



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

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>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
FACULTE DE PHARMACIE  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2011

THESE n°116

**T H E S E**

**Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 18 novembre 2011

par

M. MARTIN François

Né le 19 novembre 1981

A Besançon (25)

\*\*\*\*\*

Ténofovir, exposition et toxicité rénale.  
Polymorphismes des transporteurs d'efflux  
**MRP2 et MRP4.**

\*\*\*\*\*

JURY

M. TOD Michel, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Mme GAGNIEU Marie-Claude, Praticien-Hospitalier - Biologiste

M. MIALHES Patrick, Docteur en Médecine - Praticien Hospitalier

## **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

Président de l'Université	M. A. BONMARTIN
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. Jean-François MORNEX
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Daniel SIMON

### **Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1 SANTÉ**

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : M. François-Noël GILLY
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 : M. Pierre FARGE

### **SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Claude COLLIGNON
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christian COULET
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Jean Claude AUGROS
I.U.F.M.	Directeur : M. Régis BERNARD

Septembre 2011

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon**

**Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA**

**Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS**

**Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

**Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

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

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

Monsieur Jean-François SABOT (Pr)

Monsieur Alain BANNIER (MCU)

Monsieur Philippe BERNARD (MCU)

Mademoiselle Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)

Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

**• PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)

Madame Françoise FALSON (Pr)

Monsieur Hatem FESSI (Pr)

Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)

Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU)

Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)

Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)

Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

**• BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)

Monsieur Henri DECHAUD ((MCU - PH - HDR)

Madame Laurence HEINRICH (MCU)

Monsieur David KRYZA (MCU - PH)

Madame Sophie LANCELOT (MCU- PH)

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

**• DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)

Mademoiselle Valérie SIRANYAN (MCU)

**• ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Septembre 2011

• **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

• **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

• **HYGIENE, ENVIRONNEMENT ET BIOSECURITE**

Monsieur Dominique TREPO (MCU - PH - HDR)

• **DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

• **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

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)

• **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 Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)

Madame KERZAON Isabelle (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

• **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Septembre 2011

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

### **• TOXICOLOGIE**

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

### **• PHYSIOLOGIE**

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

### **• PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)  
Monsieur Michel TOD (PU - PH)  
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)  
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)  
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

### **• IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)  
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)  
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)

### **• HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

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

Septembre 2011

**• 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 Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)  
Madame Emilie FROBERT (AHU)  
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU - HDR)  
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)

**• PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)  
Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

**• BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)  
Monsieur Bruno MATHIAN (MCU – PH - HDR)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)

**• BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU)

**INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)  
Madame Valérie VOIRON (PAST)

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

Mademoiselle Nathalie CARTISIER 85ème section  
Monsieur Waël ZEINYEH 86ème section  
Monsieur Antony ZOROPOGUI 87ème section

**Pr : Professeur**

**PU-PH : Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier**

**MCU : Maître de Conférences Universitaire**

**MCU-PH : Maître de Conférences Universitaire, Praticien Hospitalier**

**HDR : Habilitation à Diriger des Recherches**

**AHU : Assistant Hospitalier Universitaire**

**PAST : Personnel Associé Temps Partiel**

## *Le Serment de Galien*

*Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes Condisciples.*

*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 respecter le secret professionnel.*

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

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

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

## **COMPOSITION DU JURY**

### **PRESIDENT DU JURY**

Monsieur le Professeur Michel TOD

### **MEMBRES DU JURY**

Madame le Docteur Marie-Claude GAGNIEU

Monsieur le Docteur Patrick MIALHES

**A mes parents**

Pour votre affection, votre confiance et les valeurs que vous m'avez transmises.

**A ma grand-mère Odette,**

Pour ton affection et pour ta présence en ce jour important pour moi.

**A ma grand-mère Angéline,**

Tu ne peux être présente à ma thèse et mes pensées vont vers toi.

**A mes grands-pères Georges et Marcel,**

**A ma sœur Bénédicte,**

Pour ta patience, ta douceur, ta détermination, ta disponibilité, ta générosité

Pour nos moments passés ensemble.

**A la famille Roblin,**

Pour m'avoir accueilli parmi les vôtres.

**A Jean Baptiste,**

Tes conseils, ta patience, ton savoir ont toujours été d'une très grande importance pour moi.

**A Philipp,**

Pour ta présence, ta culture, ton amour de la littérature et des langues.

**A Fanny,**

Pour ton côté artiste. Pigeons, poules, Michel le citron, taupe, oiseaux, poulpe... commencent à faire parti de mes amis.

**A Bruno,**

Pour ta gentillesse, ton humour, ta politesse.

**A Benoit, Lara et Matys,**

**A Samuel G, Aimé,**

Pour ces années de lycée passé à vos côtés

**A Matthieu, Alexis et à tous les amis de Besançon.**

**A Anne Cécile, Camille, Mathilde, Fanny, Julie, Vanessa et tous les amis de Lyon.**

Pour les années de fac passées ensemble.

**Aux amis de l'orchestre universitaires de Besançon**

Pour ces intenses moments de partage musicaux.

**Aux Phitiens,**

Pour notre cohésion pendant l'année de Master2.

**Au CROUS**

Pour m'avoir aidé dans le financement de mes études.

**A Emilie,**

Pour tous nos moments partagés.

**A Etienne,**

Notre fils.

--  
Remerciements  
--

## **A NOTRE PRESIDENT DE JURY**

### **Monsieur le Professeur Michel TOD**

Pour l'honneur que vous me faite d'accepter la présidence de mon jury.

Je vous remercie pour votre encadrement et pour la qualité de votre enseignement tout au long de mes études.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de notre profond respect.

## **A NOTRE JURY DE THESE**

### **Madame le Docteur Marie Claude GAGNIEU**

Vous avez accepté de m'accompagner dans ce travail et j'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

Je vous remercie pour votre grande disponibilité et votre encadrement.

J'ai apprécié votre esprit de synthèse et vos précieux conseils méthodologiques.

Je vous remercie de m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail et de la confiance que vous m'avez témoignée.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

### **Monsieur le Docteur MIAILHES**

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail et de l'honneur que vous me faites de participer à mon jury.

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A Gaëlle NORMAND,**

Pour ton aide précieuse dans ce travail, ton enseignement de la technique et ta disponibilité.

**A l'équipe des Hémoglobines,**

Pour vos conseils, pour vos réponses à mes questions, votre gentillesse.

**A Monsieur le Professeur Jean François ROBERT, Monsieur le Docteur Bernard REFOUVELET, Monsieur le Docteur Lhassane ISMAILI, Monsieur le Docteur Frédéric MUYARD, Madame le Docteur Corinne GIRARD, Monsieur le Docteur Yann PELLEQUER, Madame le Docteur Carole BRAUN, Monsieur le Docteur Pierre JEANNEY, Monsieur le Docteur Jean Pascal REHN,** vous avez été mes maîtres de stage au cours de études. Que votre patience, votre disponibilité et vos compétences me servent d'exemple pour mon exercice futur.

**A Monsieur Le professeur François GUEYFFIER et Monsieur le Professeur Michel TOD**

Pour avoir accepté ma candidature pour votre Master2 et m'avoir permis de réaliser de nombreuses découvertes cette année dernière.

**A Monsieur le Docteur Pierre JEANNEY, Monsieur le Docteur Jean Pascal REHN, Monsieur TAFIAL, Monsieur le Docteur CHAPIRON, Monsieur le Docteur Julien TIXIER, Madame le Docteur Véronique SIMARD.** Vous m'avez permis de travailler comme collaborateur dans vos pharmacies durant mes études, je vous en remercie.

**A mes collègues de la pharmacie Moreau, de la pharmacie des lions, de la pharmacie de La Part Dieu à Lyon, de la pharmacie Tafial en Guyane et de la pharmacie de L'Ile de France à Besançon.**

Je vous dédie cette thèse

## TABLE DES MATIERES

<i>LISTE DES FIGURES</i>	22
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	25
<i>TABLE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES</i>	27
<i>INTRODUCTION</i>	30
<i>PREMIERE PARTIE</i>	33
<i>GÉNÉRALITÉS</i>	33
<i>1. Le virus de l'immunodéficience humaine</i>	36
1.1 Généralités	36
1.2 Epidémiologie.	38
1.2.1 Modes de contamination	38
1.2.1.1 Sexuel	38
1.2.1.2 Sanguin	38
1.2.1.3 foeto-maternel	38
1.2.2 Epidémiologie dans le monde et en France	39
1.3 Le virus	39
1.4 Le système immunitaire et le virus	40
1.5 Le virus et la cellule[14]	41
1.6 Physiopathologie	42
1.6.1 Les phases du SIDA	43
1.6.2 Les effets délétères du VIH sur l'organisme et la fonction rénale	44
1.6.1.1 Toxicité du VIH sur les reins. Cas particulier : HIVAN (HIV Associated Nephropathy)	45
1.7 Les maladies opportunistes rencontrées lors d'infection par le VIH	45
1.9 Le traitement de l'infection VIH.	47
1.9.1 Les principes de bases des thérapeutiques antivirales.	47
1.9.2 Les cibles des médicaments.	48
1.9.2.1 L'entrée du virus	48
1.9.2.2 La transcriptase inverse	48
1.9.2.3 La protéase virale	48
1.9.2.4 L'intégrase	48

<b>1.9.3 Les médicaments anti-rétroviraux (Annexe 2 : tableau récapitulatif)</b>	<b>48</b>
<b>1.9.3.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse</b>	<b>49</b>
<b>1.9.3.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase</b>	<b>49</b>
<b>1.9.3.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)</b>	<b>49</b>
<b>1.9.3.2 Les inhibiteurs de la protéase virale (IP)</b>	<b>50</b>
<b>1.9.3.3 Les inhibiteurs de fusion</b>	<b>51</b>
<b>1.9.3.4 Les inhibiteurs de CCR5</b>	<b>51</b>
<b>1.9.3.5 Les inhibiteurs de l'intégrase</b>	<b>52</b>
<b>1.9.4 Le Ténofovir, inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse</b>	<b>52</b>
<b>1.9.4.2 La disponibilité du Ténofovir en France</b>	<b>53</b>
<b>1.9.4.3 Le Ténofovir dans le traitement du VIH</b>	<b>53</b>
<b>1.9.4.4 Pharmacodynamie</b>	<b>54</b>
<b>1.9.4.4.1 Mécanisme d'action du Ténofovir</b>	<b>54</b>
<b>1.9.4.4.2 Les résistances au Ténofovir</b>	<b>55</b>
<b>1.9.4.4.3 La toxicité rénale du Ténofovir</b>	<b>55</b>
<b>1.9.4.4.3.1 Les données bibliographiques pharmacodynamiques.</b>	<b>55</b>
<b>A. Exploration de la fonction rénale</b>	<b>55</b>
<b>B. L'atteinte rénale et le syndrome de Fanconi</b>	<b>56</b>
<b>La toxicité mitochondriale</b>	<b>56</b>
<b>La toxicité rénale liée aux cellules tubulaires.</b>	<b>57</b>
<b>C. Les traitements associés au Ténofovir</b>	<b>58</b>
<b>D. Les apports du modèle animal</b>	<b>59</b>
<b>E. La toxicité rénale, questions, hypothèses et début de réponse.</b>	<b>59</b>
<b>1.9.4.4.3.2 Le résumé caractéristique du produit (RCP)</b>	<b>60</b>
<b>1.9.4.4.4 Le suivi biologique du traitement par Ténofovir</b>	<b>60</b>
<b>1.9.4.5 La pharmacocinétique du Ténofovir</b>	<b>61</b>
<b>1.9.4.5.1 Les données bibliographiques [2-3, 43-44].</b>	<b>61</b>
<b>1.9.4.5.2 Les paramètres ADME du Ténofovir</b>	<b>62</b>
<b>L'absorption, influence du repas sur la biodisponibilité</b>	<b>62</b>
<b>La distribution du Ténofovir</b>	<b>63</b>
<b>Le métabolisme du Ténofovir</b>	<b>63</b>
<b>L'élimination du Ténofovir</b>	<b>63</b>
<b>1.9.4.5.3 Mécanismes d'excrétion du Ténofovir au niveau tubulaire</b>	<b>64</b>

1.9.4.6	Facteurs à l'origine de la variabilité de la pharmacocinétique du Ténofovir	66
1.9.4.6.1	Les facteurs physiopathologiques : rôle de la fonction rénale	66
1.9.4.6.2	Les facteurs iatrogènes	66
1.9.4.6.3	Les facteurs génétiques	66
2	Les transporteurs d'efflux	67
2.1	Généralités.	67
2.1.1	La superfamille des protéines de transport ABC	67
2.1.1.1	Les maladies génétiques	69
2.1.1.2	Résistance et effets indésirables	70
2.1.1.3	La structure des protéines ABC.	70
2.1.2	Les ABC protéines de type C (ABCC ou MRP)	71
2.1.2.1	ABCC2 (MRP2)	71
2.1.2.2	ABCC4 (MRP4)	71
3	La pharmacogénétique	73
3.1	Le commencement	73
3.2	La pharmacogénomique, la pharmacogénétique.	74
3.2.1	La pharmacogénomique[59]	74
3.2.2	La pharmacogénétique	74
3.3	Pharmacogénétique et quelques traitements.	75
3.3.1	Le cas des anticoagulants	75
3.3.2	Médicaments immunosuppresseurs et anti cancéreux	77
3.4	Les applications de la pharmacogénomique	78
3.4.1	La maîtrise de la toxicité des traitements	78
3.4.2	La détermination de la résistance à certains médicaments	78
3.4.3	L'évaluation des résultats positifs des traitements	79
3.4.4	L'utilisation de la pharmacogénomique dans le cadre de la chirurgie	79
3.4.5	L'utilisation de la pharmacogénomique dans le cadre de la cancérologie	79
3.5	Pharmacogénétique et développements thérapeutiques	79
3.5.4	La connaissance des prédispositions génétiques	81
3.6	Pharmacogénomique et avenir	81
	<i>DEUXIÈME PARTIE</i>	83
	<i>MATERIELS ET METHODES</i>	83

1. La genèse de ce travail	84
1.1 Les SNPs d'intérêt pour ABCC2	84
1.1.1 Les Informations générales sur les SNP étudiés	86
1.1.1.1 Les SNPs	86
1.1.1.2 Les haplotypes	86
1.2 Les SNPs d'intérêt pour ABCC4	87
1.2.1 Les Informations de la relation entre SNPs de ABCC4 et Ténofovir [19, 52, 68]	88
2. La recherche préalable à la technique	89
2.2 La recherche de la séquence des gènes d'intérêt.	89
2.3 La recherche des exons sur la séquence.	90
2.4 La recherche des SNPs d'intérêt sur les séquences	93
2.5 Le choix des amorces	94
3. La technique de biologie moléculaire	95
3.1 L'extraction de l'ADN cellulaire	95
3.2 L'amplification de L'ADN. La polymérisation en chaine (ou polymerase chain réaction ou PCR)	96
3.3 Le séquençage (feuille de protocole de séquençage en annexe M)	99
4. L'analyse des données	101
4.1 Analyses des données du séquençage.	101
4.2 Analyses statistiques	102
4.2.1 Critères d'inclusion et d'exclusion de la population étudiée	102
5. L'exposition plasmatique au Ténofovir	103
<b>TROISIÈME PARTIE</b>	<b>104</b>
<b>RÉSULTATS - DISCUSSION</b>	<b>104</b>
<b>1. RESULTATS</b>	<b>105</b>
1.1 La population générale	105
1.1.1 Selon le sexe des patients	106
1.1.2 Selon la fonction rénale	107
1.1.3 Corrélation entre les différents phénotypes dans chaque population de l'étude	108

<b>1.2 Relation Phénotypes et SNPs</b>	<b>110</b>
<b>1.2.1 Les Single nucléotide polymorphism (SNPs) d'intérêt recherchés par séquençage dans la population de l'étude.</b>	<b>110</b>
<b>1.2.2 Phénotypes et variants. La fréquence des SNPs dans la population étudiée.</b>	<b>114</b>
<b>1.2.3 Variants et phénotypes. Comparaison entre groupe présentant le SNP variant et un groupe qui ne présente pas le SNP variant.</b>	<b>120</b>
<b>1.2.4 Haplotypes et phénotypes.</b>	<b>121</b>
<b>1.2.5 Comparaisons entre tiers extrêmes phénotypiques et proportion de SNPs.</b>	<b>122</b>
<b>2. DISCUSSION</b>	<b>124</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXE A PHYLOGENIE DES RETROVIRUS[13]</b>	<b>133</b>
<b>ANNEXE B RESUME DES TRAITEMENT DU VIH</b>	<b>134</b>
<b>ANNEXE C ASPECT MOLECULAIRE DE CERTAINS TRAITEMENT VIH ET VHB</b>	<b>137</b>
<b>ANNEXE D CALCUL DES CLAIRANCES</b>	<b>138</b>
<b>ANNEXE E TENOFOVIR INTRA CELLULAIRE[4, 28]</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXE F ASPECT PROTEIQUE DE MRP2 MRP4[51]</b>	<b>140</b>
<b>ANNEXE G CYCLE DE LA VITAMINE K ET PRINCIPE DU MODE D'ACTION DES AVK</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXE H CAPTURE D'ECRAN DU LOGICIEL ALAMUT®</b>	<b>142</b>
<b>ANNEXE I les séquences recherchées et exploitées</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXE J SNP CHECK ABCC2</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXE K SNP CHECK ABCC4</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXE L PROTOCOLE AMPLITAQ CLASSIQUE</b>	<b>162</b>
<b>ANNEXE L Bis PROTOCOLE AVEC AMPLITAQ GOLD</b>	<b>163</b>

<b>ANNEXE L Ter</b>	<b>PROTOCOLE GOTAQ GREEN PCR ABCC2 Promoteur,</b>	
<b>Exon 1, Exon 10, Exon 25, Exon 28 et Exon 32</b>	_____	<b>164</b>
<b>ANNEXE M</b>	<b>PROTOCOLE DE SEQUENÇAGE</b>	_____ <b>166</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	_____	<b>170</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 Le virus de l'immunodéficience humaine. Extrait des cours de JC Lemahieu et A. Decoster complété d'après le site <a href="http://www.memobio.com">www.memobio.com</a> .....	39
Figure 2 Cycle de réplication du VIH (d'après E. Pilly, éd 2008).....	42
Figure 3 Charge virale, anticorps, lymphocytes, évolution au cours d'une infection par le VIH. D'après <a href="http://www.inrp.fr">www.inrp.fr</a> . [13].....	44
Figure 4 Chef de file des INTI, la Zidovudine comparée à la thymidine nucléoside.....	49
Figure 5 Deux structures moléculaires des 2 INNTI commercialisés : Névirapine et Efavirenz .....	50
Figure 6 Exemple de deux inhibiteurs de protéase : L'Atazanavir REYATAZ® et le Ritonavir NORVIR®.....	50
Figure 7 : le fumarate de Ténofovir disoproxil, d'après l'index Merck et <a href="http://Pharmgkb.org">Pharmgkb.org</a> ....	52
Figure 8 Métabolisme du Ténofovir : activation cellulaire .....	54
Figure 9 Microscopie électronique de la biopsie de cellules rénales lors de syndrome de Fanconi secondaire au traitement par Ténofovir. A. La morphologie et la taille des mitochondries sont très irrégulières. B. Perturbation des crêtes mitochondriales. C. Mitochondries géantes. Echelle barre : 500nm. [28].....	57
Figure 10 Métabolisme du Ténofovir d'après <a href="http://Pharmgkb.org">Pharmgkb.org</a> et Rodriguez-Novoa et al 2009, Hall et al. 2011. ....	65
Figure 11 Organisation structurale d'un transporteur ABC. [49] L'ATP se fixe sur les zones NBDs (1) et permet le passage de nucléosides/nucléotides du versant intracellulaire au versant extra cellulaire par les zones TMDs (2).....	70
Figure 12. comparaison entre MRP2 et MRP4. [51] (Annexe F) .....	72
Figure 13 Facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la variabilité de la dose à l'équilibre chez les patients traités par AVK. IMC : indice de masse corporelle ; SNP : single nucleotide polymorphism [63] .....	76
Figure 14 Répartition simplifiée du métabolisme de l'Azathioprine et de la 6-MercaptoPurine [66].....	77

Figure 15. Schéma d'un gène (ADN). (UTR: UnTranslated Region; Ex: Exon; Poly A ploy Adénylée).....	91
Figure 16 Numérotation selon le codon start. ....	91
Figure 17 Références exoniques issues du site internet NCBI[75].....	92
Figure 18 Séquence partielle d'ABCC2, issue du site internet du NCBI[75].....	92
Figure 19 Schéma de cycles PCR et programme selon les protocoles du laboratoire. Les températures indiquées sont uniquement indicatives .....	97
Figure 20 Gel de migration de produit PCR (agarose 2%) La grande flèche verticale indique le sens de migration, la petite flèche horizontale montre des dimères d'amorces. ....	99
Figure 21 Schéma technique de la disposition des produits de séquençage. ....	100
Figure 22 Réaction de séquençage selon la méthode de Sanger. Chaque lettre est un nucléotide (Adénosine, thymidine, cytidine, guanosine), ddXTP : didésoxyguanosine triphosphate, didésoxyadénosine triphosphate, didésoxythymidine triphosphate, didésoxycytidine triphosphate. dXTP : désoxy nucléoside triphosphate. D'après KOOLMAN. J[77] .....	101
Figure 23 Exemple de tracé électrophorétique obtenu après séquençage. ....	102
Figure 24 Représentation graphique de la liaison entre L'ASC et la clairance approximée par la formule du MDRD. ASC : aire sous la courbe ; Cl : clairance ; IR : insuffisants rénaux ; non IR : non insuffisants rénaux.....	109
Figure 25 Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des hétérozygotes en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur). ....	115
Figure 26 Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des homozygotes sauvages en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur). ....	116
Figure 27 Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des homozygotes mutés en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur). ....	117

Figure 28 Représentation des fréquences des variants du SNP 7 présent sur l'intron 4 d'ABCC4 selon la population IR à gauche et non IR à droite. ({1} Hétérozygotes, {2} Homozygote sauvages, {3} Homozygotes muté.) ..... 117

Figure 29 Répartition des variants pour chaque SNP selon deux groupes tiers extrême de L'Aire sous la courbe (ASC). Chaque triplet Homo NM, Hétéro, Homo M présente les variations d'un SNP. Homo : homozygotes ; hétéro : hétérozygotes ; M : muté ; NM : non muté. En ordonnée se trouve le nombre de patients. En avant le nombre de patients présents dans le groupe de valeur de l'ASC < 1,62mg.h/L et en arrière le nombre de patients présents dans le groupe de valeur de l'ASC > 2.386 mg.h/L. .... 123

