

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

2015

THESE n°63

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2015

par

Mme BERINGER Audrey

Née le 8 mai 1990
à Beaune (21)

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'INOSINE 5'-MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE
(IMPDH) ERYTHROCYTAIRE PAR HPLC CHEZ DES PATIENTS TRAITES PAR DES
MEDICAMENTS THIOPURIQUES OU PAR L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE**

JURY

Mme BOULIEU Roselyne, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier

M. CITTERIO-QUENTIN Antony, Docteur en Pharmacie

Mme BOIRON Adeline, Docteur en Pharmacie

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2015

par

Mme BERINGER Audrey

Né le 8 mai 1990
à Beaune (21)

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'INOSINE 5'-MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE
(IMPDH) ERYTHROCYTAIRE PAR HPLC CHEZ DES PATIENTS TRAITES PAR DES
MEDICAMENTS THIOPURIQUES OU PAR L'ACIDE MYCOPHENOLIQUE**

JURY

Mme BOULIEU Roselyne, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier

M. CITTERIO-QUENTIN Antony, Docteur en Pharmacie

Mme BOIRON Adeline, Docteur en Pharmacie

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|------------------------|
| • Président de l'Université | M. François-Noël GILLY |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil Scientifique | M. Germain GILLET |
| • Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe LALLE |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Jérôme ETIENNE |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis BOURGEOIS |
| • Institut des Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves MATILLON |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE MARCHI |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal FOURNIER |
| • I.U.T. LYON 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| • ESPE | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE –COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)•

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND
Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Sophie ASSANT 85^{ème} section
Monsieur Benoit BESTGEN 85^{ème} section
Madame Marine CROZE 86^{ème} section
Madame Mylène HONORAT MEYER 85^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse

À Madame Roselyne BOULIEU

Professeur d'Université et Praticien Hospitalier.

Pour m'avoir accueillie dans vos locaux durant ces six mois de stage.

Pour votre disponibilité et vos relectures qui m'ont permis de rendre ce travail meilleur.

Pour l'honneur que vous me faites en présidant cette thèse.

Soyez assurée de l'expression de ma sincère reconnaissance.

À Monsieur Antony CITTERIO-QUENTIN

Pharmacien Biologiste à l'Hôpital Edouard Herriot.

Pour m'avoir permis de découvrir le laboratoire de pharmacocinétique.

Pour m'avoir prise en charge, confié des tâches, fait confiance et impliquée dans ce projet qui a été pour moi très enrichissant

Pour m'avoir consacré du temps durant le stage et donné de précieux conseils.

Veillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

À Madame Adeline BOIRON

Pharmacien d'Officine.

Pour l'intérêt porté à mon travail en acceptant de faire partie de ce jury.

Pour le partage de vos connaissances, votre disponibilité et vos conseils qui m'ont permis de progresser sans cesse durant ces années universitaires.

Veillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

À Vincent et Julie

Techniciens au laboratoire de pharmacocinétique

Pour votre grande disponibilité et vos conseils.

Pour m'avoir appris à gérer les « caprices » de l'HP 1050.

Pour toutes les fois où vous avez changé mes vials ou relancé l'analyse lorsque vous étiez de garde.

J'ai vraiment passé un bon stage en votre compagnie.

Aux personnels du laboratoire de Biochimie, de Pharmacologie et de Toxicologie

Pour avoir aimablement accepté de donner votre sang pour cette étude.

À ma famille

À mes parents pour votre générosité, votre soutien et votre aide. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir.

À mon frère sur qui je peux toujours compter.

À mes grands-parents, même si vous n'êtes plus tous de ce monde et que les études restent un grand mystère pour vous, merci pour votre gentillesse.

À mes amis

À Vik, Mamelle et Sab pour tous ces moments passés au cheval et ailleurs. Même si nos chemins nous séparent, on a toujours su conserver notre amitié sûrement grâce à notre passion commune pour l'équitation et tous les moments forts passés ensemble à découvrir la vie.

À Laurent, Momo, Cicy, Stouph, Clacla, Belmiche, Kevin et Lucky Luke.

Pour tous les moments magiques passés ensemble entre les événements pharma, les apéros, les vacances mais aussi les TP et les révisions. Mes années d'étude en pharmacie resteront de supers souvenirs grâce à vous. Heureusement, cette amitié perdure.

À mon cher Coco de m'accepter sur ton dos. Bien que tu ne sois que mon cheval d'adoption, tu restes ma bouffée d'oxygène.

À Romain, qui a su me supporter. Merci d'être présent et d'avoir malicieusement échappé à la relecture de ce manuscrit...

SERMENT DE GALIEN

« Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements. »



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Tables des Illustrations	15
Liste des Abréviations	17
Introduction	19
Partie 1 : Revue Générale de la Littérature	23
1. Rôle de l'IMPDH dans la Biosynthèse des Nucléotides.....	24
2. Mécanisme de la Réaction de Catalysation de l'IMPDH	26
2.1. Mécanisme Général.....	26
2.2. Changement Conformationnel de l'IMPDH.....	27
2.3. Inhibition Non Compétitive du β NAD ⁺ et de ses Analogues	28
3. Structure de l'IMPDH.....	29
3.1. Structure Globale du Tétramère.....	29
3.2. Le Site Actif.....	29
3.3. Activation de l'IMPDH par un Cation Monovalent	30
4. Caractéristiques et Régulation des Isoformes de l'IMPDH	32
5. Génétique de l'IMPDH	33
5.1. Régulation Transcriptionnelle.....	33
5.1.1. L'IMPDH I.....	33
5.1.2. L'IMPDH II.....	33
5.2. Polymorphismes Génétiques	35
5.2.1. L'IMPDH I.....	35
5.2.2. L'IMPDH II.....	37
6. Mesure de l'Activité de l'IMPDH	41
6.1. Mesure de l'Expression des ARNm de l'IMPDH	41
6.2. Mesure de l'Activité de l'IMPDH par des Méthodes Radio-marquées.....	42
6.3. Mesure de l'Activité de l'IMPDH par des Méthodes Chromatographiques avec détection UV	43
6.3.1. Mesure de l'activité de l'IMPDH dans les Cellules Mononucléées du Sang Périphérique.....	44
6.3.2. Mesure de l'Activité de l'IMPDH dans les Cellules du Sang Total et les Erythrocytes	45
7. L'IMPDH dans le Métabolisme des Thiopurines	48
7.1. Molécules disponibles, Indications et Effets Indésirables	48
7.2. Pharmacocinétique	50
7.2.1. Absorption et Distribution.....	50
7.2.2. Métabolisme et Elimination.....	50
7.3. Mécanisme d'Action.....	53
7.3.1. Incorporation des 6-TGN dans l'ADN/ARN	53
7.3.2. Blocage de la Voie Anti-apoptotique des Lymphocytes T via RAC1.....	53
7.3.3. Inhibition de la Synthèse de novo de Purines	53

7.4. Sources de Variabilité à la Réponse Thérapeutique.....	54
7.4.1. Interactions d'ordre Pharmacocinétique liées au Métabolisme	54
7.4.2. Pharmacogénétique.....	55
7.5. Suivi Thérapeutique Pharmacologique Recommandé.....	57
7.5.1. Génotype et Phénotype de la TPMT	58
7.5.2. Dosage des Métabolites Actifs	58
7.5.3. Limites.....	59
7.6. Rôle Potentiel du Phénotype de l'IMPDH dans la Réponse Thérapeutique....	60
8. L'Acide Mycophénolique, un Inhibiteur de l'IMPDH	64
8.1. Formes Commerciales et Indications	64
8.2. Pharmacocinétique	65
8.2.1. Absorption et Distribution.....	65
8.2.2. Métabolisme et Elimination.....	65
8.3. Mécanisme d'Action.....	67
8.3.1. Arrêt du Cycle Cellulaire, Mort Cellulaire.....	68
8.3.2. Inhibition de la Synthèse de Glycoprotéines	68
8.3.3. Diminution de la Production d'Oxyde Nitrique	68
8.3.4. Transduction du signal.....	69
8.3.5. Rôle dans l'Equilibre Lymphocytes Th17 / Lymphocytes T Régulateurs	69
8.4. Effets Indésirables	69
8.5. Sources de Variabilité à la Réponse Thérapeutique.....	70
8.5.1. Variabilités Pharmacocinétiques	70
8.5.2. Variabilité Pharmacodynamique	71
8.5.3. Pharmacogénétique.....	71
8.6. Suivi Thérapeutique Pharmacologique.....	73
8.6.1. Approches Pharmacogénétiques	73
8.6.2. Suivi Pharmacocinétique : Exposition à l'Acide Mycophénolique	73
8.6.3. Biomarqueurs Pharmacodynamiques	74
Partie 2 : Détermination de l'Activité de L'IMPDH dans les érythrocytes.....	76
1. Matériels et Méthodes.....	78
1.1. Résumé de la Méthode de l'Article.....	78
1.1.1. Méthode de Mesure de l'Activité de l'IMPDH et sa Validation	78
1.1.2. Inclusion des Sujets Sains et des Patients traités par l'Azathioprine et la 6-Mercaptopurine	80
1.2. Inclusion des Sujets Transplantés traités par l'Acide Mycophénolique	81
1.3. Analyses Statistiques.....	81
2. Résultats.....	82
2.1. Résumé des Résultats de l'Article.....	82
2.1.1. Validation de la Méthode de Mesure de l'Activité de l'IMPDH	82
2.1.2. Variabilité Interindividuelle de l'Activité de l'IMPDH chez les Sujets Sains et les Patients traités par l'Azathioprine ou la 6-Mercaptopurine	83
2.2. Activité de l'IMPDH érythrocytaire chez les Patients Transplantés traités par l'Acide Mycophénolique	85

2.3. Variabilité Intra-individuelle de l'Activité de l'IMPDH chez des Patients traités par l'Azathioprine	87
3. Article Scientifique : « Determination of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Phenotype in Red Blood Cells using HPLC »	88
4. Discussion.....	109
4.1. Résumé de la Discussion de l'Article	109
4.1.1. Comparaison des Méthodes de Mesure de l'Activité de l'IMPDH	109
4.1.2. Variabilité Inter-individuelle des Sujets Sains et Patients traités par l'Azathioprine et la 6-Mercaptopurine	111
4.2. Variabilité intra-individuelle de Patients traités par l'Azathioprine	112
4.3. Activité de l'IMPDH des Patients Greffés traités par l'Acide Mycophénolique.....	113
Conclusions.....	118
Références Bibliographiques.....	120

TABLES DES ILLUSTRATIONS

TABLES DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

FIGURE 1 : Représentation schématique des voies de biosynthèse <i>de novo</i> et de sauvetage des nucléotides puriques	25
FIGURE 2 : Mécanisme de la réaction de catalyse de l'IMPDH	26
FIGURE 3 : Changement de conformation de l'IMPDH lors de la réaction de catalyse.	28
FIGURE 4 : Mécanisme cinétique de l'IMPDH	28
FIGURE 5 : Représentation schématique des interactions XMP*-IMPDH.	30
FIGURE 6 : Structure génomique de l'IMPDH I (A) et II (B).....	34
FIGURE 7 : Métabolisme de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine	52
FIGURE 8 : Variabilités et suivi thérapeutique de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine.	57
FIGURE 9 : Echanges intercellulaires des nucléotides de la 6-thioguanine.....	62
FIGURE 10 : Structures chimiques de l'acide mycophénolique, du mycophénolate mofétil et du mycophénolate sodique.	64
FIGURE 11 : Métabolisme de l'acide mycophénolique par les enzymes de phase II.....	67
FIGURE 12 : Mécanisme d'inhibition de l'IMPDH par l'acide mycophénolique.	68
FIGURE 13 : Variabilités et suivi thérapeutique de l'acide mycophénolique	72
FIGURE 14 : Boîtes à dispersion de l'activité de l'IMPDH pour les sujets sains, les patients adultes et pédiatriques traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.	83
FIGURE 15 : Distribution de l'activité de l'IMPDH chez les sujets sains, les patients adultes et pédiatrique traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.....	84
FIGURE 16 : Graphique en bande de l'activité de l'IMPDH chez les sujets sains, les patients adultes et pédiatriques traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine et les patients greffés traités par l'acide mycophénolique.....	86

TABLEAUX

TABLEAU 1 : Comparaison des trois méthodes chromatographiques de mesure de l'IMPDH dans les érythrocytes et les cellules du sang total.	46
TABLEAU 2 : Formules, classifications, indications et effets indésirables de la 6-thioguanine, de la 6-mercaptopurine, et de l'azathioprine.....	49
TABLEAU 3 : Caractéristiques des sujets sains et des patients traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.	80
TABLEAU 4 : Récapitulatif des paramètres optimisés : gammes de valeurs testées et valeurs sélectionnées.....	82
TABLEAU 5 : Caractéristiques et activités de l'IMPDH des patients transplantés traités par l'acide mycophénolique.	85
TABLEAU 6 : Caractéristiques et variabilités Intra-individuelles de l'activité de l'IMPDH chez 14 patients traités avec l'azathioprine.....	87

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

• AMP	adénosine monophosphate
• ASC	aire sous la courbe de la concentration en fonction du temps
• ATC	système de classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique
• AZA	azathioprine
• CBS	cystathionine- β -synthase
• GMP	guanosine 5'-monophosphate
• HGPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase
• HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
• IMPDH	inosine 5'-monophosphate déshydrogénase
• IMP	inosine 5'-monophosphate
• ITPA	inosine 5'-triphosphate pyrophosphate
• LLOQ	limite basse de quantification
• 6-MeMPN	6-methyl-mercaptopurine nucléotides
• 6-MP	6-mercaptopurine
• MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
• MPA	acide mycophénolique
• MPAG	acide mycophénolique-phenyl-glucuronide
• β NAD	β -nicotinamide adénine dinucléotide
• PD	pharmacodynamique
• PK	pharmacocinétique
• PRPP	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
• SNP	polymorphisme mononucléotidique
• STP	Suivi Pharmacologique Thérapeutique
• 6-TGN	nucléotides de la 6-thioguanine
• TPMT	thiopurine S-méthyltransférase
• XMP	xanthosine 5'-monophosphate

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les immunosuppresseurs sont des traitements inhibant la réponse immunitaire. Ainsi, ils sont indiqués dans de nombreuses maladies auto-immunes et inflammatoires liées à une hyperactivité du système immunitaire. Les médicaments immunosuppresseurs sont également utilisés en prophylaxie chez les patients greffés afin d'empêcher l'organe, le tissu ou des cellules transplantés soient attaqués par le système immunitaire du receveur conduisant à un rejet. Les patients reçoivent, le plus souvent, une association de plusieurs immunosuppresseurs agissant différemment sur une partie spécifique du système immunitaire. Malheureusement, ces médicaments utilisés pour l'immunosuppression agissent à d'autres endroits de l'organisme entraînant des effets indésirables liés à l'immunosuppression (infections, cancers) et liés à la toxicité « non immune ».

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est défini par l'Association Internationale de Suivi Thérapeutique Pharmacologique et de Toxicologie Clinique (IATDMCT) comme « *une spécialité clinique pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose de médicaments pour lesquels le bénéfice clinique du STP a été démontré dans la population générale ou dans une population particulière. Il repose sur des informations pharmacogénétiques, démographiques et cliniques a priori et/ou sur la mesure à posteriori des concentrations sanguines du médicament ou de composées endogènes de substitution ou de paramètres biologiques d'effets* ». Le but principal du STP est d'individualiser le traitement afin de diminuer le taux d'échecs thérapeutiques liés à une mauvaise observance ou une dose insuffisante et de réduire la fréquence des effets indésirables liés à une dose excessive du médicament. Pour des raisons pratique et économique, le STP s'applique uniquement aux traitements dont le risque d'inefficacité et d'effets indésirables sont lourds de conséquence. Le STP est particulièrement utile pour les médicaments présentant une marge thérapeutique étroite, une grande variabilité interindividuelle de la relation concentration-effet et une réponse pharmacologique difficilement accessible.

L'azathioprine (AZA) et la 6-Mercaptopurine (6-MP), de la classe des thiopurines, et l'acide mycophénolique (MPA) sont des immunosuppresseurs anti-métabolites inhibant la prolifération des lymphocytes en agissant sur la synthèse de l'ADN et l'ARN. Depuis les années 90, l'AZA est largement remplacé par le MPA dans la prévention du risque de rejet. Cependant, l'AZA et la 6-MP sont aussi prescrits dans les formes sévères de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques et auto-immunes bien que la 6-MP ne possède pas cette indication spécifique dans son Autorisation de Mise sur le Marché. Du fait de l'importance des effets indésirables et du risque d'inefficacité pouvant se manifester par un rejet aigu chez les patients transplantés, l'utilité du STP de ces trois molécules semble incontestable. A l'heure actuelle, le STP des médicaments thiopuriques s'effectue par le dosage des métabolites, ainsi que le génotypage et le phénotypage d'une enzyme impliquée dans le métabolisme des thiopurines présentant un polymorphisme ayant un impact sur son activité. Le STP du MPA fait appel, lui, à un paramètre pharmacocinétique (PK) : la concentration plasmatique du MPA. Cependant, le STP de ces médicaments a des limites : la survenue d'effets indésirables et les échecs thérapeutiques restent parfois inexpliqués.

L'Inosine 5'-Monophosphate Déshydrogénase (IMPDH) est une enzyme clé de la régulation du pool intracellulaire des nucléotides de la guanine. Cette enzyme est également impliquée dans la première réaction de la voie métabolique de l'AZA et de la 6-MP formant les métabolites actifs principalement responsables de l'action thérapeutique. Cette position stratégique dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP fait que le phénotype de l'IMPDH pourrait jouer un rôle dans la réponse thérapeutique de ces deux médicaments thiopuriques. Le MPA est un inhibiteur de l'IMPDH, l'activité de l'IMPDH pourrait donc être un biomarqueur pharmacodynamique (PD) du MPA.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode de mesure de l'activité de l'IMPDH utilisable en pratique clinique courante et d'étudier cette activité dans différentes populations de sujet afin de déterminer le rôle du phénotype de l'IMPDH dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP et d'évaluer la réponse pharmacodynamique du MPA.

Dans une première grande partie nommée « revue générale de la littérature », la fonction *in vivo* de l'IMPDH, son mécanisme, sa structure, sa régulation et les méthodes

disponibles de mesures de son activité seront détaillées. Ces données sont essentielles dans la mise au point d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité de l'IMPDH. Nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement aux sources de variabilités de la réponse thérapeutique de l'AZA, la 6-MP et du MPA, après une revue de leur PK et de leurs mécanismes d'action. Le but est de situer et d'évaluer la place de l'IMPDH dans la réponse thérapeutique.

La seconde partie, expérimentale, s'articulera autour d'un article scientifique traitant de la mise au point de la méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes. La méthode employée et les résultats des activités de l'IMPDH mesurées chez différentes populations de sujets seront exposés. Une partie discussion suivra, afin de mettre en lien nos résultats avec les données de la littérature.

REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE

PARTIE 1 : REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE

1. Rôle de l'IMPDH dans la Biosynthèse des Nucléotides

Les enzymes de la voie de biosynthèse des nucléotides sont essentielles afin d'assurer la prolifération cellulaire. Les cellules peuvent synthétiser des nucléotides par deux voies différentes (FIGURE 1) : la voie *de novo* et la voie de sauvetage. La voie *de novo* consiste à l'assemblage du noyau purique ou pyrimidique étape par étape, tandis que la voie de sauvetage recycle les bases nucléiques (1).

La première étape de la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides de la guanine est catalysé par l'Inosine-5'-Monophosphate Déshydrogénase (IMPDH, E.C. 1.1.1.205). Cette enzyme catalyse l'oxydation de l'Inosine 5'-Monophosphate (IMP) en Xanthosine 5'-Monophosphate (XMP) à l'aide d'un cofacteur : le β -Nicotinamide Adénine Dinucléotide (β NAD). L'XMP sera ensuite converti en Guanosine 5'-Monophosphate (GMP) par la GMP synthase (E.C. 6.3.5.2). Après l'action de plusieurs enzymes, la GMP se transformera en dGTP et GTP qui sont des éléments constitutifs de l'ADN et ARN, respectivement. Ainsi, cette enzyme est essentielle pour la prolifération cellulaire.

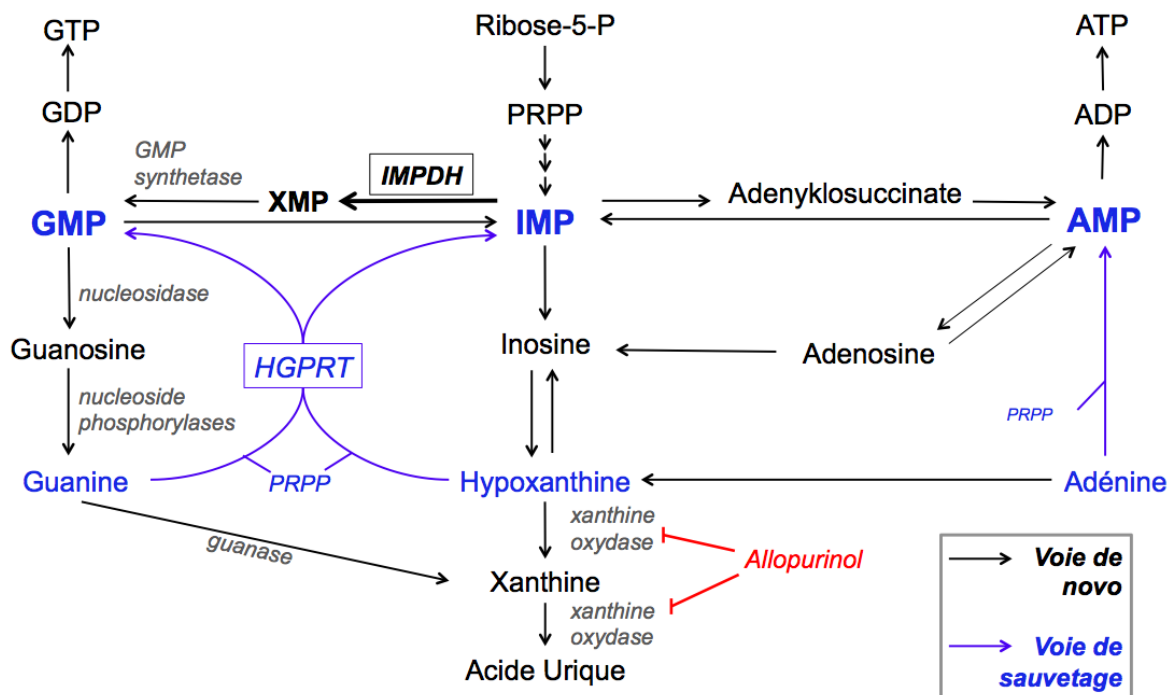


FIGURE 1 : Représentation schématique des voies de biosynthèse *de novo* et de sauvetage des nucléotides puriques d'après (2).

L'allopurinol inhibe la xanthine oxydase. AMP/ADP/ATP : Adénosine ; Mono/Di/Triphosphate ; GMP/GDP/GTP : Guanosine Mono/Di/Triphosphate ; HGPRT : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase ; IMP : Inosine 5'-monophosphate ; PRPP : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ; XMP : Xanthine monophosphate

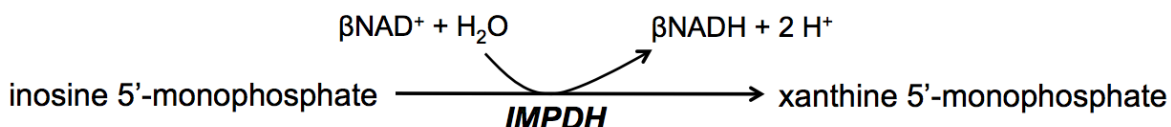
Les lymphocytes sont incapables de recycler les bases puriques par la voie de sauvetage, ils sont dépendants de la voie de synthèse *de novo* des nucléotides puriques catalysés par l'IMPDH (2). Les inhibiteurs de l'IMPDH engendrent donc un effet antiprolifératif des lymphocytes dû à l'interruption de la biosynthèse d'ADN et d'ARN (3). Cet effet antiprolifératif fait des inhibiteurs de l'IMPDH de bons agents anti-leucémiques et immunosuppresseurs.

L'inhibition de l'IMPDH, réduisant le pool des nucléotides de guanine, provoque également une diminution de la signalisation intracellulaire (4) ; une réduction de la synthèse du cofacteur BH₄ (tétrahydrobioptérine) se traduisant par la diminution du processus inflammatoire ; et une inhibition de l'expression des glycoprotéines et des molécules d'adhésions responsables du recrutement des monocytes et des lymphocytes sur le site de l'inflammation. Une inhibition de cette enzyme entraîne donc des réponses biologiques variées ; par conséquent, l'IMPDH apparaît comme une cible majeure des antiviraux, des anticancéreux et des immunosuppresseurs (5,6).

2. Mécanisme de la Réaction de Catalysation de l'IMPDH

2.1. Mécanisme Général

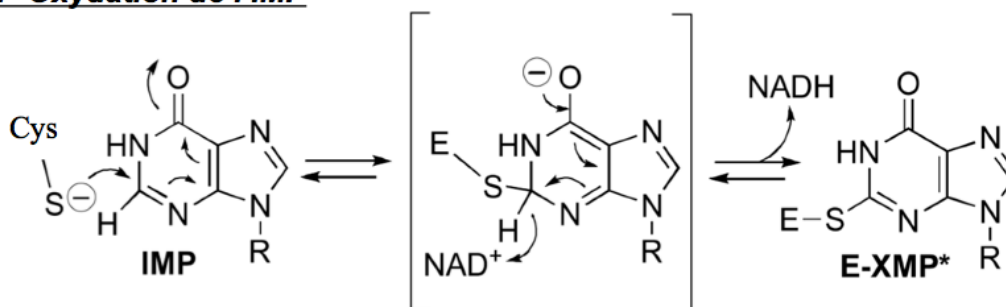
La réaction catalysée par l'IMPDH est la suivante :



L'IMPDH catalyse deux différentes réactions chimiques (FIGURE 2) :

- une réaction redox impliquant un transfert d'hydrure au βNAD^+ qui génère le βNADH et forme un intermédiaire E-XMP* par une liaison covalente entre l'XMP et l'enzyme puis,
- une réaction d'hydrolyse libérant l'XMP de l'enzyme (6).

1- Oxydation de l'IMP



2- Hydrolyse de l'E-XMP*

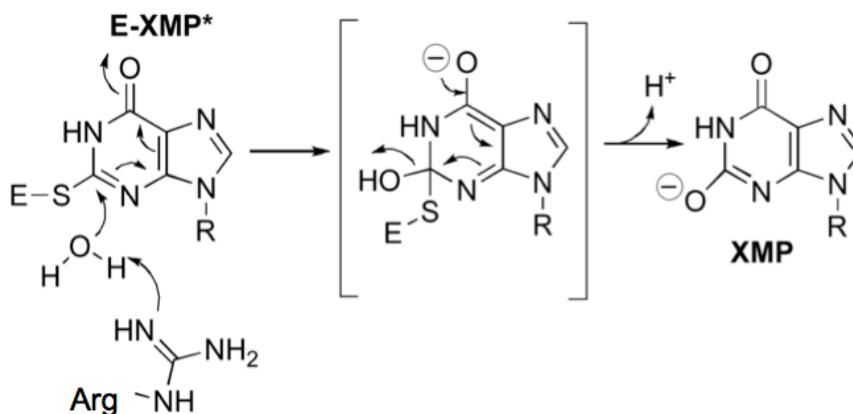


FIGURE 2 : Mécanisme de la réaction de catalyse de l'IMPDH d'après (6).

En premier lieu, le résidu Cys331 (*numérotation selon l'IMPDH humaine*) situé au niveau du site actif de l'enzyme va attaquer, par addition nucléophile, la position 2 du noyau purique de l'IMP formant un adduit tétraédrique. Celui-ci sera ensuite stabilisé par le transfert d'hydrure au βNAD^+ libérant le βNADH et conduisant à l'intermédiaire E-XMP*

(7). Le recrutement du βNAD^+ pour cette première étape de la réaction serait dû à la liaison de l'enzyme à l'IMP qui augmenterait l'affinité pour le βNAD^+ (8).

Le βNADH va alors s'écarter du site actif de l'enzyme permettant l'accès aux résidus Arg-Tyr d'occuper le site dinucléotide vacant. Le résidu arginine va ensuite réagir comme une base en activant une molécule d'eau engendrant l'hydrolyse entre l'IMPDH et l'XMP (6). Pour cette étape, l'enzyme doit rabattre son côté distal pour adopter une conformation fermée.

Les mutants Arg418Ala (*substitution du résidu arginine 418 par l'alanine, la numérotation de Trichomonas foetus sera utilisée dans la suite de cette partie*) et Tyr419Phe de *T. foetus* montre une activité de l'IMPDH diminuée d'un facteur 500 et 10 respectivement, mais sans affecter la première étape de catalysation. D'autres analyses montrent que ces mutations déstabilisent la conformation fermée de l'enzyme requise pour l'étape d'hydrolyse. Le duo Arg418 et Tyr419 semble donc être essentiel à cette seconde étape de la réaction enzymatique de l'IMPDH (9).

Des simulations selon des algorithmes métadynamiques à partir de la structure cristalline de *Trichomonas foetus* suggèrent que le résidu Thr321 localisé sur la même boucle catalytique Cys319 est aussi capable d'activer cette molécule d'eau et serait la voie dominante lorsque le résidu Arg418 est alors protoné soit à pH bas. Cette voie utilisant le résidu Thr321 aurait été la voie exclusive dans la forme ancestrale de l'IMPDH et aurait été perdue pendant l'évolution au profit du résidu Arg418, plus efficient (10).

L'hydrolyse de l'E-XMP* constitue l'étape limitante de la réaction de catalyse de l'IMPDH (11,12).

2.2. Changement Conformationnel de l'IMPDH

Comme on vient de le voir, l'IMPDH est donc capable de réaliser les deux types de réactions dans le même site actif. L'IMPDH possède ainsi deux conformations : ouverte pour la réaction redox et fermée pour l'hydrolyse de l'E-XMP* (FIGURE 3) (10) .

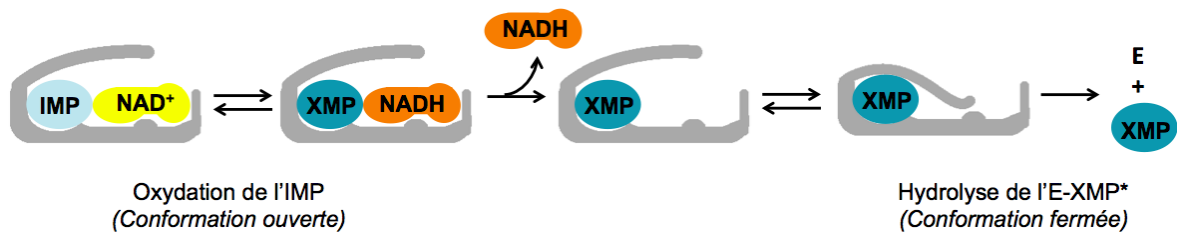


FIGURE 3 : Changement de conformation de l'IMPDH lors de la réaction de catalyse d'après (6, 10). Après le départ du β NADH, l'enzyme adopte une conformation fermée nécessaire à l'étape d'hydrolyse.

