wieland E, Schutz E, Wiese C, Niedmann PD, Oellerich M et Armstrong VW, The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid inhibits the proliferation of human mononuclear leukocytes. *Transplant.Proc.*, 2001, 33(1-2) : 1080-1081
- Shum B, Duffull SB, Taylor PJ et Tett SE, Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 2003, 56(2) : 188-197
- Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA et Wilson KP, Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell*, 1996, 85(6) : 921-930
- Smak Gregoor PJ, Hesse CJ, van Gelder T, van der Mast BJ, IJzermans JN, van Besouw NM et Weimar W, Relation of mycophenolic acid trough levels and adverse events in kidney allograft recipients. *Transplant.Proc.*, 1998, 30(4) : 1192-1193
- Smak Gregoor PJ, van Gelder T., Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM et Weimar W, Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 1999, 14(3) : 706-708
- Sola E, Alferez MJ, Cabello M, Burgos D et Gonzalez MM, Low-dose and rapid steroid withdrawal in renal transplant patients treated with tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Transplant.Proc.*, 2002, 34(5) : 1689-1690

- Sollinger HW, Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*, 1995, 60(3) : 225-232
- Sollinger HW, Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*, 2004, 18(5) : 485-492
- Sombogaard F, Peeters AM, Baan CC, Mathot RA, Quaedackers ME, Vulto AG, Weimar W et van GT, Inosine monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression is correlated to clinical outcomes in mycophenolate mofetil-treated kidney transplant patients, whereas inosine monophosphate dehydrogenase activity is not. *Ther. Drug Monit.*, 2009, 31(5) : 549-556
- Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, Budde K, van der Werf M, Vulto AG et van Gelder T, Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet. Genomics*, 2009, 19(8) : 626-634
- Staatz CE, Duffull SB, Kiberd B, Fraser AD et Tett SE, Population pharmacokinetics of mycophenolic acid during the first week after renal transplantation. *Eur. J. Clin Pharmacol.*, 2005, 61(7) : 507-516
- Strassburg CP, Barut A, Obermayer-Straub P, Li Q, Nguyen N, Tukey RH et Manns MP, Identification of cyclosporine A and tacrolimus glucuronidation in human liver and the gastrointestinal tract by a differentially expressed UDP-glucuronosyltransferase: UGT2B7. *J. Hepatol.*, 2001, 34(6) : 865-872
- Streit F, Shipkova M, Armstrong VW et Oellerich M, Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid. *Clin Chem.*, 2004, 50(1) : 152-159
- Takahashi K, Ochiai T et col., Pilot study of mycophenolate mofetil (RS-61443) in the prevention of acute rejection following renal transplantation in Japanese patients. RS-61443 Investigation Committee--Japan. *Transplant Proc.*, 1995, 27(1) : 1421-1424
- Meulen CG, Wetzels JF et Hilbrands LB, The influence of mycophenolate mofetil on the incidence and severity of primary cytomegalovirus infections and disease after renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, 15(5) : 711-714
- The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*, 1996, 61(7) : 1029-1037
- Ting LS, Partovi N, Levy RD, Riggs KW et Ensom MH, Limited sampling strategy for predicting area under the concentration-time curve of mycophenolic acid in adult lung transplant recipients. *Pharmacotherapy*, 2006, 26(9) : 1232-1240
- Traynor J, Regulator of G protein-signaling proteins and addictive drugs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2010, 1187(341-352)