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Liste non exhaustive des maladies opportunistes et de leurs traitements[18].....	46
Tableau II Posologie du Ténofovir selon la fonction rénale. [9] .....	61
Tableau III Paramètres du modèle de population finale [1] .....	62
Tableau IV Résumé des paramètres de la pharmacocinétique du Ténofovir. (RCP).....	64
Tableau V Liste des protéines de la superfamille ABC. [50] .....	68
Tableau VI Résumé des caractéristiques des différents SNPs retenus pour la séquence ABCC2.....	85
Tableau VII Résumé des principaux SNPs pour le gène ABCC4.....	88
Tableau VIII Comparaison selon les groupes sexe. ....	106
Tableau IX Caractéristiques de la population selon le groupe des insuffisants rénaux et non insuffisant rénaux pour une valeur limite de la clairance de 80mL/min/1,73m <sup>2</sup> .....	107
Tableau X Tableau récapitulatif des tests de corrélation effectués dans l'étude. (Test de corrélation de Spearman) .....	108
Tableau XI Récapitulatif des différents SNPs de l'étude. ....	111
Tableau XII Comparaison des données de la population générale. ....	112
Tableau XIII Données brutes de la recherche par séquençage des SNPs d'intérêts pour les 31 patients. ....	113
Tableau XIV Le nombre de SNPs. ....	114
Tableau XV La fréquence des SNPs .....	114
Tableau XVI Fréquences génotypiques et alléliques des dix polymorphismes de l'étude en fonction de la présence ou l'absence d'insuffisance rénale. ....	118
Tableau XVII Données statistiques pour l'exon 10 de ABCC2 (rs8187710), selon les deux groupes : hétérozygote et homozygote sauvage selon la clairance MDRD (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ). .....	120
Tableau XVIII Données statistiques pour l'exon 32 du gène ABCC2, deux groupes : 1 hétérozygote, l'autre homozygote sauvage selon l'ASC du Ténofovir (h.mg/L). ....	121

Tableau XIX Répartition de l'haplotypes CATC selon la clairance MDRD (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)  
..... 122

## TABLE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

$\Delta\mu$	Différence entre deux moyennes
3TC :	Lamivudine (INTI)
6MP :	6-mercaptopurine
AA :	Acide aminé
ABC :	ATP Binding Cassette
ABC :	Abacavir(IP)
ABCC2 :	ATP Binding Cassette 2 (gène codant pour MRP2)
ABCC4 :	ATP Binding Cassette 4 (gène codant pour MRP4)
ADME :	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARA II	antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARV:	Anti-RétroViral.
ASC :	Aire Sous la Courbe
ATP	Adénosine Tri Phosphate
AVK	Antagoniste de la vitamine K
AZT	Zidovudine
BW :	Body Weight = poids
CCPPRB	Comité Consultatif pour la protection des personnes dans la recherche biomédicale
CCR5	CC-chemokine receptor 5
CD4	Cluster de différenciation
CDC	Center for Disease Control
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CMSP :	cellule mononuclées du sang périphérique
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYP	Cytochrome P

D4T	Stavudine (INTI)
DDI	Didanosine(INTI)
ddNTP :	diDesoxy nucléotide tri phosphate
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
dNTP :	Desoxy nucléotide tri phosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
EU	Etats-Unis
FTC	Emtricitabine (INTI)
gp	glycoprotéine
HAART	highly Active Antiretroviral Therapy
HIVAN	HIV Associated Nephropathy
Homo M	Homozygote muté
Homo NM	Homozygote Non Muté
HTLV	Human. T-cell Lymphotropic Virus
IEC :	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IF :	Inhibiteur de fusion
INNTI :	Inhibiteur non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse.
INTI :	Inhibiteur Nucléosidique (nucléotidique) de la transcriptase Inverse.
IP :	Inhibiteur de Protéases
IR	Insuffisant Rénaux
Kb	kilo base
KD	Kilo Dalton
MDRD	Modification of Diet
MMWR	Morbidity and mortality Weekly Report
MRP	Multidrug Resistance Protein
MRP2	Multidrug Resistance Protein 2
MRP4	Multidrug Resistance Protein 4
Na+	Ion sodium
NAG	N-acétyl β-D-glucosaminidase
NBDs	Nucleotide Binding Domain
NCBI	Natinal Center for Biotechnology Information

Non IR	Non Insuffisant Rénaux
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PH	Potentiel Hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
PO43-	Ion Phosphate
RBP	Retinol Binding Protein
RCP	Résumé Caractéristique du Produit
Rs	Reference SNP
RT-PCR	Reverse Transcriptrase- Polymerase Chain Reaction
Scr:	créatininémie sérique
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine
SIV	Simian immunodeficiency virus
SNP :	Single Nucleoside Polymorphism
TDF :	Fumarate de Ténofovor disoproxil
TFV :	Ténofovir
TFV-DP :	Ténofovir diphosphate
Tm :	Melting temperature = température de fusion
TMDs	TransMembrane Domains
TPMT	la ThioPurine Méthyl Transférerase
UTR :	UnTranslated Region
VHB:	virus de l'hépatite B
VIH:	virus de l'immunodéficience humaine

--  
**INTRODUCTION**  
--

Le virus de l'immunodéficience humaine touche actuellement 35 millions de personnes dans le monde. En un an environ 2.7 millions de personnes s'infectent par le virus et 2 millions décèdent de maladies opportunistes. En France en 2010, 150000 personnes étaient infectées et le nombre de contaminations annuelles ne semble pas diminuer (7000 à 8000 par an d'autant plus que 50000 personnes semblent ignorer leur infection en France et 50% des personnes reçoivent un traitement trop tardif). En 2010, de nouvelles recommandations montrent des changements pour la mise sous traitement qui doit être proposé à tous les patients ayant un nombre de lymphocytes CD4  $<500/\text{mm}^3$ . [1-2]

Actuellement une trentaine de médicaments antirétroviraux se partagent le marché pour lutter contre l'infection. Le Ténofovir VIREAD<sup>®</sup> est un de ces médicaments anti rétroviral, il est donné en première intention dans le traitement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, en association avec deux autres traitements anti rétroviraux ce qui permet d'éviter les phénomènes de résistance du virus, obtenus en cas de monothérapie.

Le Ténofovir, composé de structure nucléotidique est connu pour présenter un risque potentiel de toxicité rénale. Selon les résumés des caractéristiques des produits pour les spécialités qui le contiennent -VIREAD<sup>®</sup>, TRUVADA<sup>®</sup> et ATRIPLA<sup>®</sup>, une évaluation de la fonction rénale avant mise sous traitement et au cours de celui-ci est recommandée. Une réduction posologique avec passage de 245 mg/J de Ténofovir disoproxyl, prodrogue du Ténofovir disoproxyl fumarate, à 245 mg toutes les 48h est nécessaire lorsque la clairance de la créatinine est inférieure à  $50 \text{ mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ . La diminution potentielle de la fonction rénale des patients traités par Ténofovir présente une importante variabilité interindividuelle[3]. Certains patients ne présentent aucune altération de cette fonction ; d'autres montreront une réduction modérée de celle-ci, de l'ordre de  $5 \text{ à } 8 \text{ mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  suivie d'une stabilisation et d'une absence d'évolution ultérieure ; enfin, des patients présenteront une altération régulière et continue de la fonction rénale[2]. De rares cas de syndrome de Fanconi ont également été décrits. Selon Rodriguez-Novoa et al, l'exposition plasmatique au Ténofovir est liée au niveau de l'atteinte rénale. Mais il n'existe pas de facteurs prédictifs du risque de cette atteinte rénale ni de son importance pour les patients traités par cet antirétroviral.

Le Ténofovir présente une élimination rénale prépondérante, à la fois par filtration glomérulaire et par sécrétion tubulaire. Cette sécrétion tubulaire est sous la dépendance de 2 protéines d'efflux, MRP2 et MRP4, codées respectivement par les gènes ABCC2 et ABCC4. Ces gènes présentent des polymorphismes génétiques qui en modifient l'expression et/ou la

fonction. Les protéines MRP2 et MRP4 ont été impliquées dans la toxicité de certains médicaments.

Grâce aux techniques de biologie moléculaire utilisée en pharmacogénétique les séquences des deux transporteurs ont été étudiées. La pharmacogénétique est l'étude des mécanismes et des conséquences des polymorphismes génétiques sur le devenir et l'effet des médicaments sur un organisme. Le but de cette branche de la pharmacologie est de développer des tests simples permettant d'identifier les variations génétiques à l'origine des variations interindividuelles dues aux traitements. [1]

Les polymorphismes génétiques sont responsables de variations d'expression et/ou d'activité de certaines protéines, ce qui a pour conséquence une modification de l'effet du médicament : majoration des effets indésirables, augmentation ou diminution du métabolisme et/ou de l'élimination, variation individuelle de la sensibilité et/ou l'absence d'efficacité.

L'objectif du travail de pharmacogénétique présenté ci-après a été de définir les polymorphismes génétiques d'intérêt potentiel des gènes ABCC2 et ABCC4 ainsi que la mise au point méthodologique de la recherche de ces polymorphismes pour ABCC2 et ABCC4 pour une population de patients traités par Ténofovir qui avaient des données d'exposition plasmatique au Ténofovir ainsi que des données sur l'évaluation de leur fonction rénale. Enfin nous avons analysé les données recueillies pour mettre en évidence une relation entre le phénotype et le génotype.

--  
PREMIERE PARTIE  
GÉNÉRALITÉS  
--

Actuellement, des équipes de recherche essaient de découvrir de nouvelles thérapeutiques plus efficaces contre des infections, des maladies qui encore aujourd'hui manquent d'avancées pharmacologiques. Les traitements actuels permettent pour certains de guérir de maladies infectieuses ou métaboliques, pour d'autres traitements ils ne font que de diminuer la mortalité cela sans avoir d'effet sur la morbidité. C'est ce que nous retrouvons pour le traitement de l'infection par le VIH. Les thérapeutiques actuelles sont très efficaces, mais elles ne sont pas exemptes d'effets indésirables dont on ne connaît ni le mécanisme, ni l'origine.

Par ailleurs, les pratiques cliniques et officinales montrent que chaque patient réagit différemment face à l'administration de médicaments. Nous observons ainsi pour chaque traitement des variations métaboliques entre chaque personne, parfois ces variations interindividuelles entraînent des effets indésirables, des sous dosages ou au contraire des sur dosages qui entraînent une inefficacité ou une toxicité du médicament.

Sont mis en cause dans cette variabilité interindividuelle ; la pharmacocinétique du médicament, notamment une ou plusieurs étapes des phases dites ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination ; la pharmacodynamie du médicament, autrement dit les effets du produit sur l'organisme notamment l'interaction récepteurs/effecteur ; et la pharmacogénétique qui recherche la relation entre l'hérédité et la réponse thérapeutique.

La molécule étudiée ici est le Ténofovir. Il s'agit d'un inhibiteur de la transcriptase inverse, c'est un analogue nucléotidique, il contient déjà un groupement phosphate ce qui le différencie des analogues nucléosidiques. Il sera diphosphorylé dans la cellule pour être actif. Les niveaux d'expression des enzymes intracellulaires qui agissent sur le taux de phosphorylation ainsi que l'expression de protéines d'efflux impliquées dans la concentration cellulaire de Ténofovir expliqueraient les différences de réponses aux traitements par Ténofovir.

Les cytochromes notamment hépatiques, ont été particulièrement étudiés pour leur implication dans la métabolisation de nombreux médicaments. Les protéines d'efflux quant à elles, font l'objet d'une attention particulière, elles ne modifient pas les molécules comme le font les cytochromes mais elles participent aux échanges cellulaires, intracellulaires, et intracellulaires-extracellulaires. Les protéines impliquées dans le transport du Ténofovir sont les Multidrug Resistance Protein (MRP) 2 et MRP4 toutes deux codées respectivement par les gènes ABCC2 et ABCC4. [4] Ce sont des protéines d'efflux qui font partie de la

superfamille des transporteurs ABC qui permettent l'épuration de l'organisme de molécules exogènes et endogènes.

Dans cette première partie seront expliqués, le contexte historique de cette étude, les connaissances actuelles de la maladie, du virus, du traitement et plus particulièrement du Ténofovir, les protéines étudiées dans ce travail ainsi que des notions de pharmacogénétique.

## 1. Le virus de l'immunodéficience humaine

### 1.1 Généralités

Actuellement des études rétrospectives ont montrées que le virus existait dès 1959 et était déjà répandu en Afrique la décennie précédent sa découverte. Trente espèces de singe sont naturellement infectées par le virus simien (SIV), une contamination à l'homme aurait pu se faire par morsure. Certaines espèces de singe ont un SIV très proche du VIH1 ou du VIH2.[5] Néanmoins on ne sait pas quand le virus a franchi la barrière de l'espèce.

Le Dr Joel Weisman qui était médecin généraliste à Sherman Oaks (EU) en 1980 a remarqué que trois patients homosexuels qu'il soignait, avaient les mêmes types de symptômes (fièvre, amaigrissement, tuméfaction lymphatique) que ceux de l'immunologiste Gottlieb. [6] Les patients souffraient également de candidoses orales et anales et les prélèvements ont montré qu'il s'agissait d'une maladie à inclusion cytomégalique.

C'est en 1981 à Los Angeles (EU), qu'a été ainsi décrit pour la première fois par Gottlieb [7] dans une population de jeunes homosexuels masculins, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) identifié suite à la survenue de pneumopathies opportunistes à *Pneumocystis carini* (actuellement appelé *Pneumocystis jiroveci*).[8]

L'annonce officielle de cas cliniques étranges a été faite le 5 juin 1981 dans le MMWR (Morbidity and Mortality Weekly report) bulletin du Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta, organisme qui regroupe les informations des maladies infectieuses. Cinq cas de pneumonies à *Pneumocystis* ont été rapportés entre octobre 1980 et mai 1981 pour des malades masculins, homosexuels. *Pneumocystis jiroveci* était alors connu pour son infection opportuniste lors d'une immunodépression profonde. Des cas de sarcome de Kaposi ont été également rapportés alors qu'il ne touchait généralement que des patients âgés ou transplantés prenant un traitement immunosuppresseur.

On commence ainsi à parler de SIDA, puis de « Gay syndrome », on entend parler aussi de la théorie des 4H : les Hémophiles (contaminés par des transfusions répétées), les homosexuels (contaminés par voies sexuelles), les héroïnomanes et les haïtiens qui sont les communautés chez qui la maladie s'est répandue rapidement.

En France une équipe Pasteur dirigée par les Professeurs Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi, travaille sur ce que l'on commence à nommer SIDA. Les deux cliniciens ont été contactés par le clinicien Willy Rozenbaum, de l'hôpital Claude Bernard à Paris pour un patient qu'il soigne depuis 1981 qui est steward et homosexuel atteint d'une maladie inconnue. En 1983 ce patient décède et ces ganglions lymphatiques sont prélevés pour effectuer des cultures cellulaires notamment des lymphocytes T, piliers de l'immunité. Une forte activité enzymatique a ainsi été retrouvée il s'agissait de l'activité rétrotranscriptasique de la transcriptase inverse du virus.[9]

Robert Gallo aux Etats Unis qui avait découvert les deux premiers HTLV (rétrovirus) en 1980, suite à l'envoi par les français de l'isolat, déclare que le virus ne serait pas nouveau et lui donne le nom de HTLV-III (Human T-cell Leukemia virus). La caractéristique des virus HTLV-I et II est de donner une immortalité des lymphocytes TCD4. Le « L » prit alors le nom de Lymphotrophic pour l'affinité de ces virus sur les lymphocytes. Le Professeur Luc Montagnier privilégia pour sa découverte le terme de LAV (Lymphadenopathy associated virus) et IDAV (Immune Deficiency Associated Virus). Les virus HTLV appartiennent à la famille des oncovirus (ou oncoRNAvirus pour RNA), mais ici ce nouveau virus appartient à la famille des lentivirus (réplication lente).

En 1986, une commission de nomenclature virologique donne le nom de VIH (virus de l'immunodéficience Humaine).[10]

Deux formes de VIH existent. Le VIH 1 est cosmopolite, (divisé en sous-groupes M, O, N) fut découvert en premier par le Pr Luc Montagnier<sup>1</sup> en 1983. Le VIH2 (découvert en 1986) qui n'était répandu que de façon restreinte à l'Afrique occidentale est tout aussi répandu actuellement à travers le monde que le VIH1 en raison des flux migratoires, néanmoins il serait moins contagieux que le VIH 1, il en existe 2 sous-groupes 2A et 2B.

---

<sup>1</sup> Le 6 octobre 2008, il est corécipiendaire du prix Nobel de médecine avec Françoise Barré-Sinoussi pour ses travaux sur le virus du SIDA, dont la « découverte a été essentielle à la compréhension actuelle de la biologie de cette maladie et à son traitement antirétroviral » selon le comité Nobel.

Les virus sont des virus à ARN, ils ont besoin d'une transcriptase inverse pour transformer leur ARN en ADN bicaténaire et d'une intégrase pour l'intégrer au génome cellulaire lymphocytaire. Pour fabriquer des provirus, la machinerie cellulaire est rendue défaillante et la cellule lymphocytaire rentre en apoptose. L'organisme est ainsi vulnérable aux infections virales, bactériennes, fongiques et parasitaires. Le système immunitaire n'est pas le seul touché et on remarque des atteintes neurologiques (microglie), il s'agit du « neuro-SIDA ». On observe, d'autres atteintes systémiques chez les patients infectés par les VIH à type de diminution de la fonction rénale (12.7 cas pour 1000 patients années infectés), d'augmentation de risques de maladies cardiovasculaires et de cancers. [2]

## **1.2 Epidémiologie.**

### **1.2.1 Modes de contamination**

#### **1.2.1.1 Sexuel**

Ce mode représente 80% des cas de contamination, dans l'ordre du plus contaminant au moins on retrouve les relations anales > vaginales > buccales. Tout saignement (acte violent, ou menstruations) augmente le risque de contamination.

#### **1.2.1.2 Sanguin**

Observé dans les années 80 suite à la contamination des hémophiles après transfusion sanguine, les toxicomanes se contaminent aussi par injection de drogues par voies intraveineuses en s'échangeant les seringues contaminées.

#### **1.2.1.3 foeto-maternel**

La contamination se fait surtout par le sang et les sécrétions vaginales de la mère lors de l'accouchement. L'allaitement est aussi une source de contamination. 20-30% des nourrissons sont contaminés en l'absence de mesures préventives.

Le risque de contamination est en relation directe avec la voie d'inoculation, le volume de l'inoculum et aussi du terrain génétique. Certains nourrissons n'expriment pas certains récepteurs (CCR5 entre autres) et sont ainsi partiellement protégés.

### 1.2.2 Epidémiologie dans le monde et en France

En 2008, à l'échelle mondiale, 33,4 millions de personnes vivaient avec le VIH, 2,7 millions avaient été infectées et plus de 2 millions sont décédées des conséquences de cette infection depuis le début de l'épidémie [11]

En France, en 2007, entre 115000 et 130000 personnes vivaient avec le virus du SIDA.[2] Chaque année 7000 personnes sont contaminées dans l'Hexagone.

### 1.3 Le virus

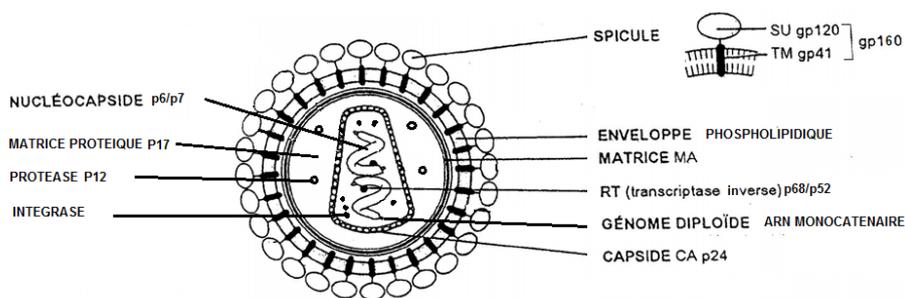


Figure 1 Le virus de l'immunodéficience humaine. Extrait des cours de JC Lemahieu et A. Decoster complété d'après le site [www.memobio.com](http://www.memobio.com)

La particule virale est de forme sphérique et mesure environ 110 nm de diamètre. Le virus est composé d'une enveloppe qui est une bicouche de phospholipides membranaires de la cellule hôte « mère ». 2 glycoprotéines y sont implantées la gp41 transmembranaire et la gp 120 qui la coiffent, cette dernière est le récepteur du CD4 des lymphocytes T CD4+, des macrophages, des cellules dendritiques ainsi que des cellules de la microglie cérébrale. L'enveloppe contient également les molécules du CMH de la cellule mère infectée. Sous l'enveloppe, se situe la matrice protéique, constituée de protéines p18/p17. Cette matrice contient l'enzyme protéase (p10/p12). Puis la capside et la nucléocapside sont composées des protéines p24, p6, p7. Enfin le génome est constitué de deux brins d'ARN monocaténaire d'environ 9200 paires de bases ; il contient des gènes gag (groupe antigène) code pour les protéines internes p17 et p24, Pol (polymérase) code pour la transcriptase

inverse (p64), la protéase (p10) et l'intégrase (p32). Le gène Env code pour les protéines de l'enveloppe (gp41 et gp120) commun à tous les rétrovirus et de gènes auxiliaires caractéristiques des rétrovirus à génomes complexes : tat, rev, indispensables à la réplication virale et des protéines accessoires codées par nef, vif, vpr, vpu (VIH-1) et vpx (VIH-2).

#### 1.4 Le système immunitaire et le virus

La cible principale du virus est le lymphocyte T CD4. Le virus infecte néanmoins toute cellule comportant à sa surface la protéine CD4 comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, de Langherans ainsi que la microglie du cerveau. L'interaction entre virus et cellule se fait grâce à son récepteur de haute affinité pour CD4, la glycoprotéine 120. [12]

Le système immunitaire répond dans un premier temps par une réponse humorale qui permet l'apparition d'anticorps dirigés contre toutes les particules protéiques virales de l'enveloppe (gp120, gp41), de la capsid (gp24, gp17), puis la réponse cellulaire se fait par le biais des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent les cellules infectées et les lymphocytes T helper (Th). L'échappement viral s'effectue par épuisement du système immunitaire.