2.3. Inhibition Non Compétitive du β NAD⁺ et de ses Analogues

La découverte de l'intermédiaire E-XMP*, l'utilisation d'analogues du β NAD⁺, la mesure d'isotopes et l'étude des cinétiques « pré-stables » suggèrent que les substrats de l'IMPDH se lient de façon aléatoire à l'enzyme (FIGURE 4) (12–14). De fortes concentrations de substrat du β NAD⁺ peuvent piéger l'intermédiaire E-XMP*. Ainsi le β NAD⁺ peut inhiber l'IMPDH à certaine concentration. Selon les valeurs de la constante d'inhibition du β NAD⁺ retrouvées dans l'étude d'Hupe *et al.*, une fraction significative du E-XMP*· β NAD⁺ pourrait exister dans des conditions physiologiques. Cependant, cette inhibition de l'IMPDH par le β NAD⁺ à des fortes concentrations n'est pas retrouvée chez les bactéries. Ceci laisse envisager que ce phénomène soit une évolution de l'enzyme, dans les organismes eucaryotes, à réguler la biosynthèse de nucléotides de la guanine (6,15).

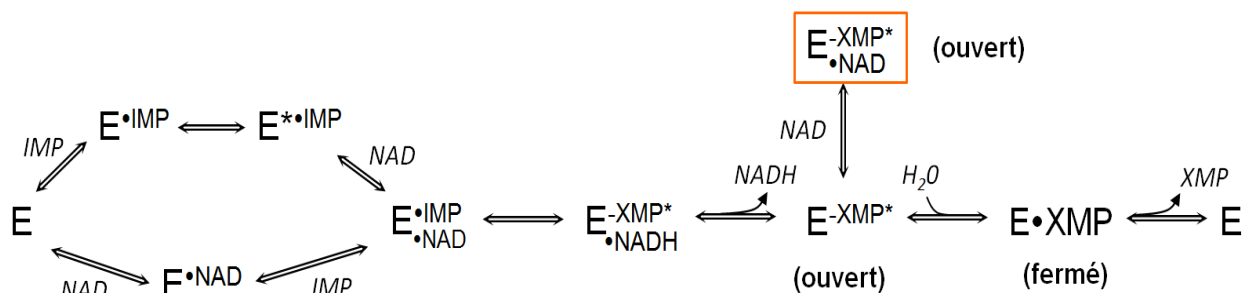


FIGURE 4 : Mécanisme cinétique de l'IMPDH d'après (12, 15).

Les indications « ouvert » et « fermé » indique la conformation de l'enzyme. Le complexe inhibiteur est encadré en orange.

3. Structure de l'IMPDH

3.1. *Structure Globale du Tétramère*

L'IMPDH humain est active sous forme d'homotétramère (16). Chaque monomère est composé de 2 domaines : un grand domaine catalytique composé d'un enchaînement de feuillets β et d'hélices α (β/α)₈, et d'un petit domaine adjacent (résidus 110 – 244) contenant deux domaines CBS (cystathionine- β -synthase ou domaine Bateman). Sa jonction avec le domaine catalytique est flexible, pouvant varier jusqu'à 120° (6). La suppression du domaine CBS chez *Escherichia coli* a entraîné un arrêt de croissance, l'adenosine et l'inosine vont se convertir en ATP. En effet, ce phénomène engendre une accumulation des bases puriques d'adénine qui induit une inhibition de PRPP synthétase (par l'AMP et l'ADP) et donc une déplétion du précurseur des nucléotides puriques et pyrimidiques : la PRPP (FIGURE 1) (17). Le domaine CBS n'est pas requis pour l'activité de l'enzyme mais pourrait donc agir comme une région régulatrice (7).

Le site actif de l'enzyme se trouve au niveau de la boucle (résidus 325-342) du côté C-terminal des feuillets β . Cette boucle contient l'acide aminé Cys331 responsable de la première étape de la réaction catalytique que l'on a vu précédemment. La boucle Cys331 est liée au segment C-terminal *via* un cation monovalent.

Un large segment entre β_8 et α_8 (résidus 110-244) forme un « rabat » couvrant le site actif. Cette portion va s'ouvrir et se fermer sur le site actif durant la réaction de catalyse : la conformation ouverte est requise pour la réaction d'oxydation tandis que la conformation fermée est nécessaire pour l'hydrolyse (FIGURE 3) (18).

3.2. *Le Site Actif*

Deux sites distincts mais adjacents permettent la réaction de catalyse : une région liant le substrat, soit l'IMP, et l'autre liant le cofacteur, soit le β NAD⁺.

Lors de la réaction, l'intermédiaire XMP* va être lié de façon covalente au résidu Cys331. Cependant, il existe de nombreuses autres interactions non covalentes entre le noyau purique et les autres résidus du site catalytique. La fonction phosphate de l'IMP va se lier à certains acides aminés par leurs fonctions amides ou hydroxyles : la Tyr411, la Ser388, la Ser329, la Gly366 et la Gly387 (FIGURE 5). Le « rabat » ou volet actif va lui se lier au noyau de l'hypoxanthine par la Met414, la Gly415 et la Gln441. Les groupements

hydroxyles du ribose interagissent avec la Ser68 et l'Asp364. Des interactions Van der Waal sont aussi observées entre l'intermédiaire réactionnel XMP* et le Met70 ainsi que l'Ile330 (19,20). L'ensemble de ses interactions semblent organiser la structure de l'IMPDH afin que la réaction de catalyse soit assurée (7). En effet, une étude de protéolyse effectuée par Nimmesgen *et al.* montre que l'IMPDH est protégé du clivage par l'elastase (enzyme clivant des séquences de l'IMPDH du côté C-terminal) en présence de l'IMP ou de l'XMP au niveau du site actif. Ces interactions non covalentes peuvent ainsi, en être la cause (1).

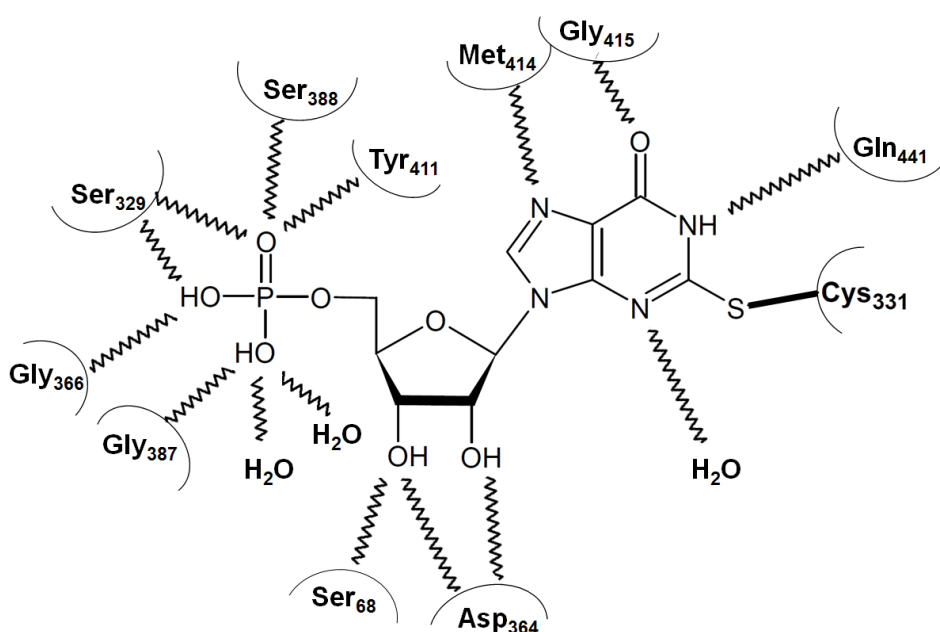


FIGURE 5 : Représentation schématique des interactions XMP*-IMPDH d'après (7,19). Il existe une liaison covalente entre l'atome sulfure de Cys331 (numérotation selon l'IMPDH humaine) et le carbone C2 du noyau de l'hypoxanthine.

3.3. Activation de l'IMPDH par un Cation Monovalent

La réaction de catalyse ne fait pas appel à un cation monovalent. Cependant, celui-ci est requis pour activer l'enzyme même si son mécanisme d'action n'est pas tout à fait clair. Toutes les IMPDH des différentes espèces sont activées par le potassium (K^+) même si la spécificité varie. Chez l'homme, le K^+ , le sodium (Na^+), le rubidium (Rb^+), le thallium (Tl^+) et l'ammonium (NH_4^+) activent tous l'IMPDH alors que le lithium (Li^+) n'a pas d'action sur l'activité de l'IMPDH (6). Toutefois, le K^+ et le Tl^+ sont les activateurs les plus puissants : ils produisent une activité maximale à des concentrations 10 fois inférieures aux autres cations monovalents. Ceci suggère que l'activité de l'IMPDH adopterait

différentes conformations faisant varier son activité en fonction du rayon ionique des différents cations qu'il lie. De plus, la taille du cation pourrait être un facteur sélectif. Enfin, une étude montre que la suppression des cations monovalents de l'IMPDH II humaine par dialyse n'engendre pas une perte irréversible d'activité de l'IMPDH ni une destruction de la structure tétramère (21).

L'ion K^+ représente le cation permettant une activité enzymatique la plus élevée. Il interagit avec des carbonates provenant d'acides aminés situé dans la boucle Cys331 et l'hélice en C-terminal (6). Trois de ces résidus sont adjacents aux autres sous-unités de l'IMPDH, ils stabiliseraient donc la forme tétramère de l'enzyme. De plus, l'ion K^+ pourrait agir en organisant la conformation protéique de la boucle constituant le site actif afin de positionner la Cys331 nécessaire à la réaction de catalyse (7). Une étude utilisant le calcul des forces potentielles indique que la présence de K^+ améliore le déplacement de la conformation « fermée » à « ouverte » de l'IMPDH. Le K^+ semble donc agir à la fois dans l'organisation et la mobilisation de la structure afin de faciliter les changements conformationnels (22). Ainsi, le K^+ est un cofacteur de choix nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme.

4. Caractéristiques et Régulation des Isoformes de l'IMPDH

Dans l'espèce humaine, il existe deux iso-enzymes distinctes de l'IMPDH : IMPDH I et IMPDH II, codées par deux gènes distincts. Ces deux iso-enzymes contenant 514 résidus avec une masse de 56 kDa, partagent 84 % d'homologie de leur séquence (23). Leurs propriétés cinétiques sont également similaires. On retrouve les deux isoformes dans la plupart des tissus, toutefois, l'IMPDH I est prédominant au niveau de la rate, la rétine et les cellules sanguines mononucléées périphériques (6,24,25). Généralement, l'IMPDH I est exprimée à faible niveau alors que l'activité de l'IMPDH II est surexprimée dans les cellules peu différenciées avec une forte activité mitogène (26,27), comme les lymphocytes T et B activés ou les cellules néoplasiques (28,29). L'isoforme II serait ainsi inductible.

Une étude chez des souris KO (*Knocked-Out*, inactivation) du gène de l'IMPDH II a montré une létalité embryonnaire précoce, prouvant l'importance de ce gène (30). Cette protéine a donc un rôle vital pour la survie cellulaire ce qui explique sa forte conservation au cours de l'évolution et le faible nombre de variants fonctionnels décrits dans la littérature (31). Par contre, l'inactivation du gène de l'IMPDH I chez les souris, n'a pas provoqué de dysfonctions concernant le développement et la fertilité des souris (32).

Une augmentation d'un facteur 5 des nucléotides de la guanine paraît essentielle pour une prolifération cellulaire en particulier pour les lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique et mitogénique. L'ajout de GTP en excès semble diminuer la transcription des deux gènes de l'IMPDH supposant donc un rétrocontrôle négatif de GTP sur l'IMPDH, qui constitue l'enzyme responsable de l'étape limitante de la synthèse *de novo* des nucléotides de la guanine (33,34).

Les isoformes de l'IMPDH I et II seraient également régulées différemment par l'AMP et l'ATP. En effet, la fixation de l'AMP au domaine CBS induirait un changement conformationnel de l'IMPDH II qui altère l'accès du site de clivage d'une protéase se traduisant ainsi par une protection significative de l'IMPDH II. Ce phénomène est aussi visible lors de la fixation de l'ATP sur l'IMPDH I. Toutefois, contrairement à l'XMP, l'incubation de AMP et ATP n'engendre pas une augmentation d'activité de l'IMPDH, ils n'ont donc pas un rôle d'activation allostérique de l'enzyme (35).

Ainsi, les isoformes humaines répondent à des régulations distinctes et sont exprimées différemment dans chaque tissu.

5. Génétique de l'IMPDH

Comme nous venons de le voir, les deux isoenzymes sont codées par deux gènes distincts. Le gène codant pour l'IMPDH I est localisé sur le chromosome 7 (7q31.3-q32) et celui codant pour l'IMPDH II sur le chromosome 3 (3p21.2-p24.2). La séquence codante nucléotidique de ces deux gènes présente approximativement 76 % de similitude (5).

5.1. *Régulation Transcriptionnelle*

5.1.1. L'IMPDH I

Le gène de l'IMPDH I a une taille d'environ 18 kb avec une partie codante composée de 14 exons (FIGURE 6). Les travaux de Gu *et al.* ont montré que la transcription de l'IMPDH I est régulée par trois promoteurs distincts conduisant à trois ARNm de tailles différentes. Le promoteur P1 code pour un transcrit de 4 kb et possède un site de fixation du facteur de transcription spécifique NF κ B (Nuclear factor kappa B) impliqué dans la régulation de nombreux gènes suite à l'activation des lymphocytes B et T et en réponse aux cytokines inflammatoires (31,36). Le promoteur P2 entraîne la transcription d'un ARNm de 2,7 kb et le promoteur P3, un transcrit de 2,5 kb. L'expression des transcrits induits par les promoteurs P1 et P3 est fortement augmentée lors de l'activation des lymphocytes T (25). Par la présence des trois promoteurs, l'expression de l'IMPDH I semble être régulée de façon complexe et différente selon les tissus par la fixation de facteurs spécifiques *trans*-régulateurs (36).

5.1.2. L'IMPDH II

Par comparaison avec le gène de l'IMPDH I, l'IMPDH II possède un gène bien plus petit de 5,8 kb ne comprenant ni les trois exons côté 5' (A, B et C), ni l'exon 13b, ni la région non-codante en 3' du gène de l'IMPDH I (FIGURE 6). Cependant, les 14 exons de la partie codante sont identiques au gène de l'IMPDH I en terme de taille et de composition en acides aminés, à l'exception d'une substitution isoleucine → valine au niveau de la frontière entre l'exon 5 et 6 (37).

L'IMPDH II possède un seul promoteur codant pour un seul ARNm de 2,3 kb. L'équipe de Zimmermann *et al.* a identifié le site de transcription du gène de l'IMPDH II en position - 50 ainsi que 7 sites *cis*-régulateurs sur 200 paires de bases en amont de ce site de

transcription (37). Ces séquences *cis*-régulatrices comprennent entre autre deux sites CRE (*cAmp responsive element*) permettant la fixation de la protéine CREB (*cAMP-response element binding protein*) dépendante de la concentration cellulaire en AMP cyclique (AMPc) pour être activé. L'AMPc est un messager second impliqué dans la cascade de signalisation de la mitose, ainsi, les motifs CRE pourraient activer la transcription du gène lors des phases de divisions cellulaires (31).

La même équipe s'est également intéressée à l'activation des régions promotrices dans les lymphocytes T activés par des *stimulus* induisant leurs proliférations (38). Ils ont constaté une absence de variation de la demi-vie de l'ARNm de l'IMPDH II à différents temps après activation d'une population de lymphocytes démontrant que la stabilité de l'ARNm a été conservée et donc que cet ARNm n'a subi aucune régulation post-transcriptionnelle en réponse à l'activation lymphocytaire. Ainsi, la régulation du pool d'ARNm ne se déroule pas à un niveau post-transcriptionnel mais à un niveau transcriptionnel en faisant appel à des séquences *cis*-régulatrices (31).

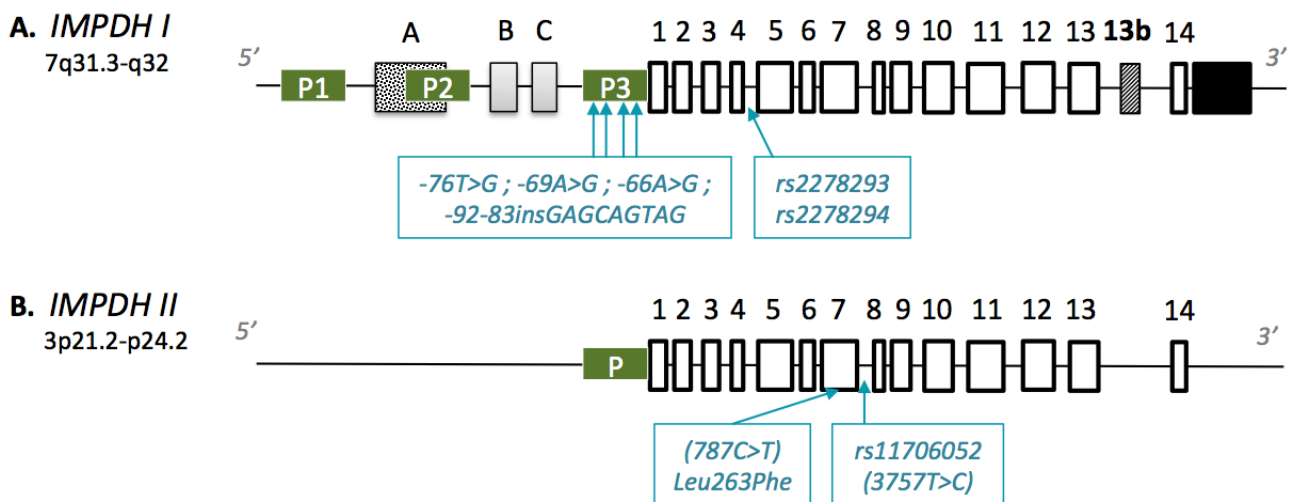


FIGURE 6 : Structure génomique de l'IMPDH I (A) et II (B) d'après (5,39).

Les différents exons sont représentés par des rectangles nommés par des lettres ou des numéros. Les rectangles verts correspondent aux promoteurs. Les flèches indiquent les principales mutations qui seront décrites dans la *sous-partie suivante* 5.2.

5.2. Polymorphismes Génétiques

Dans cette partie, nous recenserons uniquement les variants alléliques de l'IMPDH ayant fait l'objet de publications et ayant un impact potentiel sur l'activité de l'enzyme ou sur des données cliniques. Le but est d'étudier les polymorphismes génétiques présentant des applications potentielles pharmacogénétiques.

5.2.1. L'IMPDH I

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, il existe plusieurs transcrits possibles à partir du gène de l'IMPDH. Parmi eux, différentes isoformes obtenues par mutation faux sens ont été identifiées chez des fratries atteintes de rétinite pigmentaire à transmission autosomique dominant : la Thr116Met, l'Asp226Asn, la Val268Ile, la Gly324Asp, l'Arg231Pro et l'His372Pro. Cependant, leurs implications dans cette pathologie restent encore à définir. Ces mutations ne seront pas détaillées étant donné que la rétinite pigmentaire ne fait pas partie de notre problématique.

L'étude de Wang *et al.* s'est intéressée à l'influence des variations génétiques de l'IMPDH I sur la réponse et la toxicité du MPA, immunosuppresseur inhibiteur de l'IMPDH, chez des patients transplantés. Le séquençage de 30 patients transplantés hépatiques a rapporté deux nouveaux SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou polymorphisme mononucléotidique) faux-sens au niveau des exons 10 et 15 conduisant aux substitutions suivantes : l'Asp301Asn et la Gly519Arg, respectivement. Cependant, ces deux SNPs n'ont induit aucune modification de l'IMDPH ni sur sa production ni sur son activité ni sur ses liaisons (40).

De plus, la même étude a observé 15 autres SNPs après génotypage de 191 transplantés rénaux. Deux de ces SNPs (le rs2278293 (G>A) et le rs2278294 (G>A)), localisés sur l'intron 7 (FIGURE 6) ont montré une incidence significativement inférieure du rejet aigu confirmé par biopsie lors de la première année post-transplantation chez les patients transplantés porteurs de ces polymorphismes. Aucun des SNPs génotypés n'a présenté d'impact sur l'incidence du risque de leucopénie (40). Les travaux effectués par Gensburger *et al.* de génotypage des deux SNPs rs2278293 et rs2278294 de l'IMPDH I comprenant 456 patients transplantés rénaux traités par le MPA, montre que seul le SNP rs2278294, avec une fréquence allélique de 36 %, induit significativement un risque 1,66 fois plus important de leucopénie avec un risque réduit de moitié de présenter un épisode de rejet. Cependant, aucune association n'a été trouvée pour le SNP rs2278293 (41).

L'équipe de Cao *et al.* a étudié l'impact des polymorphismes de l'IMPDH I sur des patients ayant subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques traités par l'association de ciclosporine, méthotrexate et MPA à court terme et à faible dose. Quatre SNPs de l'IMPDH I ont été analysés sur les 240 paires de patients donneurs-receveurs : le rs2278293 et le rs2278294 sur l'intron 7, le rs2228075 (G>A) sur l'exon 15 et le rs714510 (C>T) dans la région adjacente intron-exon en 5'. La présence du génotype rs2278294 chez les receveurs était associée à une incidence significativement moins élevée de réaction aiguë du greffon contre l'hôte par comparaison aux autres génotypes. Cependant, le génotype rs2278294 des donneurs n'a pas d'impact significatif sur le risque de développer une réaction aiguë du greffon contre l'hôte. De plus, aucune association n'a été trouvée entre les allèles de l'IMPDH I étudiés et le risque d'apparition d'une réaction chronique du greffon contre l'hôte. Le mécanisme d'action du SNP rs2278294 est pour le moment non élucidé. Ce polymorphisme est positionné sur un intron de l'IMPDH et est donc sans conséquence sur la séquence directe de la protéine, il peut agir seul ou bien en lien avec d'autres SNPs pour contribuer à la régulation de l'expression de l'ARNm de l'IMPDH I, à l'activité de l'enzyme ou encore sur la pharmacodynamie du MPA (42).

Concernant cette mutation rs2278294, les trois précédentes études portant sur les transplantations rénales et des cellules souches hématopoïétiques confirment toutes, que les transplantés porteurs du génotype sauvage homozygote (GG) présentent un risque supérieur de rejet aigu par comparaison aux transplantés porteurs de l'allèle muté hétérozygote (AG) ou homozygote (AA) (40–42). Cependant, une dernière grande étude cohorte réalisée par Shah *et al.* portant sur 1040 transplantés rénaux traités par un inhibiteur de la calcineurine (la ciclosporine ou le tacrolimus) et le MPA démontre le contraire : les variants rs2278294 et rs2278293 ne présentent aucun impact sur le rejet aigu, ni sur la tolérance au MPA, ni sur la fonction du greffon à 1 an et ni sur la survie du greffon à 5 ans. Les fréquences alléliques minoritaires retrouvées pour rs2278294 et rs2278293 sont 43 % et 35 % respectivement (43).

Le séquençage de patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin comprenant 20 patients résistants à l'AZA et 17 répondeurs à ce même traitement, a dévoilé 12 SNPs de l'IMPDH I. Les variants du promoteur P3 retrouvés se caractérisent par la substitution de paires de bases (-76T>C, -69A>G, -66A>G) et pour l'un des patients sévèrement résistant à l'AZA, une insertion de 9 paires de bases (-92-83insGAGCAGTAG). L'activité du promoteur sauvage et du promoteur présentant ces dernières mutations a été

déterminée par clonage dans un vecteur possédant le gène rapporteur de la luciférase. Les mutations situées au niveau du promoteur P3 ont montré une discrète diminution, mais significative, de l'activité du promoteur P3 *in vitro* qui pourrait se révéler être plus importante *in vivo*. De plus, l'insertion de 9 paires de base au niveau du promoteur P3 pourrait être un site CRE fixant une protéine impliquée dans la régulation de l'expression du gène CREB (39).

5.2.2. L'IMPDH II

L'équipe de Wang *et al.* a travaillé sur les variations du gène de l'IMPDH II. Un total de 152 échantillons d'ADN provenant de transplantés hépatiques, pulmonaires et cardiaques ont été récoltés afin de séquencer les 14 exons, les jonctions exon-intron ainsi que les 300 premières bases de la région promotrice du gène. Deux SNPs exoniques ont été retrouvés mais seul un était non silencieux : le 787C>T sur l'exon 7 (FIGURE 6) menant à la substitution du résidu leucine en phenylalanine en position 263 (Leu263Phe). Ce résidu leucine, hautement conservé à travers les organismes, se situe à l'intérieur de l'hélice α appartenant au domaine catalytique de la protéine de l'IMPDH II (49). Une étude catalytique *in vitro* a alors été réalisée en produisant l'enzyme recombinante par *Escherichia coli*. Le variant 787C>T a démontré des constantes d'affinités à l'IMP et au β NAD⁺ ainsi qu'une constante d'inhibition par le MPA similaire à l'allèle sauvage. Toutefois, la vitesse de réaction enzymatique a été diminuée pour l'enzyme mutée d'un facteur 10 par rapport à l'enzyme sauvage. Etant donné la faible fréquence de cet allèle (< 1 %), il serait nécessaire de réaliser de nouvelles études *in vivo* sur une grande population afin de conclure à un véritable impact clinique (44).

Lors de la même étude, 7 SNPs introniques ont été identifiés dont un possédant une fréquence allélique de 10,2 % sur la cohorte de 152 patients : il s'agit de la mutation 3757T>C sur l'intron 7 ou rs11706052 (FIGURE 6). Ce dernier SNP n'était pas associé à l'incidence de rejet aigu prouvé par biopsie chez 191 patients transplantés rénaux (44).

Cependant, le séquençage de ce même allèle par l'équipe de Grinyo *et al.* comportant 237 patients transplantés rénaux traités par le MPA, montre le contraire. En effet, la présence d'au moins un allèle muté (patients à génotype CT ou CC) augmente d'un facteur de 3 l'incidence de rejets aigus confirmé par biopsie dans les 12 mois post-transplantation par comparaison aux patients à génotype sauvage TT (45).

Ce même allèle minoritaire rs11706052 a affiché une fréquence de 19 % dans un échantillon de 100 volontaires sains dans les travaux de Winnicki *et al.*. Les auteurs ont mesuré sur 20 échantillons de sang (comportant 8 patients porteurs d'un allèle variant et 12 patients avec le génotype sauvage) l'activité de l'IMPDH des lymphocytes et la prolifération lymphocytaire, en ajoutant le MPA à plusieurs concentrations : 2.5 µmol/L, 10 µmol/L et 25 µmol/L. Les échantillons des patients porteurs du polymorphisme rs11706052 montrent une réduction d'approximativement 50 % de l'inhibition de la prolifération lymphocytaire par le MPA par comparaison aux échantillons des patients à génotypes sauvages pour les plus fortes concentrations du MPA testées : 10 et 25 µmol/L. Ainsi, la présence du variant allélique est associée à une réduction de l'efficacité du MPA à inhiber la prolifération lymphocytaire pour un certain dosage (46).

De plus, une étude comportant une population de 101 patients transplantés rénaux dont 10 % était hétérozygote et 2 % homozygote pour l'allèle de l'IMPDH II rs11706052, a montré une activité de l'IMPDH significativement supérieure de 49 % 12 h après l'administration de MPA pour les patients porteur aux moins d'un allèle muté. L'exposition au MPA (mesurée par l'ASC, Aire Sous la Courbe de la concentration en MPA par rapport au temps) ne différait pas entre les deux groupes. Aucune différence de l'activité de l'IMPDH n'avait non plus été retrouvée avant la transplantation entre les porteurs et les non porteurs de la mutation rs11706052. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les volontaires sains et les patients avant transplantation auraient une expression de l'IMPDH I majoritaire dans les lymphocytes non activés. La transplantation entraînerait une induction de l'expression de l'IMPDH II dans ces cellules. Etant donné que le MPA présente une affinité 5 fois plus élevée pour l'IMPDH II que l'IMPDH I, un polymorphisme ayant un impact sur l'activité de l'enzyme ou sur la liaison du MPA à l'IMPDH pourrait être détectable lors de l'activation des lymphocytes et engendrer une réponse thérapeutique au MPA significativement différente (47).

Enfin, les études de cohortes de Gensburger *et al.* et de Shah *et al.* incluant respectivement, 456 et 1040 patients transplantés rénaux traités par le MPA en combinaison avec la ciclosporine ou le tacrolimus montrent une fréquence allélique du variant rs11706052 de 9 % et 11 % respectivement (41). Contrairement aux résultats obtenus par Grinyo *et al.*, les travaux de Gensburger *et al.* ne montrent aucune association significative entre rs11706052 et le rejet aigu confirmé par biopsie, la leucopénie, les infections CMV ou les autres infections. L'étude de Shah *et al.* ne met pas

non plus en évidence d'association entre le variant mutant et le rejet aigu, la tolérance au MPA, la fonction du greffon à 1 an et la survie du greffon à 5 ans (45). Il faut noter que les études prospectives de Gensburger *et al.* et Shah *et al.* ont été réalisées sur un échantillon plus important et incluent plus de paramètres cliniques et biologiques (41,43).

Les travaux de Mohamed *et al.* se sont intéressés à certains SNPs référencés dans la base de données du *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Le SNP rs4974081, qui serait situé dans une zone promotrice du gène de l'IMPDH II en position -3624 A/G, représente une fréquence allélique de 21 % sur un échantillon de 400 ADN humain. Leur analyse *in silico* prédit que ce SNP pourrait être un facteur impliqué dans la régulation promotrice du gène (48). L'équipe de Gensburger *et al.* ont inclus ce variant allélique dans leur étude qui était présent à 25 %. Cependant, aucune association n'a été démontrée entre rs4974081 et le risque de rejet aigu, leucopénie et infections chez les patients transplantés prenant du MPA. D'autres études *in vitro* sur la transcription de l'IMPDH II seraient nécessaires afin de déterminer l'effet potentiel de cette mutation (41).

Une autre étude de Garrat *et al.* a trouvé de nouveaux SNPs en utilisant une technique PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction – Single Strand Conformational Polymorphism*) permettant de séparer les différents allèles d'un même gène par migration sur un gel non dénaturant en fonction de leurs structures secondaires adoptées sur un échantillon de 96 volontaires. Trois nouveaux SNPs ont été identifiés concernant, pour le premier une substitution au niveau du promoteur : -95C>T, le second une mutation silencieuse, et le dernier à une séquence non codante. La mutation -95C>T a donc été examinée afin de déterminer sa fonction potentielle en transfectant un vecteur contenant le gène muté ou sauvage associé à un gène rapporteur de la luciférase dans des lignées de cellules immortalisées. L'activité luciférase traduisant l'activité transcriptionnelle du promoteur s'est révélée être diminuée significativement de 50 à 65 % pour le vecteur comprenant la mutation -95C>T par comparaison au gène sauvage. Ces résultats pourraient également être retrouvés *in vivo* étant donné que le SNP se situe au niveau d'un motif CRE (induit par l'AMPc) qui constitue un élément *cis*-régulateur. La fréquence de l'allèle minoritaire reste faible (0,5 %) (41).