- Tredger JM, Brown NW, Adams J, Gonde CE, Dhawan A, Rela M et Heaton N, Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: toward a therapeutic range. *Liver Transpl.*, 2004, 10(4) : 492-502
- van Agteren M, Armstrong VW et col., AcylMPAG plasma concentrations and mycophenolic acid-related side effects in patients undergoing renal transplantation are not related to the UGT2B7-840G>A gene polymorphism. *Ther.Drug Monit.*, 2008, 30(4) : 439-444
- van Gelder T, Mycophenolate mofetil: how to further improve using an already successful drug? *Am.J.Transplant.*, 2005, 5(2) : 199-200
- van Gelder T, Hilbrands LB et col., A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation*, 1999, 68(2) : 261-266
- van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, Christians U et Morris RE, Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther.Drug Monit.*, 2001, 23(2) : 119-128
- van Gelder T, Silva HT et col., Comparing mycophenolate mofetil regimens for de novo renal transplant recipients: the fixed-dose concentration-controlled trial. *Transplantation*, 2008, 86(8) : 1043-1051
- van Gelder T, Tedesco SH et col., Renal transplant patients at high risk of acute rejection benefit from adequate exposure to mycophenolic acid. *Transplantation*, 2010, 89(5) : 595-599
- van Hest RM, Mathot RA, Pescovitz MD, Gordon R, Mamelok RD et van Gelder T., Explaining variability in mycophenolic acid exposure to optimize mycophenolate mofetil dosing: a population pharmacokinetic meta-analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 2006, 17(3) : 871-880
- van Hest RM, Mathot RA, Vulto AG, Le Meur Y. et van Gelder T., Mycophenolic acid in diabetic renal transplant recipients: pharmacokinetics and application of a limited sampling strategy. *Ther.Drug Monit.*, 2004, 26(6) : 620-625
- van Hest RM, van Gelder T., Vulto AG et Mathot RA, Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin.Pharmacokinet.*, 2005, 44(10) : 1083-1096
- van Schaik RH, van Agteren M et col., UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin.Pharmacol.Ther*, 2009, 86(3) : 319-327
- Vethe NT et Bergan S, Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4<sup>+</sup> cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther.Drug Monit.*, 2006, 28(5) : 608-613
- Wang J, Yang JW et col., IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clin.Pharmacol.Ther*, 2008, 83(5) : 711-717

- Wang J, Zeevi A, Webber S, Girnita DM, Addonizio L, Selby R, Hutchinson IV et Burckart GJ, A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. *Pharmacogenet.Genomics*, 2007, 17(4) : 283-290
- Wang W et Hedstrom L, Kinetic mechanism of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II: random addition of substrates and ordered release of products. *Biochemistry*, 1997, 36(28) : 8479-8483
- Weber LT, Lamersdorf T et col., Area under the plasma concentration-time curve for total, but not for free, mycophenolic acid increases in the stable phase after renal transplantation: a longitudinal study in pediatric patients. German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Ther.Drug Monit.*, 1999, 21(5) : 498-506
- Weber LT, Schutz E, Lamersdorf T, Shipkova M, Niedmann PD, Oellerich M, Zimmerhackl LB, Staskewitz A, Mehls O, Armstrong VW et Tonshoff B, Pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) and free MPA in paediatric renal transplant recipients--a multicentre study. The German Study Group on Mycophenolate Mofetil (MMF) Therapy. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 1999, 14 Suppl 4(33-34)
- Weber LT, Schutz E, Lamersdorf T, Shipkova M, Niedmann PD, Oellerich M, Zimmerhackl LB, Staskewitz A, Mehls O, Armstrong VW et Tonshoff B, Therapeutic drug monitoring of total and free mycophenolic acid (MPA) and limited sampling strategy for determination of MPA-AUC in paediatric renal transplant recipients. The German Study Group on Mycophenolate Mofetil (MMF) Therapy. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 1999, 14 Suppl 4(34-35)
- Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schutz E, Mehls O, Zimmerhackl LB, Oellerich M et Tonshoff B, Comparison of the Emit immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal-transplant recipients on mycophenolate mofetil therapy. *Clin.Chem.*, 2002, 48(3) : 517-525
- Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schutz E, Mehls O, Zimmerhackl LB, Oellerich M et Tonshoff B, The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic Acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the german study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc.Nephrol.*, 2002, 13(3) : 759-768
- Weber LT, Shipkova M et col., Pharmacokinetics of mycophenolic acid (MPA) and determinants of MPA free fraction in pediatric and adult renal transplant recipients. German Study group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *J Am Soc.Nephrol.*, 1998, 9(8) : 1511-1520
- Weigel G, Griesmacher A, Zuckermann AO, Laufer G et Mueller MM, Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.*, 2001, 69(3) : 137-144
- Westley IS, Ray JE et Morris RG, CEDIA mycophenolic acid assay compared with HPLC-UV in specimens from transplant recipients. *Ther.Drug Monit.*, 2006, 28(5) : 632-636
- Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G, Bajari T, Winter B, Herkner H et Sengoelge G, An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics.J.*, 2010, 10(1) : 70-76

- Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Drouet M, Munteanu E, Essig M, Marquet P et Le Meur Y, Risk of diarrhoea 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*, 2010, 69(6) : 675-83.
- Yamani MH, Starling RC, Goormastic M, Van Lente F, Smedira N, McCarthy P et Young JB, The impact of routine mycophenolate mofetil drug monitoring on the treatment of cardiac allograft rejection. *Transplantation*, 2000, 69(11) : 2326-2330
- Yang JW, Lee PH, Hutchinson IV, Pravica V, Shah T et Min DI, Genetic polymorphisms of MRP2 and UGT2B7 and gastrointestinal symptoms in renal transplant recipients taking mycophenolic acid. *Ther. Drug Monit.*, 2009, 31(5) : 542-548
- Zhang WX, Chen B, Jin Z, Yu Z, Wang X, Chen H, Mao A et Cai W, Influence of uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferases and ABCC2 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites in Chinese renal transplant recipients. *Xenobiotica*, 2008, 38(11) : 1422-1436
- Zhou PJ, Xu D, Yu ZC, Wang XH, Shao K et Zhao JP, Pharmacokinetics of mycophenolic acid and estimation of exposure using multiple linear regression equations in Chinese renal allograft recipients. *Clin Pharmacokinet.*, 2007, 46(5) : 389-401
- Zicheng Y, Weixia Z, Hao C et Hongzhuan C, Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the plasma concentration-time curve in adult patients undergoing liver transplant. *Ther. Drug Monit.*, 2007, 29(2) : 207-214
- Zimmermann AG, Sychala J et Mitchell BS, Characterization of the human inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type II gene. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(12) : 6808-6814
- Zimmermann AG, Wright KL, Ting JP et Mitchell BS, Regulation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type II gene expression in human T cells. Role for a novel 5' palindromic octamer sequence. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(36) : 22913-22923
- Zucker K, Rosen A et col., Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy, and analogous in vitro findings. *Transpl. Immunol.*, 1997, 5(3) : 225-232
- Zucker K, Tsaroucha A, Olson L, Esquenazi V, Tzakis A et Miller J, Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther. Drug Monit.*, 1999, 21(1) : 35-43

---

**TITRE** *Etude pharmacogénétique et pharmacodynamique de la cible de l'acide mycophénolique : l'inosine monophosphate deshydrogenase de type II (IMPDH II).*