A partir de la primo infection le virus se multiplie intensément pour donner  $10^8$  à  $10^9$  virus. Simultanément des centaines de lymphocytes Th meurent et sont remplacés. Ensuite grâce aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques et aux anticorps neutralisants, le virus semble absent du lit sanguin dans les semaines suivant l'infection. Les tissus lymphoïdes (ganglions, rate) et les cellules dendritiques se comportent comme des réservoirs à virus, ils s'y développent activement. Lors de cette latence clinique, des variants apparaissent et vont proliférer, le système immunitaire va ensuite reconnaître cette souche et va réagir avec de nouveaux lymphocytes Tc et de nouveaux anticorps. Et ainsi de suite, des nouveaux variants échappent au système immunitaire. Les lymphocytes Th se raréfient et après plusieurs années le système immunitaire est épuisé. L'état de SIDA est décrété lorsque la destruction du système immunitaire est effective. [13]

## 1.5 Le virus et la cellule[14]

Le virus se fixe grâce à la gp120, glycoprotéine de surface SU sur les CD4 des lymphocytes T CD4 et toutes les cellules comportant ce récepteur. Deux principaux corécepteurs sont CCR5 dont les ligands naturels sont RANTES, MIP1- $\alpha$  et MIP1- $\beta$  ainsi que CXCR4 dont le ligand naturel est SDF1. La fixation entre ligant-récepteur-corécepteur active la glycoprotéine transmembranaire TM (gp41) et conduit à la fusion entre la membrane cellulaire et la bicouche lipidique virale.

Après pénétration du virus dans le lymphocyte, l'ARN viral est libéré de la capsid interne par perméabilisations de celle-ci aux dNTP, la transcriptase inverse commence ainsi la synthèse du brin d'ADN négatif. Durant l'élongation l'ARN ayant servi de matrice est dégradé par l'activité RNase H de la transcriptase inverse. Puis le brin d'ADN positif est synthétisé à partir de l'amorce des polypurines de l'ARN matrice non dégradée. La transcriptase inverse qui est une ADN polymérase, produit un ADN double brin, elle se caractérise par sa faible fidélité et sa faible processivité<sup>2</sup>. Cette propriété est à l'origine de la variabilité virale. La transcriptase inverse ne possède pas d'activité de correction ce qui entraîne un taux d'erreur estimé à  $3.10^{-5}$ .

Le transport dans le noyau est un processus actif, les protéines Vpr du VIH-1 et Vpx du VIH-2 sont impliquées. Au niveau nucléaire, l'ADN d'origine virale peut alors s'intégrer au génome cellulaire du lymphocyte hôte grâce à l'intégrase virale. La machinerie cellulaire permettra la transcription des gènes viraux à partir de cet ADN proviral. L'ARN Pol II cellulaire permet la transcription, des ARNm viraux et des ARNm cellulaires. Les trois dernières étapes du cycle de réplication du VIH seront la maturation des protéines virales sous l'effet d'une protéase virale suivie de l'assemblage des protéines virales au niveau cytoplasmique et enfin, le bourgeonnement à la membrane cellulaire de nouvelles particules virales suivies de leur libération. Une fois libérées, ces particules mûriront puis contamineront d'autres lymphocytes CD4+.

---

<sup>2</sup> Une enzyme processive est une enzyme liée à l'ADN. Moins elle est processive plus elle a tendance à se décrocher de l'ADN et ainsi de synthétiser des petits fragments d'ADN.

### 8 stades sont ainsi rapportés :

1. Attachement, fusion
2. Décapsidation
3. Rétro transcription
4. Intégration
5. Transcription
6. Épissage et transport
7. Assemblage
8. Bourgeonnement
9. Libération et maturation

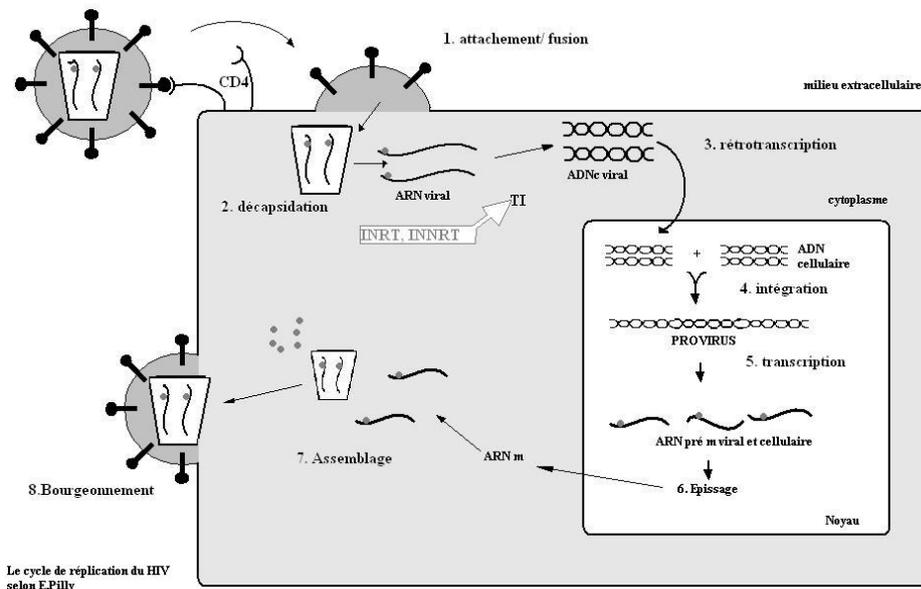


Figure 2 Cycle de réplication du VIH (d'après E. Pilly, éd 2008)

### 1.6 Physiopathologie

Le virus se réplique activement dès la primo infection. Des réservoirs de virus se forment avec intégration du virus dans les cellules des ganglions lymphatiques et dans le tissu lymphoïde du tube digestif ce qui permet au virus d'échapper au système immunitaire.

Des réponses immunitaires spécifiques contrôlent dans un premier temps la prolifération puis cette réponse s'épuise au fil du temps par réadaptation constante du système immunitaire. Celui ci va partiellement compenser la perte des lymphocytes T CD4 par une augmentation de production de lymphocytes T CD4. Mais le VIH persiste et la

réplication constante du virus entraîne l'émergence de nouveaux variants qui contaminent les nouveaux lymphocytes TCD4.

En absence de toute thérapeutique, la chute du nombre de lymphocytes T CD4 est de 30 à 100 LT CD4/mm<sup>3</sup>/an pour conduire au stade SIDA en une décennie en moyenne. Des variations interindividuelles existent sur la progression plus moins rapide de l'infection de 2ans à plus de 10ans.

Les infections opportunistes qui signent le stade SIDA, surviennent quand le taux de lymphocytes est inférieur à 200 cellules CD4/mm<sup>3</sup>. Les deux paramètres permettant de suivre l'évolutivité de l'infection et le stade du SIDA sont la charge virale plasmatique d'une part exprimée en copies/mL ou en log (copies)/mL et la numération des lymphocytes T CD4 d'autre part (nombre/mL). La charge virale représente la réplication virale et la vitesse de destruction des lymphocytes et le nombre de lymphocytes T CD4 est l'image des dégradations du système immunitaire et permet de prédire la survenue de maladies opportunistes.

Plus la charge virale est élevée plus l'évolution vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est rapide.

L'infection par le VIH quelque soit le stade de la maladie est à déclaration obligatoire.

### **1.6.1 Les phases du SIDA**

L'évolution s'effectue en 3 phases :

#### **1. La primo-infection :**

Elle est symptomatique ou asymptomatique. Les symptômes de l'infection apparaissent environ 3 semaines après contage, le tableau est peu spécifique ; fièvre, adénopathies cervicales, pharyngite, myalgies, courbatures... et est souvent un épisode qui passe inaperçu. Le virus se développe de façon intense pendant 1 à 3 semaines. Des anticorps apparaissent dans le sérum contre toutes les protéines virales, c'est la séroconversion. On dit que le patient est séropositif.

## 2. La phase asymptomatique :

Cette phase dure entre 10 et 15 ans en moyenne, le virus se développe dans les tissus lymphoïdes. Le système immunitaire s'épuise par disparition progressive des lymphocytes T CD4.

## 3. La phase clinique :

Les lymphocytes T CD4 sont inférieurs à 200/mm<sup>3</sup>, le patient devient sensible aux infections opportunistes, c'est le stade SIDA proprement dit.

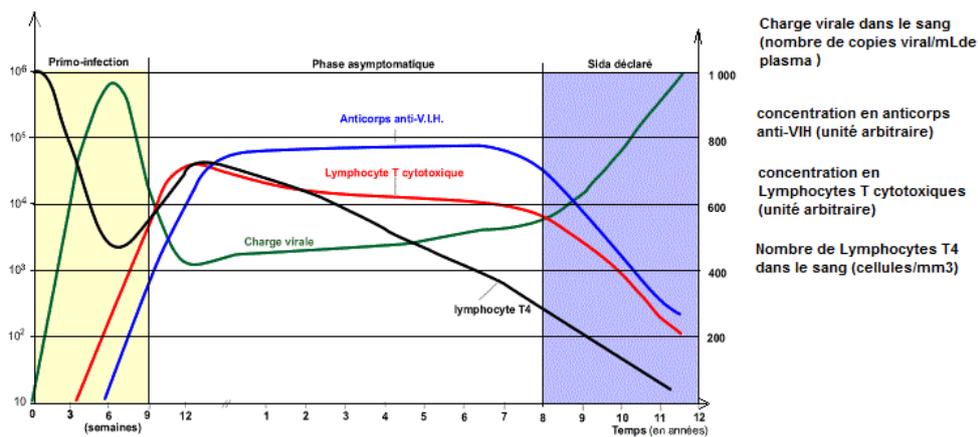


Figure 3 Charge virale, anticorps, lymphocytes, évolution au cours d'une infection par le VIH. D'après [www.inrp.fr](http://www.inrp.fr). [13]

### 1.6.2 Les effets délétères du VIH sur l'organisme et la fonction rénale

Outre le système immunitaire le virus atteint plusieurs organes et entraîne des risques accrus au niveau cardio-vasculaire, des anomalies lipidiques et glucidiques, des complications hépatiques, osseuses (ostéoporose, ostéonécrose), des complications

neurologiques ainsi que d'autres complications comme de l'hypertension artérielle et un vieillissement prématuré.

L'atteinte rénale est présente chez environ 30% des personnes HIV positives [15] et le risque relatif d'insuffisance rénale aiguë chez les patients infectés hospitalisés est de 2,96 après ajustement des facteurs confondants. La prévalence augmente depuis 1995 et la morbidité est cinq fois plus élevée que chez les patients non infectés (26% contre 4,5%)[16].

Les facteurs de risques d'insuffisance rénale chronique sont l'âge, l'origine ethnique, les co-infections virales, ainsi que la présence de polymorphismes des transporteurs d'efflux MRP2 et MRP4[2].

#### **1.6.1.1 Toxicité du VIH sur les reins. Cas particulier : HIVAN (HIV Associated Nephropathy)**

Il s'agit d'un syndrome néphrotique d'installation brutale avec insuffisance rénale rapidement progressive évoluant vers le stade d'insuffisance rénale terminale en quelques mois. Cette néphropathie survient essentiellement chez les sujets d'origine africaine ou antillaise. Le traitement repose sur l'instauration rapide du traitement antirétroviral, quelque soient le niveau des lymphocytes T CD4 et de la charge virale [17]. Si le traitement ne suffit pas à faire disparaître la protéinurie, un traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) ou antagonistes de l'angiotensine II (ARAI ou sartans) pourra être associé de même qu'une courte corticothérapie [2].

### **1.7 Les maladies opportunistes rencontrées lors d'infection par le VIH**

L'abolition des défenses immunitaires permet aux micro-organismes pathogènes de se développer entraînant la dégradation de l'état de santé jusqu'à la mort du patient s'il n'y a pas de traitement.

Par ailleurs, le système immunitaire est un « garde fou » contre le développement de cancers, en son absence on observe l'apparition de sarcome de Kaposi et de lymphomes.

Tableau I Liste non exhaustive des maladies opportunistes et de leurs traitements[18]

	Agent pathogène	traitement	Commentaire et autres traitements
<b>bactéries</b>	<i>M.tuberculosis</i>	Rifampicine+ Isoniazide+ Pyrazinamide+ Ethambutol	Si résistance
	<i>M.avium</i>		Clarythromycine +Ethambutol +Rifabutine parfois <u>Amikacine*</u>
	<i>Salmonella ssp</i>	quinolones	Élimination rénale
<b>virus</b>	CMV	Ganciclovir*	<u>Foscarnet*</u> ou <u>Cidofovir*</u>
	HSV	<u>Aciclovir*</u> , <u>Valaciclovir*</u>	
	VZV		
<b>parasites</b>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Triméthoprime sulfaméthoxazole	
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Pyriméthamine + Sulfadiazine	
<b>champignons</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<u>Amphotéricine B*</u> + 5Fluorocytosine	
	<i>Candida ssp</i>	<u>Amphotéricine B*</u>	

Ce tableau présente les principales pathologies opportunistes contractées durant l'infection par le VIH ainsi que les traitements associés à la multi thérapie du VIH. Les traitements présents peuvent entraîner des effets indésirables néphrologiques, qui entraînent des contrindications si le patient présente une altération rénale (soulignés) et des précautions d'emploi (notées par un astérisque\*). Les traitements soulignés ou marqués d'un astérisque ont une élimination rénale.

### 1.8 Diagnostic et suivi de l'infection

Le dépistage est proposé dans les populations ponctuellement ou durablement à risque de contamination, des personnes avec des signes évoquant une primo infection ou des personnes avec des pathologies pouvant être des complications de l'infection par le VIH. L'accord du malade est obligatoire pour tous dépistages.

Un test Elisa réalisé dans un premier temps permet de rechercher les anticorps spécifiques du VIH ; un test Elisa pour la détection des antigènes, un test rapide de dépistage peut être utilisé pour différencier VIH-1 et VIH-2. Le test est réalisé 3 mois après contamination car des positivations tardives sont possibles.

Quand au moins un des 2 tests de dépistage est positif, un test de confirmation sérologique est réalisé un par technique de western blot sur un second prélèvement. Il faut au moins 2 protéines d'enveloppe Env et/ou Pol et/ou Gag pour déclarer le patient séropositif.

Quand les tests sérologiques sont indéterminés, quand les anticorps maternels masque une infection éventuelle du bébé, la recherche du génome viral par Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ou de l'antigène p24 est réalisée (positive après 10 à 15 jours respectivement). Des bilans complémentaires peuvent être réalisés pour les maladies concomitantes.

## **1.9 Le traitement de l'infection VIH.**

### **1.9.1 Les principes de bases des thérapeutiques antivirales.**

L'objectif est de réduire au maximum la réplication virale pour permettre au système immunitaire de se reposer et arrêter la progression de la maladie. Arrêter la réplication virale c'est aussi éviter l'apparition de souches virales résistantes.

Ce qui change dans la mise sous traitement en 2010, selon le groupe d'expert et selon les critères de mise sous traitement est la proposition d'instauration du traitement dès que le nombre de lymphocytes T CD4 est inférieur à 500cellules/mm<sup>3</sup>. De plus dans certains cas, pour éviter une transmission les traitements peuvent être proposés pour des patients ayant un nombre normal de lymphocytes CD4 (>500LTCD4/mm<sup>3</sup>).

En 1996, à été obtenu pour la première fois une charge virale indétectable, grâce à l'association de trois molécules dénuées de résistances croisées. La première trithérapie à été l'association de 2 inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et d'un inhibiteur de la protéase virale (IP). Depuis diverse associations ont été faites : 2 INTI et 1 inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) ou encore la combinaison

entre 3 INTI. Ces associations portent le nom anglophone de *Highly Active AntiRetroviral Therapy* (HAART).

## **1.9.2 Les cibles des médicaments.**

### **1.9.2.1 L'entrée du virus**

Inhibition de l'entrée virale dans la cellule, en bloquant l'interaction entre gp120 et les CD4 de lymphocytes ou des corécepteurs CCR5 et CXCR4.

### **1.9.2.2 La transcriptase inverse**

Si la transcriptase inverse qui est une ADN polymérase, est inhibée, l'élongation de l'acide nucléique proviral est inhibée.

### **1.9.2.3 La protéase virale**

Lorsque la protéase virale est inhibée, la maturation des protéines virales est compromise et le virus ne peut s'assembler correctement.

### **1.9.2.4 L'intégrase**

L'ADN proviral double brin synthétisé à partir de l'ARN viral ne peut plus s'intégrer à l'ADN cellulaire

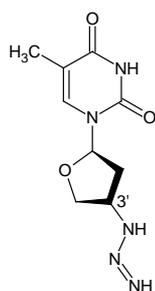
## **1.9.3 Les médicaments anti-rétroviraux (Annexe 2 : tableau récapitulatif)**

En 2010 six classes médicamenteuses sont disponibles :

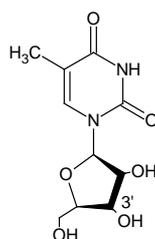
- les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) ;
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ;
- les inhibiteurs de la protéase virale (IP) ;
- les inhibiteurs de fusion (IF) ;
- les inhibiteurs du CCR5 ;
- les inhibiteurs de l'intégrase.

### 1.9.3.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

#### 1.9.3.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase



zidovudine



Thymidine (nucléoside naturel)

Figure 4 Chef de file des INTI, la Zidovudine comparée à la thymidine nucléoside.

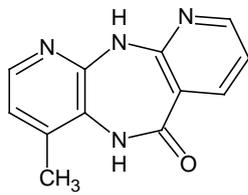
Dès 1987 l'AZT, zidovudine, le premier INTI fait son apparition sur le marché des médicaments de lutte contre le VIH. La classe thérapeutique s'est énormément étoffée depuis ce premier médicament. Ces molécules devront être phosphorylés pour être actives et se lier ensuite à la transcriptase inverse. Elles rentrent ainsi en compétition avec les nucléosides naturels et agissent en stoppant la formation de la liaison 3'5' phosphodiester de l'ADN proviral.

Les molécules commercialisées en France en 2010 sont : Zidovudine (AZT) Rétrovir<sup>®</sup>, Lamivudine (3TC) Epivir<sup>®</sup>, Abacavir (ABC) Ziagen<sup>®</sup>, Didanosine (DDI) Videx<sup>®</sup>, Stavudine (D4T) Zerit<sup>®</sup>, **Ténofovir (TDF) Viread<sup>®3</sup>**, Emtricitabine (FTC) Emtriva<sup>®</sup>. [18]

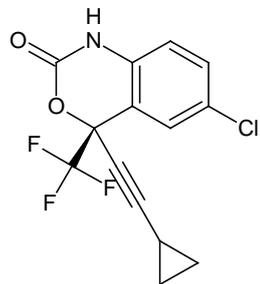
#### 1.9.3.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

La structure est totalement différente des INTI. Leur demie vie est longue et permet ainsi une administration en une prise par 24h ; leur métabolisme se fait au niveau hépatique et ils sont inducteurs ou inhibiteurs du CYP450 (cytochrome P450).

<sup>3</sup> Se référer au paragraphe spécial infra



Névirapine

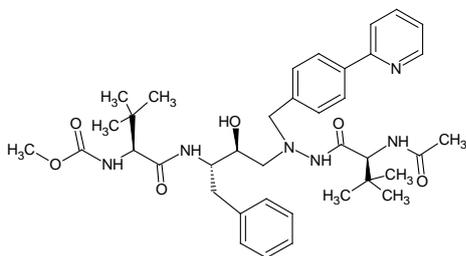


Efavirenz

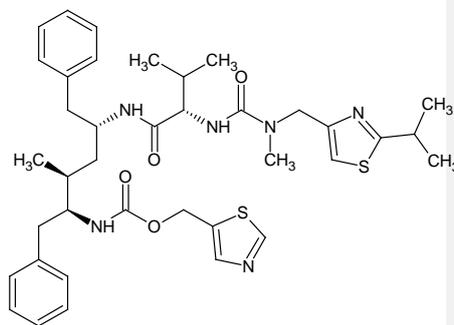
**Figure 5 Deux structures moléculaires des 2 INNTI commercialisés : Névirapine et Efavirenz**

Ils sont très puissants, la réduction de la charge virale est de l'ordre de  $2\log_{10}$ , mais l'émergence de résistance par persistance de réplication virale et l'apparition de résistance de très haut niveau rendent ces molécules inefficaces. Cette classe de médicaments n'est pas active sur le VIH-2.

### 1.9.3.2 Les inhibiteurs de la protéase virale (IP)



Atazanavir



Ritonavir

**Figure 6 Exemple de deux inhibiteurs de protéase : L'Atazanavir REYATAZ® et le Ritonavir NORVIR®**

Les IP agissent sur l'assemblage des protéines virales en inhibant l'action de la protéase virale, ils sont actifs sur les deux formes de virus.

Ils sont apparus en 1996 et ont amélioré les protocoles thérapeutiques ainsi que la qualité de vie des patients. Ils sont métabolisés au niveau hépatique grâce au cytochrome

P450, il existe ainsi de nombreuses interactions médicamenteuses. Le Ritonavir Norvir® inhibiteur puissant du cytochrome P450 est utilisé pour augmenter la biodisponibilité des autres IP. Le Ritonavir à faible dose entraîne une augmentation des concentrations (inhibiteur puissant de CYP450) de l'IP ce qui permet de diminuer le nombre de prises grâce à un espacement des doses. Les IP seront tous « boostés » par le Ritonavir.

Les molécules inhibitrices de protéase virale commercialisées en France en 2010 sont : Atazanavir REYATAZ® ; Ritonavir NORVIR® ; Darunavir PREZISTA® ; Fosamprenavir TELZIR® ; Indinavir CRIXIVAN® ; Lopinavir KALETRA® ; Saquinavir INVIRASE® ; Tipranavir APTIVUS®

L'utilisation concomitante dans la trithérapie d'inhibiteurs des protéases entraîne une augmentation de l'exposition au Ténofovir de 24 à 34%, ceci a été montré avec l'utilisation concomitante d'Atazanavir et de Lopinavir. Le mécanisme de cette interaction serait basé sur l'inhibition des transporteurs d'influx OAT1 et d'efflux MRP4 du Ténofovir.[19-20]

### **1.9.3.3 Les inhibiteurs de fusion**

L'Enfuvirtide Fuzéon®, est un peptide qui inhibe la fusion entre le virus et les lymphocytes T CD4. Enfuvirtide se lie spécifiquement à la glycoprotéine virale, effectuant son action au niveau extra cellulaire, C'est un inhibiteur du réarrangement structural de gp41. (Le produit est utilisé par voie injectable).

### **1.9.3.4 Les inhibiteurs de CCR5**

Maraviroc Celsentri® est un inhibiteur du corécepteur CCR5 du récepteur CD4 des lymphocytes. Il faut avant d'introduire cette thérapeutique vérifier que le tropisme de VIH-1 ne soit dirigé que vers CCR5 et que les virus ne présentent pas de tropismes mixtes CXCR4/CCR5 ou CXCR4 seul. Maraviroc est métabolisé par le foie par le CYP450 3A4.