Pour finir, une publication portant sur la variabilité inter-ethnique de 3 SNPs de l'IMPDH II : 787C>T ; rs11706052 et -95C>T montre que les Français caucasiens

présentent une fréquence de l'allèle muté plus importants par comparaison aux Tunisiens, Péruvien, Sénégalais et Gabonais (49).

Les différents polymorphismes de l'IMPDH décrits dans cette partie, pourraient donc avoir un rôle dans la pharmacogénétique du MPA, de l'AZA et de la 6-MP. Cependant, les études cliniques sont encore discordantes et parfois insuffisantes. D'autres études doivent être instaurées afin de pouvoir conclure.

6. Mesure de l'Activité de l'IMPDH

La mesure de l'activité de l'IMPDH permet de déterminer le phénotype de l'enzyme. Contrairement au génotype qui correspond à la séquence nucléotidique des gènes concernés, le phénotype prend en compte l'expression génomique et ses interactions avec l'environnement. Ainsi, le phénotypage de l'IMPDH peut être intéressant dans le but d'un suivi thérapeutique des médicaments thiopuriques et du MPA.

6.1. *Mesure de l'Expression des ARNm de l'IMPDH*

Une des méthodes possible pour suivre l'activité d'une enzyme est de mesurer l'expression de ses ARNm par RT-PCR (*Real-time Polymerase Chain Reaction*) qui reste une technique facilement réalisable. De plus, cette technique permet la distinction des différentes isoformes.

Plusieurs articles ont évalué l'expression génomique de l'IMPDH I et II chez des patients ayant subi une transplantation rénale et traités par le MPA. Tout d'abord, il existe une large variabilité interindividuelle de l'expression des gènes des deux isoformes avec une différence de 3 ; 8 et 17 fois dans les lymphocytes CD4⁺, le sang total et les réticulocytes, respectivement (50,51). La transplantation et l'instauration d'une thérapie immunosuppressive induit une augmentation significative de l'expression de l'IMPDH I dans le sang total (57 %), les lymphocytes CD4⁺ (50 %) et les réticulocytes (88 %) dès le premier jour suivi d'un retour à l'état initial une semaine après. Concernant l'IMPDH II, une diminution transitoire de l'ARNm de 42 % et 56 % dans le sang total et les réticulocytes a été décelée. L'ARNm dans lymphocytes CD4⁺ a, au contraire, été augmenté de 15 % de façon transitoire également (50).

Une autre étude montre une augmentation de 2 à 4 fois de l'expression de l'IMPDH I dans les cellules mononucléées du sang durant les 3 mois suivant la transplantation. Deux patients ayant présentés un rejet aigu ont vu leur ARNm de l'IMPDH I se multiplier par 20 (52). Paradoxalement, d'autres travaux ont rapporté un niveau d'ARNm des deux isoformes significativement inférieurs 6 jours après transplantation chez les patients ayant subi un épisode rejet aigu confirmé par biopsie, par comparaison aux autres patients n'ayant pas endurés d'épisodes de rejets. Les patients subissant un rejet aigu présentaient un niveau d'ARNm de l'IMPDH I et II, avant la transplantation, supérieur aux autres patients (53).

Aucune corrélation entre le niveau d'ARNm et l'activité de l'IMPDH au sein des cellules mononucléées du sang périphérique n'a été trouvée après transplantation. Une explication possible serait le fait que ces patients auraient un niveau des nucléotides de la guanine diminué à cause du traitement par le MPA inhibant l'IMPDH, ce qui induirait une augmentation de l'expression du gène de l'IMPDH (25). Toutefois, avant la transplantation, l'activité de l'IMPDH n'était pas non plus corrélée avec son ARNm alors que les patients n'étaient pas sous traitement par le MPA (53).

L'étude de Bremer *et al.* relève une tendance comparable entre l'activité de l'IMPDH du sang total et l'expression génomique de l'IMPDH II dans le sang total et les réticulocytes. L'activité de l'IMPDH II dans les érythrocytes qui constitue la population de cellules du sang la plus importante, influence très certainement l'activité du sang total (54).

Bien que la quantification de l'ARNm de l'IMPDH reste une méthode attractive, répandue et assez rapide par comparaison aux autres techniques qui seront vues par la suite, aucune corrélation n'a été précisément établie entre cette expression génomique de l'IMDPH et son activité. L'expression de l'IMPDH I et II varie en fonction des différentes populations des cellules du sang. Il faut toutefois noter qu'il existe une corrélation entre le niveau d'ARNm des deux isoformes et le risque de rejet aigu chez les transplantés rénaux.

6.2. Mesure de l'Activité de l'IMPDH par des Méthodes Radio-marquées

Proffitt *et al.* est une des premières équipes à publier une méthode radiochimique en 1983. L'objectif était de déterminer l'impact d'inhibiteurs de plusieurs enzymes interférentes afin d'optimiser la mesure de l'IMPDH. Le milieu réactionnel contenant du tampon Tris (pH 8), du chlorure du potassium, de l'EDTA, du α - β -methylene adenosine-5'diphosphate, de l'allopurinol, du β NAD⁺ et du [¹⁴C]IMP était ajouté aux surnageants d'extraits tissulaires. Après une incubation à 37°C, l'IMP et l'XMP ont été mesurés grâce à une séparation par chromatographie sur couche mince (47,55).

L'utilisation de l'isotope [³H]IMP a été introduit par Cooney *et al.* et permet de quantifier 95 % de [³H]XMP formé contre 30 à 80 % pour [¹⁴C]XMP lorsque des extraits tissulaires bruts sont utilisés (47,56). Le principe repose sur l'ajout des précurseurs de

l'IMP : [2,8-³H]-hypoxanthine ou [2,8-³H]-inosine afin d'estimer ³H₂O libéré durant la conversion de l'IMP en XMP par l'IMPDH (57–59). Grâce à cette technique, Sanquer *et al.* suivent l'activité de l'IMPDH et la concentration plasmatique de MPA chez des patients traités pas le MPA. Ils montrent une augmentation de l'activité de l'IMPDH dans le sang total et une diminution de l'effet inhibiteur du MPA sur l'IMPDH dans les 6 h suivant la prise du médicament chez les patients traités depuis plus de 2 ans par le MPA par rapport aux patients traités depuis moins d'1 an (57).

En 2001, l'équipe de Weigel *et al.* s'intéresse aux niveaux de la GTP et de l'ATP ainsi qu'à l'activité de l'IMPDH et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) dans les érythrocytes chez des patients ayant subi une transplantation cardiaque. L'activité de l'IMPDH est déterminée par une méthode radiochimique par ajout de [¹⁴C]-hypoxanthine avant incubation. La séparation est ensuite réalisée sur une plaque de polyéthylèneimine de cellulose (PEI cellulose) ; la détection est effectuée par spectrophotométrie UV et enfin le comptage par scintillation liquide. Leurs travaux révèlent une augmentation de 15 % de la concentration en ATP, 13 mois post-transplantation chez le groupe contrôle traité par l'AZA par comparaison à la concentration initiale avant la transplantation. De plus, l'instauration d'un traitement par le MPA à la place de l'AZA dans le groupe d'étude induit une augmentation significative de la GTP, de l'activité de l'IMPDH et de l'HGPRT par rapport au groupe contrôle traité par l'AZA (60). Ces données seront revues plus en détails dans la partie discussion.

L'avantage de ces techniques est le faible volume d'échantillons nécessaires mais aussi l'utilisation possible de cellules intactes (61).

6.3. Mesure de l'Activité de l'IMPDH par des Méthodes Chromatographiques avec détection UV

Malgré la précision des méthodes radioactives, ces techniques restent fastidieuses et font appel à des équipements de laboratoire peu standard. Ainsi, différentes méthodes de dosage spectrophotométrique non radioactives de l'activité de l'IMPDH ont vu le jour. Le principe de ces techniques repose sur la quantification du produit de la réaction enzymatique : l'XMP. Les cellules étudiées sont supplémentées avec le substrat de l'enzyme : l'IMP en excès et des cofacteurs dont le βNAD⁺, puis incubée à 37°C. L'arrêt

de la réaction s'effectue ensuite par ajout d'acide suivi d'une neutralisation de l'échantillon par une base. Le surnageant, contenant l'XMP produit, est ensuite analysé par chromatographie en phase liquide à haute performance.

6.3.1. Mesure de l'activité de l'IMPDH dans les Cellules Mononucléées du Sang Périphérique

De nombreuses méthodes de mesure de l'activité de l'IMPDH des cellules mononucléées du sang périphérique ont été rapportées dans le but d'évaluer l'effet immunosuppresseur du MPA. Les lymphocytes sont une sous-population des cellules mononucléées et constituent la matrice privilégiée de l'effet thérapeutique du MPA.

Bien que le principe de dosage reste le même, la difficulté se situe au niveau de l'étape d'isolement de ce type de cellules. Les cellules mononucléées du sang sont isolées par l'utilisation de « Ficoll-Paque » qui permet de séparer les différents constituants du sang après centrifugation dans un tube. Griesmacher *et al.* ajoutent à cette étape une centrifugation par un processus permettant de séparer les cellules en fonction de leurs propriétés de sédimentation afin de travailler sur les lymphocytes et les lymphoblastes, après une étape de culture pour ces derniers. Les auteurs montrent que le MPA et son métabolite glucuronidé ont un effet inhibiteur sur les deux isoformes tout en confirmant un effet plus intense sur les lymphoblastes (type IMPDH II majoritaire) que sur les lymphocytes (type IMPDH I majoritaire).

Vethe *et al.* applique la méthode de dosage de l'XMP aux lymphocytes CD4⁺ qui sont composés majoritairement des cellules T-helper très impliquées dans les processus d'inflammation et de rejet de greffe. Pour cela, ces cellules sont isolées des cellules mononucléées du sang périphérique par l'utilisation de billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps (62).

Les étapes d'isolement et de lavage sont critiques pour les études portant sur la pharmacodynamie du MPA. En effet, la suppression de la procédure de lavage entraîne une diminution de l'activité de l'IMPDH alors que l'ajout d'une étape de lavage provoque une élimination du MPA se traduisant par une augmentation de l'activité de l'enzyme (63).

En 2009, Glander *et al.* publient une nouvelle procédure nécessitant une quantité moins importante de sang et propose une standardisation de l'expression de l'activité de l'IMPDH en XMP produit par rapport au temps d'incubation et par rapport à la quantité de

l'adénosine monophosphate (AMP). En effet, l'activité de l'IMPDH exprimée par rapport à la quantité an AMP montre une variabilité moins élevée que le rapport en fonction de la concentration en protéine ou de la numération cellulaire (47,64).

Concernant la détection de l'XMP produit, des techniques de spectrophotométrie de masse ont été développées. Deux études récentes présentent une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem afin de quantifier l'XMP et l'AMP par rapport à l'étalon interne (le 8-bromo-adenosine-5'-monophosphate) (59,71). Cette méthode de détection apporte un gain en spécificité et en sensibilité. De plus l'activité de l'IMPDH peut être directement exprimée en XMP formé rapportée à la quantité de l'AMP. Une autre méthode de détection et de quantification simultanée de la xanthine, l'hypoxanthine, la guanine et l'adénine des lymphocytes CD4⁺ par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été décrite par Vethe *et al.* Les auteurs mettent en évidence que la diminution du ratio guanine / hypoxanthine semble refléter une inhibition prolongée de l'IMPDH (66).

Comme nous venons de le voir, de nombreuses équipes se sont intéressées à la détermination de l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées du sang périphérique ou des lymphocytes circulants dans le but d'un suivi thérapeutique du MPA (67). Toutefois, ces méthodes nécessitent une étape d'isolement des cellules mais également une quantité conséquente de sang total allant de 4 mL à 30 mL (67,74-76).

6.3.2. Mesure de l'Activité de l'IMPDH dans les Cellules du Sang Total et les Erythrocytes

Trois méthodes ont été décrites dans la littérature pour la détermination de l'activité de l'IMPDH dans les cellules du sang total et les érythrocytes. Seules deux de ces méthodes concernent la détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes. Les caractéristiques des trois méthodes sont résumées dans le *TABLEAU 1* ci-après.

<u>Auteurs</u>	Montero et al. 1995 (69)	Albrecht et al. 2000 (70)	Mino et al. 2009 (71)
Matrice biologique	érythrocytes	érythrocytes + cellules mononucléées du sang périphérique	érythrocytes
Anticoagulant	héparine	héparine	EDTA
<u>Milieu Réactionnel</u>			
IMP (mmol/L)	1	0,25	0.5
β NAD ⁺ (mmol/L)	0,5	0,25	1.8
KCl (mmol/L)	100	-	100
EDTA (mmol/L)	-	3	1.07
DTT (mmol/L)	-	-	0,36
Allopurinol (mmol/L)	-	0,058	-
Tampon (mmol/L)	40 (Phosphate)	0,1 (Tris)	35 (Phosphate)
pH	7,4	ND	7,4
<u>Conditions d'incubation</u>			
Temps (heure)	2	0,5 et 1	3
Température (°C)	37	37	37
Fin de la réaction	40 % TCA	4 mol/L PCA	9,2 mol/L PCA
Neutralisation	Eau saturée éther diéthylique (pH>5)	Chauffage 1h à 100°C, KOH 4 mol/L (pH 2-3)	Phosphate dipotassique 5 mol/L
<u>Facteur de dilution</u>	21,7	8,8 – 9,9	9,7
<u>Conditions chromatographique</u>			
Phase stationnaire	ODS2 Hypersil 125x4,6mm 3µm	2 en série : 150x4,6mm 5 µm	ND
Type d'HPLC	Echange d'ions	Phase inverse (affinité)	ND
Phase mobile	0.1 mol/L KH ₂ PO ₄ , 8 mmol/L TBAS / méthanol (pH 5,5) → mode gradient	4 % de méthanol dans de l'eau (pH 1,8) → mode isocratique	85 % 20 mmol/L KH ₂ PO ₄ , 40 mmol/L TBAB / 15 % CAN (pH 7,3) → mode isocratique
Volume d'injection (µL)	50	200	10
Débit (mL/min)	1	1	ND
Longueur d'onde UV	254 et 280	260	ND
LLOQ (µmol/L)	ND	118 ng/mL = 0,78	1,25
Composé analysé	XMP	xanthine	XMP
<u>Unité de l'activité</u>	pmol XMP/mg protéine/h	nmol XMP/mL cellules du sang total/min	nmol XMP/g Hb/h

TABLEAU 1 : Comparaison des trois méthodes chromatographiques de mesure de l'IMPDH dans les érythrocytes et les cellules du sang total.

ND : Non Disponible ; TCA : acide trichloracétique , PCA : acide perchlorique ; Ht : Hématocrite ; TBAS/TBAB : Sulfate d'hydrogène/Bromure de tetra-n-butylammonium ; ACN : acétonitrile ; LLOQ :Lower limit of quantification.

Montero *et al.* publient en 1995 la première méthode de mesure de l'activité de l'IMPDH par quantification par HPLC de l'XMP produit après incubation, en présence de l'IMP et du β NAD⁺ dans des érythrocytes obtenus à partir de sang total. Cette étude montre que les 9 patients déficitaires en HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase, *cf.* FIGURE 1) présentent une activité de l'IMPDH supérieure de 2,7 fois aux contrôles. Aucune différence significative de l'activité de l'enzyme n'est toutefois rapportée entre les patients souffrants de leucémie et les sujets sains (69).

L'équipe d'Albrecht *et al.* rapporte une méthode reposant sur la détermination de la concentration de la xanthine après hydrolyse de l'XMP formé. Leurs travaux montrent que l'activité enzymatique de l'IMPDH est principalement localisée dans les érythrocytes et uniquement 10 % de l'activité du sang total est recensée au niveau des cellules mononucléées du sang chez deux patients transplantés rénaux (70). Ainsi, l'activité mesurée des cellules du sang total reflètent principalement l'activité de l'IMPDH présente dans des érythrocytes qui représentent la population quantitativement dominante du lysat des cellules sanguines.

Mino *et al.* ont, pour leur part, étudié l'activité de l'IMPDH érythrocytaire en fonction des concentrations plasmatiques du MPA et de ses métabolites chez les transplantés rénaux (71). Leurs résultats seront présentés dans la partie discussion.

La mesure de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes et les cellules sanguines est plus facilement réalisable par comparaison aux cellules du sang mononucléées. En effet, aucune isolement particulière des cellules n'est nécessaire et le volume de sang requis est moins élevé étant donné le ratio érythrocytes/cellules mononucléées du sang est important.

Pour conclure, de nombreux travaux portent sur la mesure de l'activité de l'IMPDH dans le cadre du suivi thérapeutique du MPA qui constitue un immunosuppresseur très utilisé en transplantation. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne traite de la distribution de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH au sein de la population. Seulement deux publications abordent le rôle de l'IMPDH dans le métabolisme des thiopurines qui sera décrit dans la partie suivante (72,73). Toutefois, la mesure de l'activité de l'IMPDH s'est effectuée dans les cellules mononucléées du sang périphérique.

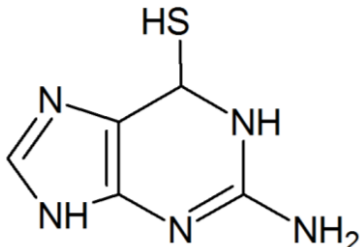
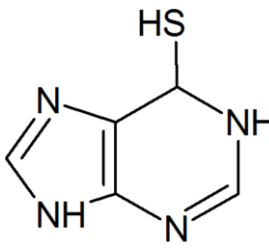
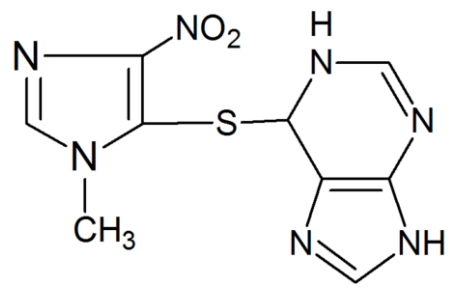
7. L'IMPDH dans le Métabolisme des Thiopurines

7.1. Molécules disponibles, Indications et Effets Indésirables

Trois médicaments thiopuriques sont actuellement sur le marché international : l'azathioprine (AZA), la 6-mercaptopurine (6-MP) et la 6-Thioguanine. Ces molécules ont des propriétés antinéoplasiques et immunosuppressives. Elles sont indiquées dans le traitement de certaines leucémies, de maladies auto-immunes et inflammatoires mais aussi dans la prévention du rejet de greffe. Les caractéristiques de ces différents médicaments sont résumées dans le TABLEAU 2 (74–76).

Seule l'AZA possède une indication spécifique pour les formes sévères de pathologies inflammatoires chroniques et auto-immunes comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) caractérisées par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Les MICI regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. La maladie de Crohn s'installe le plus souvent à la jonction de l'iléon et du colon alors que les atteintes de la recto-colite hémorragique sont plutôt localisées au niveau du colon et du rectum. Les médicaments thiopuriques sont indiqués dans les MICI en seconde intention après échec d'un traitement par un anti-inflammatoire intestinal aminosalicylé (mésalazine ou sulfasalazine), ou bien en cas d'intolérance aux corticoïdes ou corticodépendance (77).

Dans le cadre de l'étude de l'IMPDH, nous nous intéresserons uniquement à l'AZA et la 6-MP car l'IMPDH n'entre pas dans le métabolisme de la 6-thioguanine.

DCI Nom commercial	Formule chimique	Classification ATC et Indications	Effets indésirables
6-Thioguanine <i>Lanvis®</i> (74)	 <p>Analogue sulfhydryl de la guanine</p>	<p><i>Antineoplasiques</i> → <i>antimétabolique</i> → <i>analogues de la purine</i> (code L01BB)</p> <p>Leucémie Aigüe Myéloblastique (LAM)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hypoplasie médullaire (leucopénie, thrombopénie, anémie) - Hépatotoxicité (cholestase, nécrose hépatocytaire)
6-Mercaptopurine (6-MP) <i>Purinethol®</i> (75)	 <p>Analogue sulfhydryl l'hypoxanthine</p>	<p><i>Antineoplasiques</i> → <i>antimétabolique</i> → <i>analogues de la purine</i> (code L01BB)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leucémie Aigüe Lymphoblastique (LAL) - Leucémie Aigüe Myéloblastique (LAM) - Leucémie Myéloïdes Chronique (LMC) 	<ul style="list-style-type: none"> - Troubles gastro-intestinaux (anorexie, nausées, vomissements, ulcérations buccales ou intestinales, diarrhée, pancréatite)
Azathioprine (AZA) <i>Imurel®</i> (76)	 <p>Dérivé méthyl-nitro-imidazole de la 6-MP</p>	<p><i>Immunosuppresseurs</i> (code L04AX)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prévention du rejet du greffon (<i>en association avec des corticoïdes et d'autres agents immunosuppresseurs</i>) - Maladies dysimmunitaires (<i>forme sévère, intolérance ou échec à un autre traitement</i>) : Lupus érythémateux disséminé, Polyarthrite rhumatoïde sévère, Hépatite chronique auto-immune, Purpura thrombopénique idiopathique, Anémie hémolytique auto-immune, Dermatomyosite, Polymyosite, Vascularite, Pemphigus vulgaire, Maladie de Crohn et Rectocolite hémorragique 	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction d'hypersensibilité (rare) : fièvre, arthralgies, myalgies, éruption cutanée, malaise général, hypotension

TABEAU 2 : Formules, classifications, indications et effets indésirables de la 6-thioguanine, de la 6-mercaptopurine, et de l'azathioprine.
DCI : Dénomination Commune Internationale, Classe ATC : Classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique.

7.2. Pharmacocinétique

7.2.1. Absorption et Distribution

Les concentrations maximales plasmatiques de l'AZA et de la 6-MP sont atteintes rapidement environ 2h après la prise orale. La biodisponibilité absolue de la 6-MP après administration de l'AZA est de 50 % environ (78). La biodisponibilité moyenne de la 6-MP est quant à elle de 16 % avec d'importantes variations interindividuelles allant de 5 à 37 %. Un effet de premier passage, dû au métabolisme hépatique de la 6-MP, pourrait expliquer cette variabilité, nous le détaillerons dans la partie suivante. Le taux de liaison aux protéines plasmatiques est évalué à 30 % (75).

7.2.2. Métabolisme et Elimination

Par comparaison à la plupart des autres médicaments, le métabolisme des thiopurines est complexe. L'AZA et la 6-MP sont tous les deux des pro-drogues convertis en métabolites actifs *via* un métabolisme détaillé dans la FIGURE 7. La biodisponibilité de ces deux molécules est variable comme nous venons de le voir : 27 – 83 % pour l'AZA et 5 – 37 % pour la 6-MP (79). En effet, il existe un passage hépatique transformant 6-MP en thioxanthine (2-OH-6-MP) puis en acide thiourique (ATU) *via* l'aldéhyde oxydase (AO) et/ou xanthine oxydase (XO) qui pour ce dernier, est exprimé dans les cellules épithéliales intestinales et du foie (80). L'ATU est un métabolite inactif qui sera excrété dans les urines.

La 2nd voie de métabolisation de la 6-MP fait appel à la Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) qui convertit la 6-MP en un métabolite inactif : le 6-méthylmercaptopurine (6-MMP).

La 3^{ème} voie qui mène à l'action thérapeutique, transforme la 6-MP en 6-Thioinosine monophosphate (6-TIMP) qui constitue un substrat de plusieurs enzymes. Premièrement, l'action de l'IMPDH sur le 6-TIMP conduit, après plusieurs transformations enzymatiques à la formation des métabolites actifs de l'AZA : les 6-Thioguanosine nucléotides (6-TGN) incluant les Thioguanines 5'-monophosphate, -diphosphate, -triphosphate (6-TGMP, 6-TGDP, 6-TGTP) et les désoxy-6-TGN. Les 6-TGTP représentent 85 % des 6-TGN retrouvés dans les érythrocytes (81).

De plus, la 6-TIMP est aussi substrat de la TMPT formant un métabolite crucial : MeTIMP pouvant également être converti en forme diphosphate (MeTIDP) et triphosphate (MeTITP). Ces métabolites méthylés avec les 6-MMP sont désignés sous le terme de 6-Méthyl Mercaptopurine Nucléotides (6-MeMPN), ce sont des puissants inhibiteurs de synthèse des purines et contribuent ainsi à l'effet plutôt hépatotoxique de l'AZA et de la 6-MP (82,83).

Enfin, les 6-TIMP peuvent également être pris en charge par une kinase aboutissant à la formation de 6-TIDP puis de 6-TITP. Ce dernier peut subir une déphosphorylation qui reformera le 6-TIMP.

L'élimination du médicament est principalement urinaire : 50 % de la dose est excrétée dans les urines et 12 % dans les selles. Dans l'urine, le composé le plus retrouvé est le métabolite oxydé inactif, l'ATU. L'AZA et la 6-MP représentent moins de 2 % des formes excrétées (78).

7.3. Mécanisme d'Action

7.3.1. Incorporation des 6-TGN dans l'ADN/ARN

L'effet immunosuppresseur principal de l'AZA et la 6-MP est l'incorporation de la 6-dTGTP dans l'ADN et de la 6-TGTP dans l'ARN à la place des bases puriques. En effet, ces analogues des bases puriques engendrent un mésappariement lorsque les nucléotides thioguanines (la 6-dTGTP et la 6-TGTP) veulent former une paire de base avec la cytosine ou bien par erreur la thymine (86). Ces paires de bases sont tolérées par l'ARN et l'ARN polymérases, mais elles inhibent ultérieurement la progression du cycle cellulaire lors des phases S et G₂ (87).

7.3.2. Blocage de la Voie Anti-apoptotique des Lymphocytes T via RAC1

L'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ activé *via* le CD28, le CD3 et l'IL-2 est prévenu par l'activation de bcl-XL *via* la GTPase Rac 1 (88). L'AZA et la 6-MP peuvent empêcher cet effet anti-apoptotique par leur métabolite 6-TGTP qui entre en compétition avec la GTP au niveau du site RAC1. Le RAC1-6-TGTP va entraîner une accumulation de molécules RAC1 inactives et diminuer l'expression des gènes cibles de RAC1 (79). Ainsi, cette voie à la base anti-apoptotique va entraîner l'apoptose des mitochondries dans ce contexte (89). Ce mécanisme contribue à réduire le nombre de lymphocytes T activés dans la *lamina propria* digestive (tissus conjonctif de soutien) des patients présentant une MICI (88).

7.3.3. Inhibition de la Synthèse de novo de Purines

Bien que la voie menant aux 6-MeMPN est considérée comme une voie concurrente des 6-TGNs, certains de ces métabolites méthylés ont une activité biologique. En effet, les 6-MeMPN sont des inhibiteurs de la Phosphoribosyl Pyrophosphate (PRPP) amidotransferase qui constitue une enzyme limitante dans la biosynthèse *de novo* des purines (82,87). Ainsi, la biosynthèse des bases puriques est réduite, facilitant l'incorporation des 6-TGN dans l'ADN et l'ARN. Concernant la PRPP, qui est un co-substrat du HGPRT, sa concentration est augmentée ce qui d'une part, intensifie la voie de sauvetage des précurseurs (thio)purines et d'autre part, augmente l'activation de la 6-MP en 6-TIMP *via* l'HGPRT (FIGURES 1 et 7) (90).

La prolifération des lymphocytes, dépendante de la voie de biosynthèse *de novo* des purines, serait donc impactée. De plus, le déséquilibre entre les nucléotides puriques et pyrimidiques causés par la réduction de la biosynthèse *de novo* des purines et l'augmentation des concentrations de la PRPP contribuerait à la mort cellulaire (79,90).

7.4. Sources de Variabilité à la Réponse Thérapeutique

7.4.1. Interactions d'ordre Pharmacocinétique liées au Métabolisme

Plusieurs interactions médicamenteuses interviennent au niveau du métabolisme de l'AZA et de la 6-MP (FIGURE 8). Les dérivés de l'acide aminosalicylique (ASA), 5-ASA ou sulfasalazine, majorent l'effet myélosuppresseur des thiopurines par l'augmentation des concentrations de 6-TGN. La TPMT serait inhibée par les dérivés de l'ASA mais les études restent discordantes à ce sujet (79).

L'allopurinol est un médicament hypo-uricémiant inhibant la xanthine oxydase (XO). L'oxypurinol, le métabolite de l'allopurinol, est un inhibiteur plus puissant de la XO et il possède également une demi-vie plus longue. Cette diminution de l'activité de la XO se traduit par une inhibition de la transformation de la 6-MP en métabolites inactifs. La biodisponibilité de la 6-MP est augmentée comme ses risques de toxicité (79,91). Toutefois, l'allopurinol est parfois prescrit à faibles doses en association aux thiopurines chez les patients résistants présentant un ratio MeTIMP / 6-TGN élevé (84). En effet, les espèces réactives de l'oxygène produites par la XO lors de l'oxydation de la 6-MP, génèrent du stress oxydant susceptible d'entraîner des lésions hépatiques. L'administration d'allopurinol chez les patients ayant une concentration de 6-MeMPN importante diminue le risque de toxicité hépatique (92).

Le méthotrexate est également un inhibiteur de la XO augmentant donc le risque de la toxicité des thiopurines. De plus, le méthotrexate facilite l'incorporation des 6-TGN dans l'ADN et l'ARN par son effet thérapeutique inhibant la synthèse *de novo* des nucléotides de la guanine (93).

7.4.2. Pharmacogénétique

La pharmacogénétique étudie l'influence des variations de la séquence génomique sur la réponse aux médicaments. Une partie de la variabilité de la réponse aux thiopurines pourrait être expliquée par la pharmacogénétique des nombreux transporteurs et d'enzymes intervenant dans le métabolisme de ces médicaments. Les principaux polymorphismes génétiques présentant une action potentiellement impliquée dans la réponse thérapeutique de l'AZA ou de la 6-MP seront détaillées dans cette partie (FIGURE 8). Les polymorphismes touchant les gènes de l'IMPDH ont été traités dans *la partie 5.2*, ils ne seront donc pas revus dans cette partie.

TPMT

La TPMT constitue, sans doute, l'enzyme la plus étudiée en terme de polymorphisme génétique bien que l'on ne connaisse ni sa fonction biologique, ni ses substrats endogènes. Cependant, cette enzyme occupe une place cruciale dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP en catalysant les réactions de S-méthylation menant aux métabolites des 6-MeMPN. A ce jour, plus de 40 variants alléliques ont été identifiés (94). Les variants les plus retrouvés sont les allèles TPMP*2, TPMT*3A et TPMT*3B. TPMP*2 et TPMT*3A augmentent la dégradation de l'enzyme entraînant une demi-vie raccourcie à 15 min contre 18h pour l'allèle sauvage TPMT1*, alors que l'allèle TPMT*3B est non fonctionnel. La fréquence allélique diffère entre les populations ethniques. Les mutations les plus retrouvées dans la population Caucasienne sont TPMT*3A (3,2 – 5,7 %) suivi de TPMT*2 (0,2 – 0,5 %) et de TPMT*3C (0,2 – 0,8 %). Ces trois variants alléliques représentent à eux seuls, plus de 95 % des variants totaux recensés (85).