---

**RESUME** L'Acide Mycophénolique (AMP), communément utilisé en transplantation, a pour cible l'IMPDH I et II. L'isoforme II est l'étape limitante de la voie de synthèse de novo des purines dont la prolifération lymphocytaire est dépendante. Nos objectifs étaient (i) d'étudier l'effet des métabolites de l'AMP sur l'IMPDH II ; (ii) d'analyser l'effet des polymorphismes génétiques de l'*IMPDH I* et *II* sur la réponse au traitement ; (iii) d'optimiser les méthodes de mesure de l'activité IMPDH. L'activité des métabolites de l'AMP a été étudiée *in-vitro* sur la rhIMPDH II puis extrapolés à la situation *in-vivo*. Seul l'AMPaG possède une activité inhibitrice de l'IMPDH, négligeable dans les conditions d'utilisation thérapeutique du MMF. Le gène de l'*IMPDH II* a été séquencé chez 80 patients transplantés afin d'identifier de nouveaux polymorphismes, sans succès. Plusieurs polymorphismes précédemment décrits n'ont pas été retrouvés. 5 SNPs de l'*IMPDH I* et *II* potentiellement impliqués dans la pharmacodynamie de l'AMP ont été génotypés puis intégrés à une analyse multivariée prenant en compte les variables confondantes de 456 patients. Seul le SNP rs2278294 de l'*IMPDH I* était significativement associé à une diminution de l'incidence de rejets et à une fréquence accrue de leucopénies. Afin d'optimiser la mesure de l'activité IMPDH de PBMC de patients réalisé à l'aide d'un dosage CLHP-UV du XMP formé après incubations *ex-vivo* ; 324 prélèvements sanguins de 27 patients transplantés ont été analysés. La méthode de standardisation du dosage par la concentration protéique était inadaptée. Une alternative utilisant la concentration en ADN de l'échantillon a été mise au point mais n'a également pas présenté de résultats satisfaisants. Une standardisation par la concentration d'Amp publiée entre temps pourrait améliorer nos résultats. Ces travaux ont souligné l'intérêt limité du dosage de l'AMPaG dans le cadre du STP de l'AMP ainsi que l'implication du SNP rs2278294 dans la pharmacodynamie du MMF. La méthode de mesure de l'activité IMPDH *ex-vivo* reste à optimiser.

---

**MOTS-CLES** Acide Mycophénolique (AMP), métabolites, interactions pharmacogénétique pharmacodynamique, séquençage, génotypage, Activité IMPDH, CLHP-UV

---

**TITLE** *Pharmacogenetic and pharmacodynamic study of acid mycophenolic acid's target : Type II Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH II).*

---

**ABSTRACT** Mycophenolic Acid (MPA) is a commonly used immunosuppressant. Its targets are IMPDH I and II. The type II isoform catalyzes the rate-limiting step, *de novo*, purine biosynthesis which lymphocytes are dependant upon for their proliferation. The aims of this work were (i) to study MPA metabolites effect on IMPDH II; (ii) to identify associations between *IMPDH I* and *II* polymorphisms and clinical outcomes; (iii) to optimize methods for IMPDH activity measurement. We evaluated the inhibitory activity of MPA metabolites on rhIMPDH II. Results were extrapolated to the *in vivo* situation using an intracellular accumulation experiment *ex vivo*. AcMPAG showed an inhibition activity which was not strong enough to present an additive effect to that of MPA in therapeutic conditions, showing the poor interest of AcMPAG determination for MPA TDM. We also sequenced *IMPDH II* gene in 80 patients. We did not identify new polymorphism. We genotyped 5 *IMPDH I* and *II* SNPs reported to be associated with clinical outcomes in a population of 456 transplant recipients receiving MMF. We then integrated each genotype in a multivariate analysis taking into account confounding factors. This analysis showed that only the *IMPDH I* rs2278294 SNP was significantly associated with both leucopenia and acute rejection incidence. We tried to optimize an IMPDH activity measurement method based on the dosage of XMP produced *ex-vivo* by incubation of IMP and NAD<sup>+</sup> with PBMC lysates. 324 blood samples were analyzed but the standardization based on protein concentration was inappropriate. The alternative method based on DNA concentration did not provide better results. A recently published method using the intra-lymphocyte Adenosine monophosphate concentration showed reliable results. The *ex-vivo* IMPDH activity measurement is still to be improved.

---

**KEY-WORDS** Mycophenolic Acid (MPA), metabolites, pharmacogenetic-pharmacodynamic interactions, sequencing, genotyping, IMPDH activity, HPLC-UV

---

**DISCIPLINE** : Pharmacologie

---

**Unité Inserm UMR-S850 - Pharmacologie des immunosuppresseurs en transplantation:** Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 LIMOGES