### 1.9.3.5 Les inhibiteurs de l'intégrase

Raltégravir Isentress® est indiqué en association avec d'autres traitements antirétroviraux pour traiter les infections par le VIH-1. L'ADN proviral ne peut s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte quand l'intégrase est inhibée.

### 1.9.4 Le Ténofovir, inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse

Le Ténofovir est la molécule sur laquelle notre étude a portée, il est connu pour entraîner des atteintes rénales parfois graves (cf. infra).

#### 1.9.4.1 Aspect chimique

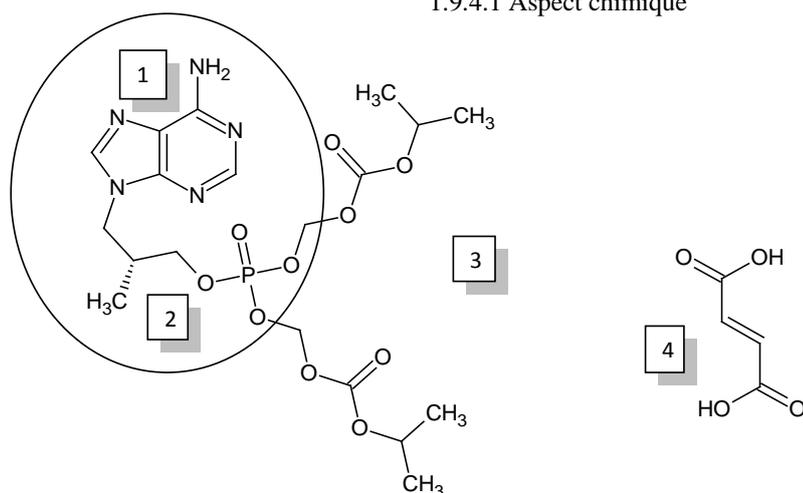


Figure 7 : le fumarate de Ténofovir disoproxil, d'après l'index Merck et Pharmgkb.org

1. Adénine
2. Ténofovir TFV
3. Ténofovir Disoproxil =  
(bis (isopropylcarbonyl-oxyméthyl)-(R)-9-2- phosphonylméthoxypropyl) adénine.
4. Ténofovir Disoproxil Fumarate = TDF

La formule chimique brute du Ténofovir est CCOP(=O)(C)C1=NC=NC2=C1N=CN2 ou encore (R)-9-(2-phosphonmethoxypropyl) adénine; (R)-PMPA (cf. index Merck). En comparaison le PME= (phosphonylmethoxyethyl) adénine est l'Adéfovir, antiviral utilisé dans le traitement de l'hépatite B chronique. Le Ténofovir est le seul inhibiteur nucléotidique utilisé dans le traitement du VIH, c'est un nucléoside mono phosphate.

#### 1.9.4.2 La disponibilité du Ténofovir en France

L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du Ténofovir remonte à 2002. Il est donné en première ligne dans l'association de trithérapie en France Selon le rapport 2010 sur la prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH sous la direction du Pr-Patrick Yéni.

Depuis son introduction pour le traitement du VIH, il est rencontré dans trois spécialités différentes, seul ou en association avec d'autres antirétroviraux.

- Ténofovir (245mg) Viréad®  
(Ténofovir disoproxil fumarate 300 mg, équivaut au Ténofovir disoproxil 245mg, comprimé)
- Ténofovir associé à Emtricitabine (INTI) (200mg) Truvada®, comprimé.
- Ténofovir associé à Emtricitabine (200mg) et Efavirenz (INNTI) Atripla® (300mg TDF, 200mg, 600mg), comprimé.

#### 1.9.4.3 Le Ténofovir dans le traitement du VIH

Le TDF sera donné en première intention chez le patient VIH. Dès 1995 le Ténofovir, sous le nom de PMPA, est suspecté d'avoir des effets anti rétroviral[21]. Il est combiné à deux autres molécules, soit un autre inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI) et un inhibiteur des protéases du VIH (IP) ou un INNTI. Le Ténofovir est

contre indiqué chez les sujets de moins de 18 ans et les insuffisants rénaux [2]. Le Ténofovir est également utilisé dans le traitement des infections par le VHB [22].

#### 1.9.4.4 Pharmacodynamie

##### 1.9.4.4.1 Mécanisme d'action du Ténofovir

Le Ténofovir est administré sous forme de prodrogue, le fumarate de Ténofovir disoproxil (TDF). Administré à la dose de 300mg de cette pro-drogue équivalente à 245 mg de Ténofovir disoproxil par 24h. L'action pharmacologique des analogues nucléotidiques et nucléosidiques s'effectue dans les cellules mononuclées sanguines périphériques. Après phosphorylation intracellulaire, le Ténofovir agit sous forme diphosphorylée [23]. Les deux phosphorylations successives s'effectuent notamment dans les cellules lymphocytaires T activées et non activées. Le nucléotide diphosphate inhibe les polymérase virales après incorporation dans l'ADN par liaison compétitive directe avec le substrat désoxy-ribo-nucléotidique naturel [23].

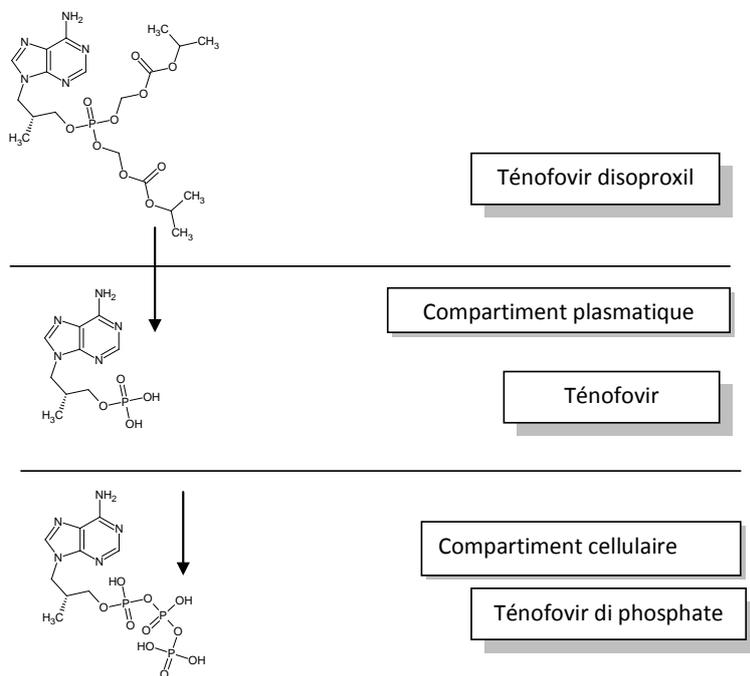


Figure 8 Métabolisme du Ténofovir : activation cellulaire

#### **1.9.4.4.2 Les résistances au Ténofovir**

En 2004, l'étude de Mc Coll et al[24] s'est intéressée à des patients traités par TDF. Ces derniers ont sélectionné des virus dont la transcriptase inverse présentait les mutations K65R et dont la sensibilité au Ténofovir était diminuée. Depuis le RCP recommande de ne pas administrer le Ténofovir disoproxil aux personnes porteuses de cette mutation. Dans la même étude d'autres mutations de la transcriptase inverse, M41L ou L210W, ont montré une diminution de la réponse thérapeutique au traitement par Ténofovir.

#### **1.9.4.4.3 La toxicité rénale du Ténofovir**

##### **1.9.4.4.3.1 Les données bibliographiques pharmacodynamiques.**

Le Ténofovir (TDF) est un traitement efficace utilisé à la fois pour lutter contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et virus de l'hépatite B. La principale cible de la toxicité semble être le tubule proximal, et dans les cas les plus graves, les patients peuvent développer un syndrome de Fanconi<sup>d</sup>.

Avant l'HAART, des néphropathies étaient observées mais il s'agissait de la toxicité directe du virus sur le néphron. Depuis l'arrivée sur le marché de nouveaux traitements puissants, la pathologie a changé pour voir disparaître l'atteinte rénale. Elle est réapparue avec l'arrivée du Ténofovir qui possède néanmoins une très bonne tolérance et une très bonne efficacité.[25-26]

##### **A. Exploration de la fonction rénale**

Pour connaître le statut rénal des patients le dosage de la créatinine sérique est effectuée puis la clairance est calculée grâce aux formules des clairances selon Cockcroft et Gault ou selon la formule « MDRD » (pour Modification of Diet in Renal Disease) (voir annexe D). La masse musculaire, l'alimentation carnée, l'activité physique intense font varier le dosage de la créatinine et nous savons que les patients VIH présentent généralement une masse musculaire altérée. Ainsi il est donc important de prendre en compte le poids lors

des études réalisées sur la fonction rénale de ces patients. D'où le ratio poids /créatinine proposé pour une estimation correcte du débit de filtration glomérulaire.[3]

Il est à prendre en compte que la créatinine est une molécule qui est filtrée par le glomérule et est sécrétée par le tubule proximal. C'est pourquoi d'autres molécules peuvent être utilisées pour évaluer l'atteinte rénale comme la Retinol Binding Protein (RBP)<sup>4</sup> qui est filtrée librement par le glomérule ; le ratio RBP/créatinine est parfois utilisé. Ce ratio est augmenté lors d'atteintes rénales. Le N-acétyl  $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) est également utilisé pour évaluer les anomalies d'origine tubulaire, mais n'est pas spécifique du traitement par Ténofovir. La  $\beta$ -2 microglobuline est un très bon marqueur de mesure pour la présence d'anomalie rénale tubulaire en présence de Ténofovir, mais son dépistage est dépendant du pH et est sensible à la dégradation enzymatique. [28]

### **B. L'atteinte rénale et le syndrome de Fanconi**

Depuis le début des années 2000, de nombreuses observations publiées faisaient état de patients présentant des tubulopathies, des acidoses lactiques mortelles, des diabètes insipides et des syndromes de Fanconi<sup>d</sup>, lors de traitements anti-VIH comportant le Ténofovir. Ce syndrome est réversible à l'arrêt du Ténofovir.

Différentes études ont inclus l'hypophosphatémie, les douleurs osseuses, l'augmentation du ratio urinaire protéine/créatinine et l'augmentation de la créatinine sérique pour évaluer la gravité de ce syndrome.[28]

Deux mécanismes de toxicité cellulaire ont été évoqués : la toxicité mitochondriale et la toxicité sur les cellules tubulaires rénales.

#### **La toxicité mitochondriale**

**La toxicité mitochondriale** a été bien établie pour l'Adéfovire<sup>e</sup> et le Cidofovire<sup>e</sup> qui sont des analogues structuraux au Ténofovir [29] (Annexe C). Cette toxicité peut être

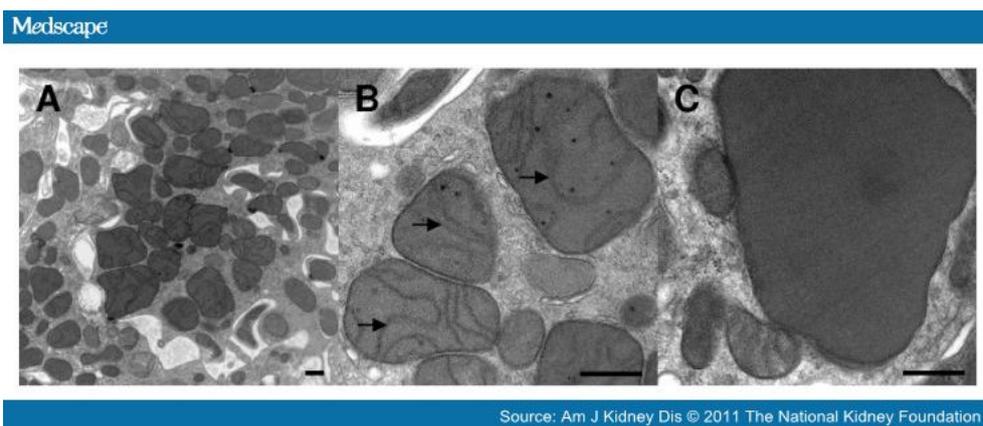
---

<sup>4</sup> La RBP est une  $\alpha$ 2 protéine filtrée par le rein, réabsorbée, elle est métabolisée au niveau proximal. Une diminution peut être rencontrée lors de néphropathies tubulaires (absence de réabsorption entraînant une fuite urinaire), mais aussi lors de hypovitaminoses A, d'états inflammatoires (origine hépatique).27.

DIEUSAERT, *GUIDE PRATIQUE DES ANALYSES MEDICALES*. MALOINE ed. 2009.

similaire pour le Ténofovir car cette molécule partage beaucoup de propriétés avec ces deux analogues nucléotidiques. Mais le Ténofovir présente une faible cytotoxicité comparé aux autres INTI. Les changements sur le contenu en ADN mitochondrial (ADNmt) sont minimes sous Ténofovir, possiblement parce qu'il s'agit d'un faible inhibiteur de l'ADN polymérase- $\gamma$  présente dans la mitochondrie. [19] Néanmoins cette polymérase sera tout de même inhibée, d'où la toxicité observée.

Des biopsies rénales ont été réalisées chez des patients atteints de néphropathies suite à la prise de Ténofovir, les patients présentent des augmentations du taux de créatinine sérique, une protéinurie... Les principales anomalies observées ont été les dommages du tubule proximal, aplatissement de l'épithélium, diminution du nombre de mitochondries, pertes des crêtes mitochondriales, apparitions d'inclusions éosinophiles intra cytoplasmiques et formation de mitochondries géantes et irrégulières.(Figure 9)[28]



**Figure 9** Microscopie électronique de la biopsie de cellules rénales lors de syndrome de Fanconi secondaire au traitement par Ténofovir. A. La morphologie et la taille des mitochondries sont très irrégulières. B. Perturbation des crêtes mitochondriales. C. Mitochondries géantes. Echelle barre : 500nm.[28]

#### **La toxicité rénale liée aux cellules tubulaires.**

Le deuxième mécanisme de **toxicité rénale** serait **lié aux cellules tubulaires**. Les modèles animaux ont montré, avec l'Adéfovir et le Cidofovir qu'il existait une inhibition compétitive de MRP4. Ceci conduit à une réduction de l'efflux cellulaire de la molécule et à

une augmentation de la toxicité. Il a été démontré que la concentration cellulaire du Ténofovir augmente lorsque MRP4 est inhibé. Cette observation conforte l'idée que ce transporteur est impliqué dans l'excrétion urinaire tubulaire du Ténofovir chez l'Homme. [19]

Les syndromes de Fanconi<sup>d</sup> de ces patients sont apparus après plusieurs mois de traitement par Ténofovir, ces atteintes auraient été favorisées par l'association de molécules telle que la Didanosine. [30] Ce syndrome est réversible à l'arrêt du Ténofovir.

Néanmoins, si la tolérance rénale du Ténofovir est bonne, elle est associée au long cours à une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) avec une réduction de 10mL/min en moyenne pour une durée de 96 semaines de traitement [31].

### C. Les traitements associés au Ténofovir

Les facteurs de risques indépendamment associés à une diminution de la fonction rénale sont le diabète, le niveau de la fonction rénale initiale et l'utilisation d'IP boosté par le Ritonavir. Le Ritonavir est un substrat de MRP2. [32] Il a été impliqué dans l'inhibition d'efflux du Ténofovir mais les mécanismes ne sont pas clairs.[29, 33] On sait néanmoins que le Ritonavir diminue la clairance rénale de Ténofovir [34] et on sait aussi que l'augmentation plasmatique est responsable de toxicité tubulaire.[35]

La prévalence d'insuffisance rénale augmente avec l'exposition cumulée au Ténofovir associé à un IP [36] comme l'Atazanavir. [37]. Le mécanisme de cette interaction serait basé sur l'inhibition des transporteurs d'influx OAT1 et d'efflux MRP4 du Ténofovir par les IPs

---

<sup>d</sup>Le Syndrome de Fanconi est un trouble généralisé de la fonction rénale. On retrouve lors de cette dysfonction tubulaire proximale, une protéinurie tubulaire, une hypophosphatémie, une hyperphosphaturie, une hypouricémie, et une hypokaliémie par fuite urinaire, associées à une glycosurie normoglycémique, une amino-acidurie généralisée et une acidose tubulaire rénale proximale due à une perte de bicarbonates.

<sup>e</sup>L'acidovir (analogue des bases puriques) (AMM 1999) et le Cidofovir (analogues des bases pyrimidiques) (AMM 1999-2000) sont des analogues structuraux du Ténofovir (analogues structural des bases puriques) commercialisés 2 ans avant le Ténofovir, d'où la présence de nombreuses études à leur sujet.

#### **D. Les apports du modèle animal**

Les modèles animaux ont permis de montrer que le Ténofovir induit une régulation négative sur l'expression des gènes qui codent pour les autres transporteurs membranaires, comme le co-transporteur IIa  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^{3-}$ , l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , et l'aquaporine 2. Les changements d'expression de ces transporteurs membranaires sont responsables d'hypophosphatémie, comme cela a été démontré pour l'Aciclovir.

Le modèle animal apporte aussi l'information que pour de fortes concentrations en Ténofovir, des dysfonctions tubulaires rénales par accumulation intracellulaire de la molécule apparaissent. Les patients ayant eu un dysfonctionnement tubulaire avaient tous une concentration plasmatique en Ténofovir supérieure à 160 ng/mL. Une relation dose dépendante avec les pathologies tubulaires rénales a été trouvée.[19] De plus le modèle animal montre une diminution de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans les cellules tubulaires quand l'animal est exposé au Ténofovir.[28]

D'autres hypothèses ont été émises quant à l'augmentation des concentrations plasmatiques de Ténofovir et de son exposition. Au niveau digestif, des études in vitro ont démontré que les IP augmentent la perméabilité des cellules intestinales au Ténofovir.

#### **E. La toxicité rénale, questions, hypothèses et début de réponse.**

Les personnes les plus à risque de néphropathies tubulaires induites par le Ténofovir sont les personnes âgées, les personnes de masse corporelle basse, les sujets de sexe masculin, la préexistence d'insuffisance rénale, l'association du Ténofovir avec des médicaments néphrotoxiques (Didanosine(INTI), Anti Protéases dont le Ritonavir...) et les polymorphismes des transporteurs d'efflux MRP2/ABCC2 en position -24 sur le gène, ainsi que l'allèle 3463G du gène ABCC4 qui code pour la protéine MRP4 [19] .

La pharmacogénomique et la recherche d'interactions médicamenteuses aident à la compréhension des mécanismes d'accumulation et renforce certaines hypothèses établies, mais ne peuvent expliquer définitivement l'implication des cibles et des chemins empruntés par le médicament. On sait actuellement que MRP4 est impliqués dans l'efflux du Ténofovir, alors que l'implication de MRP2 n'est qu'une hypothèse. [38] Le problème pourrait venir aussi plus en amont avec les anomalies mitochondriales rencontrées.[28]

L'ADNmt est donc une cible des analogues nucléosidiques.[39-40] Des mutations de l'ADNmt entraînent les mêmes symptômes que le syndrome de Fanconi.[41] Effectivement, la mitochondrie est responsable de la phosphorylation oxydative, permettant de produire l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire par régénération de l'ADP+Pi en ATP. Or la cellule tubulaire proximale est riche en mitochondries (cf. figure 10, infra) pour permettre le bon fonctionnement des nombreux transporteurs qui fonctionnent contre le gradient de concentration. S'il n'ya plus d'ATP il n'y a plus de transport par les protéines d'efflux ATP dépendante.

#### **1.9.4.4.3.2 Le résumé caractéristique du produit (RCP)**

Lorsque les individus infectés par le VIH sont traités par Ténofovir, les hypophosphatémies sont considérées comme très fréquentes lorsqu'elles sont supérieures ou égales à une personne sur 10 traitées (1/10). L'insuffisance rénale, l'insuffisance rénale aiguë, la tubulopathie proximale et le syndrome de Fanconi sont considérés comme rares avec une fréquence comprise entre [1/10000 ; 1/1000]. La nécrose tubulaire aiguë est considérée comme très rare, avec une fréquence inférieure à 1/10000.

#### **1.9.4.4.4 Le suivi biologique du traitement par Ténofovir**

Puisque le traitement par Ténofovir entraîne des tubulopathies, les recommandations préconisent, à l'instauration du traitement une surveillance rénale par la mesure de la clairance approximée par la formule MDRD et un dosage des phosphates sériques toutes les 4 semaines pendant la première année de traitement puis tous les 3 mois pendant toute la durée d'utilisation du Ténofovir.[2] Le HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America préconise lui un suivi tous les 3 mois pendant la première année de traitement puis tous les 6 mois les années suivantes.

Par ailleurs la posologie du Ténofovir sera adaptée selon le degré d'insuffisance rénale du patient. (Tableau II).

**Tableau II Posologie du Ténofovir selon la fonction rénale. [9]**

	clairance rénale à la créatinine (mL/min)				Hémodialyse
	>50	49-30	29-10	<10	
Posologie du Ténofovir	300mg /24h	300mg/48h	300mg, 2x/sem	300mg, 1x/sem	

Pour augmenter la précision du dépistage, bien que le rapport d'experts n'en parle pas, le ratio protéines U/créatinine U peut être utilisé. Il sera augmenté chez les patients atteints de lésions tubulaires graves. La présence d'une protéinurie tubulaire semble être très sensible et l'équipe de Hall et al.[28] pense que le ratio urinaire RBP urinaire/créatinine est un bon outil diagnostique. A défaut, le dosage de l'excrétion des phosphates et la glycosurie sont eux aussi des marqueurs d'anomalies tubulaires mais moins sensibles.

#### **1.9.4.5 La pharmacocinétique du Ténofovir**

La dose recommandée de TDF (fumarate de Ténofovir disoproxil) afin d'obtenir un effet maximal sur la diminution de la charge virale est de 300mg par jour (dose équivalente à 245mg de Ténofovir disoproxil) [42].

##### **1.9.4.5.1 Les données bibliographiques [2-3, 43-44].**

Le modèle de cinétique final du Ténofovir est bicompartimental avec une constante d'absorption d'ordre 1. Selon Gagnieu et al, la clairance (CL/F) est calculée en prenant en compte le ratio : masse corporelle divisée par la créatinine (Bw/Scr) selon l'équation  $CL/F = 36.2 + 135 \times (BW/Scr)$ . De plus la constante d'absorption (Ka) montre une variabilité interindividuelle dépendante des valeurs de la clairance (CL/F), de la clairance intercompartmentale apparente (Q/F), et des volumes des compartiments, central (V1/F) et périphérique (V2/F) de chaque patient. Un modèle plus complexe n'améliore pas l'ajustement du modèle. [3]

Le tableau suivant présente les paramètres pharmacocinétiques obtenus avec une cohorte prospective de 175 patients suivis sur 18 mois.[3]

**Tableau III Paramètres du modèle de population finale [1]**

paramètre	Médian (IC <sub>95</sub> )	CV interindividuel (IC <sub>95</sub> )
Ka, 1/h	1.06(0.62-1.86) <sup>a</sup>	49 (24-79) <sup>a</sup>
V1/F,L	892 (644-1210)	51 (30-84)
V2/F,L	2490 (1730-1210)	58 (1-96)
CL/F, L/h	36.2 + 135x (BW/Scr) <sup>b</sup> (0.3-72) (97-185) <sup>c</sup>	Interindividuel : 19 (1-30) Intraindividuel: 32 (23-39)
Q/F,L/h	493 (366-676)	81 (30-127)
CV(ε) <sup>d</sup> ,%	15 (9-22)	---

Les valeurs sont le bootstrap. CI95, 95 % intervalle de confiance base sur le bootstrap du modèle; CV, coefficient of variation.