Ces mutations engendrent une distribution trimodale de l'activité de la TPMT. Le phénotype d'activité de la TPMT est transmis sous le mode autosomal co-dominant. En Europe et en Amérique du Nord, environ 89% des sujets présentent une activité élevée en TPMT (homozygote de l'allèle fonctionnelle de la TPMT), 11 % ont une activité intermédiaire (hétérozygote : un allèle fonctionnel et un allèle non fonctionnel) et 0,3 % présentent un déficit total d'activité (homozygotes de l'allèle non fonctionnel) (95). Dans certains cas assez rares, il peut exister une amplification du gène menant à une augmentation de l'activité de la TPMT et à un phénotype de métaboliseurs ultra-rapides.

ITPA

L'ITPA est une enzyme cytosolique catalysant la conversion de 6-TIMP en 6-TIMP. La mutation faux-sens 94C>A (rs1127354) de l'ITPA est responsable d'un déficit complet en ITPA. Les hétérozygotes ont une activité résiduelle d'environ 20 % de l'activité de l'ITPA moyenne. La fréquence de ce polymorphisme est de l'ordre de 11 – 19 % chez les Asiatiques et de 5 à 7 % chez les Caucasiens, les Afro-Américains et les Africains (92). Cette mutation entraînerait une accumulation de 6-TIMP qui serait responsable d'effets néfastes comme des éruptions cutanées ou des symptômes pseudo-grippaux. La concentration des métabolites méthylés (MeTIMP) serait également augmentée. Cependant, certaines études ne sont pas en accord avec ses résultats (79,92).

XO

La XO, présente dans la muqueuse intestinale et dans le foie, catalyse la transformation de 6-MP en acide thiourique. Il existe une variabilité interindividuelle et inter-ethnique de l'activité de la XO importante. Les hommes présentent une activité 21 % plus importante que les femmes. On trouve également 11 % de métaboliseurs lents dans la population japonaise contre 20 % dans la population Caucasienne. Plusieurs SNP pouvant entraîner une diminution ou une augmentation de l'activité de la XO ou bien la synthèse de l'enzyme inactive ont été découvertes (92).

GST

L'AZA est transformée en 6-MP grâce à l'action de la GST consommant du glutathion sous forme réduite (GSH). Une déplétion de GSH engendre des dommages causés par les espèces réactives à l'oxygène et une dénaturation de nombreux composés. L'allèle nul du GSTM1 (GSTM1*0), présent chez 39 – 62 % des Européens, a montré une diminution de la survenue de leucopénie et un rôle protecteur sur l'incidence des effets indésirables de l'AZA (79,92). Ce phénomène pourrait expliquer que 47 – 60 % des patients intolérants à l'AZA supportent la 6-MP (88).

Transporteurs

L'entrée cellulaire des métabolites thiopuriques est assurée par les ENT1 et ENT2 (*Equilibrative nucleosides transporters*, codés par les gènes SLC29A1 et SLC29A2) et CNT2 et 3 (*Concentrative Na⁺-dependant nucleoside transporters*, codé par les gènes SLC28A2 et SLC28A3). Les transporteurs MRP4 et MRP5 (*Multidrug Resistance associated Proteins*, codés par les gènes ABCC4 et ABCC5) sont responsables de l'efflux des nucléotides thiopurines. Le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP peut être altéré par certaines mutations

conduisant à une dysfonction des transporteurs ou à une régulation positive ou négative de leurs fonctions (92). Un SNP présent sur le gène ABCC4 (rs3765534), engendrant une importante réduction de l'activité du transporteur MRP4, a été identifié (96). Les patients porteurs de ce variant ont d'ailleurs montré une concentration intra-érythrocytaires plus élevée en 6-TGN et une numération significativement plus faible des leucocytes (97). Une augmentation de l'expression des transporteurs MRP peut aussi entraîner une résistance aux thiopurines (98).

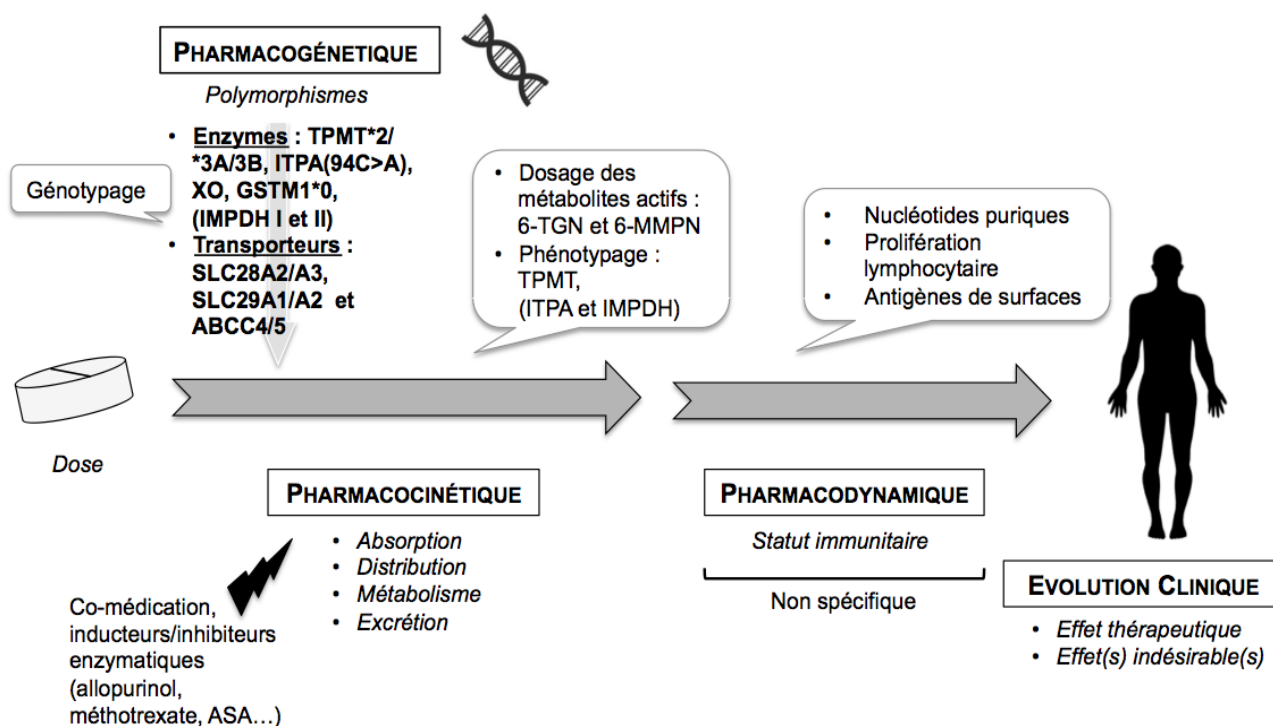


FIGURE 8 : Variabilités et suivi thérapeutique de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine.
ASA : acide aminosalicylique

7.5. Suivi Thérapeutique Pharmacologique Recommandé

Comme nous venons de le voir, le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP est complexe et comprend plusieurs voies métaboliques qui peuvent être influencées par le profil pharmacogénétique des patients. Il n'existe pas de biomarqueur PD spécifique des médicaments thiopuriques, le STP s'appuie donc à ce jour sur d'autres données (FIGURE 8).

7.5.1. Génotype et Phénotype de la TPMT

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'activité de la TPMT a une distribution trimodale dans la population. Avant l'initiation d'un traitement aux thiopurines, l'activité de la TPMT est déterminée en pratique clinique courante, comme les recommandations le stipule (99). En effet, la génotypage et/ou le phénotypage de la TPMT sont des outils précieux permettant de prévoir quels sont les patients susceptibles de faire un accident hématologique sous AZA ou 6-MP (homozygotes déficitaires, activité de la TPMT faible) ou, au contraire, d'être répondeurs faibles (activité de la TPMT élevée) (92). Les patients « métaboliseurs ultra-rapides » sont également susceptibles d'éliminer trop rapidement le médicament.

Ces deux techniques permettent de déterminer les métaboliseurs ultra-rapides, rapides, intermédiaires et lents. La corrélation entre le génotype et le phénotype de la TPMT varie entre 65 et 89 %. La cause de cette variabilité n'est pas claire, cependant, le risque myélosuppression induit par le traitement est mieux prédit par le phénotypage de la TPMT que son génotypage. Toutefois, le génotypage de la TPMT sera préféré chez les patients ayant subi une transfusion récente et les patients dialysés car ces derniers possèdent généralement une urémie élevée pouvant affecter certaines méthodes de phénotypage de la TPMT (84).

7.5.2. Dosage des Métabolites Actifs

Les deux méthodes de dosage des métabolites actifs des thiopurines les plus répandues sont les méthodes chromatographiques de *Lennard et Singleton* et de *Dervieux et Boulieu*. Ces dosages s'effectuent dans les globules rouges. Le protocole proposé par *Dervieux et Boulieu* affiche certains avantages : le protocole est simplifié, plus rapide avec un taux de recouvrement > 84 % pour les 6-MeMPR contre 37 % pour la méthode de *Lennard et Singleton* (100,101).

Les travaux de *Nguyen et al.* ont traité de la relation entre les concentrations en métabolites actifs et certaines données démographiques et pharmacologiques chez des patients pédiatriques atteints de MICI. Une corrélation positive entre la dose d'AZA, la concentration des 6-TGN et des 6-MeMPN et le ratio 6-MeMPN/6-TGN a été mise en évidence. Les patients les plus jeunes ont montré une concentration des métabolites actifs plus basse, probablement due à l'influence de l'âge sur l'absorption et le métabolisme de l'AZA. Chez les patients pédiatriques, les filles présentaient une concentration en 6-MeMPN plus importante que les garçons. La co-administration de l'infliximab (anticorps monoclonal liant TNF α) et de l'AZA augmentait la concentration des 6-TGN pouvant expliquer l'efficacité

des thérapies combinées. Enfin, une importante variabilité interindividuelle des concentrations en métabolites actifs d'approximativement 50 % a été rapportée, démontrant l'intérêt du STP et de l'ajustement posologie pour chaque patient (102).

Plusieurs études ont travaillé sur la relation entre l'activité de la TPMT et la concentration des métabolites. L'activité de la TPMT est corrélée positivement avec les concentrations de MeTIMP (89,103) mais négativement aux concentrations des 6-TGN (104).

Les 6-TGN semblent un marqueur essentiel dans le suivi thérapeutique des patients sous AZA et 6-MP (105). En effet, de trop fortes concentrations de 6-TGN sont associées à une augmentation du risque de myélotoxicité tandis que de faibles concentrations sont associées à une diminution de l'efficacité thérapeutique (83). Une concentration de 6-TGN supérieure à $250 \text{ pmol} / 8.10^8$ érythrocytes est corrélée à une meilleure réponse thérapeutique chez les enfants atteints de MICI (106) tandis qu'une concentration supérieure à $405 \text{ pmol} / 8.10^8$ érythrocytes prédirait une résistance à l'AZA nécessitant l'instauration d'une thérapie alternative (107). De plus, ce dosage a un intérêt dans le suivi dans la compliance au traitement : une concentration de 6-TGN bas ou nul peut montré une non-observance du patient. Bien que la concentration efficace de 6-TGN ne soit pas uniformisée, toutes les études semblent s'accorder sur le fait que le monitoring des 6-TGN a son utilité en cas de sous-dosage en AZA et d'effets indésirables hématologiques (FIGURE 8) (92).

De fortes concentrations en 6-MeMPN supérieures à $5\,700 \text{ pmol} / 8.10^8$ érythrocytes ont été associées à un risque de survenu d'hépatotoxicité (108). Le risque de myélotoxicité serait, lui, associé avec des concentrations importantes en 6-TGN (109). Les patients déficients en TPMT, formant peu de 6-MeMPN, ont montré une bonne tolérance aux fortes concentrations de 6-TGN par comparaison aux patients ayant une activité en TPMT normale. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides n'est pas impactée, du fait de l'absence de 6-MeMPN, diminuant ainsi l'incorporation de 6-dTGTP dans l'ADN. Ce phénomène a été décrit dans le mécanisme d'action (*sous-partie 7.3.3.*). La cytotoxicité des 6-TGN serait donc rencontrée à une concentration plus élevée (79,82).

7.5.3. Limites

Bien qu'il soit maintenant évident que l'efficacité de l'AZA et de la 6-MP n'est pas fonction du dosage mais de leur métabolisme, des effets indésirables restent encore

fréquemment observés : 15 à 28 % des patients sous ces traitements selon les études (92,110). De plus, le polymorphisme de la TPMT n'explique pas toutes les intolérances : approximativement 25 % des patients souffrant de MICI ont des concentrations faibles en 6-TGN et des concentrations hautes en MeTIMP malgré une activité normale en TPMT (79). La TPMT seule ne prédit donc pas tous les profils métaboliques.

L'IMPDH pourrait ainsi être un facteur de variations supplémentaires impliqué dans l'effet thérapeutique, mais aussi dans la survenue d'effets indésirables des patients sous AZA et 6-MP. En effet, cette enzyme occupe une place stratégique dans le métabolisme des thiopurines en transformant le 6-TIMP, substrat également de la TPMT, en 6-TGN.

7.6. Rôle Potentiel du Phénotype de l'IMPDH dans la Réponse

Thérapeutique

Seuls les travaux de Haglund *et al.* ont étudié le rôle de l'activité de l'IMPDH chez les patients souffrants de MICI traités par des médicaments thiopuriques (72,73,79). Dans leurs travaux, les mesures de l'activité de la TPMT, le dosage des 6-TGN et des 6-MeMPN étaient effectués dans les érythrocytes tandis que l'activité de l'IMPDH était déterminée dans les cellules mononucléées sanguines.

Les auteurs ont montré une activité de l'IMPDH des cellules mononucléées du sang inversement corrélée aux concentrations des dérivés méthylés (6-MeMPN) chez les patients ayant une activité de la TPMT normale. Paradoxalement, aucune corrélation entre l'activité de l'IMPDH et les concentrations en 6-TGN n'a été trouvée chez ces mêmes patients (72).

Chez 26 patients avec un fort ratio métabolique $6\text{-MeMPN}/6\text{-TGN} > 20$, l'activité de l'IMPDH mesurée était significativement plus basse que l'activité des 21 patients avec un ratio $6\text{-MeMPN}/6\text{-TGN} < 20$ bien que l'activité de la TPMT soit similaire entre les deux groupes d'étude. Les auteurs ont rapporté une activité de l'IMPDH des cellules mononucléées du sang, inversement corrélée aux concentrations des dérivés méthylés (6-MeMPN). Toutefois, aucune corrélation entre l'activité de l'IMPDH et les concentrations en 6-TGN n'a été trouvée chez ces mêmes patients (72). De plus, les patients avec un faible ratio métabolique < 4 n'ont pas montré d'activité de l'IMPDH significativement supérieure aux patients ayant un ratio > 20 (79).

Pour 10 patients ayant une activité de la TPMT réduite, aucune corrélation n'a été trouvée avec l'activité de l'IMPDH, ni même avec les concentrations de 6-MeMPN et de 6-TGN normalisées par la dose. Seule la concentration en 6-TGN était significativement plus

élevée chez les patients avec une activité de la TPMT réduite par comparaison aux patients avec une activité normale en TPMT (73).

Les résultats de l'équipe de Haglund *et al.* n'ont donc pas mis en évidence de liens tangibles entre le phénotype de la TPMT et la concentration des métabolites actifs intervenants dans le suivi thérapeutique des thiopurines. Il ne faut pas perdre de vue que les compartiments d'étude diffèrent dans ces analyses. Les auteurs ont choisi de mesurer l'activité de la TPMT et de doser les métabolites dans les érythrocytes. La mesure de l'activité de l'IMPDH s'est effectuée dans les cellules mononucléées du sang et a été justifiée par le fait que ces cellules sont les cibles des thiopurines et que l'activité de l'enzyme dans les érythrocytes est très basse (79).

Cependant, l'équipe d'Albrecht *et al.* a démontré que l'activité de l'IMPDH du sang total est présente majoritairement dans les érythrocytes, probablement parce qu'ils constituent la population sanguine largement prédominante. L'expression de l'IMPDH I et II peut différer entre ces deux populations cellulaires, notamment, chez des patients souffrant de leucémie, d'une pathologie auto-immune ou ayant subi une transplantation. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'expression de l'IMPDH II est induite dans les cellules néoplasiques et dans les lymphocytes activés. De plus, les érythrocytes matures sont démunis de noyau cellulaire ainsi, l'expression de l'IMPDH n'est plus régulée à un niveau transcriptionnel ni traductionnel dans ce type de cellule. Enfin, l'expression de l'IMPDH érythrocytaire pourrait avoir un impact sur la concentration des 6-TGN dans les cellules mononucléées du sang étant donné qu'il existait un transfert des 6-TGN entre les érythrocytes et les leucocytes (111). Ce mécanisme dynamique est illustré dans la FIGURE 9 et détaillé dans le prochain paragraphe.

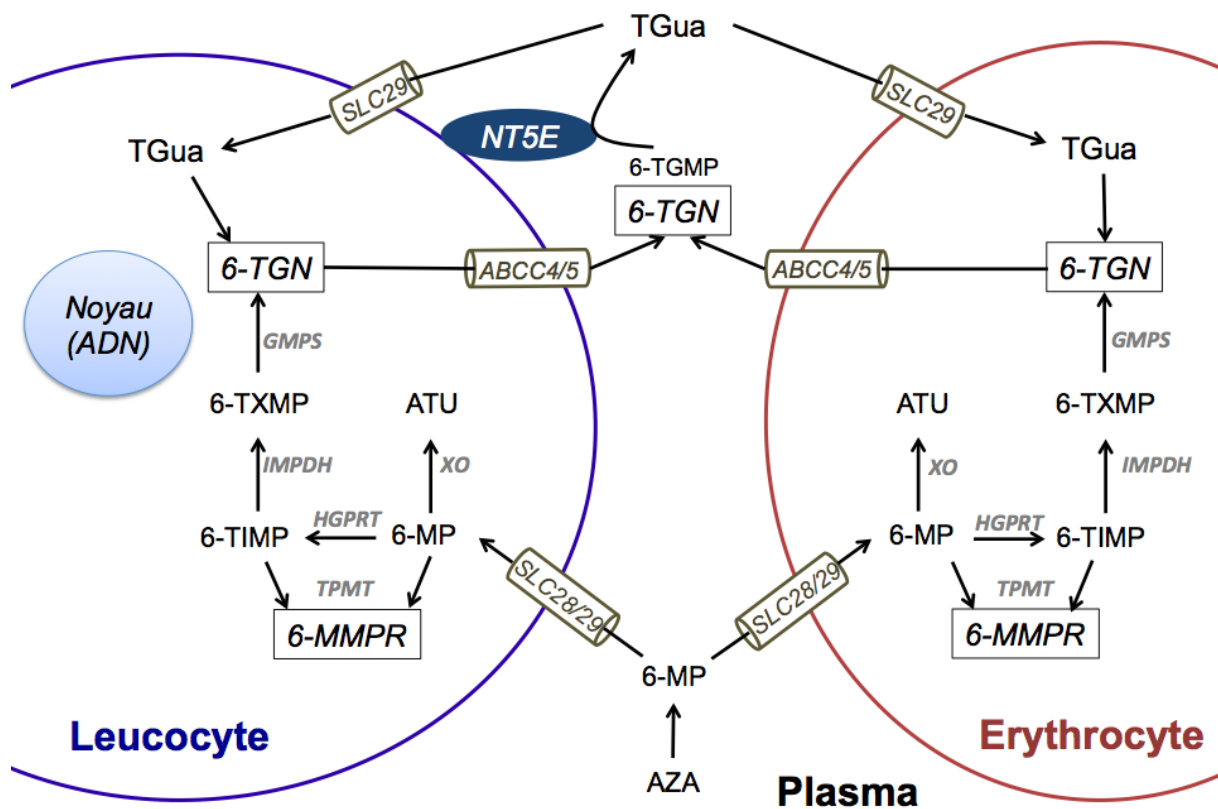


FIGURE 9 : Echanges intercellulaires des nucléotides de la 6-thioguanine d'après (111,112).
NT5E : ecto-5-nucléotidase ; TGua : Thioguanosine. Les autres abréviations ont déjà été rencontrées dans la FIGURE 7.

Après conversion de l'AZA en 6-MP dans le plasma, la 6-MP pénètre dans la cellule par les transporteurs SLC29A1, SCL29A2, SLC28A2 et SLC29A3 (113). La 6-MP suivra ensuite plusieurs voies métaboliques que nous avons déjà détaillées dans la FIGURE 9. Les 6-TGN ne peuvent pas diffuser à travers la membrane plasmatique, par contre, ils peuvent sortir de la cellule *via* les transporteurs MRP4 et MRP5 (117). Le 6-TGMP sera alors converti en 6-thioguanosine par le CD73, nommé également ecto-5'-nucleotidase (5'-NT, EC 3.1.3.5) codée par le gène NT5E. Cette enzyme se situe à la surface externe de la membrane plasmatique. Elle catalyse l'hydrolyse des ribonucléotides 5'-monophosphate extracellulaire formant ainsi leurs nucléotides correspondants. L'étude *in vitro* de Li *et al.* a montré une corrélation entre l'expression de NT5E et les concentrations intracellulaire de 6-TGN. Leurs travaux démontrent également que TGMP est incapable de rentrer dans la cellule. La 6-thioguanosine peut pour sa part, pénétrer dans la cellule en utilisant les transporteurs SLC29 (112).

Cette circulation dynamique des métabolites des thiopurines permettrait le transfert des 6-TGN, notamment entre les érythrocytes et les cellules du sang mononucléées. Pour rappel, les érythrocytes matures n'ont pas de noyau cellulaire, les 6-TGN n'agissent donc pas dans ce type de cellules sans ADN. Par contre, ils pourraient réaliser leur effet thérapeutique en étant transférés dans les lymphocytes *via* les transporteurs et à l'action du NT5E.

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'activité de l'IMPDH est vraisemblablement différente entre les cellules mononucléées du sang et les globules rouges. Cette hypothèse peut être confortée par les résultats des travaux de Haglund *et al.*. Aucune corrélation entre l'activité de l'IMPDH mesurée et la concentration en 6-TGN n'a été mise en évidence (72). De plus, l'impact de l'activité de l'IMPDH des érythrocytes sur l'activité du sang total est conséquent. Ainsi, l'activité de l'IMPDH érythrocytaire pourrait être corrélée à la fois aux concentrations de 6-TGN et de 6-MMPR érythrocytaire mais aussi à l'effet thérapeutique et aux effets indésirables de l'AZA et de la 6-MP étant donné qu'il existerait des échanges dynamiques de certains métabolites actifs entre les érythrocytes et les cellules immunocompétentes constituant la cible thérapeutique. Le phénotypage de l'IMPDH dans les érythrocytes pourrait donc être une donnée pertinente à intégrer au suivi thérapeutique de l'AZA et de la 6-MP.

8. L'Acide Mycophénolique, un Inhibiteur de l'IMPDH

8.1. Formes Commerciales et Indications

Le MPA (FIGURE 10A, code ATC : L04AA06) est un produit de fermentation de plusieurs espèces de *Penicillium* et possède des propriétés immunosuppressives utilisées dans la prévention des rejets de greffes. Deux formes pharmaceutiques, qui ont pour objectif d'augmenter la biodisponibilité du MPA, sont actuellement sur le marché : le mycophénolate mofétil (*Cellcept®*) et le mycophénolate sodique (*Myfortic®*). Le mycophénolate mofétil est l'ester morpholino-éthyle du MPA (FIGURE 10B), c'est donc une prodrogue qui sera hydrolysée par des estérases intestinales dans l'estomac et l'intestin grêle en MPA (114). Afin de limiter les effets indésirables du mycophénolate mofétil, une formulation gastro-résistante permettant une libération plus tardive dans le tube digestif a été développée : il s'agit du mycophénolique sodique (FIGURE 10C). Cette dernière libère directement le MPA qui correspond au composé pharmacologiquement actif (115).

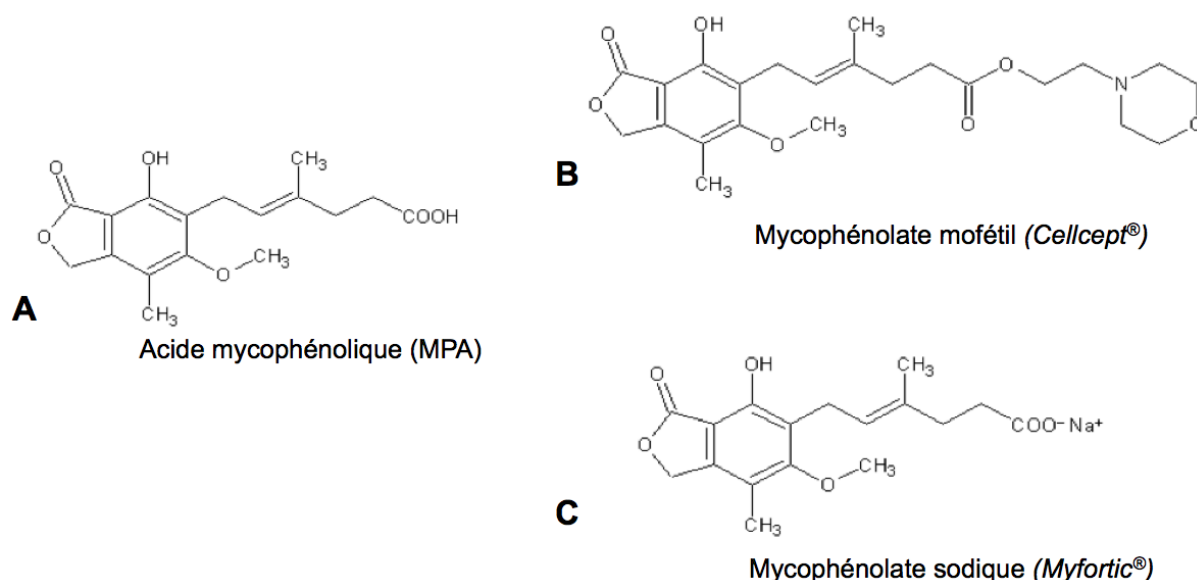


FIGURE 10 : Structures chimiques de l'acide mycophénolique, du mycophénolate mofétil et du mycophénolate sodique.

Le MPA est indiqué, en association à la ciclosporine et aux corticoïdes, pour la prévention des rejets aigus d'organe chez des patients ayant bénéficiés d'une allogreffe rénale. L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du mycophénolate mofétil a également une indication pour les transplantations cardiaques et hépatiques. Le Service Médical Rendu (SMR) a été évalué comme important pour les deux formes pharmaceutiques disponibles *Cellcept®* et *Myfortic®* (116,117).

Cependant, en pratique, le mycophénolate mofétil est parfois utilisé seul ou en association à d'autres immunosuppresseurs non mentionnés dans l'AMM. La ciclosporine est couramment remplacée par un autre inhibiteur de la calcineurine : le tacrolimus, qui a d'ailleurs prouvé, dans plusieurs études, son efficacité au côté du *Cellcept*[®] (115,118,119). Le MPA peut aussi être associé aux inhibiteurs de la mTOR, comprenant le sirolimus et l'évérolimus (115,120).

8.2. Pharmacocinétique

8.2.1. Absorption et Distribution

Le mycophénolate mofétil est rapidement et massivement absorbé après une hydrolyse dans l'estomac et l'intestin grêle grâce aux estérases (112). Cette forme pro-droque du MPA est indétectable dans le plasma après administration orale. Pour la forme injectable, le mycophénolate mofétil n'est plus détectable après 10 à 30 min. La biodisponibilité absolue de la forme orale de *Cellcept*[®] est de 94 % par rapport à sa forme intraveineuse (121). En ce qui concerne le mycophénolate sodique, le temps d'obtention de la concentration maximale du MPA est de 1,5 à 2 h ce qui est en accord avec la forme pharmaceutique gastro-résistance. Concernant cette forme sodique, l'absorption digestive du MPA est de 93 % et sa biodisponibilité absolue de 72 % (122).

Dans le sang, le MPA est présent à 99,99 % dans le plasma, 0,01 % dans les cellules mononucléées du sang et 0,0005 % dans les érythrocytes (123). Le MPA et son métabolite, le glucuronide du MPA, sont fortement liés aux protéines plasmatique à hauteur respectivement, de 97 % et de 82 % (122).

8.2.2. Métabolisme et Elimination

Le métabolisme du MPA, essentiellement rénal et hépatique, est complexe et fait appel à des enzymes de la phase I et II. Les enzymes de phase II sont principalement impliquées dans le métabolisme du MPA (FIGURE 11). Les Uridines Diphosphate Glucuronosyltransferases (UGT) forment le métabolite majoritaire : le MPA-phenyl-glucuronide (MPAG). Ce dernier est inactif, il ne possède pas d'activité inhibitrice de l'IMPDH mais il participe à la PK via le cycle entéro-hépatique contribuant à environ 10 – 60 % de l'exposition au MPA (5). En effet, le MPAG est transporté par les protéines MRP2 ou OATP1B1/1B3 au niveau biliaire puis, il est partiellement déconjugué par la flore bactérienne pour enfin être réabsorbé sous forme de MPA. Ce phénomène contribue donc à

un rebond de la concentration du MPA (FIGURE 11) (5,31). Il existe également deux autres métabolites minoritaires de phase II : le MPA-phenyl-glucoside (MPAGI), inactif, et le MPA-acyl-glucuronide (AcMPAG), actif sur l'IMPDH mais *via* un mécanisme encore flou.

Le métabolisme de phase I est minoritaire et fait appel au cytochrome P450 (principalement par les isoformes CYP3A et 2C) pour donner le métabolite 6-O-desméthyl du MPA (DM-MPA) qui pourra ensuite être secondairement glucuro-conjugué.

L'administration par voie orale du mycophénolate mofétil radiomarqué montre que 93 % de la dose administrée est retrouvée dans les urines et 6 % dans les selles. La majorité de la fraction urinaire (environ 83 %) se retrouve sous forme de MPAG (121).

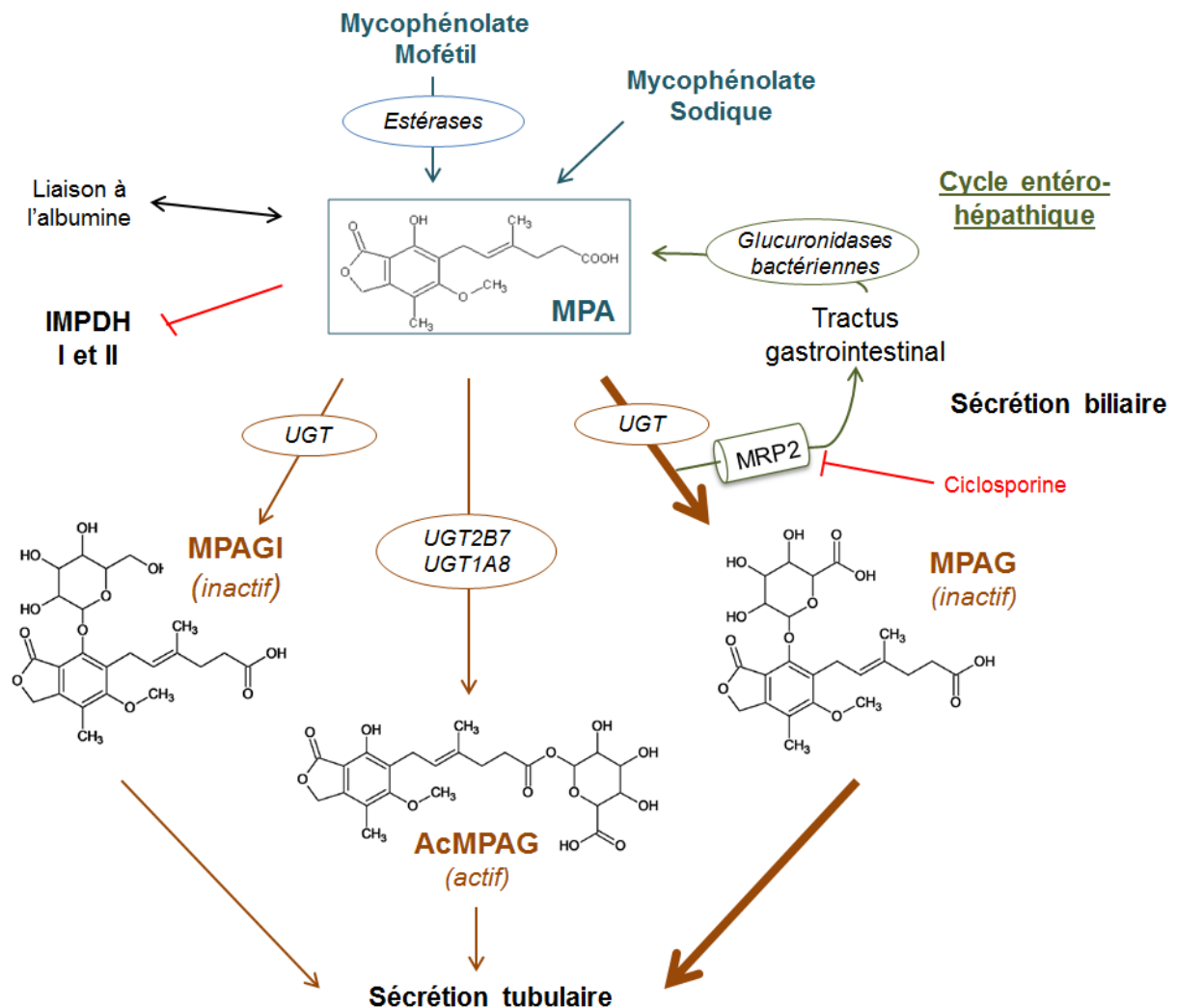


FIGURE 11 : Métabolisme de l'acide mycophénolique par les enzymes de phase II d'après (5). Le métabolite majeur du MPA est le MPA-phenyl-glucuronide (MPAG, actif). Les deux métabolites mineurs sont le MPA-acyl-glucuronide (AcMPAG, actif) et le MPA-phenyl-glucoside (MPAGI, inactif). MRP2 : Multidrug resistance-associated protein 2

8.3. Mécanisme d'Action

Le MPA est un inhibiteur non compétitif et réversible de l'IMPDH. Comme nous l'avons déjà vu, l'IMPDH est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* des nucléotides de guanine, indispensable à la réplication de l'ADN. Le mécanisme d'action de cet inhibiteur est illustré dans la FIGURE 12 : le MPA se fixe au complexe Enzyme-XMP* lors de la seconde phase de la réaction catalytique, et empêche la libération de l'XMP (5). Le MPA présente une affinité 5 fois supérieure à l'isoforme de type II de l'IMPDH qui est fortement exprimé dans les lymphocytes activés (2). Ainsi, le MPA présente un effet plus marqué sur les lymphocytes

que sur les autres cellules. Les différents effets immunosuppresseifs, antiprolifératifs et anti-inflammatoires du MPA vont être présentés dans les prochains paragraphes.

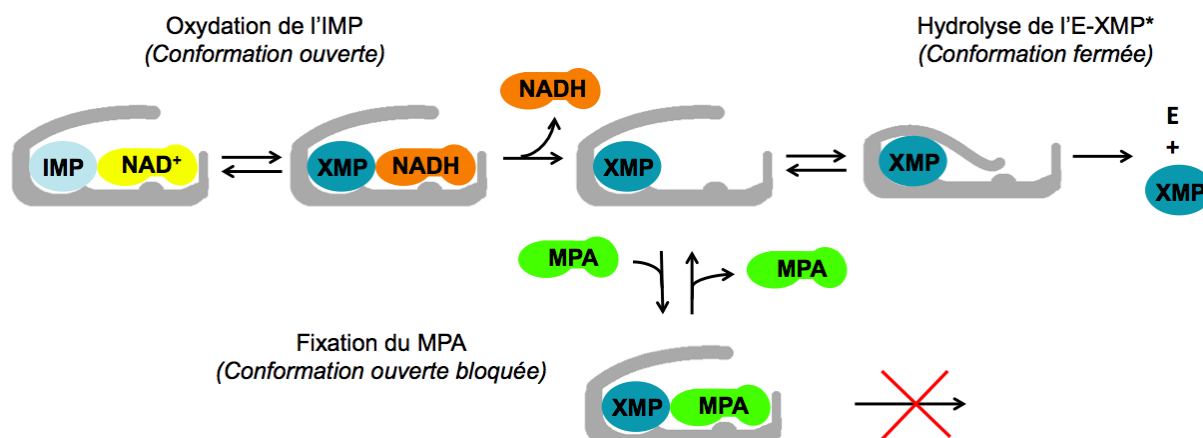


FIGURE 12 : Mécanisme d'inhibition de l'IMPDH par l'acide mycophénolique d'après (6,10).
MPA : acide mycophénolique ; E : Enzyme

8.3.1. Arrêt du Cycle Cellulaire, Mort Cellulaire

Les lymphocytes B et T sont incapables d'utiliser la voie de sauvetage des nucléotides. Ainsi, leurs proliférations est dépendantes de la voie *de novo* des nucléotides puriques et donc de l'IMPDH. Le MPA a donc un effet cytostatique sur ces types de cellules. Le MPA pourrait également induire l'apoptose dans les lignées cellulaires des lymphocytes et des macrophages / monocytes *via* l'activation de signaux de nécrose (2,124).

8.3.2. Inhibition de la Synthèse de Glycoprotéines

Le MPA agit également au niveau du recrutement des leucocytes, de la présentation des antigènes et de la fonction effectrice des leucocytes. La diminution de GTP provoqué par le MPA inhibe le transfert de fructose en mannose nécessaire à la synthèse des glycoprotéines qui comprennent plusieurs molécules d'adhésions et de co-stimulation. Ceci se traduit par une diminution du recrutement des monocytes et des leucocytes au niveau des sites inflammatoires et donc supprime la phase d'initiation et effectrice de la réponse immunitaire (2,5).

8.3.3. Diminution de la Production d'Oxyde Nitrique

L'enzyme iNOS (inductible nitric oxide synthetase), qui catalyse la production d'oxyde nitrique, est impliquée dans plusieurs processus inflammatoire. L'activation de l'iNOS est d'ailleurs corrélée aux rejets de greffes. Le MPA inhibe cette enzyme, probablement *via* la

diminution de GTP qui réduit la synthèse du cofacteur BH₄ (tetrahydrobioptérin) de l'iNOS dans les cellules endothéliales. Dans les fibroblastes, une diminution de l'activation du facteur de transcription IRF-1 de l'iNOS a été rapportée. Le MPA présente, *via* ce mécanisme un effet anti-inflammatoire (2,5).

8.3.4. Transduction du signal

Une diminution de GTP induite par le MPA interfère avec la fonction des protéines G responsable de la transduction du signal qui peut être nécessaire à l'activation et aux fonctionnements des lymphocytes T et de leurs antigènes de surfaces. La concentration en cGMP (cyclic GMP) jouant un rôle dans les voies de signalisation cellulaire, est également réduite étant donné que le cGMP est formé par la GTP. L'altération des protéines G et la diminution de cGMP provoque donc un effet antiprolifératif et cytotoxique (2,5).

8.3.5. Rôle dans l'Equilibre Lymphocytes Th17 / Lymphocytes T Régulateurs

Les lymphocytes Th17 possèdent un rôle pro-inflammatoire antagonisé par les lymphocytes T régulateurs (Treg) (125). Des études récentes montrent que les patients transplantés rénaux traités par le mycophénolate mofétil possèdent un niveau du facteur de transcription FoxP3 supérieur aux patients transplantés non traités par le mycophénolate mofétil (124). FoxP3 est nécessaire à la différenciation des Treg, ainsi, l'équilibre Th17/Treg est maintenu, ce qui évite un effet pro-inflammatoire, et développe une certaine tolérance immunitaire (123).

8.4. Effets Indésirables

Les principaux effets indésirables du MPA sont d'ordre digestif, hématologique et infectieux (126). Plusieurs études montrent que les patients ayant une fraction libre du MPA significativement plus élevée, ont plus de risque de présenter ces effets indésirables (124). Les troubles hématologiques les plus fréquents sont la leucopénie, l'anémie et la thrombocytopénie. Les affections gastro-intestinales souvent rencontrées comprennent la diarrhée, les douleurs abdominales, les nausées, les vomissements, la dyspepsie et la constipation. En ce qui concerne les infections, elles sont de type virales, bactériennes et fongiques. Les infections invasives à Cytomégalovirus (CMV) et au virus de l'herpès restent les infections les plus rapportées (115,127).

8.5. Sources de Variabilité à la Réponse Thérapeutique

Afin d'assurer l'efficacité du MPA et de limiter les effets indésirables, il est nécessaire que les concentrations en MPA se situent dans la fenêtre thérapeutique, qui est évaluée entre 30 et 60 mg/h/L (5). En effet, une faible exposition à la fraction libre du MPA entraîne une augmentation du risque de rejet aigu tandis qu'une fraction libre du MPA élevée augmente le risque de survenue d'effets néfastes (117). En pratique, la fenêtre thérapeutique du MPA est loin d'être atteinte chez tous les patients. Plusieurs études rapportent des variabilités interindividuelles pour une dose fixe de MPA pouvant atteindre un facteur 10. La variation intra-individuelle est également très importante, le coefficient de variation moyen de l'ASC individuel se situe entre 30 – 47 % (114). Il est donc important de connaître les sources de variabilités PK et PD afin d'ajuster le traitement en conséquence. Certaines de ces variabilités seront résumées dans la FIGURE 13.

8.5.1. Variabilités Pharmacocinétiques

Le MPA est lié à l'albumine, ainsi, l'albuminémie a un rôle important car il est responsable du ratio MPA libre/MPA lié. Seule la fraction libre du MPA est responsable de l'effet immunosuppresseur. Une diminution de l'albuminémie entraîne une augmentation de la fraction libre du MPA (31).

Une altération de la fonction rénale, diminuant la filtration glomérulaire, provoque une accumulation de MPAG (métabolite glucuronide du MPA) qui déséquilibrera la fraction libre/fraction lié du MPA par compétition sur l'albumine (114). On aura alors une augmentation de la fraction libre du MPA. Ce phénomène sera aussi retrouvé lors d'une urémie élevée car l'urée entre également en compétition avec le MPA sur l'albumine (31).

Différents immunosuppresseurs souvent associés au MPA ont présenté des interactions pharmacocinétiques. L'association ciclosporine et MPA diminue entre 35 – 50 % l'ASC_{0-12h} du MPA (114) et supprime même chez certains patients le deuxième pic de concentration du MPA par comparaison aux combinaisons MPA et tacrolimus ou sirolimus (31). La ciclosporine inhibe la protéine MRP2 responsable de la sécrétion biliaire de MPAG. Le cycle entéro-hépatique de MPAG, menant la réabsorption du MPA est donc diminué (FIGURE 11) (111).

Une étude montre qu'une diminution progressive des corticoïdes engendre une augmentation du MPA par comparaison aux patients ayant conservé la même posologie

pour les corticoïdes. Les auteurs suggèrent que les corticoïdes possèdent une fonction inhibitrice sur les UGT augmentant le clairance du MPA (31).

Chez les patients transplantés rénaux, il faut être très attentif à la durée nécessaire afin que la fonction rénale soit totalement rétablie. En effet, l'ASC du MPA durant la période post-transplantation est approximativement 30 – 50 % plus faible à l'activité mesurée 3 mois après la greffe. De plus, les patients ayant subi une transplantation récemment montre des profils d'ASC du MPA irréguliers et très variables à plusieurs reprises pour un même receveur (114). Ces observations peuvent être dues à l'hypoalbuminémie ou encore la réduction de médicaments associée lorsque que le patient transplanté rénal atteint un état stable, comme par exemple les corticoïdes qui diminuent le métabolisme du MPA (31).

8.5.2. Variabilité Pharmacodynamique

Une variabilité importante de l'activité basale de l'IMPDH pourrait avoir un impact sur les différences PD du MPA chez les patients greffés. D'ailleurs, une étude montre une association entre l'activité de l'IMPDH des cellules mononucléées du sang total avant, et après la transplantation. Les patients avec une activité de l'IMPDH faible présentaient plus de complications liées au traitement par le MPA. Au contraire, les patients avec une activité importante de l'IMPDH étaient plus sujets aux risques de rejets (128). De même, les patients présentant une expression de l'IMPDH II importante dans les lymphocytes T CD4+ avant la transplantation ont montré un risque supérieur de développer un rejet aigu (50). La variabilité interindividuelle de l'activité de l'IMPDH peut donc être en partie responsable des différences observées de l'effet thérapeutique et des effets indésirables liés au MPA. Les patients possédant une activité élevée de l'IMPDH pourraient nécessiter une posologie supérieure en MPA et inversement (114).

8.5.3. Pharmacogénétique

Certaines variations génétiques ont montré des effets PK et clinique au MPA. Ces gènes impliqués codent pour les enzymes UGT du métabolisme du MPA (UGT1A9, UGT1A8, UGT2B7), des transporteurs MRP2 (ABCC2) et OATP (SLCO1B1 et SLCO1B3) et enfin, de l'enzyme cible du MPA (IMPDH I et II) (124). Les différents SNPs ne seront pas détaillés mais il faut savoir qu'elles peuvent jouer un rôle dans l'absorption, le métabolisme du médicament, le cycle entéro-hépatique, la liaison à l'albumine et donc présenter un impact sur l'élimination du médicament. Ces facteurs pharmacogénétiques pourraient

contribuer aux causes de variations de la réponse thérapeutique au MPA. Le polymorphisme génétique de l'IMPDH I et II, qui a déjà été traité dans la partie 5.2, peut aussi influencer la réponse au traitement du MPA d'un point de vue PD.

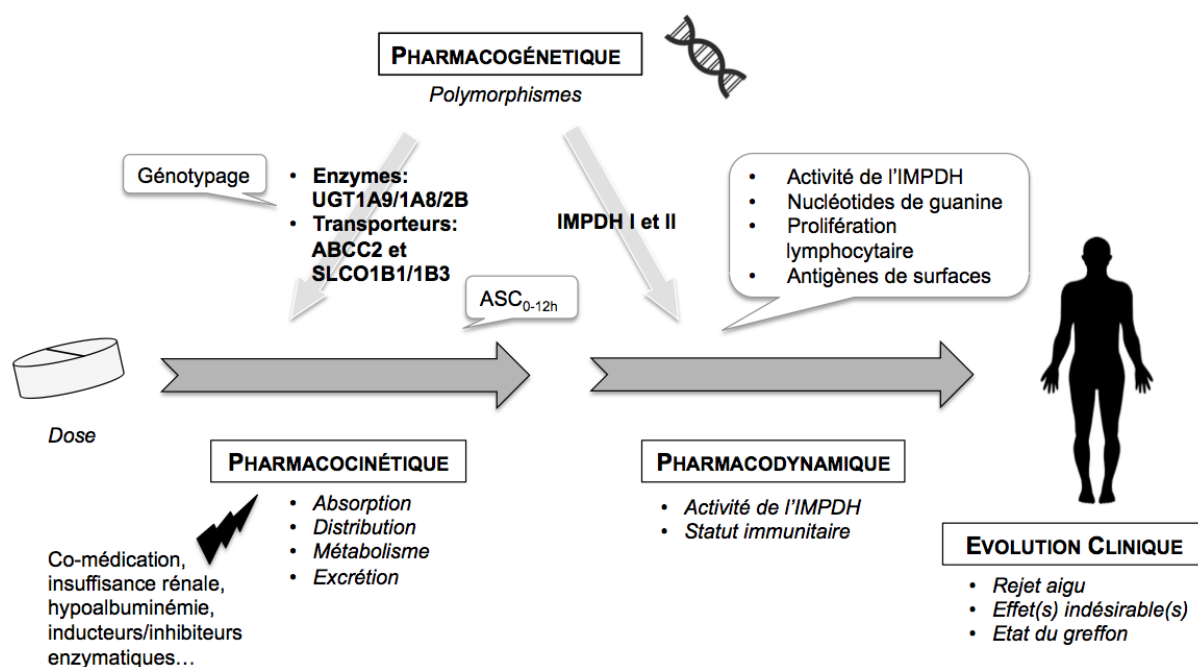


FIGURE 13 : Variabilités et suivi thérapeutique de l'acide mycophénolique

ASC_{0-12h} : Aire sous la courbe concentration de l'acide mycophénolique en fonction du temps.

8.6. Suivi Thérapeutique Pharmacologique

Comme nous venons de le voir, de nombreux travaux ont montré une relation entre la concentration la concentration en MPA et l'apparition de rejet aigu ou d'effets indésirables. Les effets indésirables peuvent être lourds et le risque d'inefficacité du MPA est très important se traduisant par un risque de rejet aigu (124). De plus, il existe une forte variabilité PK et PD intra et interindividuelle et des polymorphismes génétiques ayant un impact sur la réponse au MPA (FIGURE 13). Le suivi thérapeutique du MPA qui possède une marge thérapeutique étroite est nécessaire afin d'adapter la posologie du MPA au cas par cas en fonction du temps. La période post-transplantation, les changements des traitements immunosuppresseurs et les manifestations cliniques majeures sont des périodes critiques nécessitant une surveillance particulière du MPA.

8.6.1. Approches Pharmacogénétiques

L'approche de pharmacogénétique peut être particulièrement utile afin de choisir la dose initiale lors de la mise en place d'un nouveau traitement afin d'assurer une immunosuppression adéquate. Les informations concernant le génotype peuvent être également nécessaire à l'interprétation des données PK et PD (5). Le génotypage des SNPs connus ou le séquençage des gènes codant pour l'IMPDH I et II, les transporteurs MRP2 (ABCC2) et OATP (SLCOB1 et SLCO1B3) et les enzymes UGT (UGT1A9, UGT1A8, UGT2B7) peuvent être intéressants pour l'initiation d'un traitement au MPA. Cependant, l'impact de ces données génétiques sur la PK et PD du MPA n'est pas encore établi. D'autres études comprenant de grands échantillons de patients inter-ethniques doivent être réalisées afin de déterminer le lien entre les données génétiques et le phénotype des patients pour potentiellement définir des recommandations en fonction du génotype.

8.6.2. Suivi Pharmacocinétique : Exposition à l'Acide Mycophénolique

A ce jour, le meilleur prédicteur d'exposition du MPA est l' ASC_{0-12h} . Cette valeur est le reflet de l'exposition totale du patient au MPA durant les 12 premières heures suivant l'administration du médicament. Plusieurs méthodes d'estimation de l' ASC_{0-12h} ont vu le jour afin de pouvoir déterminer cette ASC en pratique clinique en réduisant le nombre de prélèvements. La meilleure stratégie d'approximation de l' ASC_{0-12h} utilise un estimateur bayésien qui est basé sur les caractéristiques PK de la population et les données de concentration sanguine issues de 3 prélèvements sanguins. Cette méthode présente moins de biais que l'utilisation d'une méthode par régression linéaire multiple (31). Cependant, ce

paramètre a ses limites : les données nécessaires à l'estimateur bayésien ne sont pas toutes disponibles les premiers jours suivant la transplantation, l'ASC_{0-12h} n'est pas toujours corrélé aux effets indésirables et la variabilité de l'enzyme cible du MPA, l'IMPDH, n'est pas prise en compte (7).

8.6.3. Biomarqueurs Pharmacodynamiques

Les biomarqueurs PD déterminent de façon plus directe l'effet biologique des médicaments en intégrant la variabilité PK, PD et pharmacogénétique (FIGURE 13). Les paramètres PD non spécifiques du MPA reflètent l'activité générale du système immunitaire. La prolifération lymphocytaire, la détermination des antigènes de surface et la production de cytokines peuvent être des biomarqueurs utiles au suivi des immunosuppresseurs. L'inhibition de la prolifération lymphocytaire et l'expression antigénique par le MPA est d'ailleurs corrélée aux doses de mycophénolate mofétil (5).

Le principal effet du MPA est la réduction du taux de nucléotides de la guanine. Ces nucléotides peuvent donc être un biomarqueur proche de l'efficacité du MPA. Des patients souffrant de myélome multiple traité par mycophénolate mofétil ont montré une corrélation positive entre la diminution intracellulaire de dGTP et la réponse clinique (130). Cependant, il existe une forte variabilité interindividuelle et intra-individuelle des nucléotides puriques ; et la réduction des nucléotides de la guanine après l'administration de mycophénolate mofétil n'est pas immédiate dans les lymphocytes T CD4+ chez des volontaires sains (62).

La mesure de l'activité de l'IMPDH, enzyme cible du MPA, est le biomarqueur plus spécifique de l'effet du MPA. Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie 6, l'activité de l'IMPDH peut être déterminée par quantification de l'ARNm ou par des techniques mesurant la production d'XMP en utilisant des substrats radiomarqués ou encore par des méthodes chromatographiques. L'étude de Vethe *et al.* constate d'ailleurs une forte inhibition de l'expression génomique de l'IMPDH dès l'administration de mycophénolate mofétil dans lymphocytes T CD4+ (62). Raggi *et al.* étudie l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées du sang chez des patients greffés du rein traités par le MPA. Les patients ayant subi un rejet la première semaine suivant la transplantation, ont montré une inhibition de l'activité de l'IMPDH significativement inférieure aux patients n'ayant pas subi de rejet. Aucune corrélation n'avait été d'ailleurs établie entre le risque de rejet et les concentrations de MPA et des inhibiteurs de la calcineurine (tacrolimus et ciclosporine) pris par ces patients. Les auteurs finissent donc par conclure que la réponse biologique au traitement qui

correspond à l'activité de l'IMPDH pour le MPA, est le prédicteur le plus fiable des évènements de rejets et d'inflammation (129).

La mesure de l'activité de l'IMPDH semble donc le biomarqueur le plus approprié au suivi thérapeutique d'un traitement par le MPA. Afin de pouvoir mesurer cette activité en pratique clinique courante, il est nécessaire de mettre au point une méthode simple et robuste nécessitant peu de sang. Les érythrocytes, abondants et facilement isolables, pourraient être une matrice de choix.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE 2 : DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'IMPDH DANS LES ERYTHROCYTES

Ces rappels bibliographiques nous ont permis de faire un point sur les méthodes de mesure de l'activité de l'IMPDH disponibles et sur le rôle potentiel de l'IMPDH dans la variabilité de la réponse thérapeutique de l'AZA, la 6-MP et le MPA. Nous allons maintenant aborder la partie expérimentale de ce travail. Cette seconde partie s'articule autour d'un article scientifique : « *Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase phenotype in red blood cells using HPLC* » soumis pour publication dans une revue internationale. Cet article traite de la mise en point, l'optimisation et la validation de la méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes. Les activités de l'IMPDH mesurées chez des sujets sains et les patients traités par l'AZA et la 6-MP sont également présentes dans l'article. Les points importants de l'article faisant l'objet de ces travaux sont résumés et illustrés dans les différentes sous-parties Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion. D'autres données, non incluses dans l'article, concernant notamment l'activité de l'IMPDH chez des patients greffés traités par le MPA et la variabilité intra-individuelle chez des patients traités par l'AZA seront également rapportées.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Résumé de la Méthode de l'Article

1.1.1. Méthode de Mesure de l'Activité de l'IMPDH et sa Validation

Cette partie repose sur la mise au point, l'optimisation et la validation d'une nouvelle méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH au sein des érythrocytes. Le principe est toujours basé sur la mesure par HPLC d'XMP formé après incubation de lysats érythrocytaires en présence du substrat de l'enzyme (IMP) et de ses cofacteurs. De nombreux essais ont été effectués à différentes étapes afin de détecter de l'XMP formé au cours de la période d'incubation.

On peut diviser cette méthode en trois principales étapes comportant pour chacune divers paramètres :

- 1) Préparation du lysat érythrocytaire : le nombre d'étape de lavage des érythrocytes ; le facteur de dilution ; la vitesse, le temps et la température de centrifugation ; le temps et la température de conservation.
- 2) Conditions d'incubation et d'arrêt de la réaction enzymatique : la concentration de chaque composant ajouté, le pH du milieu réactionnel, la température et le temps d'incubation ; le rapport du volume de lysat et du milieu réactionnel pour un échantillon ; la vitesse, le temps et la température de centrifugation.
- 3) Conditions chromatographiques : le type de phase stationnaire ; la composition, le pH et la molarité de phase mobile ; le volume d'injection ; le débit de la phase mobile ; la longueur d'onde de détection.

Ces paramètres ont dû être optimisés afin d'obtenir une méthode sensible et robuste.

La préparation du lysat érythrocytaire et l'arrêt de la réaction enzymatique ont été optimisés par rapport aux protocoles mis en place au laboratoire pour la détermination de la TPMT et de l'ITPA afin de pouvoir utiliser le même échantillon de lysat pour déterminer les activités de ces trois enzymes.

L'activité de l'IMPDH est exprimée en nanomole d'XMP formé par gramme d'hémoglobine par heure (nmol XMP/g Hb/h).

La validation analytique de la méthode a été réalisée afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 spécifiant les exigences de qualité et de compétence applicable

aux laboratoires de biologie médicale. Toutes les informations relatives aux réactifs utilisés, à l'appareillage de l'HPLC, au protocole de mesure de l'activité de l'IMPDH et à la validation de la méthode sont présentées dans l'article scientifique dans *la partie 3*.

1.1.2. Inclusion des Sujets Sains et des Patients traités par l’Azathioprine et la 6-Mercaptopurine

Les caractéristiques des volontaires sains et des patients traités par l’AZA ou la 6-MP sont incluses dans l’article scientifique et présentées dans le TABLEAU 3 ci-après.

	Sujets Sains (n = 30)	Patients > 18 ans (n = 50)	Patients < 18 ans (n = 62)
<u>Age (années)</u>			
moyenne ± écart type	40,3 ± 16,0	37,1 ± 14,6	12,9 ± 3,3
[minimum – maximum]	[21,4 – 78,4]	[18,0 – 79,5]	[4,2 – 17,8]
<u>Sexe (féminin / masculin)</u>			
	18 / 12	25 / 25	29 / 33
<u>Traitement :</u>	AZA	0	49
	6-MP	0	1
<u>Pathologie diagnostiquée (%)</u>			
	0		
Maladie de Crohn		18 (36 %)	29 (46 %)
Rectocolite Hémorragique		7 (14 %)	10 (16 %)
Vascularite		7 (14 %)	2 (1,6 %)
Hépatite Auto-immune ou Cholangite Sclérosante Primitive		6 (12 %)	10 (16 %)
Lupus Erythémateux Systémique		4 (8 %)	1 (1,6 %)
Maladie de Behcet		3 (6 %)	1 (1,6 %)
Prophylaxie du Rejet de greffon		1 (2 %)	1 (1,6 %)
Anémie Hémolytique Auto- immune		1 (2 %)	0
Syndrome de Gougerot-Sjögren		1 (2 %)	0
Dermatite Atopique		1 (2 %)	0
MICI Non Diagnostiquée		1 (2 %)	8 (13 %)

TABLEAU 3 : Caractéristiques des sujets sains et des patients traités par l’azathioprine ou la 6-mercaptopurine.

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l’intestin

1.2. Inclusion des Sujets Transplantés traités par l'Acide Mycophénolique

Un total de 13 patients greffés et traités par le MPA comprenant 5 femmes et 8 hommes ont été inclus. L'âge de ces patients était compris entre 20,4 et 64,0 ans (moyenne : 44,0 \pm 12,3 ans). Tous ces patients ont subi une transplantation rénale mais également une transplantation du pancréas pour trois d'entre eux. Les échantillons de sang ont été prélevés entre 3 mois et 15 ans suivant la transplantation (moyenne : 4,7 ans). Onze de ces patients étaient traités par le mycophénolate mofétil (*Cellcept*®) et les deux autres, par le mycophénolate sodique (*Myfortic*®). Le MPA était associé à d'autres immunosuppresseurs : un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) et aussi, pour dix d'entre eux à des corticoïdes (prednisolone). Les caractéristiques des patients seront revues dans la *partie 2 Résultat* (TABLEAU 5).

1.3. Analyses Statistiques

Les tests statistiques réalisés ont été effectués à l'aide du logiciel R (*version 3.1.1*) et Excel 2011 (*version 14.0.0*). Une valeur de *p value* < 0,05 indique une différence statistique. La distribution de la variable binaire « homme / femme » entre les groupes d'étude a été évaluée par un test de Khi-Deux. La comparaison de la variable âge entre les volontaires sains et les patients adultes traités par l'AZA ou la 6-MP a été réalisée par un test non-paramétrique de Mann-Whitney. Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour la comparaison des variables continues « âge » et « activité de l'IMPDH » entre des groupes d'étude d'un nombre supérieur à deux.

2. Résultats

2.1. Résumé des Résultats de l'Article

2.1.1. Validation de la Méthode de Mesure de l'Activité de l'IMPDH

De nombreux essais ont dû être réalisés afin d'optimiser chaque paramètre de la méthode, comme nous l'avons vu dans la *partie 1.1.1*. L'étude des paramètres qui concerne les conditions enzymatiques a été réalisée sur différents lysats de patients ou de pools ayant des activités hétérogènes de l'IMPDH. Chaque valeur testée d'un paramètre a été répliquée en 3 fois afin de vérifier la répétabilité des résultats. L'optimisation des conditions chromatographiques s'est effectuée à l'aide de contrôle chargé en XMP. Ces données sont résumées dans le TABLEAU 4 ci-dessous.

Paramètres testés	Gamme de valeur testée	Valeur choisie
pH	6 – 10	8,5
[IMP]	0,5 – 10 mmol/L	5 mmol/L
[β NAD ⁺]	0,005 – 2 mmol/L	0,3 mmol/L
[DTT]	0 – 8 mmol/L	0,5 mmol/L
[KCl]	25 – 450 mmol/L	200 mmol/L
[EDTA]	0 – 6 mmol/L	5 mmol/L
Volume de lysat (<i>Volume final</i> = 500 μ L)	0 – 460 μ L	450 μ L
Temps d'incubation	0 – 72 h	24 h
<i>Phase mobile :</i>		
[K ₂ HPO ₄]	100 – 400 mmol/L	280 mmol/L
pH	4,2 – 6,2	6,2
Volume d'injection	20 – 200 μ L	200 μ L

TABLEAU 4 : Récapitulatif des paramètres optimisés : gammes de valeurs testées et valeurs sélectionnées.

La linéarité de la quantité d'XMP produite en fonction du temps d'incubation et du volume de lysat a été vérifiée ($r^2 = 0,986$ et $0,992$ respectivement).

Grâce à l'optimisation de ces différents paramètres, la méthode a gagné en sensibilité ainsi qu'en robustesse et a parfaitement répondu aux exigences établies par le "Center for Drug Evaluation and Research" concernant la spécificité, le recouvrement, la gamme de calibration, la précision et l'exactitude. Toutes ces données sont présentées dans l'article scientifique de la *partie 3*.