- a. Médiane et covariance inter individuelle de l'estimation individuelle par approche empirique Bayésienne.
- b. BW= body weight poids en kg; Scr= créatinine sérique en μM.
- c. CI95 pour l'intercept et la pente de CL/F.
- d. ε est l'erreur résiduelle

La variabilité résiduelle a un coefficient de variation relativement élevé (15%) cela pourrait être dû à l'imprécision de mesures des concentrations de Ténofovir. La variabilité globale de CL/F, après ajustement au poids corporel et à la clairance à la créatinine est de 50% avec 20% de variabilité inter individuelle et 30% de variabilité intra individuelle. [3]

Devant ces variations intra et interindividuelles des paramètres pharmacocinétiques du Ténofovir, des liens de causalité ont été recherchés avec les facteurs suspectés de faire varier ces paramètres comme les polymorphismes génétiques impliqués dans la pharmacocinétique du Ténofovir.

#### 1.9.4.5.2 Les paramètres ADME du Ténofovir

##### L'absorption, influence du repas sur la biodisponibilité

La biodisponibilité (F) du Ténofovir est de 40%. Celle ci est améliorée si la prise du médicament se fait en même temps qu'un repas. L'aire sous la courbe (ASC) est augmentée de 40% et la concentration maximale (Cmax) est augmentée de 14% si le repas est riche en graisses [2-3]. La constante d'absorption du Ténofovir (Ka) a pour moyenne 1,06 [0,62-1,86] h<sup>-1</sup>.

### **La distribution du Ténofovir**

L'ASC se situe entre 1 et 6 mg.h/L. La Cmax (concentration maximale) du Ténofovir a pour moyenne 254 mg/L [221-292 mg/L] au Tmax (temps maximal pour atteindre Cmax) situé entre 2 et 4h[2].

Le volume de distribution (Vd) est partagé entre deux compartiments (Tableau III). Le volume central (V1/F) vaut 892 L [644-1210 L] (soit pour F de 0,4 ; V1= 356,8L de moyenne) et le volume du compartiment périphérique (V2/F) qui a pour valeur 2490 L [1730-3660 L] (soit pour F de 0,4 ; V2= 996 L). [3]

### **Le métabolisme du Ténofovir**

Ni le TDF ni le Ténofovir ne sont des substrats pour les enzymes du Cytochrome P450 [3, 19-20]. Le Ténofovir sera métabolisé dans les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) sous forme de Ténofovir diphosphorylé. Le métabolisme dans la cellule tubulaire rénale est le plus étudié du fait de la toxicité du Ténofovir, lors de sa sécrétion active au niveau du tubule rénal.

### **L'élimination du Ténofovir**

Le Ténofovir est éliminé à 80% de la dose administrée sous forme inchangée dans l'urine[2]. La clairance rénale du Ténofovir se situe entre 160 et 203 mL/h/kg pour une clairance de la créatinine est de 77mL/h/kg ; le Ténofovir est à la fois éliminé par sécrétion active par le rein et filtré au niveau glomérulaire [42].

Le temps de demie vie du Ténofovir est de 14h [2, 42]. Le Ténofovir intra cellulaire di-phosphorylé a une demie vie supérieure à 60h [2]. Le RCP apporte la notion de durée de vie dans les CMSP selon leur activation, avec T1/2 de 10h dans les CMSP activées et supérieure à 60h dans les cellules non activées.

Les 20% restant de l'élimination s'effectue par catabolisme cellulaire.

Le tableau ci dessous décrit les valeurs de la pharmacocinétique du Ténofovir d'après le RCP.

**Tableau IV Résumé des paramètres de la pharmacocinétique du Ténofovir. (RCP)**

<b>Absorption</b>	Biodisponibilité (F)	0,25 à jeun 0,40 avec un repas riche en graisses
	ASC ng x h /mL	3324 (3,324mg.h/L)
	Cmax (µg/L)	326
	Cmin (µg/L)	64,4
<b>Distribution</b>	Volume de distribution(L)	800
	Liaison aux protéines plasmatiques	<0,7
	Liaison aux protéines sériques	<7,2
<b>Métabolisme</b>	Cytochromes	Le Ténofovir n'est pas substrat du cytochrome P450.
	Interactions	Peu probable avec les médicaments métabolisés par le CYP 450.
<b>Elimination</b>	T1/2 (h)	14 (>60 intracellulaire) plusieurs semaines pour le Ténofovir di-phosphate
	Clairance Totale	230mL/h/kg ( 300mL/min)
	Clairance Rénale	160 (210 mL/min)
	Clairance Hépatique	0
	Fraction urinaire de la dose administrée	0,7 à 0,8 inchangé

ASC : aire sous la courbe ; CYP 450 : cytochrome P 450.

#### 1.9.4.5.3 Mécanismes d'excrétion du Ténofovir au niveau tubulaire

Le Ténofovir pénètre dans la cellule tubulaire (fig.3) grâce aux transporteurs OAT1 (organic anion transporters) ou SLC22A6 [2] et OAT3 ou SLC22A8[45]. Une fois dans la cellule tubulaire rénale le Ténofovir suit la voie de phosphorylation et est monophosphorylé par les AK2 et AK3 (adénylate kinase), puis diphosphorylé par les NME2 et NME3 (non metastatic cells)[46], le Ténofovir diphosphate peut entraîner à ce niveau tubulaire une toxicité mitochondriale[4]. Si le Ténofovir intra cellulaire ne suit pas cette voie de la phosphorylation, il sera le substrat des transporteurs d'efflux MRP4 (Multidrug Resistance Associated Protein ) [47] et MRP2[4].

Des études menées sur des souris KO pour MRP4 ainsi que des travaux in vitro ont montré une diminution de la clairance intrinsèque du Ténofovir de 54% et une concentration intracellulaire deux fois plus élevée en Ténofovir[29, 47].

Les résultats restent contradictoires quant à l'implication de MRP2 et éventuellement de certains de ses polymorphismes, dans l'élimination du Ténofovir [19, 47]. Effectivement l'article de Ray et Cihlar [47] en 2007 contredit l'implication de MRP2 et de certains polymorphismes avancés par Izzédine et al en 2006 [48] dans l'excrétion du TFV (figure 10). Les travaux de Rodriguez-Novoa et al en 2009 confirment cette confusion. [19] Néanmoins cette étude montre l'implication de MRP2 par une surexpression du polymorphisme -24 C/T (rs 717620) qui serait plus fréquent dans le groupe avec anomalie rénale.

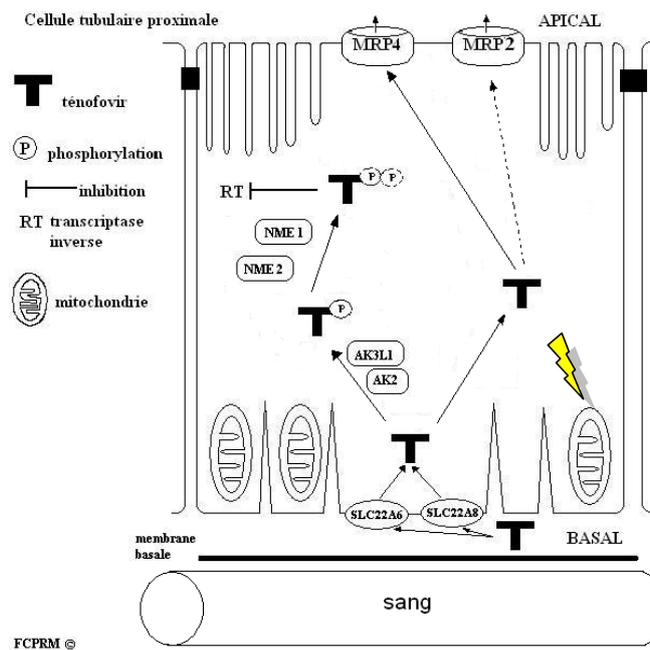


Figure 10 Métabolisme du Ténofovir d'après Pharmgkb.org et Rodriguez-Novoa et al 2009, Hall et al.2011.

#### **1.9.4.6 Facteurs à l'origine de la variabilité de la pharmacocinétique du Ténofovir**

##### **1.9.4.6.1 Les facteurs physiopathologiques : rôle de la fonction rénale**

Toute pathologie rénale sera susceptible d'entraîner une accumulation cellulaire du Ténofovir, une surveillance accrue de la fonction rénale est recommandée. Les facteurs cellulaires jouent un rôle important

##### **1.9.4.6.2 Les facteurs iatrogènes**

En première intention les experts du Rapport Yéni 2010 proposent une association entre Ténofovir, Emtricitabine (FTC) (INTI) et Atazanavir (ATZ) (IP) boosté par le Ritonavir. Or l'association du Ténofovir avec l'Atazanavir (ATZ)/r<sup>c</sup> diminue en moyenne l'Aire Sous la Courbe (ASC) de 25% de l'inhibiteur de protéase. Par ailleurs, l'Atazanavir/r<sup>c</sup>, le Lopinavir/r<sup>c</sup>(IP), le Darunavir (IP) augmentent l'ASC du Ténofovir de 30% [47].

##### **1.9.4.6.3 Les facteurs génétiques**

Les polymorphismes des transporteurs d'influx et d'efflux de la cellule tubulaire rénale et de l'entérocyte seraient à l'origine des variations des paramètres pharmacocinétiques du Ténofovir [19]. Notre travail a porté sur les transporteurs d'efflux de la cellule tubulaire rénale (MRP2 et MRP4)

---

<sup>c</sup> /r : signifie que r = ritonavir (IP) boost à faible dose l'effet de l'antiviral (IP) associé.

## 2 Les transporteurs d'efflux

Le Ténofovir est administré sous forme de prodrogue. Dans la cellule, il est sous forme de nucléoside phosphorylé (nucléotide) acyclique et est mis soit en relation avec de nombreuses enzymes, de phosphorylation ou bien il sera directement excrété, sous forme de Ténofovir, par deux transporteurs d'efflux MRP4 et/ou MRP2.[19, 28]

### 2.1 Généralités.

Des transporteurs d'influx et d'efflux sont impliqués dans l'excrétion tubulaire rénale du Ténofovir. Ces transporteurs sont des protéines associées aux membranes plasmiques. On sait que  $\frac{1}{4}$  du génome humain codes pour ces protéines de transport [48bis]. Ces canaux et ces transporteurs membranaires assurent les mouvements moléculaires entre l'intérieur et l'extérieur des cellules, ce qui est nécessaire à la communication et à la survie cellulaire.

La plus grande famille de transporteurs transmembranaires est la famille des ABC protéines (ATP Binding Cassette). Toutes les espèces présentent en grand nombre ces protéines qui sont responsables d'un transport actif, à contre courant, de molécules endogènes ou exogènes à travers les membranes cellulaires. Pour cela, l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP qui se fixe sur deux zones intra cellulaires de la protéine (ATP cassette protein).

5% du génome de *E.coli* code pour 69 transporteurs ABC, 51 protéines ABC pour la drosophile (*drosophila*), 28 pour la levure *Saccharomyces* et 48 pour l'être humain.[49]

#### 2.1.1 La superfamille des protéines de transport ABC

Chez l'homme presque tous les chromosomes possèdent un gène codant pour les protéines de la superfamille des ABC protéines.

Les transporteurs ABC sont divisés en 7 sous familles (de ABCA à ABCG). Pour exemple, ABCB1 est le gène de la glycoprotéine-p, transporteur historique de détoxification de l'organisme.

**Tableau V Liste des protéines de la superfamille ABC. [50]**

<b>gène, ABC</b>	<b>proteine</b>	<b>locus</b>	<b>fonction</b>	<b>Expression</b>
<b>ABCA1</b>	ABC1	9q31.1	Efflux de cholestérol dans les HDL	
<b>ABCA2</b>	ABC2	9q34.3	Résistance aux drogues	Cerveau
<b>ABCA3</b>	ABC3	16p13.3	Efflux de phosphatidylcholine	Poumons
<b>ABCA4</b>	ABCR	1p22.1-p21	Efflux de N-rétinylidène-PE	Photorécepteurs
<b>ABCA5</b>		17q24.3		Muscle, cœur, testicules
<b>ABCA6</b>		19p13.3		Foie
<b>ABCA7</b>		17q24.3		Thymus, rate
<b>ABCA8</b>		17q24.3		Ovaires
<b>ABCA9</b>		17q24.3		Cœur
<b>ABCA10</b>		17q24.3		Muscle, cœur
<b>ABCA12</b>		2q34		Estomac
<b>ABCA13</b>		7p11-q11		
<b>ABCB1</b>	PGY, MDR	7p21.12	Résistance à de multiples drogues	Reins, cerveau, GS*
<b>ABCB2</b>	TAP1	6p21.3	Transport de peptides	Toutes cellules
<b>ABCB3</b>	TAP2	6p21.3	Transport de peptides	Toutes cellules
<b>ABCB4</b>	PGY3	7q21.12	Transport de phosphatidylcholine	Foie
<b>ABCB5</b>		7p21.1		Ubiquitaire
<b>ABCB6</b>	MTABC3	2q35	Transport de fer	Mitochondrie
<b>ABCB7</b>	ABC7	Xq12-q13	Transport de cluster Fe/S	Mitochondrie
<b>ABCB8</b>	MABC1	7q36		Mitochondrie
<b>ABCB9</b>		12q24.31		Cœur, cerveau
<b>ABCB10</b>	MTABC2	1q42.13		Mitochondrie
<b>ABCB11</b>	SPGP	2q24.3	Transport de sels biliaires	Foie
<b>ABCC1</b>	MRP1	16p13.12	Résistance aux drogues	Poumons, testicules, CMSP
<b>ABCC2</b>	MRP2	10q24.2	Efflux d'anions organiques	Foie, reins
<b>ABCC3</b>	MRP3	17q21.33	Résistance aux drogues	Poumons, intestins, foie
<b>ABCC4</b>	MRP4	13q32.1	Transport de nucléosides	Prostate, reins
<b>ABCC5</b>	MRP5	3q27.1	Transport de nucléosides	Ubiquitaire
<b>ABCC6</b>	MRP6	16p13.12		Reins foie
<b>ABCC7</b>	CFTR	7q31.31	Canal chlorure	Glande exocrines
<b>ABCC8</b>	SUR	11p15.1	Récepteur aux sulfonylurées	Pancréas
<b>ABCC9</b>	SUR2	12p12.1	Régulateur de canaux K(ATP)	Cœur muscles
<b>ABCC10</b>	MRP7	6p21.1		
<b>ABCC11</b>		16q12.1		
<b>ABCC12</b>		16q12.1		
<b>ABCD1</b>	ALD	Xq28	Régulateur de transport de VLCFA	Peroxisomes

<b>ABCD2</b>	ALDL1, ALDR	12q11		Peroxisomes
<b>ABCD3</b>	PXMP1, PMP70	1p22.1		Peroxisomes
<b>ABCD4</b>	PMP69, P70R	14q24.3		Peroxisomes
<b>ABCE1</b>	OABP, RNS4I	4q31.31	Protéine liant l'oligoadénylate	Ovaires, testicules, rate
<b>ABCF1</b>	ABC50	6p21.1		Ubiquitaire
<b>ABCF2</b>		7q36.1		Ubiquitaire
<b>ABCF3</b>		3q27.1		Ubiquitaire
<b>ABCG1</b>	ABC8, White	21q22.3	Transport de cholestérol	Ubiquitaire
<b>ABCG2</b>	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Efflux de toxines, Rce aux drogues	Placenta, intestins
<b>ABCG4</b>	White 2	11q23		Foie
<b>ABCG5</b>	White3	2p21	Transport de stérol	Foie, intestins
<b>ABCG8</b>		2p21	Transport de stérol	Foie, intestins

VLCFA, very long chain fatty acids. CMSP, cellules mononucléées du sang périphérique. Rce, résistance

### 2.1.1.1 Les maladies génétiques

Le gène ABCG2 est nommé « breast cancer resistance protein » car il est impliqué dans la résistance des cancers du sein aux différents traitements. Le gène ABCD1 est impliqué dans les troubles neurodégénératifs de l'adrénoleucodystrophie. Dans la sous famille de gènes ABCC, le gène ABCC7 code pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) qui est un transporteur d'ions chlore, impliqué dans la mucoviscidose et le gène ABCC2, un des 2 gènes de notre étude, est impliqué dans le syndrome de Dubin –Johnson<sup>5</sup>.

D'autres encore sont impliqués dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (ABCA4), dans l'hypoglycémie hyperinsulinémique congénitale (ABCC8), dans le transport du cholestérol, maladie de Tangier (ABCA1). On retrouve également des déficits immunitaires, des anémies, des déficits en surfactant pour lesquels des atteintes de protéines ABC sont impliquées.

<sup>5</sup> Le syndrome de Dubin-Johnson est une défaillance de l'excrétion biliaire de la bilirubine glucuronocconjuguée il entraîne un ictère. Ce syndrome est transmis de façon autosomique récessive, il s'agit d'une maladie bénigne.

### 2.1.1.2 Résistance et effets indésirables

De nombreux mécanismes de résistances et d'effets délétères sont la conséquence de l'activation ou de l'inhibition de ces protéines.

Ainsi, ABCB1 (Multidrug resistance 1 (MDR1) appelée encore glycoprotéine p) est associée au transport de molécules hydrophobes et est présente dans de nombreux cas d'échecs thérapeutiques de la lutte anticancéreuse. ABCC2 est impliqué dans l'élimination de molécules conjuguées comme la vinblastine et ABCC4 est relié au transport de nucléosides conjugués (nucléoside monophosphate). ABCC4 sont impliqués dans l'efflux de molécules telle que le Ténofovir et plus généralement de certains analogues nucléosidiques (cf.§2.1.3)[4, 47]. L'implication d'ABCC2 n'est pas claire face au transport d'analogues nucléotidiques.[19, 29, 33, 38, 48].

### 2.1.1.3 La structure des protéines ABC.

Les transporteurs ABC sont constitués de deux domaines hydrophobes composés de six segments transmembranaires, ils sont appelés TransMembrane Domains (TMDs). Deux autres domaines intra cytoplasmiques fixent l'ATP, ces zones sont appelées Nucleotide Binding Domain (NBDs). L'hydrolyse de l'ATP permet de fournir l'énergie nécessaire pour le transfert d'analogues nucléotidiques (nucléosides monophosphates) contre le gradient de concentration. L'unité fonctionnelle est l'association de deux TMDs et deux NBDs.[49, 51]

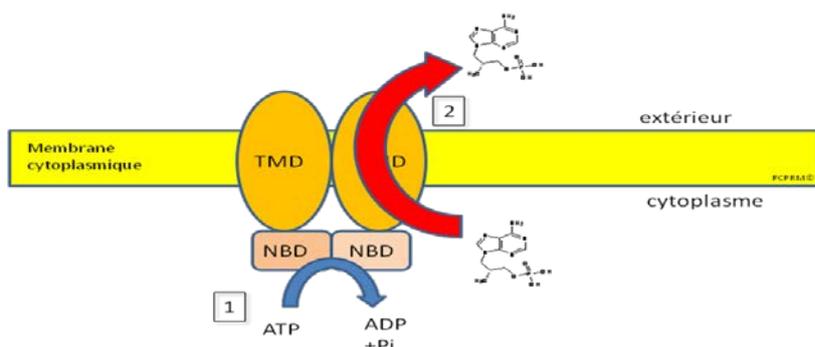


Figure 11 Organisation structurale d'un transporteur ABC.[49] L'ATP se fixe sur les zones NBDs (1) et permet le passage de nucléosides/nucléotides du versant intracellulaire au versant extra cellulaire par les zones TMDs (2).

### **2.1.2 Les ABC protéines de type C (ABCC ou MRP)**

Les Multidrug Resistance Protein sont responsables de l'efflux de nombreuses molécules exogènes et endogènes. (Cf. Tableau V). Deux MRPs sont vu en détail dans cette étude, MRP2 et MRP4.

#### **2.1.2.1 ABCC2 (MRP2)**

La protéine MRP2 transporte des anions organiques, d'où son autre nom, cMOAT (canalicular MultiOranique Anion Transporteur).[4]

Le gène ABCC2 est situé sur le chromosome 10 en 10q24, il s'étend sur 69 kilobases (kb) et comporte 32 exons. Le gène est dans le sens chromosomique conventionnel.

La protéine codée par le gène ABCC2 donne une protéine transporteur d'efflux MRP2 qui s'exprime au niveau rénal et hépatique. Ce transporteur est plus connu pour son action dans l'excrétion hépatique de la bilirubine conjuguée, notamment dans le cas du syndrome de Dubin-Johnson, où 3 mutations ont été relevées sur la séquence du gène de MRP2. Les mutations identifiées ont été retrouvées à la fois dans le domaine cytoplasmique de la protéine, qui comprend 2 ATP binding cassette, et dans le domaine transmembranaire adjacent.

MRP2 est constituée de 1545 acides aminés et a une masse moléculaire de 190kDa. La protéine transmembranaire MRP2 est impliquée dans l'efflux du Méthotrexate, PMEA [48], Irinotécan, Cisplatine, Doxorubicine[4], Ciclosporine, Carbamazépine . [52] Elle est aussi impliquée dans l'efflux de molécule endogène comme la bilirubine conjuguée<sup>6</sup>.

#### **2.1.2.2 ABCC4 (MRP4)**

Le gène ABCC4 est situé sur le chromosome 13 en 13q32.1. Il est constitué de 280 kb et possède 32 exons. Le gène se lit dans le sens inverse du sens conventionnel. Le gène est très polymorphe et possède deux transcrits, qui sont traduit en deux protéines, l'une de 1325 acides aminés (aa) et l'autre de 859 aa. La protéine composée de 1325 aa, comporte 12

---

<sup>6</sup> Ne pas confondre avec l'ictère à Bilirubine non cojuguée, rencontré lors de la maladie de Gilbert anomalie liée à un défaut de glucuronoconjugaison et de l'enzyme UGT1A1.

hélices  $\alpha$  transmembranaires dans 2 domaines hydrophobes de 6 hélices  $\alpha$  trans membranaire chacun ainsi que des replis de fixation des nucléotides en vue de leur élimination. (Cf. **Figure 12**) ABCC4 est ubiquitaire et est retrouvé au niveau cérébral, hépatique, intestinal, rénal, prostatique...