2.1.2. Variabilité Interindividuelle de l'Activité de l'IMPDH chez les Sujets Sains et les Patients traités par l'Azathioprine ou la 6-Mercaptopurine

Un des objectifs de cette étude était d'évaluer la distribution de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH chez des sujets sains et des patients adultes et pédiatriques traités par l'AZA et le 6-MP. On remarque une large gamme d'activité de l'IMPDH illustrée dans la FIGURE 14. L'activité est comprise entre 3.4 – 37.6 nmol XMP/g Hb/h pour les volontaires sains, 2.6 – 35,8 et 2,9 – 51,4 nmol XMP/g Hb/h pour les patients adultes et pédiatriques traités par médicament thiopuriques respectivement. La distribution de l'activité de l'IMPDH dans ces trois groupes est présentée dans la FIGURE 15 et semble être uni-modale.

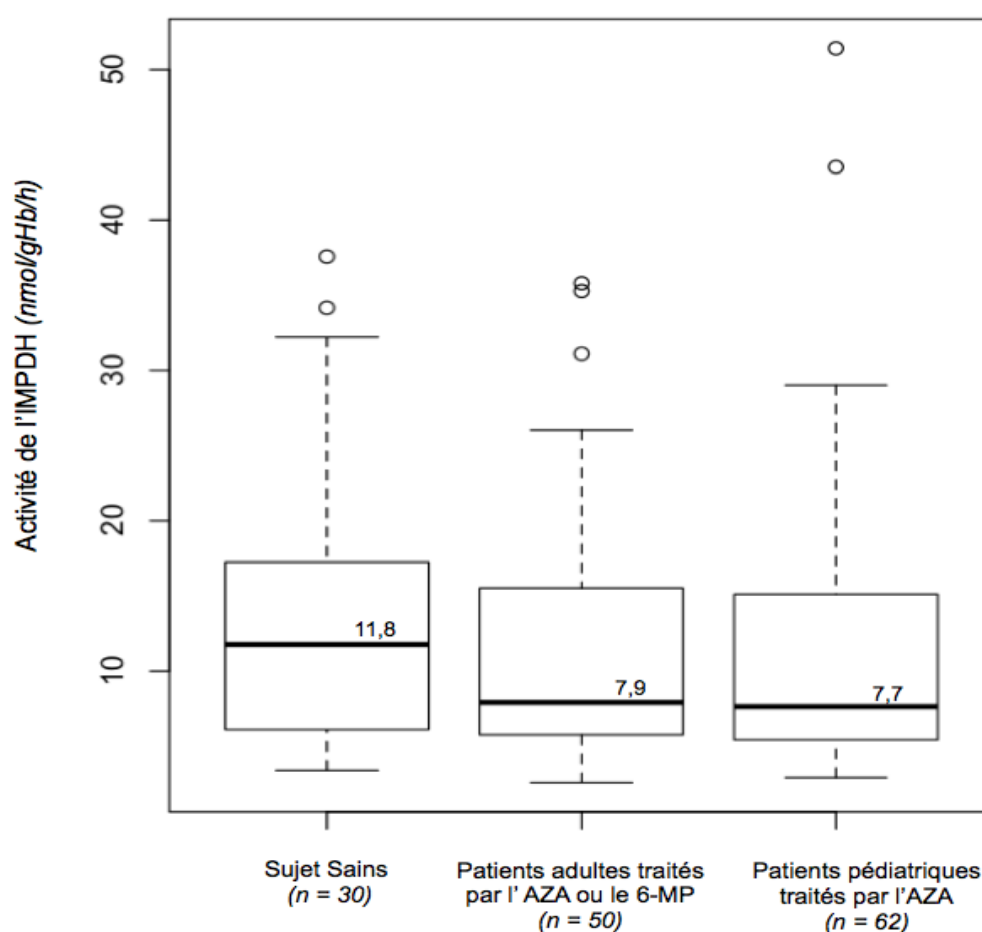


FIGURE 14 : Boîtes à dispersion de l'activité de l'IMPDH pour les sujets sains, les patients adultes et pédiatriques traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.

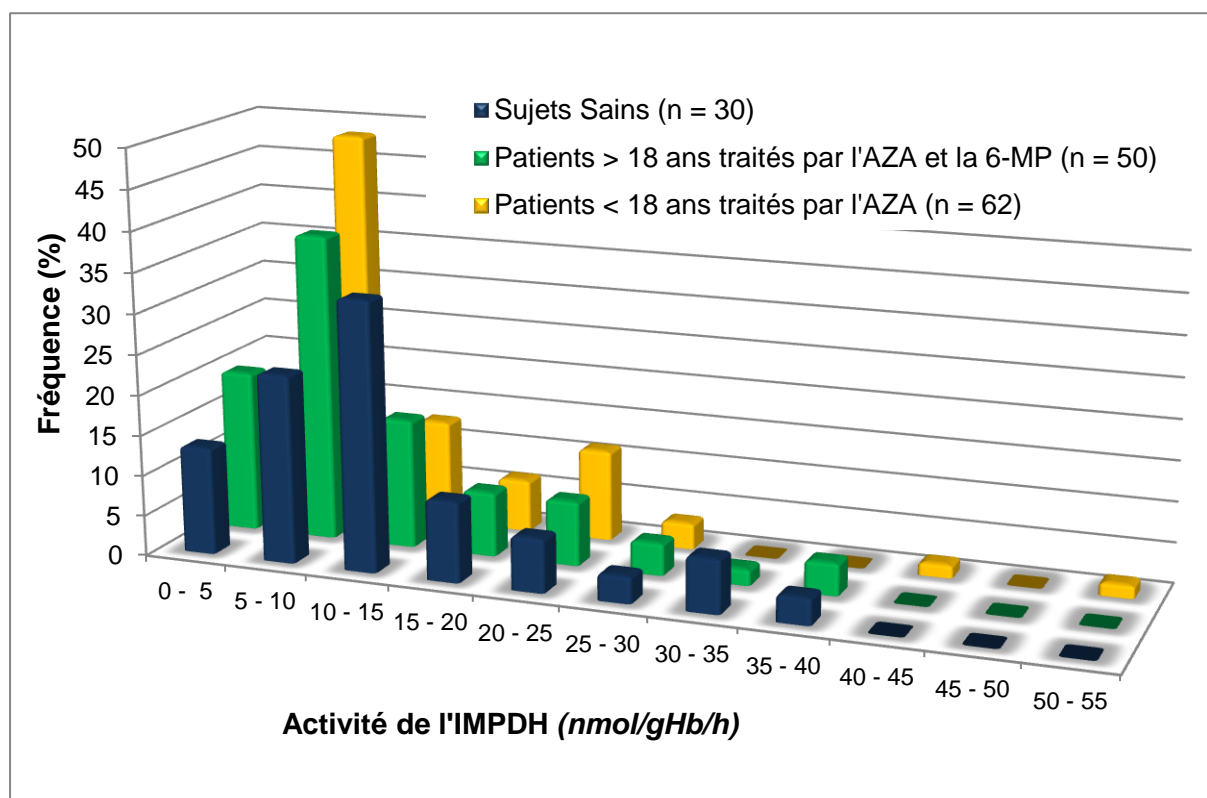


FIGURE 15 : Distribution de l'activité de l'IMPDH chez les sujets sains, les patients adultes et pédiatrique traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.

Avant de comparer l'activité de l'IMPDH de ces 3 groupes, la comparabilité des données démographiques des groupes a d'abord été établie. La distribution homme / femme ne diffère pas significativement entre ces groupes ($p > 0,48$). L'âge n'est pas significativement différent entre les volontaires sains et les patients adultes traités par l'AZA ou la 6-MP ($p > 0,43$). Ainsi, la comparaison de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH entre ces 3 groupes a pu être effectuée et n'a montré aucune différence significative ($p > 0,25$).

2.2. Activité de l'IMPDH érythrocytaire chez les Patients Transplantés traités par l'Acide Mycophénolique

Les 13 patients transplantés et traités par le MPA, en prévention d'un rejet du greffon, ont des profils et des activités de l'IMPDH variables (TABLEAU 5).

N° d'ID	Âges (années)	Sexe	Organe(s) Transplanté(s)	Traitement immunosuppresseur	Années post-greffe	Activité IMPDH (nmol/g Hb/h)
1	20,4	M	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus	4	69*
2	64,0	M	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus, prednisolone	5,1	661
3	55,2	M	Rein	Myfortic [®] , tacrolimus, prednisolone	0,3	1044
4	42,2	F	Rein, pancréas	Cellcept [®] , ciclosporine, prednisolone	3,5	613
5	43,4	M	Rein	Cellcept [®] , ciclosporine, prednisolone	4	551
6	56,3	M	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus, prednisolone	4	370
7	40,3	M	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus, prednisolone	0,4	615
8	32,6	M	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus, prednisolone	3	166
9	32,8	M	Rein	Cellcept [®] , ciclosporine, prednisolone	0,7	554
10	45,4	F	Rein	Cellcept [®] , tacrolimus, prednisolone	15	280
11	60,1	F	Rein	Cellcept [®] , ciclosporine, prednisolone	5,8	268
12	43,0	F	Rein, pancréas	Cellcept [®] , ciclosporine	14,2	751
13	36,3	F	Rein, pancréas	Myfortic [®] , tacrolimus, prednisolone	1	452

TABLEAU 5 : Caractéristiques et activités de l'IMPDH des patients transplantés traités par l'acide mycophénolique.

N° d'ID : numéro d'identification ; F : Féminin ; M : masculin ; * Patient non observant

L'activité de l'IMPDH de ces 13 patients comprise entre 69 et 1 044 nmol XMP/g Hb/h avec une médiane de 551 est très variée et élevée par rapport aux autres populations étudiées précédemment (FIGURE 16). On remarque que le patient peu observant (*patient n°1*) possède la plus basse activité du groupe.

La comparabilité des données démographiques de ces groupes a été vérifiée. La parité homme / femme entre les 4 groupes ne diffère pas significativement ($p > 0,54$) et l'âge non plus entre les volontaires sains, les patients adultes traités par l'AZA ou la 6-MP et les patients transplantés sous MPA ($p > 0,20$). L'activité de l'IMPDH a été évaluée entre ces 4 groupes et a montré une différence significative ($p < 0,01$). Etant donné que l'activité de l'IMPDH n'était pas significativement différente entre les sujets sains et les 2 groupes de patients traités par l'AZA ou la 6-MP, on peut conclure que l'activité de l'IMPDH des patients greffés traités par le MPA diffère des 3 autres groupes.

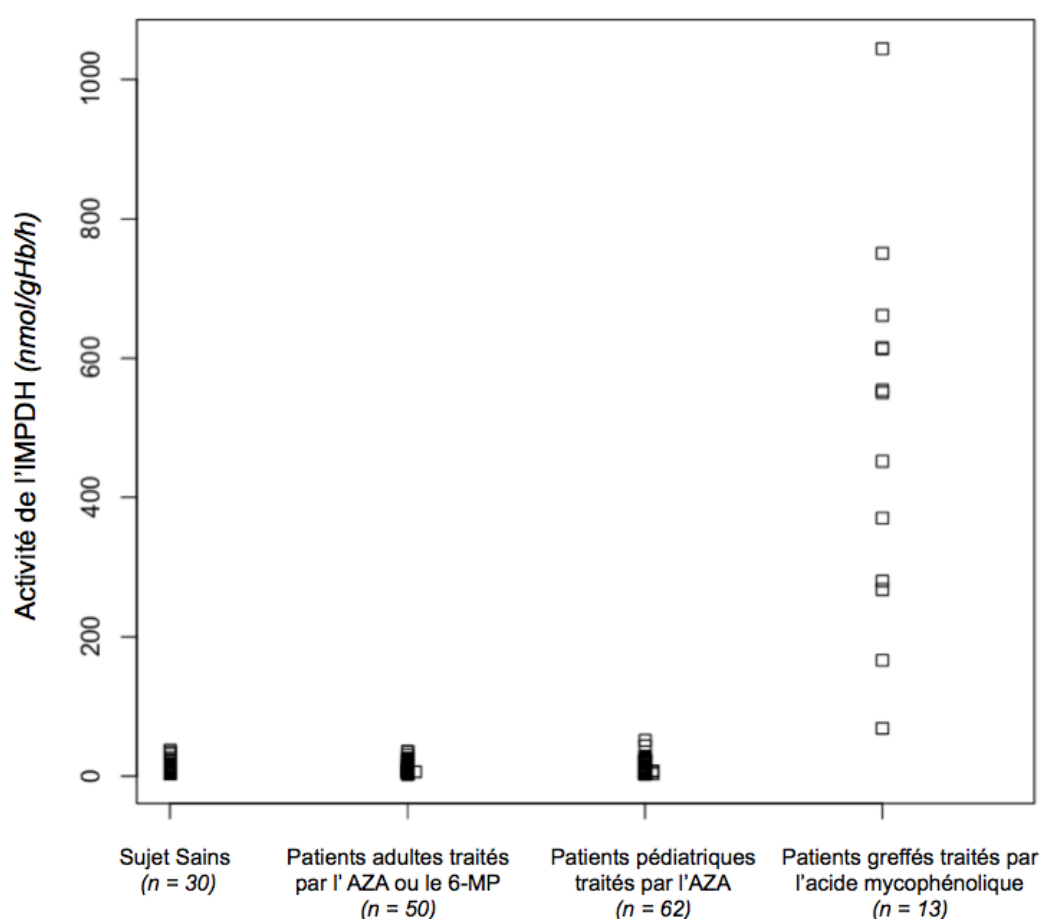


FIGURE 16 : Graphique en bande de l'activité de l'IMPDH chez les sujets sains, les patients adultes et pédiatriques traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine et les patients greffés traités par l'acide mycophénolique.

2.3. Variabilité Intra-individuelle de l'Activité de l'IMPDH chez des Patients traités par l'Azathioprine

La variabilité intra-individuelle de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes chez 14 patients traités par l'AZA est présentée dans le TABLEAU 6, ci-dessous.

Sexe	Age	Diagnostique	Activité de l'IMPDH (nmol XMP/g Hb/h)		Intervalle de temps (jours)	CV (%)
			1 ^{er} dosage	2 nd dosage		
F	11	Maladie de Behcet	5,3	27,8	1	95,8
F	8	Hépatite auto-immune	10,6	43,9	33	86,5
F	10	MICI non diagnostiquée	20,1	14,3	46	23,9
M	16	Hépatite auto-immune	7,4	13,5	64	41,5
F	17 - 18	Non diagnostiqué	5,3	5,9	70	7,8
Prophylaxie du rejet de						
M	14	greffe	15,0	4,1	84	80,6
F	16	Hépatite auto-immune	3,6	7,2	84	46,2
M	25	Maladie de Behcet	11,2	2,7	104	86,3
M	15	Maladie de Crohn	7,6	11,6	119	29,5
M	8 - 9	Maladie de Crohn	51,4	18,3	144	67,2
M	15 - 16	Maladie de Crohn	9,9	10,1	187	1,6
F	14 - 15	Maladie de Crohn	7,7	6,2	220	15,9
M	16 - 17	Maladie de Crohn	29,0	6,8	249	87,9
M	16 - 17	Maladie de Crohn	5,2	5,1	287	1,5

TABLEAU 6 : Caractéristiques et variabilités Intra-individuelles de l'activité de l'IMPDH chez 14 patients traités avec l'azathioprine.

F : Feminin, M : Masculin, CV: Coefficient of variation, MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

L'activité de l'IMPDH présente une forte variabilité intra-individuelle (CV : 1,5 – 95,8 %) indépendante de l'intervalle de temps entre les deux dosages compris entre 1 et 287 jours dans ce groupe de patients. Cependant, l'activité de l'enzyme reste toujours dans la même gamme d'activité précédemment décrite chez les sujets sains et patients traités par l'AZA ou la 6-MP (2,6 - 51,4 nmol XMP/g Hb/h).

3. Article Scientifique : « Determination of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Phenotype in Red Blood Cells using HPLC »

Cet article a été soumis à publication dans une revue internationale.

Manuscript Title:	Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase phenotype in red blood cells using HPLC
Manuscript No:	CLINCHEM/2015/243006
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	12 May 2015
Complete List of Authors:	Audrey Beringer, Antony Otero, Quentin, Rebeca Obenza Otero, Clémence Gustin, Rebecca Clarke, Jean-Paul Salvi, and Roselyne Boulieu
Keywords:	HPLC; IMPDH Phenotype; Red Blood Cells; Thiopurines

Dear Reviewer,

Thank you for reviewing this manuscript, please remember the following:

1. The attached manuscript is confidential and should not be circulated or shared with anyone.
2. Authors of this manuscript should never be contacted until after its publication.
3. If you have a conflict of interest regarding this work, contact the editorial office immediately.

**Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase
phenotype in red blood cells using HPLC**

Clinical Chemistry

Journal Categories: Drug Monitoring and Toxicology (DMT)

Audrey Beringer^{1,2}, Antony Citterio-Quentin^{1,2}, Rebeca Obenza Otero¹,
Clémence Gustin¹, Rebecca Clarke^{1,3}, Jean-Paul Salvi¹, Roselyne Boulieu^{1,2}

1. Université Lyon 1, EA 4169, SFR Lyon-Est Santé – INSERM US 7– CNRS
UMS 3453, ISPB, Laboratoire de Pharmacie Clinique, Pharmacocinétique et
Evaluation du médicament, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08,
France

2. CHU de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Unité de
Pharmacocinétique Clinique, Lyon F-69643, France.

3. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Trinity College Dublin,
Dublin, Ireland

Running title : IMPDH phenotype in red blood cells

All correspondence should be addressed to:

Professor Roselyne BOULIEU

Université Lyon1-ISPB-Faculté de Pharmacie

Pharmacie Clinique, Pharmacocinétique et Evaluation du Médicament

8 avenue Rockefeller

69373 Lyon Cedex 08, France

Tel 33(0)478777132; E-mail roselyne.boulieu@univ-lyon1.fr

Keywords: IMPDH, red blood cells, phenotype, thiopurines, HPLC

List of abbreviations: IMPDH, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase; AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine; IBD, inflammatory bowel disease; TPMT, thiopurine S-methyltransferase; β NAD, β nicotinamide adenine dinucleotide; IMP, inosine 5'-monophosphate; XMP, xanthosine 5'-monophosphate; RBCs, red blood cells; ITPA, inosine triphosphate pyrophosphatase, DTT, Dithiothreitol; 6-TGN, 6-Thioguanine nucleotides

Confidential

Abstract

Background: Thiopurine drugs are commonly used to treat autoimmune diseases or to prevent transplant rejection. Genetic variation in thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is associated with adverse events leading to drug adjustments. However, TPMT polymorphism doesn't explain all adverse events. Investigation of the role of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), involved in thiopurine metabolism, is lacking. This study reports a HPLC method to determine IMPDH activity in red blood cells (RBCs).

Methods: IMPDH activity was evaluated by enzymatic conversion of inosine 5'-monophosphate (IMP) to xanthosine 5'-monophosphate (XMP). The enzymatic reaction was stopped by heating for 3 minutes at 100 °C. The XMP formed was analysed on a Luna NH2 stationary phase. IMPDH activity was measured in healthy volunteers, adult and pediatric patients treated with thiopurines.

Results: XMP was eluted below 10 minutes. The method was linear in the range 1 to 100 mmol/L of XMP. Intra-assay and inter-assay precisions were below 9 % for RBCs supplemented with 2, 40 and 80 mmol/L of XMP. A wide range of IMPDH activity in RBCs was observed in healthy volunteers (median 11.8, range 3.4 – 37.6 nmol XMP/gHb/h). No difference in IMPDH activity was found between healthy volunteers and patients on thiopurine therapy ($p > 0.25$).

Conclusions: The method described is useful to determine IMPDH activity in RBCs due to the easy and reliable treatment procedure and the low blood volume required. RBCs lysate allowing the measurement of TPMT, ITPA, IMPDH phenotype, the relation between these enzymes and thiopurine metabolites could be investigated to optimize thiopurine therapy.

Introduction

The thiopurine drugs azathioprine (AZA) and 6-mercaptopurine (6-MP) are frequently used in cancer chemotherapy and immunosuppressive therapy to treat leukemia, inflammatory bowel disease (IBD), autoimmune hepatitis, vasculitis, rheumatoid arthritis, atopic dermatitis and in rejection prophylaxis. Adverse drug events were observed in 30% of patients and lead to thiopurine discontinuation (1–4). Thiopurine methyltransferase (TPMT; EC 2.1.1.1.67) which catalyzed the conversion of thiopurines to methylated intracellular metabolites is often involved in thiopurine toxicity (5–7). The activity of this enzyme is under genetic control with a trimodal activity distribution. However, TPMT polymorphism explains only 30-60% of cases with thiopurine intolerance (8).

Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH; EC 1.1.1.205) is a key enzyme involving the *de novo* biosynthesis of guanine nucleotides. IMPDH catalyzes the β -nicotinamide adenine dinucleotide (β NAD) dependent dehydrogenase, which converts inosine 5'-monophosphate (IMP) into xanthosine monophosphate (XMP). Two isoenzymes have been identified in humans, IMPDH1 and IMPDH2. It has also a strategic position in the metabolic pathway of AZA and 6-MP. IMPDH seems to be the rate-limiting enzyme in the formation of thioguanine nucleotides (6-TGNs), which are responsible of the main immunosuppressive properties of these thiopurines but can also lead to myelotoxicity.

In a study sequencing patients treated with AZA, one AZA-resistant patient presented a genetic variation resulting to reduction of promoter activity *in vitro* of a gene encoding IMPDH (IMPDH 1). This mutation corresponded to an insertion in the P3 promoter of IMPDH1 (9). This variant promoter seems to be rare but could altered IMPDH function *in vivo* and contributed to a part of AZA resistance observed

in 9% of IBD patients. In this way, determination of IMPDH phenotype could be useful.

To our knowledge, no data on IMPDH phenotype in red blood cells (RBCs) to investigate the role of IMPDH activity in thiopurine metabolism were available. Only two studies deal with IMPDH activity in IBD patients on thiopurine therapy but activity was determined in peripheral blood mononuclear cells (10,11). However, *Albrecht et al.* demonstrated that IMPDH activity in whole blood cells is predominantly located in erythrocytes by comparison to mononuclear cells (12), most likely because RBCs constitute the largest blood cell population (13).

The present study reports a HPLC method using a weak anion exchange phase to determine IMPDH activity in RBCs. This method allows to phenotype IMPDH in current practice as others enzyme involved in thiopurine metabolism, previously described (14-16), to investigate the potential role of IMPDH in thiopurine resistance and adverse events.

Materials and methods

Chemicals and Reagents

Inosine 5'-monophosphate disodium salt (IMP), β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD), potassium chloride (KCl), Xanthine 5'-monophosphate (XMP), Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) and dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma-Aldrich. Potassium dihydrogen phosphate buffer was obtained from Merck and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from BDM Prolabo. Stock solutions of IMP (300 mmol/L) and XMP (50 mmol/L) were prepared in distilled water and stored at -20 °C.

Chromatographic Conditions

The HPLC system consisted of an Agilent 1050 series using HPChem software. Chromatographic separations were carried out on a Luna® NH₂ 100 Å (3 µm, 4.6 × 150 mm; Phenomenex) equipped with a guard column (SecurityGuard Cartridges, 4 × 3.0 mm; Phenomenex) containing the same packing material, which acts as a weak anion exchanger. The amino group for anion exchange properties is bonded to the silica matrix through aliphatic propyl spacer. Isocratic elution was performed with 280 mmol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.2) at a flow rate of 1 mL/min. The volume of injection was 200 µL, the analysis run was 15 min and the detection wavelength was set at 250 nm using a photodiode array detector. Calculations were made in external standard mode using peak-area ratios.

Volunteers and Patients

Thirty healthy volunteers, 50 adult patients and 62 pediatric patients on thiopurine therapy were included. Samples of healthy blood donors were obtained from 30 adult Caucasians (18 females and 12 males) ranged from 21 to 78 years old (mean 40.3 years old; median 35.9 years).

Forty-nine adult patients on AZA therapy and 1 adult patient on 6-MP therapy (25 females and 25 males) ranged from 18 to 80 years old (mean: 37.1 years old; median 36.9 years old) were included. Diagnosis of these patients was Crohn's disease (18 patients, 36%); ulcerative colitis (7 patients, 14%), vasculitis (7 patients, 14%), autoimmune hepatitis (6 patients, 12%), Behcet's disease (3 patients, 6%), systemic lupus erythematosus (4 patients, 8%), autoimmune hemolytic anemia (1 patient, 2%), Sjögren's syndrome (1 patient, 2%), atopic dermatitis (1 patient, 2%), undiagnosed IBD (1 patient, 2%) and renal transplantation (1 patient, 2%).

Pediatric patients treated with AZA were composed of 29 girls and 33 boys ranged from 4 to 17.8 years old (mean: 13 years old; median 13 years old). Thiopurine therapy indications was Crohn's disease (29 patients, 46%); ulcerative colitis (10 patients, 16%), autoimmune sclerosing cholangitis or hepatitis (10 patients, 16%), undiagnosed IBD (8 patients, 13%), vasculitis (2 patients, 3%), Behcet's disease (1 patient, 1.6%), systemic lupus erythematosus (1 patient, 1.6%) and liver transplantation (1 patient, 1.6%).

Sample preparation

Washing and lysis of RBCs were performed according to a previous protocol described for TPMT and inosine triphosphate pyrophosphate (ITPA) (14-16). Hemoglobin concentration of washed erythrocytes in saline solution was determined by Advia 2120®, Siemens. Then, the RBCs were lysed with 4 volumes of cold distilled water and centrifuged. The supernatant was stored at - 80°C until analysis.

Enzymatic reaction

IMPDH activity assay was based on the conversion of IMP to XMP in presence of NAD as hydrogen acceptor. The reaction mixture was composed of 50 mmol/L IMP, 3 mmol/L NAD, 5 mmol/L DTT, 2 mol/L KCl, 50 mmol/L EDTA and 1 mol/L TRIS-HCl (pH 8.5). After thawing, the reaction was started by addition of 50 µL of the reaction mixture to the 450 µL of RBCs lysate. A final volume of 500 µL was incubated in a water bath at 37°C for 24 h. The enzyme reaction was stopped by heating at 120°C for 3 min which induced protein precipitation as previously described (14). After deproteinization, the tubes were centrifuged at 4,800g for 15 minutes at 15°C, and the supernatant was ultracentrifuged at 15,500g for 5 minutes at 4°C. The

supernatant was injected into the column. IMPDH activity was expressed as nanomoles of XMP formed per gram of hemoglobin per hour (nmol XMP/g Hb/h).

Validation of the assay

All assays were performed in triplicate to determine the optimal enzymatic conditions using RBCs lysate from patients and pools with high and low IMPDH activity. The influence of the concentration of the substrate IMP was assessed in the concentration varying from 0.5 to 10 mmol/L. Likewise, the influence of the concentration of cofactors, β NAD (0.005 – 2 mmol/L), KCl (25 – 50 mmol/L) and EDTA (0 – 6 mmol/L) was evaluated. The influence of DTT was also tested in the range 0 to 8 mmol/L. The influence of the pH of the reaction mixture was assessed in the range 6 to 10. The linearity and proportionality of the enzymatic reaction regarding the incubation time and the lysate volume was tested between 0 to 72 h and 0 to 460 μ L, respectively.

Different concentrations of KH_2PO_4 (0.1 – 0.4 mol/L) and pH (4.2 – 6.2) of the mobile phase was also evaluated. The volume of injection was also tested in the range 20 to 200 μ L.

Analytical validation of the method was performed according to the guideline for industry in bioanalytical method validation from Center for Drug Evaluation and Research. Linearity was evaluated in the range 1 to 100 μ mol/L of XMP. The lower limit of quantification of XMP was defined as the lowest concentration with a precision $\leq 20\%$ and an accuracy of 80% – 120%. The intra-assay and inter-assay precision and accuracy were performed with replicate analysis of RBCs lysates supplemented with low (2 μ mol/L), medium (40 μ mol/L), and high (80 μ mol/L) concentrations of XMP. The recovery was investigated by comparison of peak area

from RBCs lysates and aqueous solutions, both supplemented with XMP at 1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$.

Statistical analysis

Statistics was processed by R computer software (version 3.1.1.). Comparison of patient age between healthy volunteers and patients treated with AZA or 6-MP were analyzing using non-parametric Mann-Whitney U test. Gender distribution was evaluated using Chi-Square test. For group comparison of IMPDH activity, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. A $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

Assay conditions

The optimal IMP final concentration was 5 mmol/L (Figure 1A). A βNAD concentration of 0.3 mmol/L was chosen. βNAD concentrations higher than 0.5 mmol/L lead to a decrease in IMPDH activity as shown in Figure 1B. The optimal enzyme conditions for KCl and EDTA concentration were 0.2 mol/L and 0.1 mol/L, respectively. The study on the influence of the concentration of DTT (0 – 10 mmol/L) showed that high DTT concentration was not needed. The optimal pH of reaction mixture was 8.5 with a TRIS buffer concentration at 0.1 mol/L. Under these conditions, the XMP formation was linear regarding the RBCs lysate volume of 0 – 460 μL ($r^2 = 0.992$) and during the incubation period of 0 – 72 h ($r^2 = 0.986$). The K_m and V_{\max} of IMP evaluated by Lineweaver-Burk plot were 0.14 mmol/L and 5.9 nmol XMP/g Hb/h.

Analytical Performance

Figure 2 shows a chromatogram of a RBCs lysate from a subject with a XMP concentration of 65.8 $\mu\text{mol/L}$. XMP was eluted at 9.4 min.

Specificity was tested using lysate incubated without NAD and IMP and in presence of mycophenolate mofetil, an inhibitor of IMPDH (Figure 3).

The mean analytical recoveries were 89.15%, 95.6% and 98.8% at XMP concentrations of 1, 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The calibration curve ($y = 63.4x - 19.8$) was linear over XMP concentration of 1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ with a correlation coefficient of 0.999. The standard deviation of residual, the slope and the intercept was 23.0, 0.23 and 11.9 (pic area), respectively. Linearity was also assessed up to XMP concentration of 250 $\mu\text{mol/L}$ and remains linear ($r^2 = 0.999$). The lower limit of quantification was 1 $\mu\text{mol/L}$. Intra-assay and inter-assay precision and accuracy were shown in Table 1.

Distribution of IMPDH activity in RBCs

IMPDH activity distribution was showed in Figure 4. The median of IMPDH activity was 11.8 nmol XMP/g Hb/h (range: 3.4 - 37.6) in healthy volunteers. Patients on thiopurine therapy had enzyme activity median of 7.9 nmol XMP/g Hb/h (range: 2.6 - 35.8) for adults and 7.65 nmol XMP/g Hb/h (range: 2.9 - 51.4) for pediatric patients. There was no significant difference with respect to gender between these 3 populations ($p > 0.48$) and in age between healthy volunteers and adult patients on thiopurine therapy ($p > 0.43$). IMPDH activity in RBCs was no significantly different between healthy group, adult patient and pediatric patient groups treated with AZA or 6-MP ($p > 0.25$).

Discussion

The present study reports a robust and sensitive method for the determination of IMPDH activity in RBCs. Several factors influencing the IMPDH activity and chromatographic conditions were optimized using RBCs as cellular materials. Compared to previous data using RBCs reported in the literature (17, 18), we observed that saturation occurs at higher value of IMP concentration due to the choice of an incubation time of 24 h. NAD concentration of 0.3 mmol/L was chosen corresponding to concentration lower than the NAD concentration used by *Montero et al.* (17) and *Mino et al.* (18), 0.5 and 1.8 mmol/L respectively. High NAD concentrations decrease IMPDH activity (Figure 1B) that confirm kinetic mechanism theory as previously described (19,20). We also observed that a pH value of 8.5 leads to an increase of IMPDH activity by comparison to a pH value of 7.4 (17,18) or 8.0 (12). It may be due to the first step of IMPDH reaction which involves ionized cysteine thiol group (pKa 8.3) so the ratio ionized thiol / protonated thiol increase at pH value more basic than physiological pH.

The choice of RBCs instead of mononuclear cells or whole blood is justified by the predominant localization of IMPDH in RBCs (12) and the abundance of these cells in whole blood. Furthermore, RBCs can be easily isolated by only blood centrifugation compared to the fastidious treatment required to isolate white blood cells. Twenty-four hour incubation time allows the use of a small volume of whole blood (100 μ L for one sample), which is essential for routine measurement, especially for pediatric population. The preparation of RBCs lysate reported here to measure IMPDH activity is identical than those used to determine TPMT and ITPA activities as previously described (14-16). Thus, with only 500 μ L of whole blood, the phenotype of TPMT, ITPA (14-16) and IMPDH, three enzymes involved in

metabolism pathways of thiopurine drugs can be performed. The use of heating to stop the enzymatic reaction allows to reduce the time spent and avoid the dilution of the sample by addition of acid and then buffer required to neutralize the sample before injection into the column.

To our knowledge, this study is the first method reported to compare IMPDH activity in RBCs in a large population of healthy volunteers and patients on thiopurine therapy. A wide range of IMPDH activity (2.6 – 51.4 nmol XMP/g Hb/h) in RBCs from healthy volunteers and patients treated with AZA and 6-MP was observed in this study. Our results showed no significant influence of diseases and therapy with AZA or 6-MP on IMPDH activity. A wide IMPDH inter-variability was previously described in peripheral blood mononuclear cells with no difference in IMPDH activity between healthy blood donors and IBD patients treated with thiopurines (10,21).

The method described can be implemented in routine clinical practice due to the easy and reliable treatment procedure and the lowest blood volume required with regard to previous papers reported in the literature (17,18). Using this method, the relation between TMF phenotype, ITPA and IMPDH activity associated with the monitoring of thiopurine metabolites could be investigated for optimizing the treatment and preventing resistance and adverse events of thiopurine drugs. Furthermore, this method could be also of interest in the monitoring of transplant patients treated by IMPDH inhibitors as mycophenolic acid.

Acknowledgments

The authors thank Vincent Valognes and Julie Lejeune for their technical assistance, and all blood donors at the Edouard Herriot Hospital. The authors also acknowledge Alice Denis, Bérengère Brevet, Pilar Vitores and Louis Boiron for their participation to this work.

References

1. Costantino G, Furfaro F, Belvedere A, Alibrandi A, Fries W. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: Response predictors, safety, and withdrawal in follow-up. *J Crohns Colitis*. 2012;6:588-96.
2. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*. 2002;50:485-9.
3. Jharap B, Seinen ML, de Boer NKH, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, et al. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: Analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1541-9.
4. Saibeni S, Virgilio T, D'Inca R, Spina L, Bortoli A, Paccagnella M, et al. The use of thiopurines for the treatment of inflammatory bowel diseases in clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2008;40:814-20.
5. Dubinsky MC, Lamothe S, Ying Yang H, Targan S, Sinnett D, Théorêt Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000;118:705-13.
6. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Andersberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:331-42.
7. Nygaard U. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity*1. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:274-81.
8. Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, von Ahsen N. Measurement of erythrocyte Inosine triphosphate Pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a caucasian population. *Clin Chem*. 2006;52:240-247.
9. Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy MA. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J*. 2007;7:312-7.
10. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65:69-77.
11. Haglund S, Vikingsson S, Söderman J, Hindorf U, Grännö C, Danelius M, et al. The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Ther Drug Monit*. 2011;33:200-8.
12. 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;22:283-94.
13. Bremer S, Mandla R, Vetthe NT, Rasmussen I, Rootwelt H, Line P-D, et al. Expression of IMPDH1 and IMPDH2 After Transplantation and Initiation of Immunosuppression: Transplantation. 2008;85:55-61.
 14. Boulieu R, Sauviat M, Dervieux T, Bertocchi M, Mornex JF. Phenotype determination of thiopurine methyltransferase in erythrocytes by HPLC. *Clin Chem.* 2001;47:956-58.
 15. Citterio-Quentin A, Salvi J-P, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase phenotype in human red blood cells using HPLC. *Ther Drug Monit.* 2012;34:477-80.
 16. Citterio-Quentin A, Long S, Salvi J-P, Moulsmas M, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase in red blood cells using HPLC : An improved method. *Ther Drug Monit* 2014; 36, 689-691.
 17. Montero C, Duley JA, Fairbank LD, M. R. de MB, Micheli V, Cant AJ, et al. Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chim Acta.* 1995;238:169-78.
 18. Mino Y, Naito T, Otsuka A, Ozono S, Kagawa Y, Kawakami J. Inosine monophosphate dehydrogenase activity depends on plasma concentrations of mycophenolic acid and its glucuronides in kidney transplant recipients. *Clin Chim Acta.* 2009;409:56-61.
 19. Citterio-Quentin A, Wang W, Josephine HR, Hedstrom L. A Kinetic Alignment of Orthologous Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenases. *Biochemistry* 2008;47:6689-96.
 20. Xiang B, Markham GD. The Conformation of Inosine 5'-Monophosphate (IMP) Bound to IMP Dehydrogenase Determined by Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. *J Biol Chem.* 1996;271:27531-5.
 21. Glander P, Patrick Braun K, 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;34:543-9.

Table 1: Precision and Accuracy of XMP determination in spiked RBCs.

Target ($\mu\text{mol/L}$)	Intraday (n = 10)			Interday (n = 5)		
	Mean Measured Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	Mean Percentage of Target Value	Mean Measured Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	Mean Percentage of Target Value
1 (LLOQ)	1.03	7.75	103.4	1.10	5.45	110.0
2	2.12	5.65	105.9	1.95	8.57	97.5
40	41.03	2.66	102.6	40.47	2.46	101.2
80	79.71	2.88	99.6	79.44	3.02	99.3

371 RSD, relative standard deviation of the mean

Legends

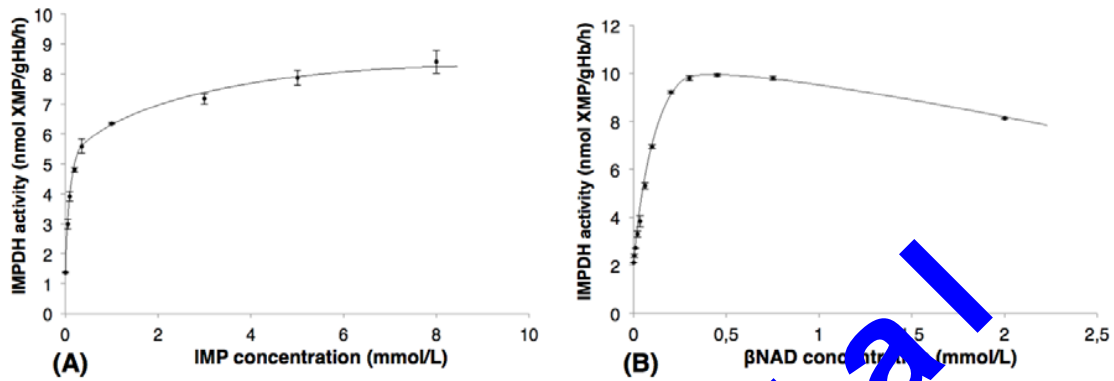
Figure 1: (A) Influence of IMP concentration on IMPDH activity in RBCs lysate incubated with 0.3 mmol/L β NAD. (B) Influence of β NAD concentration on IMPDH activity in RBCs lysate incubated with 5 mmol/L IMP.

Figure 2: Chromatogram of a RBCs lysate from a subject with IMPDH activity of 224.0 nmol XMP/g Hb/h corresponding to XMP concentration of 65.8 μ mol/L.

Figure 3: Influence of mycophenolate mofetil concentration on IMPDH activity in red blood cells.

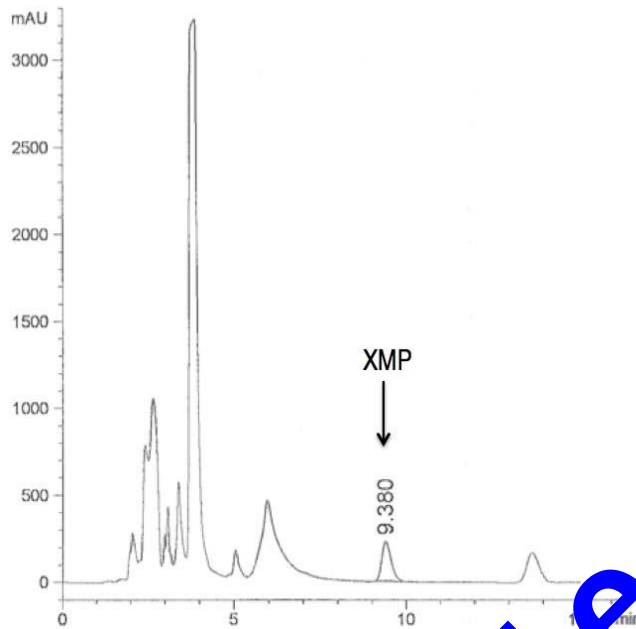
Figure 4: Frequency distribution of RBCs IMPDH activity in 30 healthy subjects, 50 adult and 62 pediatric patients treated with azathioprine or 6-mercaptopurine.

Confidential

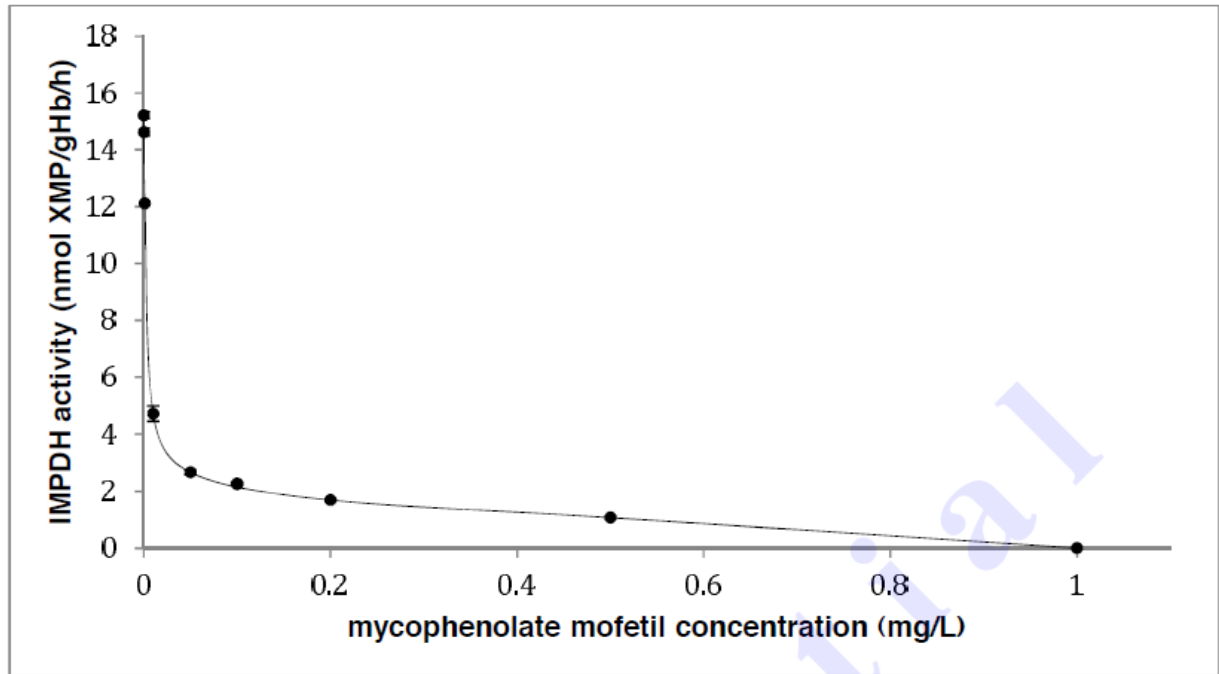


Confidential

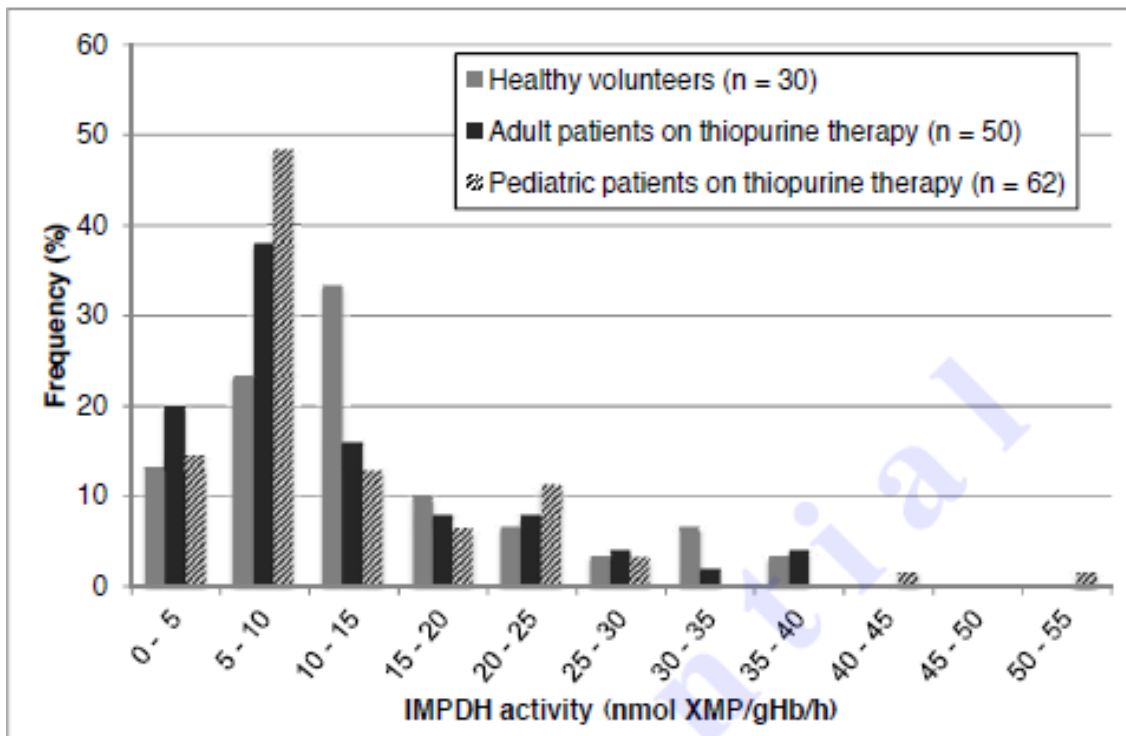
Figure 2



Confidential



Confidential



Confidential

4. Discussion

4.1. **Résumé de la Discussion de l'Article**

4.1.1. Comparaison des Méthodes de Mesure de l'Activité de l'IMPDH

La méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH décrite est sensible et robuste grâce à l'optimisation de différents paramètres influençant l'activité de l'IMPDH et les conditions chromatographiques. Parmi les paramètres relatifs aux milieux réactionnels, on peut recenser des différences avec les deux autres méthodes chromatographiques de détermination de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH de *Montero et al.* et *Mino et al.* (leurs valeurs respectives retrouvées dans ces deux publications seront exprimées dans cet ordre dans la suite de ce paragraphe) précédemment présentées dans la grande partie 1, sous-partie 6.3.2. (69,71) :

- La concentration en IMP nécessaire à la saturation de l'IMPDH se situait à 5 mmol/L lors de nos essais ce qui est bien plus élevé comparé aux deux autres méthodes (1 et 0,5 mmol/L). Cette concentration supérieure peut être expliquée par notre temps d'incubation de 24h (contre 2 et 3 h pour les autres protocoles).
- La concentration choisie de β^+ à 0,3 mmol/L est inférieure à celles utilisées dans la littérature (0,5 et 1,8 mmol/L). Nous avons remarqué une inhibition de l'activité de l'IMPDH à partir de cette concentration en βNAD^+ . En effet, il existe une inhibition non compétitive du βNAD^+ qui a été décrite dans la sous-partie 2.2. dans les rappels bibliographiques (15–17).
- Lors de nos essais sur l'influence du pH du milieu réactionnel, nous avons observé qu'un pH à 8,5 générerait une plus forte activité de l'IMPDH par comparaison à un pH de 7.4 utilisée dans les méthodes de *Montero et al.* et *Mino et al.* Comme nous l'avons vu précédemment, la première étape de la réaction enzymatique fait appel au groupement thiol ionisé d'une cystéine qui possède un pKa de 8,3. Ainsi, un pH plus basique que le pH physiologique augmente le ratio thiol ionisé / thiol protoné.

Cette méthode est également la seule à stopper la réaction par la chaleur (120 °C, 3 min). En effet, les autres méthodes mesurant l'activité de l'IMPDH ajoutent eux, de l'acide puis un tampon afin de neutraliser l'échantillon avant de l'injecter dans la colonne (69–71). La déprotéinisation par la chaleur a deux grands avantages dans cette méthode : elle évite de diluer l'échantillon et diminue le temps nécessaire à cette étape.

Nous avons choisi de travailler sur les érythrocytes plutôt que les cellules mononucléées pour plusieurs raisons. L'équipe de *Albrecht et al.* a démontré que l'activité de l'IMPDH est située majoritairement dans les érythrocytes, probablement car c'est la population cellulaire la plus abondante du sang total. Les cellules mononucléées représentaient moins de 10 % de l'activité de l'enzyme du sang total selon les auteurs (70). De plus, le volume requis pour la détermination de l'activité de l'IMPDH est moins important pour des érythrocytes du fait de leur abondance de 4,2 à 5,5 millions d'érythrocytes par μL de sang total contre 4 000 à 10 000 leucocytes par μL . Les globules rouges sont aussi faciles à isoler par comparaison aux cellules mononucléées. Enfin, comme nous l'avons détaillé dans *la partie 7.6 des rappels bibliographiques*, l'activité de l'IMPDH érythrocytaire pourrait être un élément pertinent à déterminer dans le cadre d'un suivi thérapeutique de l'AZA et de la 6-MP étant donné qu'il existerait des transferts intercellulaires de leurs métabolites actifs.

L'objectif principal de la mise au point de cette méthode est de pouvoir l'appliquer en routine et donc, par conséquent, d'utiliser un volume de sang faible ce qui implique un temps d'incubation plutôt long de 24h. Notre choix s'est porté sur l'utilisation de la même préparation de lysat érythrocytaire pour la mesure de l'activité de la TPMT et de l'ITPA. Le volume de sang total nécessaire pour un échantillon est de 100 μL ce qui est faible par comparaison aux méthodes de mesure de l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées ou des lymphocytes qui requièrent un volume compris entre 4 mL à 30 mL. Il est maintenant possible de mesurer l'activité de la TPMT, l'ITPA et l'IMPDH, qui sont trois enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AZA et la 6-MP, avec seulement 500 μL de sang total. Ces conditions sont particulièrement satisfaisantes pour le suivi thérapeutique des médicaments thiopuriques dans la population pédiatrique.

Un autre point essentiel de cette méthode est de diluer au minimum le lysat érythrocytaire étant donné que l'activité de l'IMPDH est de l'ordre des nanomoles par gramme d'hémoglobine par heure. Ceci a été possible grâce à la conception d'un milieu réactionnel très concentré et à l'arrêt de la réaction par la chaleur qui évite une dilution de l'échantillon par comparaison à un arrêt par l'ajout d'acide. Notre volume d'injection chromatographique de 200 μL , plus élevé que les autres méthodes disponibles (TABLEAU 1), permet l'analyse d'une quantité plus importante d'XMP par HPLC.

Cette méthode facilement réalisable et robuste, peut aisément être utilisée en pratique clinique courante. En effet, un faible volume de sang est nécessaire et la préparation de lysat commune pour la mesure de la TPMT, l'ITPA et l'IMPDH évite la dispersion de sang et permet un gain de temps.

4.1.2. Variabilité Inter-individuelle des Sujets Sains et Patients traités par l'Azathioprine et la 6-Mercaptopurine

L'activité érythrocytaire de l'IMPDH a été mesurée chez 30 sujets sains, 50 patients adultes et 62 patients pédiatriques traités par l'AZA ou la 6-MP. L'objectif était de déterminer et de comparer la distribution de l'activité de l'IMPDH entre ces groupes. Ainsi, nous avons remarqué une large distribution de l'activité de l'IMPDH compris globalement entre 2,6 et 51,4 nmol XMP/g Hb/h. L'activité de l'enzyme n'était pas significativement différente pour ces trois populations ce qui indique que les pathologies et les traitements médicamenteux de ces patients ne semblent pas influencer l'activité de l'IMPDH.

L'équipe de *Montero et al.* est la seule étude, avec la nôtre, à avoir déterminé l'activité de l'IMPDH chez des sujets sains. L'activité moyenne de ses 27 sujets était de 85 ± 9 nmol XMP/g Hb/h ce qui est supérieure à la gamme d'activité retrouvée chez nos volontaires sains qui possédaient une moyenne de $13,8 \pm 6,9$ nmol XMP/g Hb/h. Cet écart est difficile à expliquer, cependant, on retrouve dans les travaux de *Weigel et al.* une activité érythrocytaire autour de 20 nmol XMP/g Hb/h pour 27 patients traités par la cyclosporine, l'AZA et la prednisolone ayant subi une transplantation cardiaque (60). De même, la médiane de l'activité de l'IMPDH de 48 patients ayant reçu une greffe du rein, non traités par le MPA, se situe approximativement à 22 nmol XMP/g Hb/h (71). Même si ces patients ont des profils différents de nos sujets, ces dernières données sont en accord avec nos résultats.

L'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées du sang périphérique était comprise chez les sujets sains entre 4,7 et 32,9 nmol XMP/g protéine/h ($n = 60$) dans l'étude de *Glander et al.* (63) et entre 4,7 et 24,3 nmol XMP/g protéine/h ($n = 100$) dans l'étude de *Haglund et al.* (72). Cette dernière étude s'est également intéressée aux patients souffrants de maladies inflammatoires de l'intestin traités par l'AZA ou la 6-MP.

Leurs activités étaient comprises entre 7 et 21,7 nmol XMP/g protéine/h (n = 50) et n'étaient pas significativement différentes par rapport aux volontaires sains. Ainsi, on arrive à la même conclusion pour l'activité de l'IMPDH dans les globules rouges et les cellules mononucléées du sang périphérique : l'IMPDH possède une large gamme d'activité qui ne diffère pas entre les volontaires sains et les patients traités par l'AZA ou la 6-MP.

Cependant, la relation entre le phénotype de la TPMT, de l'ITPA et de l'IMPDH associés aux concentrations des métabolites actifs de l'AZA et de la 6-MP doit être déterminée afin d'optimiser le traitement des médicaments thiopuriques et de prévenir l'apparition d'effets indésirables et de résistance au traitement.

4.2. Variabilité intra-individuelle de Patients traités par l'Azathioprine

Nous sommes la première étude à avoir analysé la variabilité intra-individuelle de l'activité de l'IMPDH dans les globules rouges. Il existe une très forte variabilité intra-individuelle avec un coefficient de variation compris entre 1,5 et 95,8 % dans des intervalles de temps variant de 1 – 287 jours chez 14 patients traités par AZA.

L'équipe de *Glander et al.* a également étudié la variabilité intra-individuelle de l'activité de l'IMPDH dans une période de 4 semaines mais dans les cellules mononucléées du sang périphérique. Huit mesures ont été au minimum réalisées par personne, le coefficient de variation médian était de 14,0 % chez 10 volontaires sains (7,7 – 21,0 %) et 13,5 % chez 10 patients dialysés (7,1 – 26,0 %) (128). Ces résultats en accord avec une autre étude qui observe des variations comprises entre 9,5 et 21 % dans une période d'un mois (4 mesures par personne) chez 3 sujets sains (72,79). L'activité de l'IMPDH a aussi été déterminée dans une période de trois ans comprenant 10 mesures chez un sujet sain. Le coefficient de variation était de 17,5 % pour ce patient (128). La variation intra-individuelle de l'activité de IMPDH ne semble donc pas non plus dépendante du temps dans les cellules mononucléées du sang périphérique. Enfin, les auteurs ont trouvé des coefficients de variation chez 5 patients transplantés traités par le MPA bien plus importants (36 – 85 %), mais expliqués par les fluctuations de dosage du MPA (128).

Il est difficile de tirer des conclusions concernant les variations intra-individuelles recensées dans les cellules mononucléées du sang et dans les érythrocytes car les profils de sujets sont très différents. En effet, la pathologie et le traitement médicamenteux comprenant l'AZA pour nos 14 patients pourraient avoir un rôle dans l'activation ou l'inhibition de l'IMPDH. Les données présentées chez les 14 patients traités par AZA peuvent être de bonne base pour des futures recherches. En effet, il serait intéressant de déterminer et comparer les variations intra-individuelles de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH chez un nombre plus important de patients traités par médicaments thiopuriques mais aussi chez des sujets sains et des patients greffés traités ou non par le MPA. En recensant les données cliniques, pharmacologiques et biologiques de ces différentes populations, on pourrait voir apparaître certaines corrélations entre ces facteurs et l'activité de l'IMPDH.

4.3. Activité de l'IMPDH des Patients Greffés traités par l'Acide Mycophénolique

Bien que cela soit paradoxal, la détermination de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH chez 13 patients greffés traités par le MPA a montré une activité forte et dispersée (69 – 1044 nmol XMP/g Hb/h) significativement différente des sujets sains et des patients traités par l'AZA et le 6-MP (2,6 – 51,4 nmol XMP/g Hb/h). La médiane des patients greffés sous MPA (551 nmol XMP/g Hb/h) était plus de 45 fois supérieure à la médiane des sujets sains (11,8 nmol XMP/g Hb/h). Pourtant, lors de nos essais *in vitro* dans un lysat érythrocytaire, le MPA a bien montré son puissant effet inhibiteur sur l'activité de l'IMPDH (*cf. figure 3 de l'article scientifique*).

Montero et al. ont été les premiers à décrire ce phénomène *in vivo* dans les érythrocytes avec un autre inhibiteur de l'IMPDH qui possède une action antivirale : la ribavirine. Un enfant déficient en PNP (Purine Nucleoside Phosphorylase, aussi connu sous Inosine phosphorylase) catalysant entre autre, la conversion de l'inosine en hypoxanthine, ne montre pas une activité de l'IMPDH significativement différente des contrôles. Cependant, lors de l'introduction de la ribavirine, l'activité de l'IMPDH a augmenté de 27 fois. Trois autres enfants, présentant un déficit immunitaire combiné sévère, montre également une activité de l'IMPDH multipliée par 10,2 et 22,2 après la

mise en place du traitement antiviral par comparaison à l'activité initiale. La ribavirine est donc bien la cause de l'élévation de l'activité érythrocytaire de l'IMPDH (69).

Comme nous l'avons déjà vu, l'équipe d'*Albrecht et al.* travaille sur des cellules du sang total, dont l'activité de l'IMPDH est majoritairement représentée par les globules rouges. Ils montrent une activité jusqu'à 40 fois supérieure chez les patients transplantés rénaux traités par le MPA et la ciclosporine par comparaison aux sujets sains et transplantés rénaux recevant l'association ciclosporine et corticostéroïdes (70). Une autre étude utilisant la même méthode d'*Albrecht et al.* arrive à la même conclusion : une relation inverse entre les concentrations plasmatiques du MPA et l'activité de l'IMPDH est observée post-transplantation. Après 8 semaines, les concentrations plasmatiques du MPA se stabilisent mais l'activité de l'IMPDH des cellules sanguines continuent à augmenter. Quarante jours après la transplantation, cette activité représente 5 fois les valeurs initiales pré-transplantation (133).

Les travaux *Weigel et al.* mesurent les concentrations de GTP et d'ATP, l'activité de l'IMPDH par une méthode radiomarkée ainsi que l'activité de l'HGPRT dans les érythrocytes de patients ayant subi une transplantation cardiaque. Ces sujets sont subdivisés en deux groupes : le groupe contrôle avec un traitement immunosuppresseur comprenant la ciclosporine, la prednisone et l'AZA et le groupe d'étude suivant la même thérapie médicamenteuse mais avec un changement de l'AZA contre le MPA trois mois après transplantation. Leurs travaux révèlent une concentration en ATP inchangée avant et après le changement AZA / MPA dans le groupe d'étude. Par contre, une augmentation graduelle significative de GTP et de l'activité de l'IMPDH par rapport au groupe contrôle est observée dans le groupe d'étude dès l'introduction du MPA et le retrait de l'AZA. L'augmentation de l'activité de l'IMPDH était 5 fois plus élevée dans le groupe d'étude. Quant à l'activité de l'HGPRT, une augmentation plus modérée mais significativement différente a été décelée chez le groupe d'étude par comparaison au groupe contrôle. Ainsi, le traitement par le MPA a un impact sur les activités de l'IMPDH et de HGPRT mais aussi sur les concentrations de GTP qui est un produit généré par ces deux dernières enzymes (60). *Goldsmith et al.* relèvent également une augmentation significative de GTP érythrocytaire chez des patients ayant subi une greffe du rein et traités par le MPA, la ciclosporine et la prednisolone par comparaison à des patients ayant le même profil mais prenant l'AZA à la place du MPA. Les auteurs éliminent

l'hypothèse d'un rejet étant donné que les concentrations de l'ATP n'étaient pas élevées par rapport aux concentrations avant la transplantation dans le groupe traité par le MPA (134).

Des travaux plus récents ont étudié l'activité de l'IMPDH érythrocytaire en fonction des concentrations plasmatiques du MPA, mais aussi ses métabolites chez les transplantés rénaux (71). Cette activité augmente progressivement durant les 60 jours suivant la transplantation chez 8 patients traités par le MPA. De plus, les patients transplantés traités par le MPA (n = 56) révèlent une activité de l'IMPDH significativement supérieure aux groupes transplantés non traités par cet inhibiteur de l'IMPDH (n = 48). Le traitement par le MPA et, non la transplantation, semble être la principale cause de l'augmentation de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes. Leur analyse de régression multiple montre que la co-administration des immunosuppresseurs incluant l'AZA, le tacrolimus, la ciclosporine, la prednisolone et la mizoribine n'affecte pas l'activité de l'IMPDH des globules rouges. Enfin, la détermination de cette activité pourrait être un indicateur de l'immunosuppression induite par le MPA à court terme selon les résultats obtenus de *Mino et al* qui révèlent une diminution rapide de l'activité de l'IMPDH dépendante des concentrations plasmatiques du MPA suivi d'un retour à une activité un peu supérieure à l'activité initiale 12 h après l'administration du traitement (82). Ces observations rejoignent les conclusions de *Storck et al.* qui travaillent sur les cellules du sang total selon la méthode très similaire décrite par *Albrecht et al.*. Ils constatent une inhibition maximale de l'IMPDH, 2 à 3 h après l'administration du MPA suivi d'un retour à l'état initial 8 h après (135).