ABCC4 est un régulateur indépendant de la concentration intra cellulaire de nucléotides cycliques et est aussi un médiateur, AMPc dépendant, de la transduction de message au noyau.[53] Il est impliqué dans le transport de molécules antivirales de type analogue nucléosidique/nucléotidique (Zidovudine, Adéfovir [54], Lamivudine, Ganciclovir, Ténofovir [29] et se trouve être transporteur de molécules anti cancéreuses (Méthotrexate au niveau cérébral). Il a été montré que MRP4 contribue à la capacité migratoire des cellules dendritiques.[55] Cette protéine transporteuse n'est pas utilisée que par les xénobiotiques, elle est aussi retrouvée comme transporteur de molécules endogènes comme les prostaglandines, les stéroïdes, les acides biliaires et les folates.

MRP4 est exprimée de façon ubiquitaire, retrouvée avec une forte expression dans la prostate, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules sanguines, les cellules tubulaires rénales, le foie et le cerveau. Généralement présent sur la membrane apicale de la cellule, ce transporteur peut être aussi exprimé sur la membrane baso-latérale, comme dans les plexus choroïdes, la prostate et au niveau hépatique. Cette protéine est située au niveau de la bordure en brosse de la cellule tubulaire rénale (figure 9).

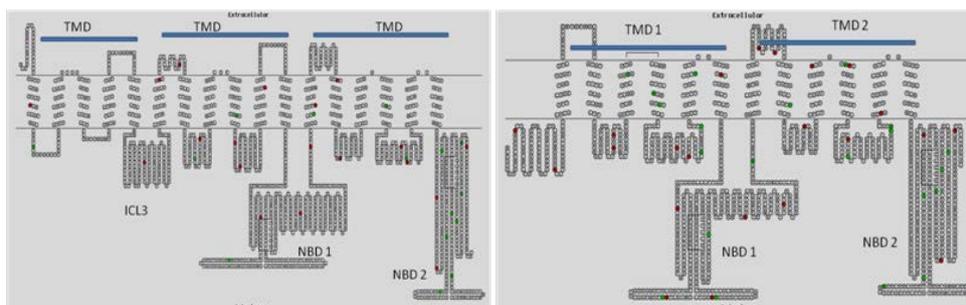


Figure 12. comparaison entre MRP2 et MRP4.[51] (Annexe F) TMD : domaine trans membranaire, NBD domaine de fixation de nucléotides.

### 3 La pharmacogénétique

#### 3.1 Le commencement

On pourrait dire que tout commence avec Pythagore -510av J.C. Mathématicien mais aussi très bon observateur il avait remarqué que l'ingestion de fèves entraînait parfois de graves effets (anémie hémolytique dues à un déficit en G6PDH) et ces effets ne survenaient que chez certaines personnes.[56] Ce n'est qu'en 1902 que l'aspect génétique est relié aux réactions médicamenteuses.[57] Et c'est en 1959 que le terme de pharmacogénétique fait son apparition.[56] Elle est le carrefour de plusieurs disciplines, la génétique, la biochimie et la pharmacologie.

Trois milliards de bases du génome humain, sont semblables d'un individu à l'autre à 99,9 %. Les polymorphismes ne représente alors que 0,1 %, soit 3 millions de bases pour produire la différence qui caractérise chaque individu.

Parmi ces différences figure la sensibilité aux médicaments. Ainsi, à une dose donnée de médicament, la réponse des individus est normale, insuffisante ou excessive. Ce qui produit parfois des effets indésirables ou secondaires ou bien une inefficacité de traitement.

Le mécanisme entre le gène et l'expression de la réponse par l'organisme a deux origines, une pharmacodynamique et une pharmacocinétique.

L'annonce en 2001 du séquençage total du génome humain [58] est porteuse d'énormes espoirs. Le fait d'identifier dans l'« immédiat » certains gènes comme « porteur de risques » de maladies (cancer ou maladies cardiovasculaires) ou de sensibilités accrues à certains traitements est ralenti par des contraintes d'interprétation du génome et des différents phénotypes qui en résultent. Ces recherches n'en sont aujourd'hui qu'à leurs prémices.

Aujourd'hui grâce à des projets pangénomiques de séquençage nous connaissons le génome entier de l'espèce humaine et de plusieurs autres espèces (poissons, insectes, nématodes, levures,...). Ils permettent l'étude du génome dans plusieurs domaines, comme celui de la santé et celui de l'agroalimentaire.

Avec ces recherches la médecine entre dans une nouvelle ère, celle de l'approche personnalisée des soins. La pharmacogénomique permettrait à terme de rentabiliser les traitements, éviter des effets indésirables coûteux en termes de morbidité et parfois de mortalité. Grâce à des tests prédictifs mis en place lors de ces recherches nous pourrions dire si le patient peut recevoir un traitement sans avoir d'effets délétères à son administration ou au long cours.

### **3.2 La pharmacogénomique, la pharmacogénétique.**

#### **3.2.1 La pharmacogénomique[59]**

La pharmacogénomique est l'étude des mécanismes génétiques des variations interindividuelles de la réponse aux médicaments et autres xénobiotiques. Les connaissances acquises sont appliquées à l'adaptation de certains traitements.

La pharmacogénomique est l'étude du gène dans sa globalité. Elle englobe la pharmacogénétique en identifiant les variations du génome responsable des modifications des réponses de l'organisme.

La pharmacogénomique fait aussi référence à l'utilisation de la génomique dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.[59]

#### **3.2.2 La pharmacogénétique**

La pharmacogénétique étudie l'influence du patrimoine génétique sur le sort des médicaments.[60] La totalité des gènes impliqués dans les réactions aux médicaments caractérise la pharmacogénétique.

Dès la fin des années 50 le terme de pharmacogénétique apparaît et désigne les modifications des réponses pharmacologiques influencées par l'hérédité. L'analyse génétique de cette époque n'était possible que par l'analyse des expressions phénotypiques encore utilisées aujourd'hui. [59]

La différence de métabolisme est ici étudiée entre chaque individu, car des variations interindividuelles existent sur le plan pharmacocinétique. L'analyse est effectuée grâce au phénotype enzymatique et de leur conséquence sur l'organisme. L'agence européenne pour l'évaluation des médicaments la définit comme l'étude des variations inter individuelles dans les séquences d'ADN en relation avec les réponses aux médicaments. [56]

Le but de cette branche de la pharmacologie est de développer des tests simples permettant d'identifier les variations génétiques à l'origine des variations interindividuelles dues aux traitements. [61]

Ainsi, la pharmacogénomique s'intéresse au gène et non plus uniquement à son expression. La pharmacogénétique est englobée dans la pharmacogénomique en identifiant les variations du génome responsables des modifications des réponses de l'organisme. Lorsque les liens entre les polymorphismes d'un ou plusieurs gènes et leurs traductions au niveau d'une enzyme, d'un récepteur ou d'un transporteur et les conséquences cliniques de ceux-ci sont établis, l'analyse du génome, qui est aujourd'hui rapide et sûre, permet d'éviter des dosages et des tests biologiques souvent longs, difficile à mettre place qui sont parfois imprécis.

Les deux termes (pharmacogénomique et pharmacogénétique) sont souvent utilisés indistinctement pour définir la même recherche : l'analyse d'une relation entre les médicaments et les gènes

### **3.3 Pharmacogénétique et quelques traitements.**

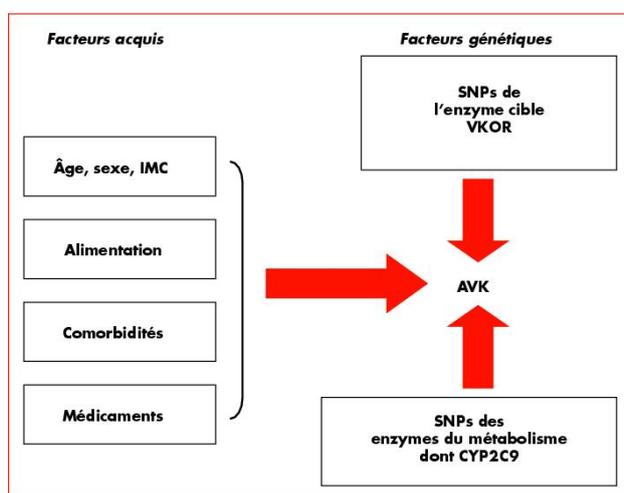
Dans ce paragraphe, deux cas historiques sont développés. Actuellement les connaissances ne cessent de s'enrichir et servent à éviter des effets indésirables ainsi qu'à la compréhension de mécanismes délétères ou d'insuffisance d'effet de médicaments.

#### **3.3.1 Le cas des anticoagulants**

Les accidents hémorragiques sous antagonistes de la vitamine K (antivitamine K, AVK) est en France la première cause d'hospitalisation pour effet iatrogène.[62]

Le risque hémorragique induit par les AVK est dépendant de l'intensité de la décoagulation, de facteurs liés aux patients, de la durée du traitement et de l'usage concomitant de médicaments actifs sur la coagulation ou sur la fonction plaquettaire. Des facteurs de co morbidité peuvent être associés (cancer, éthyliste, hépatopathies...).

Des polymorphismes génétiques sur différents gènes sont également impliqués dans les risques hémorragiques. (Figure 13) Le cycle de la vitamine K avec le traitement et les enzymes intervenant dans son métabolisme sont expliqués en annexe G. Deux enzymes sont impliqués dans le métabolisme de la vitamine K, le CYP 450 2C9 (permet la dégradation des AVK) et le VKORC1 (permet le renouvellement de la vitamine K).



**Figure 13 Facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la variabilité de la dose à l'équilibre chez les patients traités par AVK.** IMC : indice de masse corporelle ; SNP : single nucleotide polymorphism [63]

Le premier gène identifié comme responsable de la sensibilité à la warfarine a été CYP2C9. [64] Six SNPs ont été trouvés et impliqués comme modifiant l'activité du cytochrome et de la dégradation des AVK.

Puis VKORC1 (pour Vitamine K époxyde Réductase sous unité C1) à été identifié. Il transforme la vitamine K époxyde en vitamine K active (diols) (cf. Cycle Annexe G). Les différents polymorphismes identifiés du gène VKORC1 sont en déséquilibre complet de liaison, c'est pourquoi l'étude d'un seul d'entre eux, 1173C>T ou -1639G>A, suffit pour séparer les sujets hypersensibles des autres. Une équipe a réussi à créer le lien entre le polymorphisme 1173C>T situé dans l'intron 1 du gène de VKORC1 et la dose moyenne

quotidienne de Warfarine à l'équilibre. (Pour exemple, celle-ci est significativement plus faible chez les patients 1173TT (3,5 mg ;  $p < 0,001$ ) comparativement aux patients 1173CT (4,8 mg ;  $p = 0,002$ ) et aux patients 1173CC (6,2 mg)).[65]

Au final, l'analyse combinée des polymorphismes de CYP2C9 et de VKORC1 a permis d'expliquer 30 à 40 % de la variabilité individuelle de la dose à l'équilibre de warfarine et donc de la réponse au traitement. si on prend en compte, en plus, l'âge et la taille du patient, il est alors possible d'expliquer plus de 50 % de la variabilité de cette réponse.[63]

### 3.3.2 Médicaments immunosuppresseurs et anti cancéreux

L'exemple de l'Azathioprine donné comme immunosuppresseur et de son métabolite la 6-mercaptopurine (6-MP) donné comme anti cancéreux est présenté ci-dessous. Ces composés impliquent dans leur métabolisme une enzyme la thiopurine méthyl transférase (TPMT) qui est responsable de leur catabolisme.

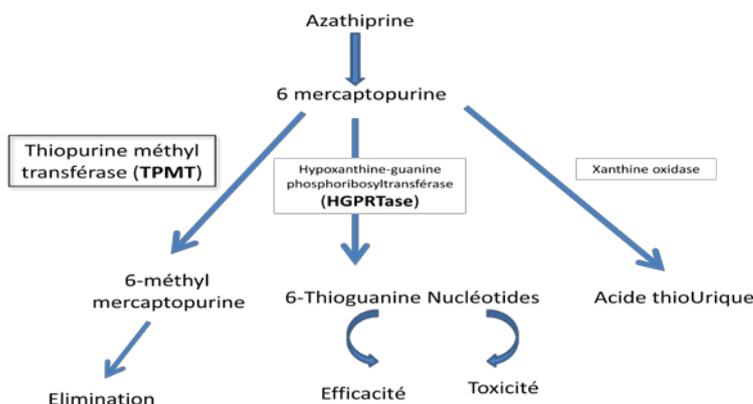


Figure 14 Répartition simplifiée du métabolisme de l'Azathioprine et de la 6-Mercaptopurine[66]

Azathioprine et 6MP sont responsables d'atteintes de la moelle osseuse parfois réversibles mais pouvant également aller jusqu'à l'aplasie médullaire. Est mis en cause dans ces atteintes les métabolites actifs, les 6 ThioGuanine Nucléotide (6-TGNs), qui s'avèrent actifs mais également toxique lorsqu'ils s'accumulent. Cette voie est en compétition avec la

voie catalytique présentée ci-dessus. Si la TPMT est déficitaire, les 6-TGNs s'accumulent dans la cellule et sont responsables de l'aplasie médullaire.

Ce déficit d'activité de la TPMT est d'origine génétique avec 3 polymorphismes fréquents : \*2, \*3B et \*3C. 0,3% de la population générale est homozygote pour l'un de ces polymorphismes avec un risque majeur de toxicité. 11% de la population générale ont une combinaison hétérozygote qui résulte en un niveau intermédiaire de l'activité enzymatique de TPMT. Si ces patients doivent être traités par ces molécules la posologie devra être réduite par rapport aux doses usuelles. Enfin 89% de personnes héritent de deux copies de gènes dont l'activité de l'enzyme est de haut niveau et peuvent être traitées avec une posologie usuelle de thiopurines.[67]

### **3.4 Les applications de la pharmacogénomique**

Elle permet de prescrire des traitements adaptés aux patients grâce à :

#### **3.4.1 La maîtrise de la toxicité des traitements**

Les deux exemples précédents (AVK et les thiopurines) montrent cette maîtrise. D'autres études sont en cours pour évaluer l'impact des polymorphismes génétiques sur la toxicité des traitements dans la population. C'est dans cette démarche que s'inscrit l'étude présentée ci-dessous qui recherche l'implication de gènes dans la toxicité rénale du Ténofovir. (cf. partie 2)

#### **3.4.2 La détermination de la résistance à certains médicaments**

De nombreuses recherches ont été effectuées sur les cytochromes hépatiques. Elles montrent de nombreuses variations génétiques qui modifient la production de ces enzymes et entraînant une résistance des certains patients aux antidépresseurs, anti psychotiques et  $\beta$ bloquants.

### **3.4.3 L'évaluation des résultats positifs des traitements**

Des équipes recherchent et établissent des corrélations entre les variations génétiques des patients et les bénéfices réels observés des traitements, dans le domaine cardiovasculaire notamment et les thérapeutiques ciblées en cancérologie.

### **3.4.4 L'utilisation de la pharmacogénomique dans le cadre de la chirurgie**

L'existence d'une mutation sur un gène de susceptibilité des sujets porteurs de cancers colorectaux est en relation directe avec les modalités d'intervention chirurgicale. De même pour un dépistage génétique des personnes à risque de thrombose post opératoire sous traitement AVK (cf. supra).

### **3.4.5 L'utilisation de la pharmacogénomique dans le cadre de la cancérologie**

Certains variants du génome présent dans les cellules cancéreuses conditionnent leur comportement face à la radiothérapie et la chimiothérapie. Les traitements anticancéreux prendront en compte, dans l'avenir, non seulement la constitution génétique du patient mais aussi celle de sa tumeur, ce qui pourrait conduire à un véritable traitement sur mesure.

Ainsi, par l'étude des caractéristiques génomiques des patients, il serait possible de détecter les sujets non répondeurs avant toute mise en route de traitement anti cancéreux lourd et leur épargner les effets indésirables de ce traitement tout en leur proposant lorsqu'elle existe une thérapeutique alternative adaptée.

## **3.5 Pharmacogénétique et développements thérapeutiques**

La pharmacogénomique n'a pas qu'un rôle d'amélioration de la clinique du patient, elle pourrait jouer un rôle très important dans les étapes de développement du médicament.

### 3.5.1 Le ciblage des essais

30 % environ des molécules développées aujourd'hui n'atteignent pas la phase III des essais cliniques à cause d'effets indésirables. La découverte de ces effets à une phase avancée des essais cliniques génère une perte importante de temps et d'argent. Le recours à la pharmacogénomique pourrait permettre de cibler les essais cliniques en sélectionnant des personnes présentant la plus grande variété de réponses à un médicament afin d'adapter la taille de l'échantillon représentatif.[59]

### 3.5.2 La récupération de molécules délaissées

Actuellement, une molécule arrive sur le marché pour 10 présentes en Phase I. La pharmacogénomique peut améliorer cette situation en démontrant que certains médicaments, s'ils paraissent inutiles ou dangereux pour certains patients, peuvent être utilisés pour d'autres; en fonction des polymorphismes, ils pourraient avoir des applications insoupçonnées.

### 3.5.3 Les tests génétiques

Faire passer un test à un malade avant de lui donner un traitement afin d'avoir un traitement adapté à son profil génétique est une réalité de plus en plus proche.

En 1995, les puces à ADN ("*microarray*") sont apparues. La société américaine Affymetrix a mis au point, avec le centre médical de l'Université de Georgetown, et commercialisé la première puce à ADN spécifiquement destinée à une utilisation en pharmacogénomique. (Dix-huit altérations étaient détectées sur deux gènes humains codant pour des enzymes du métabolisme de médicaments comme des bêtabloquants, certains antidépresseurs et anticonvulsivants).

Les tests de biologie moléculaire « classiques » comme le couplage PCR-séquençage permettent d'effectuer ce genre de recherche mais de façon plus ponctuelle. (cf. partie 2)

D'autres techniques de génie génétique permettent de mettre en évidence des variations comme la « Restriction Fragment Length Polymorphism » qui utilise des enzymes de restriction ou l'HRM pour « high resolution melting » avec l'utilisation du Light cycler de chez Roche, qui permet de réaliser des PCR en temps réel.

Commentaire [H1]: ajout

### 3.5.4 La connaissance des prédispositions génétiques

Actuellement, dans certains cas, les puces à ADN permettent de déceler les mutations génétiques indiquant qu'un individu a de fortes probabilités d'être atteint d'une maladie.

Plusieurs types de puces permettent de façon simple, rapide et moins coûteuse, avec une fiabilité comparable aux techniques classiques de biologie moléculaire de détecter des prédispositions génétiques. Les puces permettent d'étudier ainsi, les mutations du gène CFTR de la mucoviscidose, les mutations du gène de la bêta-globine chez les enfants menacés de bêta-thalassémie, les mutations du gène BRCA 1 chez les femmes risquant d'être atteintes d'un cancer du sein. Le diagnostic du cancer peut également être réalisé par des biopuces, notamment par l'étude des gènes K-Ras et P 53.

### 3.6 Pharmacogénomique et avenir

Mettre en relation le génome et la pharmacologie afin de diminuer les résistances aux traitements, les effets indésirables et adapter la posologie en fonction de la lecture du génome est très ambitieux et ceci suppose l'existence de tests rapides, fiables et peu coûteux pour pouvoir être effectués avant l'instauration du traitement.

La pharmacogénétique n'existe pas sans poser des problèmes éthiques. L'encadrement juridique de cela est organisé par le CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale) suite à la loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 consolidée au 22 juin 2000, appelée loi Huriet-Sérusclat.

Aujourd'hui, la recherche n'est pas encore suffisamment avancée pour permettre de façon systématique de réaliser un test de dépistage puis d'avoir un traitement systématique.

Pour exemple si le test Affymétrie™ permet la recherche des mutations du gène BRCA1 pour le risque de cancer du sein, la conduite à tenir pour les patientes reste à définir en l'absence de traitement précoce, et où la seule alternative est l'acte chirurgical.

--

## DEUXIÈME PARTIE

--

### MATERIELS ET METHODES

Le travail présenté a été fait en plusieurs étapes :

- Premièrement, une définition des polymorphismes d'intérêt potentiel pour les gènes ABCC2 et ABCC4 a été recherchée par consultations de la littérature et de bases de données.
- Deuxièmement, la mise en forme de ces données a été établie pour l'élaboration des moyens méthodologiques utiles à la recherche de ces polymorphismes.
- Troisièmement, la mise au point analytique pour la recherche des polymorphismes d'intérêt d'ABCC2 et ABCC4 a été effectuée pour son application à une population de patients VIH traités par Ténofovir.

## **1. La genèse de ce travail**

Le but de notre travail était de mettre en évidence un ou plusieurs variants, ou un haplotype (ensemble de SNPs) qui seraient directement relié aux phénotypes présents dans une population de patient, d'une part par différence d'exposition au Ténofovir (représentée par l'aire sous la courbe ; ASC) et d'autre part, à l'apparition d'effets indésirables rénaux liés à ce traitement (représenté par la clairance MDRD). Une fréquence supérieure à 5% du SNP dans la population générale à été retenue.[52, 68]

### **1.1 Les SNPs d'intérêt pour ABCC2**

Six SNPs ont été retenus dans notre étude pour avoir une fréquence supérieure à 5% de présence dans la population générale. (Tableau VI) Ils sont tous cité dans la littérature comme ayant plus ou moins d'action sur l'expression des protéines tubulaires d'efflux et possiblement sur l'efflux de Ténofovir.

**Tableau VI Résumé des caractéristiques des différents SNPs retenus pour la séquence ABCC2.**

Position chromosomique	Référence SNP	Variation Position dans le gène	locus du gène et variations protéique	Médicament(s) impliqué(s)	Fréquence allélique allèle%	Références Bibliographiques
Ch. 10 :101531573	rs2804402	-1019A/G	Promoteur 5'UTR	Irinotécan	A 64 G 36	[69]
Ch10 :101532568	rs717620	-24C/T	Promoteur 5'UTR	Ténofovir Cyclosporine Mycophénolate mofetil	C 86.5 T 13.5	[19] [70]
Ch10 :101553805	rs2273697	1249G/A	Exon10 Val417Ile	Ténofovir Cyclosporine Mycophénolate mofetil Talinolol	G 85 A 15	[19, 48]
Ch10 :101585986	rs17222723	3563T/A	Exon25 Val1188Glu	Ténofovir Doxorubicine	T94.2 A5.8	[19, 48]
Ch10 :101594197	rs3740066	3972C/T	Exon 28 Ile1324Ile	Ténofovir	C 69.1 T30.9	[19, 48]
Ch10 : 101601284	rs8187710	4544G/A	Exon 32 Cys/Tyr 1515	Ténofovir	G88.5 A11.5	[19, 48]

Nous remarquons que les SNPs présents sur la séquence d'ABCC2 se dispersent de façon homogène sur celle-ci.

Notons que le SNP de l'exon 28 est considéré comme « synonyme » puisqu'il ne modifie pas l'acide aminé présent dans la protéine MRP2 (Ile → Ile).

## 1.1.1 Les Informations générales sur les SNP étudiés

### 1.1.1.1 Les SNPs

Des variants du gène ABCC2, ont été impliqués spécifiquement dans le métabolisme de médicaments, autres que le Ténofovir. Le polymorphisme -1019 A/G (rs2804402) a été impliqué dans la diminution de la clairance totale de l'Irinotécan. [69] Le polymorphisme, 1249 G/A (rs2273697), a été associé à une augmentation de l'activité du transporteur au niveau intestinal, pour l'absorption du Talinolol<sup>7</sup>. [71] Les variants 3563 T/A (rs1722723) et 4544 G/A (rs8188770) sont impliqués dans la cardiotoxicité de la Doxorubicine. [72]

Le premier polymorphisme étudié ici (rs2804402 ; présent en position -1019A/G) n'a pas été impliqué dans le transport du Ténofovir dans la littérature, Nous l'avons toutefois recherché au cours de nos travaux, puisque sa fréquence dans la population générale est >5%.

-24C/T (rs717620) situé sur le promoteur juste avant le premier exon est le variant pour lequel ABCC2 permet une augmentation de 19% de l'excrétion de Ténofovir en plus, pour les personnes porteuses de l'allèle T par rapport aux personnes porteuses de l'allèle C. Le génotype C-C est plus fréquent chez les patients avec des lésions tubulaires. [19, 48]

Le génotype AA du variant 1249G/A (rs2273697) présent sur l'exon 10 et le génotype TT homozygote du variant 3563 T/A (rs1722723) de l'exon 25(rs8187710) sont plus fréquents chez les patients avec des lésions tubulaires.[19]

L'allèle A de 4544 G/A (rs8187710) présent sur le dernier exon de la séquence du gène ABCC2 est absent chez les sujets présentant des lésions tubulaires. [19, 48]

Les équipes de Izzédine et al et de Rodriguez-Novoa et al se sont intéressées d'une part aux variations ponctuelles et d'autre part aux haplotypes (association de variants ou non entre eux).

### 1.1.1.2 Les haplotypes

Ces deux équipes ont suggéré et observé différents haplotypes. Les haplotypes sont des groupements d'allèles génétiquement liés, appelé « déséquilibre de liaison ». Pour

---

<sup>7</sup> Bêta bloquant non commercialisé en France

exemple, l'haplotype de Izzédine et al. est noté CATC pour des polymorphismes de -24 C>T, 1249 G>A, 3563 T>A, 3972 C>T.

Izzédine a spécifié aussi 6 autres haplotypes dont 2 sont significativement liés à des lésions rénales pour sa population. Il s'agit de l'haplotype CATC et CGAC.

Rodriguez et son équipe, reprend les haplotypes testés par Izzédine et en a testé deux autres. Selon les études on observe des discordances de significativité entre les deux études, notamment pour l'haplotype TGTT et l'haplotype CGTC où la différence significative est presque démontrée.

## **1.2 Les SNPs d'intérêt pour ABCC4**

Quatre SNPs ont été retenus dans notre étude pour avoir une fréquence supérieure à 5% de présence dans la population générale[52, 68]. Il est utile de rappeler pour des raisons techniques que la séquence ABCC4 est très polymorphe et que la séquence ABCC4 est dans le sens inverse du sens chromosomique conventionnel : le promoteur se trouve effectivement en aval de la lecture classique des gènes.

Au total, une centaine de SNPs ont été identifiés sur toute la séquence du gène ABCC4 (exons et introns), soit une fréquence de 11 SNPs par kilo base (kb). Quarante trois de ces polymorphismes sont situés dans des régions codantes et 22 sont non silencieuses. Ces SNPs sont répartis tout au long du gène et la plupart d'entre eux codent pour des acides aminés retrouvés dans les régions intracellulaires de la protéine (17 SNPs sur 22) [73].

**Tableau VII Résumé des principaux SNPs pour le gène ABCC4.**

Position chromosomique	Référence SNP	Variation Position dans le gène	locus du gène et variations protéique	Médicament(s) Impliqué(é)	Fréquences allélique allèle%	Références Bibliographiques
Ch13 : 94714976	Rs1751034	3463A/G	Exon 26 Lys/lys 1116	Ténofovir	A77 G23	[19]
Ch. 13 :95713715	rs 9561778	3366+1243G>T	Intron 26	Cyclophosphamide	G80 T20	[19]
Ch13: 95859035	Rs2274407	1031G/T	Exon 8 304Lys/Asp	Ténofovir	G81 T19	[19]
Ch13 : 95874956	Rs1926657	C/T	Intron 4		C74 T26	[19]

Ce tableau classe les SNPs d'intérêt (fréquence >5% dans la population générale).

### 1.2.1 Les Informations de la relation entre SNPs de ABCC4 et Ténofovir [19, 52, 68]

Les variant rs9561778, 3366+1243G>T sur l'intron 26 et rs1926657 de l'intron 4 sont impliqués dans le cancer du sein et la survenue d'effets indésirables avec un traitement de Cyclophosphamide. [74] Ces deux derniers polymorphismes n'ont pas été recherchés dans l'efflux du Ténofovir dans ces études. Les critères de sélection des SNPs d'ABCC4 ont été les mêmes que pour les SNPs d'ABCC2, avec une fréquence dans la population générale supérieure à 5 %. Nous avons essayé de montrer s'il existait une relation (cf. infra, partie 2 chapitre 2 et Résultats) entre le phénotype et ces SNPs.

Le variant, rs1751034, 3463 A>G présent sur l'exon 26 à été mis en cause dans l'efflux du Ténofovir. Il est associé à une augmentation de 35% de la concentration intra cellulaire de Ténofovir diphosphate. Les sujets présentant ce variant (allèle G) montrent une diminution de la clairance rénale de 15% et l'ASC plasmatique est augmentée de 35% par rapport aux sujets ne présentant pas ce polymorphisme. [19].

Enfin le polymorphisme du SNP, rs2274407 G>T présent sur l'exon 8 apparaît chez 20% des personnes d'origine africaine et chez 8% des caucasiens. Les études d'Izzédine et al et de Rodriguez et al. n'ont pas mis en évidence de relation entre la fonction rénale des individus et la présence de ce SNP néanmoins la fréquence dans la population générale est suffisante pour permettre son étude.

## **2. La recherche préalable à la technique**

### **2.1 Protéines de transport d'efflux MRP2 et MRP4 et les gènes ABCC2 et ABCC4.**

La première étape du travail technique a consisté à rechercher la séquence des gènes ABCC2 et ABCC4. Grâce aux banques de données que l'on trouve sur internet ( données en accès direct), les séquences des deux gènes ABCC2 et ABCC4 ont été identifiées.[75] Ces sites offrent de multiples liens pour obtenir les séquences entières, partielles, les séquences d'acides aminés, les positions chromosomiques et les positions des SNPs. Les séquences de nombreux gènes se trouvent sur ces sites suite aux études pangénomiques menées depuis la fin du vingtième siècle (projet HapMap...).

### **2.2 La recherche de la séquence des gènes d'intérêt.**

Le site du « national center for biotechnology information » (NCBI) présente la séquence entière des gènes, et la liste des références des différents exons ainsi que la séquence protéique qui en découle. Pour cette étude, la connaissance de la séquence du gène dans son intégralité (introns et exons) est capitale. Effectivement, si l'on sait que les zones non codantes (5'UTR et introns) n'ont pas de rôle direct pour la transmission de l'information génétique de la séquence d'ADN, elles ont un rôle indirect essentiel dans la régulation de la transcription<sup>8</sup> des gènes (e.g : le promoteur, les sites d'épissage retrouvés sur les introns)

---

<sup>8</sup> La transcription est le passage du gène (séquence ADN exonique) en ARNm qui sortira du noyau.

Par ailleurs, ces séquences sont également disponibles, avec le logiciel payant, Alamut®, d'Interactive Biosoftware, société fondée en 2007 liée à l'équipe INSERM U614 de l'université de Rouen (France). Le logiciel est complet et facile d'utilisation. Il permet une interface pratique pour l'exploitation des données du génome disponible en accès direct sur internet. Ainsi que la séquence d'ADN de façon linéaire en sens et en antisens, les exons, les introns, on y retrouve aussi la séquence traduite en acide aminés, les SNPs d'intérêt ainsi que les séquences retrouvées dans d'autres espèces animales. (Annexe G) Le désavantage de ce logiciel est qu'il est payant ainsi tous les laboratoires ne l'ont pas à leur disposition. Sa fiabilité est très importante bien qu'il ne soit pas exempt d'erreur.

Les séquences ne figurent pas dans cette thèse car la totalité du gène, intron et exon se développent sur plusieurs centaines de pages.

Technique de recherche : on copie la séquence dans son intégralité dans un fichier Word®. (L'utilisation d'Open Office® est déconseillée car un espace est comptabilisé à chaque fin de ligne).

### **2.3 La recherche des exons sur la séquence.**

Le site du NCBI fournit les références numériques des différents exons sur les séquences proposées, ainsi que les références positionnelles des SNPs. Il est ainsi aisé de positionner les exons sur la séquence.

Depuis 2008, Alamut® rend la recherche des exons, des introns et des SNPs plus rapide. Les exons sont visualisés directement sur la séquence ce qui permet de résoudre certains problèmes rencontrés lorsque le promoteur se situe en aval du gène comme pour ABCC4. Le logiciel ne met pas à l'abri d'erreurs et pour traiter les données il est préférable de disposer des deux sources d'informations complémentaires, le site source NCBI et l'interface Alamut®.

En effet si ABCC2 est dans le sens chromosomique conventionnel, la séquence ABCC4 est en sens inverse sur le chromosome. La protéine est traduite ainsi à partir du brin anti sens. Le problème rencontré sur le NCBI était d'avoir la séquence antisens pour faciliter le positionnement des exons. Ce sont d'ailleurs les 2 premières difficultés auxquelles nous avons été exposés dans la recherche des SNPs.

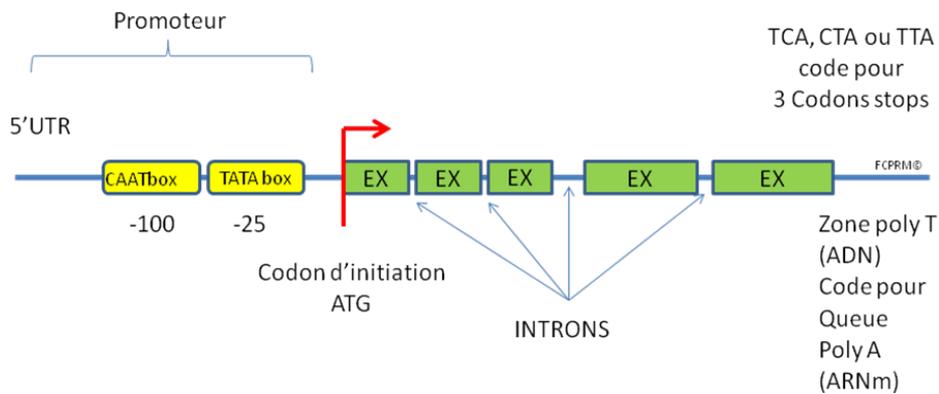


Figure 15. Schéma d'un gène (ADN). (UTR: UnTranslated Region; Ex: Exon; Poly A ploy Adénylée)

Pour mémoire, le premier exon commence avec le triplet ATG (Adénine, Thymine, Guanine), il s'agit du codon d'initiation qui code pour l'acide aminé, méthionine. Toutes les bases se trouvant en aval de la base nucléique A du codon d'initiation ATG auront une référence numérique positive. Toutes celles se trouvant en amont du codon d'initiation seront notées négativement.

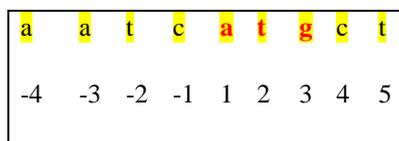


Figure 16 Numérotation selon le codon start.

### Technique de Recherche :

On copie sous Word® la séquence du site internet NCBI. Les références des différents exons sont données comme dans l'exemple suivant.

[CDS](#) [join\(5140..5172,6903..7076,14529..14654,15846..15980,  
16187..16294,16708..16763,19392..19626,21502..21665,...](#)

Figure 17 Références exoniques issues du site internet NCBI[75]

Ensuite il faut effectuer la recherche des exons sur la séquence fournie avec ces références. Les bases sont classées par dizaines ce qui facilite la lecture et la recherche des exons, d'un un point de vu technique les espaces seront supprimés pour permettre une recherche par similitude de séquence (grâce à la fonction Ctrl+F).

```
4861 ttatgatgg ccaactctac agaggcctct tgtactffgg gaactgggta gtctccctgt
4921 ccctagggct ttttagtcac atgtccatcc actgtffcaa tgtaacatgc atctaggcaa
4981 ggtaacgat taaatgggtg ggatgaaagg tcatccttta cggagaacat cagaatgga
5041 gataattcct gtccacttt ctttgatgaa acaagtaaag aagaaacaac acaatcatat
5101 taatagaaga gtcttcgttc cagacgcagt ccaggaatca tgctggagaa gttctgcaac
5161 tctactffff gggtgagaaa ttacatttat ctccatattg actcttctca gactcagaac
5221 aagtggtagt tagttaactt agggtggtca ccaacaagaa ccagaaatgt tagatgtgca..
```

Figure 18 Séquence partielle d'ABCC2, issue du site internet du NCBI[75]

Sur cette figure (figure 18) on observe, le premier exon qui débute à partir de l'adénine (5140) du codon Start. Puis on recherche tous les exons de la séquence. Une fois le premier exon placé on procède de la même manière pour les exons suivants.

Par ailleurs le dernier codon est un codon « stop ». Il terminera le dernier exon de la séquence. (UAA, UAG, UGA ; U pour uridine retrouvée dans l'ARNm, sur l'ADN nous

aurons les triplets de bases TCA, CTA ou TTA) la transcription continuera pour donner une queue poly A (succession de A) à l'ARN messager.

Nous n'observons sur la figure 16 aucun chiffre « 0 », s'il existait un « trou » dans le génome se serait une délétion. Or les logiciels utilisés dans cette étude pour le séquençage Seqscape® (cf. infra) font systématiquement l'erreur de compter le chiffre « 0 » décalant la fenêtre de lecture d'une base lorsque l'on doit travailler sur le promoteur.

## **2.4 La recherche des SNPs d'intérêt sur les séquences**

Après avoir procédé à la recherche bibliographique, identifié les séquences entières des gènes ABCC2 et ABCC4, placé les exons, les SNPs d'intérêt retenus pour leur fréquence sont localisés sur le gène grâce à leur référence, les « rs number » (rs pour ref-SNP).

Différents sites internet sont disponibles pour effectuer la recherche des séquences qui encadrent les polymorphismes[51-52, 68]. Le site du NCBI propose les données numériques pour la recherche des SNPs directement sur la séquence fournie. Le site pharngkb et le site de l'Université de San Francisco sont de bons outils dans cette recherche de polymorphismes sur la séquence. [51]

### **Technique de recherche :**

Avec les deux derniers sites internet cités, la recherche des SNPs se fait par similitude entre des séquences entourant le SNP grâce au module Word® (Ctrl+F rechercher/remplacé). Attention, ce mode de recherche doit faire la distinction entre les séquences sens et anti-sens. On utilise la séquence du NCBI, on supprime les espaces et les chiffres puis on effectue la recherche sur tout le gène.

Il est également possible de s'aider du logiciel Alamut®, avec le même module de recherche rapide (Ctrl+F) que sur Word®, avec la référence du SNP ou par similitude de séquence.

Les résultats des recherches pour les gènes ABCC2 et ABCC4 structure nucléotidique, exons, introns et polymorphismes sont présentés. (Annexe H)

## 2.5 Le choix des amorces

Afin de réaliser une PCR (réaction de polymérisation en chaîne, Polymerase Chain Reaction) sensible et spécifique, des amorces sont dessinées.

Lors de la PCR, afin d'obtenir une amplification spécifique de la zone à étudier, un couple d'amorces doit être défini pour chaque SNP recherché. Les séquences amplifiées doivent comporter 1 maximum de 800 paires de bases (pb) pour obtenir une qualité correcte des électrophorogrammes obtenus lors des séquençages.

Avant tout on recherche une séquence entre 20 et 25 bases. La taille de l'amorce est importante ; au delà de 25 pb la température d'hybridation des amorces à l'ADN se rapproche de la température d'élongation avec un risque de non hybridation des amorces à l'ADN.

Le nombre de « GC » et de « AC » de l'amorce dicte leur température d'hybridation. Le  $T_m$  (melting temperature) de l'amorce peut être calculé selon la formule :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

La température optimale d'hybridation (cf. infra, fonctionnement PCR), est choisi selon le modèle : température optimale d'hybridation =  $T_m$  calculé - 5°C. Cette température d'hybridation peut être comparée à celle fournie par le site primerblast du NCBI.[76]

Primerblast est un outil mis à disposition par le NCBI ; il permet soit de générer des amorces selon la séquence proposée, soit nous pouvons proposer des amorces en les soumettant à cet outil. Le programme informatique propose l'endroit du génome où ces amorces se fixent (spécificité) ainsi que leur sensibilité d'hybridation. (Température d'hybridation optimale)

La spécificité sera quant à elle établie grâce à un logiciel en libre accès sur internet et mis à disposition par l'université de Manchester, le SNPcheck. La ligne de commande est assez simple sans oublier les espaces : Le nom du SNPcheck - espace- le premier primer (amorce) -espace- puis le deuxième primer un espace et le numéro du chromosome.

Ex :

### **Rs1751034 AAATCTGGCAGCTATGC ATCGATCGGTACGTAGCT 26**

On obtient les résultats présentés en annexe I, les SNPs sont placés sur la séquence, afin d'avoir le maximum d'information sur celle-ci. On obtient ainsi des amorces spécifiques si aucun SNPs n'est détecté sur leurs séquences. En effet si un SNP se niche au sein de l'amorce celle-ci ne s'hybridera pas ou peu pendant la réaction de PCR et remettra en cause le protocole de PCR.

### **3. La technique de biologie moléculaire**

Le choix méthodologique pour la recherche des polymorphismes d'ABCC2 et d'ABCC4 est celui du séquençage par électrophorèse capillaire. Celle-ci nécessite la mise en place analytique de méthodes de PCR spécifiques et sensibles, le dessin des amorces pour obtenir ces qualités, la mise au point des méthodes de séquençage et l'analyse des électrophorégrammes à l'aide de logiciels dédiés (Seqscape®, APPLIED Biosystems).

L'ADN est extrait des cellules nucléées du sang périphérique puis il est amplifié par PCR, purifié, et enfin séquencé.

#### **3.1 L'extraction de l'ADN cellulaire**

L'extraction des acides nucléiques s'effectue sur du sang total, leucocytes, prélèvement buccal, tissus, buvard...Les prélèvements sanguins sont effectués sur EDTA. L'Héparine qui est un inhibiteur de la PCR n'est pas recommandée.

Avant l'automatisation du procédé l'extraction de l'ADN se faisait approximativement de la même façon que pour extraire les alcaloïdes de plantes, ou de tissus cellulaires<sup>9</sup>. Cette manipulation était toxique par l'utilisation de solvants organiques volatiles (phénol et chloroforme). Le phénol est déprotéinisant et le chloroforme est dénaturant, l'alcool est utilisé comme anti moussant. Dans un premier temps les cellules sont

---

<sup>9</sup> Extraction par passages d'une phase hydrophile à une phase hydrophobe, permettant la sélection du produit puis purification sur colonne de silice.

lysées et on fait agir une protéase, puis le phénol et le chloroforme sont ajoutés. Enfin le filament d'ADN est dissout dans un tampon.

Aujourd'hui la technique d'extraction est améliorée par un automate le Qiacube™ de Quiagen. De faibles volumes sont utilisés, l'action de la protéase existe toujours en revanche, il y a un passage sur colonne, l'ADN s'adsorbe sur une membrane (ou colonne) de silice, le pH et les sels permettent l'élimination des protéines, l'ADN est ensuite lavé puis élué.

L'ADN est dosé quantitativement par spectrophotométrie UV. L'ADN possède 2 pics d'absorption un à 260 nm et l'autre à 254 nm plus intense. Les protéines absorbent à 280nm pour vérifier la pureté en ADN, un ratio est réalisé entre les deux mesures à 254nm et 280nm.

### **3.2 L'amplification de L'ADN. La polymérisation en chaîne (ou polymérase chain réaction ou PCR)**

La réaction de PCR de cette étude est dite « en point final » ce qui la différencie de la PCR dite « en temps réelle » réalisée avec le Light Cycler® qui permet de suivre la réaction de PCR.

La PCR est l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN de  $2^n$  fois ( $n$ = nombre de copies) soit plus de  $34.10^9$  copies pour 35 cycles. Cette amplification de fragments n'est pas exponentielle sur toute la durée de la PCR, elle suit la relation :

$$X=X_0 \times (1+eff)^n$$

$X_0$ = quantité initiale d'ADN à amplifier,  $n$  est le nombre de cycles,  $Eff$  est l'efficacité de l'amplification.

Les réactifs nécessaires pour réaliser une PCR sont : l'ADN à amplifier, les deux amorces spécifiques, les 4 désoxynucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) en large excès molaire, l'ADN polymérase (Taq polymérase) et le milieu réactionnel constitué d'un tampon et d'une concentration en  $MgCl_2$  pour une activité optimale de la Taq polymérase.

La PCR est la succession de trois étapes thermiques.

1. L'étape de dénaturation de l'ADN permet d'obtenir un ADN monocaténaire pour permettre l'hybridation des amorces. Elle s'effectue à au moins 94 °C et conduit à la rupture des liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires du brin d'ADN bicaténaire, soit 3 liaisons hydrogènes pour les bases complémentaires GC et 2 entre les bases complémentaires AT.

2. L'étape d'hybridation est quasi instantanée, elle se fait aux alentours du Tm des amorces, comportent une vingtaine de résidus de bases (A, T, C ou G).