Nos résultats sont donc bien en adéquation avec ce qui a été décrit dans la littérature. L'activité de l'IMPDH et la production de GTP chez les patients subissant une transplantation rénale et traités par un inhibiteur de l'IMPDH augmentent considérablement dans les érythrocytes mais diminuent dans les cellules mononucléées du sang périphériques. En effet, l'administration de MPA entraîne une forte inhibition de l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées du sang, et reste visible chez des patients prenant ce traitement à long terme (67,131,133,136,137). La distribution du MPA dans le sang total n'est toutefois pas la même : 99,99 % du MPA est été retrouvé dans le plasma, 0,01 % dans les cellules mononucléées du sang et enfin 0,0005 % dans les érythrocytes (123). Une très faible fraction de MPA se trouve donc dans les érythrocytes

qui sont pourtant la population des cellules du sang la plus abondante. Cette distribution pourrait expliquer une faible inhibition du MPA dans les érythrocytes mais pas cette augmentation observée.

Une théorie établie par *Goldsmith et al.* peut expliquer cette différence d'activité de l'IMPDH entre ces deux populations sanguines. Comme nous l'avons vu, le MPA inhibe la réaction de catalyse de l'IMPDH en se fixant à la partie du site actif qui lie le βNAD^+ . Ces interactions entre le MPA et l'enzyme pourraient stabiliser et allonger le temps de demi-vie de l'IMPDH, notamment durant l'érythropoïèse. Les réticulocytes et les hématies sont les stades les plus matures de la lignée érythrocytaire et sont caractérisés par une perte de noyau. Le MPA ne peut donc pas induire une modification transcriptionnelle dans les érythrocytes matures. Ainsi, la théorie de la persistance du complexe MPA – IMPDH lors des stades de maturations de la lignée érythrocytaire semble plus plausible. L'IMPDH peut continuer à synthétiser du GMP dans les érythrocytes étant donné que la liaison du MPA est réversible. L'augmentation lente de GTP à l'instauration du traitement par le MPA et la diminution lente à son retrait conforte cette hypothèse (134,138). En effet, la durée de vie des érythrocytes atteint 120 jours, ainsi, l'augmentation graduelle de la concentration en GTP et de l'activité de l'IMPDH observée dans plusieurs études décrites précédemment (71,133,134) comprise entre 40 et 60 jours suivant la mise en place de la thérapie par le MPA coïncide avec cette théorie.

Bien que cela semble contradictoire, une augmentation de GTP et de l'activité de l'IMPDH au sein des érythrocytes pourraient refléter une bonne observance du patient à son traitement inhibiteur de l'IMPDH. D'ailleurs, le patient possédant la plus faible activité de l'IMPDH dans notre étude est le seul des 13 patients greffés à être décrit par l'équipe médicale, comme peu observant *vis à vis* du MPA.

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode de mesure de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire est facilement utilisable en routine. D'autres études sur un échantillon plus important de sujets traités par le MPA établissant un suivi de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire par patient devraient être réalisées afin de déterminer la relation entre l'activité érythrocytaire de l'IMPDH et la réponse au traitement du MPA. Avec un temps de demi-vie moyen de 28 jours, les érythrocytes pourraient être un marqueur de choix dans l'ajustement posologique et le suivi du traitement à long terme du MPA.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme BERINGER Audrey

Le métabolisme de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine est complexe et implique différentes enzymes. La thiopurine S-méthyltransférase, enzyme clé du métabolisme des purines présente un polymorphisme génétique qui explique seulement 30 à 60 % des effets indésirables observés lors de traitement par les médicaments thiopuriques. Deux autres enzymes également impliquées dans le métabolisme des thiopurines, l'inosine monophosphate déshydrogénase et l'inosine triphosphate pyrophosphate pourraient jouer un rôle dans la survenue des effets indésirables. L'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase semble intéressante à étudier car cette enzyme possède une position stratégique dans la voie métabolique conduisant aux métabolites intracellulaires actifs, les nucléotides de la 6-thioguanine également responsables des effets myélotoxiques.

De plus, l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase pourrait être un biomarqueur pharmacodynamique de l'acide mycophénolique, immunosuppresseur largement utilisé en transplantation, et qui inhibe cette enzyme. L'acide mycophénolique, qui possède une marge thérapeutique étroite et une forte variabilité pharmacocinétique est actuellement administrée à des doses quotidiennes fixes et identiques pour tous les patients.

Nos travaux ont conduit à la mise au point d'une méthode de mesure de l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase érythrocytaire sensible, robuste et utilisable en pratique clinique courante. Cette technique repose sur l'incubation de lysat érythrocytaire en présence d'inosine monophosphate, substrat de l'enzyme et de cofacteurs. La xanthosine monophosphate formée est ensuite dosée par chromatographie en phase liquide à haute performance avec une détection par spectrophotométrie UV avec barrette de diodes. Les paramètres ont été optimisés afin d'utiliser un faible volume de sang et une préparation de lysat érythrocytaire commune aux mesures des activités de la thiopurine S-méthyltransférase et de l'inosine triphosphate pyrophosphate.

La mesure de l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase chez les patients sains, les patients adultes et pédiatriques traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine, et les patients greffés traités par l'acide mycophénolique a montré : (i)

une forte variabilité interindividuelle pour les 4 populations de sujets ; (ii) une forte variabilité intra-individuelle pour les 14 patients traités par l'azathioprine étudiés ; (iii) aucune différence significative de l'activité de l'enzyme entre les sujets sains, les patients pédiatriques et adultes traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine; (iv) une activité significativement supérieure chez des patients greffés traités par l'acide mycophénolique par comparaison aux autres populations étudiées.

L'état physiopathologique et le traitement pharmacologique des patients traités par les thiopurines, souffrant le plus souvent de pathologie auto-immunitaire, ne semblent pas affecter l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase dans les érythrocytes. Des études sont nécessaires sur de plus grands échantillons afin d'identifier les relations entre le phénotype de la thiopurine S-méthyltransférase, de l'inosine triphosphate pyrophosphate et de l'inosine monophosphate déshydrogénase ; la concentration des métabolites intracellulaires thiopuriques et la réponse clinique chez les patients traités par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine.

La forte variabilité interindividuelle et l'activité de l'inosine monophosphate déshydrogénase dans les érythrocytes fortement augmentée chez les patients greffés traités par l'acide mycophénolique doivent également être étudiée sur un nombre de patients plus conséquent.

Le Président de la thèse,

Nom : *P. R. Isoué*

Signature :

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le

15 JUIN 2015

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nimmesgern E, Black J, Futer O, Fulghum JR, Chambers SP, Brummel CL, et al. Biochemical analysis of the modular enzyme inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Protein Expr Purif.* 1999;17(2):282-9.
2. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000;47(2):85-118.
3. Jayaram H, Dion R, Glanzer R, Johns D, Robins R, Srivastava P, et al. Initial studies on the mechanism of action of a new oncolytic thiazole nucleoside, 2-B-D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide. *Biochem Pharmacol.* 1982;31(14):2371-80.
4. Manzoli L, Billi AM, Gilmour RS, Martelli AM, Matteucci A, Rubbini S, et al. Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: tiazofurin down-regulates phospholipase C β 1. *Cancer Res.* 1995;55(14):2978-80.
5. Bremer S. Inosine Monophosphate Dehydrogenase: The Molecular Target of Mycophenolate. Doctoral thesis: Medical biochemistry; Oslo; 2009.
6. Hedstrom L. IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Chem Rev.* 2009;109(7):2903-28.
7. Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, et al. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell.* 1996;85(6):921-30.
8. Nimmesgern E, Fox T, Fleming MA, Thomson JA. Conformational Changes and Stabilization of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Associated with Ligand Binding and Inhibition by Mycophenolic Acid. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19421-7.
9. Guillén Schlippe YV, Riera TV, Seyedsayamdost MR, Hedstrom L. Substitution of the Conserved Arg-Tyr Dyad Selectively Disrupts the Hydrolysis Phase of the IMP Dehydrogenase Reaction. *Biochemistry.* 2004;43(15):4511-21.
10. Min D, Josephine HR, Li H, Lakner C, MacPherson IS, Naylor GJ, et al. An enzymatic atavist revealed in dual pathways for water activation. *PLoS Biol.* 2008;6(8):e206.
11. Gan L, Seyedsayamdost MR, Shuto S, Matsuda A, Petsko GA, Hedstrom L. The Immunosuppressive Agent Mizoribine Monophosphate Forms a Transition State Analogue Complex with Inosine Monophosphate Dehydrogenase. *Biochemistry.* 2003;42(4):857-63.
12. Wang W, 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):8479-83.
13. Riera TV, Wang W, Josephine HR, Hedstrom L. A Kinetic Alignment of Orthologous Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenases. *Biochemistry.*

2008;47(33):8689-96.

14. Xiang B, Markham GD. The Conformation of Inosine 5'-Monophosphate (IMP) Bound to IMP Dehydrogenase Determined by Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27531-5.
15. Digits JA, Hedstrom L. Kinetic Mechanism of *Tritrichomonas foetus* Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase. *Biochemistry.* 1999;38(8):2295-306.
16. Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM. Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(7):3531-6.
17. Pimkin M, Pimkina J, Markham GD. A Regulatory Role of the Bateman Domain of IMP Dehydrogenase in Adenylate Nucleotide Biosynthesis. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7960-9.
18. Hedstrom L, Gan L. IMP dehydrogenase: structural schizophrenia and an unusual base. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(5):520-5.
19. Sintchak MD, Nimmesgern E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology.* 2000;47(2):163-84.
20. Bairagya HR, Mukhopadhyay BP, Bera AK. Conserved water mediated recognition and the dynamics of active site Cys 331 and Tyr 411 in hydrated structure of human IMPDH-II. *J Mol Recognit.* 2011;24(1):35-44.
21. Xiang B, Taylor JC, Markham GD. Monovalent Cation Activation and Kinetic Mechanism of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1996;271(3):1435-40.
22. Riera TV, Zheng L, Josephine HR, Min D, Yang W, Hedstrom L. Allosteric Activation via Kinetic Control: Potassium Accelerates a Conformational Change in IMP Dehydrogenase. *Biochemistry.* 2011;50(39):8508-18.
23. Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K. Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1990;265(9):5292-5.
24. Senda M, Natsumeda Y. Tissue differential expression of two distinct genes for human IMP dehydrogenase (E.C.1.1.1.205). *Life Sci.* 1994;54(24):1917-26.
25. Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wang Y, Nimmesgern E, et al. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(4):767-76.
26. Zimmermann A, Gu JJ, Spsychala J, Mitchell BS. IMPDH Expression: Transcriptional regulation of the type I and type II genes. *Advan Enzyme Regul.* 1996;36:75-84.
27. Nagai M, Natsumeda Y, 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):258-61.

28. Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL, Huberman E. Increased inosine-5'-phosphate dehydrogenase gene expression in solid tumor tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1992;52(20):5826-8.

29. Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, et al. Expression of Human IMP dehydrogenase Types I et II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol Chem.* 1991;266(1):506-9.

30. Gu JJ, Stegmann S, Gathy K, Murray R, Laliberte J, Ayscue L, et al. Inhibition of T lymphocyte activation in mice heterozygous for loss of the IMPDH II gene. *J Clin Invest.* 2000;106(4):599-606.

31. Gensburger O. Etude pharmacogenetique et pharmacodynamique de la cible de l'acide mycophenolique : l'inosine monophosphate deshydrogenase de type II. Thèse de recherche : Pharmacologie : Limoges ; 2010.

32. Gu JJ, Tolin AK, Jain J, Huang H, Santiago L, Mitchell BS. Targeted Disruption of the Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Type I Gene in Mice. *Mol Cell Biol.* 2003;23(18):6702-12.

33. Glesne DA, Collart FR, Huberman E. Regulation of IMP dehydrogenase gene expression by its end products, guanine nucleotides. *Mol Cell Biol.* 1991;11(11):5417-25.

34. Catapano CV, Dayton JS, Mitchell BS, Fernandes DJ. GTP depletion induced by IMP dehydrogenase inhibitors blocks RNA-primed DNA synthesis. *Mol Pharmacol.* 1995;47:948-55.

35. Thomas EC, Gunter JH, Webster JA, Schieber NL, Oorschot V, Parton RG, et al. Different Characteristics and Nucleotide Binding Properties of Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) Isoforms. George A, éditeur. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e51096.

36. Gu J, Spychala J, Mitchell BS. Regulation of the human inosine monophosphate deshydrogenase type I gene: utilization of alternative promoters. *J Biol Chem.* 1997;272(7):4458-66.

37. Zimmermann A, Spychala J, Mitchell BS. Characterization of the Human Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenase Type II Gene. *J Biol Chem.* 1995;270(12):6608-14.

38. Zimmermann AG, Wright KL, Ting JP-Y, 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):22913-23.

39. Roberts RL, Geary RB, Barclay ML, Kennedy MA. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(5):312-7.

40. Wang J, Yang J, Zeevi A, Webber S, Girnita D, Selby R, et al. IMPDH1 Gene Polymorphisms and Association With Acute Rejection in Renal Transplant Patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(5):711-7.

41. Gensburger O, Van Schaik R, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard J-B, et al. Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(9):537-43.
42. Cao W, Xiao H, Lai X, Luo Y, Shi J, Tan Y, et al. Genetic Variations in the Mycophenolate Mofetil Target Enzyme Are Associated with Acute GVHD Risk after Related and Unrelated Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(2):273-9.
43. Shah S, Harwood SM, Döhler B, Opelz G, Yaqoob MM. Inosine Monophosphate Dehydrogenase Polymorphisms and Renal Allograft Outcome. *Transplant J*. 2012;94(5):486-91.
44. Wang J, Zeevi A, Webber S, Girnita D, Addonizio L, Selby R, et al. A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. *Pharmacogenet Genomic*. 2007;17(4):283-90.
45. Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2008;21(9):879-91.
46. Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G, Bajari T, Winter B, Herkner H, et al. An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J*. 2009;10(1):70-6.
47. Sombogaard F. Pharmacodynamic monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity. Doctoral thesis: Pharmacology; Rotterdam; 2010.
48. Mohamed M, Frye R, Langae T. Interpopulation variation frequency of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II (IMPDH2) genetic polymorphisms. *Genet Test*. 2008;12(4):513-7.
49. Garat A, Cardenas CLL, Lionet A, Devos A, Glowacki F, Kenani A, et al. Inter-ethnic variability of three functional polymorphisms affecting the IMPDH2 gene. *Mol Biol Rep*. 2011;38(8):5185-8.
50. Bremer S, Mandla R, Vethe NT, Rasmussen I, Rootwelt H, Line P-D, et al. Expression of IMPDH1 and IMPDH2 After Transplantation and Initiation of Immunosuppression: Transplantation. 2008;85(1):55-61.
51. Vannozzi F, Filipponi F, Di Paolo A, Danesi R, Urbani L, Bocci G, et al. An exploratory study on pharmacogenetics of inosine-monophosphate dehydrogenase II in peripheral mononuclear cells from liver-transplant recipients. *Transplant Proc*. 2004;36(9):2787-90.
52. 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(2):328-35.

53. Sombogaard F, Peeters AM, Baan CC, Mathot RA, Quaedackers ME, Vulto AG, et al. 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):549-56.
54. Bemer MJ, Risler LJ, Phillips BR, Wang J, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Recipient Pretransplant Inosine Monophosphate Dehydrogenase Activity in Nonmyeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(10):1544-52.
55. Proffitt RT, Pathak VK, Villacorte DG, Presant CA. Sensitive radiochemical assay for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and determination of activity in murine tumor and tissue extracts. *Cancer Res.* 1983;43(4):1620-3.
56. Cooney DA, Wilson Y, McGee E. A straightforward radiometric technique for measuring IMP dehydrogenase. *Anal Biochem.* 1983;130(2):339-45.
57. Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(6):640-8.
58. Brunet M, Martorell J, Oppenheimer F, Vilardell J, Millan O, Carrillo M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transpl Int.* 2000;13(S1):S301-5.
59. 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;287:785-90.
60. Weigel G. Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):137-44.
61. Glander P, Budde K. Target enzyme activity as a biomarker for immunosuppression. *Ther Drug Monit.* 2010;32(3):257-60.
62. Vethe NT, Bergan S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit.* 2006;28(5):608-13.
63. Glander P, Patrick Braun K, 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(7):543-9.
64. Glander P, Sombogaard F, Budde K, van Gelder T, Hambach P, Liefeldt L, et al. Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood cells. *Ther Drug Monit.* 2009;31(3):351-9.
65. Laverdière I, Caron P, Couture F, Guillemette C, Lévesque É. Liquid

Chromatography–Coupled Tandem Mass Spectrometry Based Assay to Evaluate Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenase Activity in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Stem Cell Transplant Recipients. *Anal Chem.* 2012;84(1):216-23.

66. Andersen AM, Bremer S, Line P, Rootwelt H, Bergan S. Simultaneous Quantification of IMPDH Activity and Purine Bases in Lymphocytes Using LC-MS/MS: Assessment of Biomarker Responses to Mycophenolic Acid. *Ther Drug Monit.* 2014;36(1):108-18.

67. Glander P, Hambach P, Liefeldt L, Budde K. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1391-7.

68. Daxecker H, Raab M, Müller MM. Influence of mycophenolic acid on inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Chim Acta.* 2002;318(1):71-7.

69. Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AJ, et al. Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chim Acta.* 1995;238(2):169-78.

70. Albrecht W, Storck M, Pfetsch E, Martin W, Abendroth DK. 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):283-94.

71. Mino Y, Naito T, Otsuka A, Ozono S, Kagawa Y, Kawakami J. Inosine monophosphate dehydrogenase activity depends on plasma concentrations of mycophenolic acid and its glucuronides in kidney transplant recipients. *Clin Chim Acta.* 2009;409(1-2):56-61.

72. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(1):69-77.

73. Haglund S, Vikingsson S, Söderman J, Hindorf U, Grännö C, Danelius M, et al. The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Ther Drug Monit.* 2011;33(2):200-8.

74. Thériaque. Monographie spécialité de Lanvis. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=6531&info=CLASS> (consulté le 14/02/2015).

75. Thériaque. Monographie spécialité de Purinethol. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=6541> (consulté le 14.02.2015).

76. Thériaque. Monographie spécialité de l'Imurel. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=17868&info=CLASS> (consulté le 14.02.2015).

77. World Gastroenterology Organization global Guidelines. Bernstein C, Fried M, Krabshuis J, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, et al. Maladies inflammatoires chroniques intestinales : une approche globale; 2009. Disponible sur: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/fr/pdf/guidelines/21_inflammatory_bowel_disease_fr.pdf (consulté le 14/02/2015).
78. AFMPS. Résumé des caractéristiques du produit Imuran. Disponible sur: <http://bijsluiters.fagg-afmps.be/DownloadLeafletServlet?id=105991> (consulté le 14.02.2015).
79. Haglund S, Interindividual differences in thiopurine metabolism: studies with focus on inflammatory bowel disease. Doctoral thesis: Health Sciences; Linköping; 2011.
80. Rashidi M-R, Beedham C, Smith JS, Davaran S. In vitro study of 6-mercaptopurine oxidation catalysed by aldehyde oxidase and xanthine oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(4):299-306.
81. Vikingsson S, Carlsson B, Almer SH, Peterson C. Monitoring of thiopurine metabolites in patients with inflammatory bowel disease-what is actually measured? *Ther Drug Monit.* 2009;31(3):345-50.
82. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res.* 2001;61(15):5810-6.
83. Van Asseldonk DP, Sanderson J, de Boer NKH, Sparrow MP, Lémann M, Ansari A, et al. Difficulties and possibilities with thiopurine therapy in inflammatory bowel disease—Proceedings of the first Thiopurine Task Force meeting. *Dig Liver Dis.* 2011;43(4):270-6.
84. Yarur AJ. Therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(13):3475.
85. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(5):715-29.
86. Krynetski EY, Krynetskaia NF, Gallo AE, Murti KG, Evans WE. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA. *Mol Pharmacol.* 2001;59(2):367-74.
87. Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(1):24-36.
88. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1133-45.
89. Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, et al. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(10):1007-14.

90. Böklerink JP, Stet E, De Abreu R, Damen F, Hulscher T, Bakker M, et al. 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(7):1455-63.
91. Min MX, Weinberg DI, McCabe RP. Allopurinol enhanced thiopurine treatment for inflammatory bowel disease: safety considerations and guidelines for use. *J Clin Pharm Ther*. 2014;39(2):107-11.
92. Garat A. Pharmacogénétique des médicaments thiopuriques implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1. Thèse de recherche : Pharmacologie : Lille 2; 2009.
93. Dervieux T, Brenner TL, Hon YY, Zhou Y, Hancock ML, Sandlund JT, et al. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate in vivo. *Blood*. 2002;100(4):1240-7.
94. Chouchana L. Optimisation de la réponse aux thiopurines par la pharmacogénétique: approches in vitro et cliniques. Thèse de recherche : Pharmacologie : Paris V; 2014.
95. Weinshilboum R and Sladek LS. Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980;32(5):651-62.
96. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, et al. Transporter-Mediated Protection against Thiopurine-Induced Hematopoietic Toxicity. *Cancer Res*. 2008;68(13):4983-9.
97. Ban H, Andoh A, Imaeda H, Kobori A, Bamba S, Tsujikawa T, et al. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2010;45(10):1014-21.
98. Peng X-X, Shi Z, Tiwari A, Damaraju V, Fu L, Cass C, et al. Up-regulation of P-glycoprotein confers acquired resistance to 6-mercaptopurine in human chronic myeloid leukemia cells. *Oncol Lett*. 2011;(2):549-56.
99. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(3):387-91.
100. Dervieux T, Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem*. 1998;44(3):551-5.
101. Lennard L, Singleton H. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr*. 1992;583(1):83-90.
102. Nguyen T, Vu D, Nguyen T, Lachaux A, Boulieu R. Relationship between

azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric IBD patients: identification of covariables using multilevel analysis. *Ther Drug Monit.* 2013;35(2):251-7.

103. Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, et al. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol.* 2002;62(1):102-9.

104. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(23):2001-8.

105. Stocco G, Londero M, Campanozzi A, Martellosi S, Marino S, Malusa N, et al. Usefulness of the measurement of azathioprine metabolites in the assessment of non-adherence. *J Crohns Colitis.* 2010;4(5):599-602.

106. Nguyen T, Vu D, Nguyen T, Lachaux A, Boulieu R. Exploring associations of 6-thioguanine nucleotide levels and other predictive factors with therapeutic response to azathioprine in pediatric patients with IBD using multilevel analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(11):2404-10.

107. Nguyen T-V-A, Nguyen T-M-H, Lachaux A, Boulieu R. Usefulness of Thiopurine Metabolites in Predicting Azathioprine Resistance in Pediatric IBD Patients: The Journal of Clinical Pharmacology. *J Clin Pharmacol.* 2013;53(9):900-8.

108. Nygaard U. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity*1. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;75(4):274-81.

109. Wojtuszkiewicz A, Barcelos A, Dubbelman B, De Abreu R, Brouwer C, Bökkerink JP, et al. Assessment of Mercaptopurine (6MP) Metabolites and 6MP Metabolic Key-Enzymes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):422-33.

110. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(2):331-42.

111. Vikingsson S, Universitetet i Linköping, Hälsouniversitetet. Development of new methodology for therapeutic drug monitoring of thiopurine treatment. *Medical Dissertations: Clinical Pharmacology; Linköping; 2012.*

112. Li F, Fridley BL, Matimba A, Kalari KR, Pelleymounter L, Moon I, et al. Ecto-5'-Nucleotidase and Thiopurine Cellular Circulation: Association with Cytotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(12):2329-38.

113. Zaza G, Cheek M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, et al. Thiopurine pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(9):573-4.

114. Arns W, Cibrik DM, Walker RG, Mourad G, Budde K, Mueller EA, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplant Patients Treated With Mycophenolate Mofetil: Review of the Literature: Transplantation. 2006;82(8):1004-12.

115. Prémaud PY. Pharmacocinétique et suivi thérapeutique pharmacologique du mycophénolate mofetil dans le traitement anti-rejet de greffe. Thèse de recherche : Pharmacologie : Limoges ; 2004.
116. Thériaque. Monographie spécialisée de Cellcept. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=14710&info=CLASS> (consulté le 07/05/2015).
117. Thériaque. Monographie spécialisée de Myfortic. Disponible sur: http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=16587&info=CLASS#CLASS_bk1 (consulté le 07/05/2015).
118. Jain A, Kashyap R, Dodson F, Kramer D, Hamad I, Khan A, et al. A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplantation: a single center report. *Transplantation*. 2001;72(6):1091.
119. Squifflet J-P, Backlan L, Claesson K, Dietl K, Ekberg H, Forsythe J, et al. Dose Optimization of mycophenolate mofetil when administered with a low dose of tacrolimus in cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation*. 2001;72(1):63-9.
120. Silva Jr. HT, Cibrik D, Johnston T, Lackova E, Mange K, Panis C, et al. Everolimus Plus Reduced-Exposure CsA versus Mycophenolic Acid Plus Standard-Exposure CsA in Renal-Transplant Recipients: Everolimus Plus Reduced-Exposure CsA. *Am J Transplant*. 2010;10(6):1401-13.
121. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Cellcept. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0227329.htm> (consulté le 07/05/2015).
122. ANSM. Résumé des Caractéristiques du Produit Myfortic. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0224055.htm> (consulté le 07/05/2015).
123. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem*. 1995;41(7):1011-7.
124. Staatz CE, Tett SE. Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: an update. *Arch Toxicol*. 2014;88(7):1351-89.
125. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;13(6):668-77.
126. Kitchin JES, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL. Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(3):445-9.
127. Wiesel M, Carl S. A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combinaison with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients: 1 year results. *J Urol*. 1998;159:28-33.
128. Glander P, Hambach P, Braun K-P, 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(12):2045-51.

129. Raggi MC, Siebert SB, Steimer W, Schuster T, Stangl MJ, Abendroth DK. Customized Mycophenolate Dosing Based on Measuring Inosine-Monophosphate Dehydrogenase Activity Significantly Improves Patients' Outcomes After Renal Transplantation: Transplantation. 2010;90(12):1536-41.
130. Takebe N, Cheng X, Wu S, Bauer K, Goloubeva OG, Fenton RG, et al. Phase I clinical trial of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil (cellcept) in advanced multiple myeloma patients. Clin Cancer Res. 2004;10(24):8301-8.
131. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, Tinelli C, Cosmai L, Valentini G, et al. Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy. Br J Clin Pharmacol. 2010;69(1):38-50.
132. Maiguma T, Yosida T, Otsubo K, Okabeà Y, Sugitanià A, Tanalaà M, et al. Evaluation of inosin- 5'- monophosphate dehydrogenase activity during maintenance therapy with tacrolimus. J Clin Pharm Ther. 2010;35:79-85.
133. Vethe NT, Mandla R, Line P - D., Midtvedt K, Hartmann A, Bergan S. Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment. Scand J Clin Lab Invest. 2006;66(1):31-44.
134. Goldsmith D, Carrey EA, Edbury S, Smolenski RT, Jagodzinski P, Simmonds HA. Mycophenolate mofetil, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, causes a paradoxical elevation of GTP in erythrocytes of renal transplant patients. Clin Sci. 2004;107(1):63-8.
135. Storck M, Abendroth D, Albrecht W, Sollinger HW. IMPDH activity in whole blood and isolated blood cell fraction for monitoring of CellCept-mediated immunosuppression. Transplant P. 1999;31:1115-6.
136. Fukuda T, Goebel J, Thøgersen H, Maseck D, Cox S, Logan B, et al. Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) Activity as a Pharmacodynamic Biomarker of Mycophenolic Acid Effects in Pediatric Kidney Transplant Recipients. J Clin Pharmacol. 2011;51(3):309-20.
137. Glander P, Sommerer C, Arns W, Ariatabar T, Kramer S, Vogel E-M, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intensified versus Standard Dosing of Mycophenolate Sodium in Renal Transplant Patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5(3):503-11.
138. Goldsmith DJA, Carrey EA, Edbury SM, Marinaki AM, Simmonds HA. GTP Concentrations are Elevated in Erythrocytes of Renal Transplant Recipients when Conventional Immunosuppression is Replaced by the Inosine Monophosphate Dehydrogenase Inhibitor Mycophenolic Acid Mofetil (MMF). Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004;23(8-9):1407-9.

**La Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent
donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ;
ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.**

BERINGER Audrey

Détermination de l'activité de l'inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH) érythrocytaire par HPLC chez des patients traités par les médicaments thiopuriques ou par l'acide mycophénolique.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2015

RESUME

L'azathioprine (AZA) et la 6-mercaptopurine (6-MP) sont des immunosuppresseurs largement utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) des métabolites intracellulaires actifs associé au phénotypage de la thiopurine méthyltransférase (TPMT) est utile afin d'optimiser le traitement en individualisant la posologie. Cependant, le polymorphisme de la TPMT n'explique pas tous les effets indésirables observés ni les cas de résistance au traitement. L'inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme impliquée dans le métabolisme des thiopurines pourrait jouer un rôle dans la réponse thérapeutique de ces médicaments. L'IMPDH constitue en outre, la cible d'action de l'acide mycophénolique (MPA), immunosuppresseur à marge thérapeutique étroite et forte variabilité interindividuelle à l'origine d'échecs thérapeutiques et de toxicités. L'activité de l'IMPDH pourrait être un biomarqueur pharmacodynamique du MPA comme cela a été décrit par différentes équipes.

Une méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes sensible, robuste et utilisable en pratique clinique courante a été mise au point. Après incubation des lysats érythrocytaires avec l'inosine monophosphate, substrat de l'IMPDH et des cofacteurs, la xanthosine monophosphate formée a été dosée par HPLC couplé à un détecteur à barrette de diodes. L'activité de l'IMPDH a été mesurée chez 30 volontaires sains, 50 patients adultes et 62 patients pédiatriques traités par l'AZA ou le 6-MP et 13 patients greffés traités par le MPA. Les résultats concernant l'activité de l'IMPDH ont montré : (i) une forte variabilité interindividuelle pour les 4 populations de sujets ; (ii) une forte variabilité intra-individuelle pour 14 des patients traités par l'AZA étudié ; (iii) aucune différence entre les sujets sains, les patients pédiatriques et adultes traités par l'AZA ou le 6-MP ; (iv) une activité très supérieure chez les patients greffés traités par le MPA par comparaison aux autres populations étudiées. Ces résultats devront être confirmés sur un nombre de patients plus conséquent.

MOTS CLES

Inosine 5'-Monophosphate Déshydrogénase (IMPDH)
Phénotype
Thiopurines
Acide Mycophénolique

JURY

Mme BOULIEU Roselyne, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
M. CITTERIO-QUENTIN Antony, Docteur en Pharmacie
Mme BOIRON Adeline, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE

Mardi 7 juillet 2015

ADRESSE DE L'AUTEUR

7 rue de Parentis – 01800 Meximieux