3. La troisième étape est l'étape d'élongation de l'ADN cible de départ. Cette élongation se fait dans le sens 5'→3' pour les deux amorces, à la température d'activité de l'ADN polymérase, soit à 72°C pour une Taq polymérase.

Ces trois étapes sont répétées sous forme de cycles (n) grâce à des thermocycleurs, avec habituellement n compris entre 30 et 50 cycles.

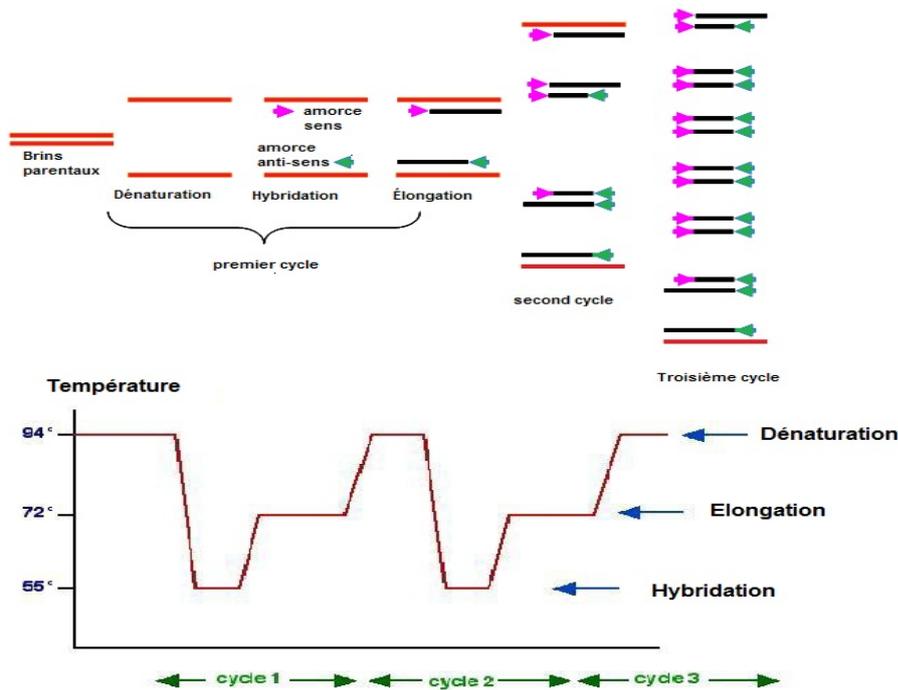


Figure 19 Schéma de cycles PCR et programme selon les protocoles du laboratoire. Les températures indiquées sont uniquement indicatives

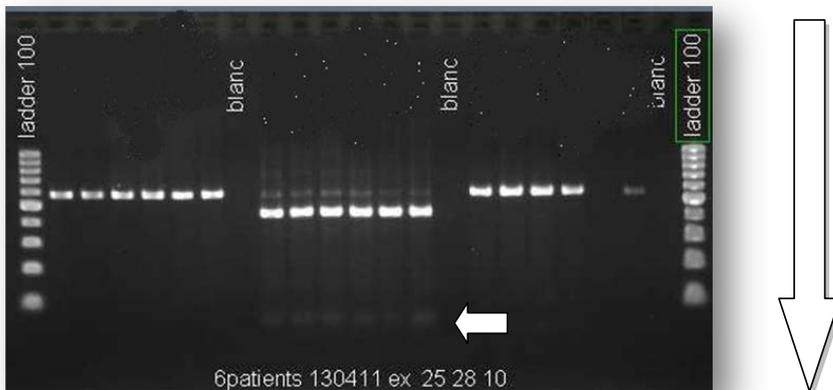
L'ADN polymérase est une enzyme de 94 kilo dalton (KD), il s'agit le plus souvent de Taq polymérase, extrait d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*.

La mise en place d'un protocole de PCR (annexe J) doit permettre d'obtenir une excellente spécificité de la réaction. Pour obtenir 1 amplicon unique, plusieurs paramètres interviennent dont la température d'hybridation des primers, la concentration en MgCl<sub>2</sub> qui est indispensable à l'action de la Taq. La durée des phases de dénaturation et d'élongation de la PCR dépend de la longueur du brin à amplifier. En dessous de 1000pb, 30 à 45 secondes sont suffisantes pour la durée de chaque étape de dénaturation et d'élongation. Pour obtenir un amplicon de bonne qualité nous avons gardé une durée, lors de la phase d'hybridation, d'une minute. La phase d'hybridation étant quasi instantanée nous avons pour cette phase gardée une durée de 45 Secondes. (cf. protocoles Annexe J, le protocole GoTaq green)

Il est à remarquer ici que la plupart des PCR de l'étude ont été faites avec des protocoles amplitaq et amlitaq Gold qui sont utilisées dans le laboratoire pour la réalisation d'autre PCR. Des essais sont réalisés actuellement avec la Go Taq green qui est plus confortable et moins coûteuse (elle est stable, contient les tampons et les révélateurs de migration)

Une fois le matériel génétique amplifié, il convient de vérifier la qualité de la PCR. Pour cela on effectue une électrophorèse du produit PCR obtenu. L'ADN est chargé négativement et migre dans un gel d'agarose de la cathode vers l'anode(+). La densité du gel d'agarose dépend de la taille des ADN amplifiés, plus les brins seront grands moins ils migreront vers l'anode.

Après migration le gel est imprégné dans du bromure d'éthidium et est révélé sous lumière UV.



**Figure 20** Gel de migration de produit PCR (agarose 2%) La grande flèche verticale indique le sens de migration, la petite flèche horizontale montre des dimères d'amorces.

Des marqueurs de taille (Ladder), permettent la lecture de taille de l'amplicon. Ici un trait toutes les 100pb, d'où son nom Ladder 100. Les signaux observés pour l'exon 25 (environ 580 bases) sont précis (voir les 6 spots à gauche sur la figure20), l'exon 28 a migré à environ 400 bases. Il manque de spécificité nous observons des trainées d'ADN et des dimères d'amorces (flèche horizontale de la figure 20) pour améliorer la spécificité de la réaction de PCR de l'exon 28, nous avons augmenté la température d'hybridation de 2°C et diminué la concentration en amorces.

### 3.3 Le séquençage (feuille de protocole de séquençage en annexe M)

Le principe du séquençage est de lire la séquence de l'amplicon après migration électrophorétique capillaire (l'ADN chargé négativement migre vers l'anode dans un capillaire). La détection des fragments d'ADN est réalisée par spectrophotométrie UV selon la longueur d'onde du fluorochrome fixé sur le dernier ddNTP incorporé et qui est spécifique de la base purique ou pyrimidique qu'il contient.

Le produit de PCR obtenu, doit être purifié afin d'éliminer l'excès de réactifs de la réaction de PCR (amorces et dNTPs). Pour cela on incube le produit PCR avec une enzyme,

ExoSap-it, a 37°C pour activer l'enzyme pendant 15 minutes et ensuite 15 minute à 80°C pour l'inactiver.

La réaction de séquençage est la réaction qui permet après incubation de différents réactifs, de lire la séquence ADN que l'on a amplifié. Pour chaque séquence que l'on veut observer, deux puits sont utilisés. On dispose dans les deux puits le produit PCR traité par l'ExoSap-it, on ajoute le Big Dye® qui est constitué de plusieurs réactifs dont une Taq polymérase avec son tampon, des dNTPs (désoxynucléotide tri phosphates) non marqués et des ddNTPs (didésoxy NTP) marqués par un fluorochrome spécifique de chaque base. Le Big Dye® contient aussi du MgCl<sub>2</sub> indispensable à l'activité de la Taq polymérase. Puis, à la différence de la réaction de PCR où on ajoutait les deux amorces, sens et anti sens dans le même milieu, on incorpore l'amorce sens dans le premier puits et l'amorce anti sens dans le second. Chaque paire de puits représente l'analyse d'une séquence pour un patient.

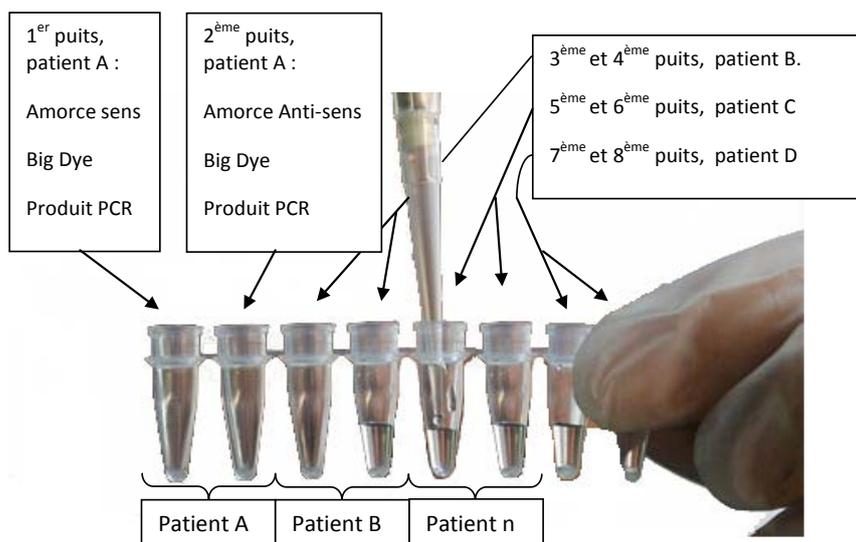
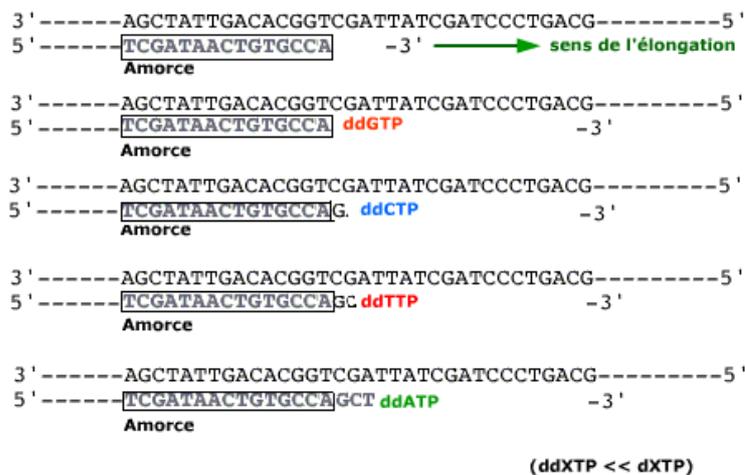


Figure 21 Schéma technique de la disposition des produits de séquençage.

On ne cherche plus à amplifier une séquence (PCR) mais à incorporer les ddNTPs marqué pour lire la séquence. Le ddNTP stoppera l'élongation du brin complémentaire de l'ADN matrice car il ne possède plus le groupement hydroxyle (3') lui permettant de fixer par hydrolyse le phosphate 5' du nucléotide suivant. Il s'agit de la réaction découverte par Sanger en 1977 qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1980.



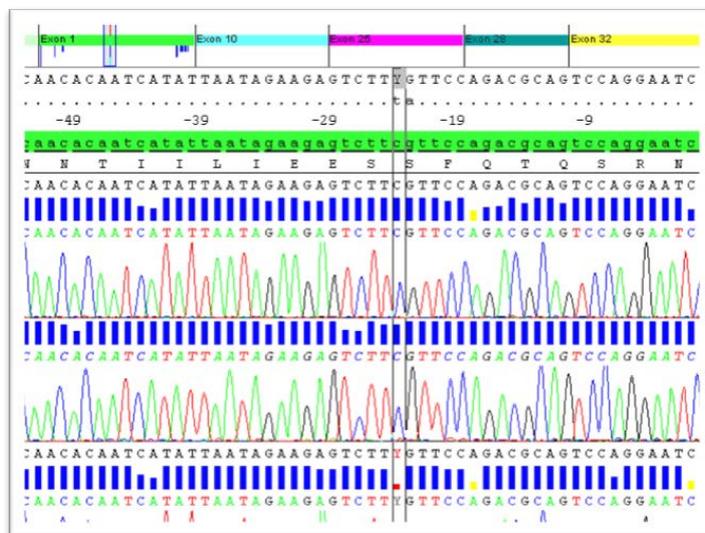
**Figure 22 Réaction de séquençage selon la méthode de Sanger.** Chaque lettre est un nucléotide (Adénosine, thymidine, cytosine, guanosine), ddXTP : didésoxyguanosine triphosphate, didésoxyadénosine triphosphate, didésoxythymidine triphosphate, didésoxycytidine triphosphate. dXTP : désoxy nucléoside triphosphate. D'après KOOLMAN. J[77]

Le milieu d'incubation avec tous ses réactifs est mis à incuber en thermocycleur, 30 cycles avec les mêmes étapes que pour une PCR classique. Le produit est ensuite purifié par centrifugation sur colonne. Enfin les ddNTP fixés aux séquences seront lus grâce aux séquenceurs capillaires. Une feuille de route est ensuite préparée pour permettre le traitement des données par les séquenceurs elle contient les références des patients.

#### 4. L'analyse des données

##### 4.1 Analyses des données du séquençage.

Les données sont analysées grâce à un logiciel de lecture du séquençage, Seqscape<sup>®</sup>, on peut traiter plusieurs amplicons à la fois ainsi que plusieurs patients simultanément. Pour effectuer la lecture du séquençage, il faut au préalable intégrer la séquence du ou des amplicons recherchés (Partie 2, §2) avec la position de leurs SNPs dans la base de données du logiciel.



**Figure 23 Exemple de tracé électrophorétique obtenu après séquençage.**

Nous pouvons observer ici le rendu des résultats obtenu par le logiciel Seqscape®. Le polymorphisme T recherché ici sur l'exon 1 de ABC2 est retrouvé, il remplace la base C sauvage. Le résultat de séquençage donne deux tracés par patients un tracé pour la lecture SENS et un deuxième tracé pour la lecture ANTI SENS.

## 4.2 Analyses statistiques

Les résultats sont descriptifs, il s'agit de variables continues qui sont exprimées avec la médiane et leurs quartiles. Ces variables continues sont comparées grâce à l'utilisation du test non paramétrique de Wilcoxon, Mann et Whitney et du test paramétrique du t de Student. Pour la comparaison de proportions, le test du Khi deux a été utilisé avec la correction de Yates ou de Fisher.

Toutes différences avec des valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

### 4.2.1 Critères d'inclusion et d'exclusion de la population étudiée

Tous les patients de l'étude prennent du Ténofovir, que cela soit sous forme de Viread®, Truvada® ou Atripla®.

La clairance rénale à la créatinine des patients a été calculée par la formule du MDRD dans le cadre de la routine ce qui nous a permis de créer deux groupes, un groupe avec une fonction rénale normale et un groupe avec une fonction rénale altérée. Le seuil a été fixé à  $80\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  Cette valeur représente la fonction rénale moyenne de sujet sans atteinte rénale moins l'altération de la fonction rénale ( $-10\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ) observée lors d'infection par le VIH.[2] (cf. supra)

Les patients ont été inclus dans l'étude de façon consécutive et n'ont pas fait état d'autre sélection.

Deux patients ont été exclus de l'étude, une patiente pour avoir tenté de se suicider au Ténofovir (ingestion de 50 comprimés), et un patient pour anomalie des temps de dosage, ce qui aurait faussé les données pharmacocinétiques.

## **5. L'exposition plasmatique au Ténofovir**

Elle est évaluée après détermination de la concentration plasmatique du Ténofovir à un temps donné mais précis après la dernière administration médicamenteuse de cet antirétroviral. Cette mesure plasmatique est réalisée en routine dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique du laboratoire par une méthode validée de type HPLC couplée à une détection UV et par spectrométrie de masse [3].

L'exposition plasmatique au Ténofovir est évaluée par le calcul de l'ASC estimée sur 24h. Ce calcul est effectué selon des données de pharmacocinétiques établies lors d'un précédent travail du laboratoire par un logiciel de modélisation pharmacocinétique du Ténofovir se nommant ADAPT®. Les éléments utiles à ce calcul sont, outre la concentration plasmatique en Ténofovir à un ou plusieurs temps  $t$  suivant la dernière administration, le poids du patient, la créatininémie.

--  
TROISIÈME PARTIE  
--  
RÉSULTATS - DISCUSSION

## 1. RESULTATS

### 1.1 La population générale

La population de l'étude est composée de 31 patients dont 8 femmes. Ils ont été identifiés pour la période du 1<sup>er</sup> mars au 11 avril 2011 et inclus de façon consécutive dans l'étude. Pour chacun d'eux, les polymorphismes de 6 SNPs de ABCC2 ainsi que 4 SNPs de ABCC4 retenus pour leur fréquence allélique d'au moins 5% dans la population générale ont été déterminés.

Aucune femme ne présente d'insuffisance rénale (définie par un MDRD < 80 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> pour l'étude) dans notre population. Une femme a été exclue de l'étude car il s'agissait d'un cas de tentative de suicide avec du Ténofovir.

Une comparaison entre les femmes sans Insuffisance rénale (IR) et les hommes sans IR a été établie pour vérifier s'il existe une différence significative. Seule la créatinine entre les deux groupes s'est avérée être différente ( $p = 0,009$ ) ce qui est normal en raison de la masse musculaire différente entre les sexes.

En raison de l'absence de femmes présentant une IR, nous avons également comparé les hommes entre eux selon qu'ils aient ou non une insuffisance rénale selon leurs âges, leurs poids, leurs taux de créatinine sérique, leur clairance MDRD, leurs aires sous la courbe (ASC), leurs ratio poids/ créatinine sérique. Les âges, les poids sont homogènes dans les deux groupes. L'ASC n'a pas montré de différence significative ( $p = 0,08$ ) contrairement à ce que nous attendions. Par contre la créatinine, la clairance MDRD et le ratio poids/ créatinine sont très significativement différents. ( $P \ll 0,05$ )

### 1.1.1 Selon le sexe des patients

Ce tableau (Tableau VIII) montre en effet des différences significatives entre hommes/femmes pour l'âge, les femmes sont plus jeunes que les hommes d'environ 10ans. La créatinine, l'ASC, et le ratio poids /créatinine, présentent également des différences significatives. Ainsi, la clairance à la créatinine selon la formule du MDRD est plus élevée chez les hommes que chez les femmes de 20mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Ce qui semble normal. La clairance ne présente pas de différence significativité entre les deux groupes sexes. Par contre l'ASC semble plus importante pour les hommes avec une ASC > de 0,5 mg.h/L. Le ratio poids sur créatinine est à l'inverse supérieur dans le groupe des femmes ; cela concorde avec une clairance inférieure chez les femmes.

**Tableau VIII Comparaison selon les groupes sexe.**

		médiane	moyenne	$\sigma$	$\sigma^2$	CV %	p<0,05	IC 95%
<b>âge</b>	femme	38,5	38,8	11,6	135,4	0,3		[30,76 ; 46,8]
	homme	50,0	49,3	13,6	183,8	0,3	0,048	[43,74 ; 54,8]
<b>poids</b>	femme	62,0	65,6	21,1	443,1	0,3		[50,98 ; 80,2]
	homme	66,0	65,8	8,5	73,0	0,1	0,602	[62,33 ; 69,2]
<b>créatinine</b>	femme	61,5	58,5	8,9	78,6	0,2		[52,33 ; 64,6]
	homme	88,0	89,4	22,1	490,4	0,2	0,0006	[80,37 ; 98,4]
<b>CI MDRD</b>	femme	104,0	110,1	23,2	539,6	0,2		[94,02 ; 126,1]
	homme	85,0	92,2	33,0	1088,5	0,4	0,095	[78,71 ; 105,6]
<b>ASC</b>	femme	1,5	1,6	0,7	0,5	0,5		[1,11 ; 2,0]
	homme	2,0	2,1	0,7	0,4	0,3	0,041	[1,81 ; 2,3]
<b>poids /créatinine</b>	femme	1,1	1,2	0,8	0,7	0,7		[0,65 ; 1,7]
	homme	0,7	0,8	0,2	0,0	0,3	0,039	[0,72 ; 0,8]

CV :  $\sigma$  : écart type ;  $\sigma^2$  : variance ; coefficient de variation ; MDRD Modification of the diet in renal disease ; ASC aire sous la courbe ; âge en années, poids en Kg, créatinine en  $\mu\text{mol/L}$ , ASC h.mg/L ; poids/créatinine en Kg.L/ $\mu\text{mol}$ .

### 1.1.2 Selon la fonction rénale

La population étudiée comporte 10 insuffisants rénaux (32%). Le seuil de l'insuffisance rénale a été fixé pour cette étude à une clairance MDRD < 80 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.

**Tableau IX Caractéristiques de la population selon le groupe des insuffisants rénaux et non insuffisant rénaux pour une valeur limite de la clairance de 80 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.**

		moyenne	médiane	$\sigma$	$\sigma^2$	CV %	p<0,05	IC 95%
<b>âge</b>	IR	54,7	50,0	11,7	136,5	21,4		[47,4 ; 62,0]
	non IR	42,7	46,0	13,1	172,5	30,7	0,044	[37,1 ; 48,3]
	totale	46,6	48,0	13,7	188,4	29,5		[41,8 ; 51,4]
<b>poids</b>	IR	66,0	66,0	5,8	33,1	8,7		[62,4 ; 69,6]
	non IR	65,7	65,0	14,8	220,4	22,6	0,626	[59,4 ; 72,0]
	totale	65,8	66,0	12,5	156,9	19,0		[61,4 ; 70,2]
<b>créatinine</b>	IR	107,0	105,5	19,3	372,0	18,0		[95,0 ; 120,2]
	non IR	69,3	70,0	14,2	201,8	20,5	9,2E-5	[63,2 ; 75,4]
	totale	81,5	79,0	23,8	567,3	29,2		[73,1 ; 89,9]
<b>CI MDRD</b>	IR	64,4	64,5	9,0	80,3	13,9		[58,8 ; 70,0]
	non IR	112,3	108,0	25,9	668,6	23,0	9,9E-6	[101,2 ; 123,4]
	totale	96,8	93,0	39,8	1583,4	41,1		[82,8 ; 110,8]
<b>ASC</b>	IR	2,4	2,2	0,6	0,4	26,9		[2,0 ; 2,8]
	non IR	1,8	1,7	0,7	0,4	37,0	0,024	[1,5 ; 2,1]
	totale	2,0	2,0	0,7	0,5	35,7		[1,8 ; 2,2]
<b>poids /créatinine</b>	IR	0,6	0,6	0,1	0,0	22,2		[0,5 ; 0,7]
	non IR	1,0	0,9	0,4	0,1	35,4	0,0007	[0,8 ; 1,2]
	totale	0,9	0,8	0,3	0,1	39,0		[0,8 ; 1,0]

CV :  $\sigma$  : écart type ;  $\sigma^2$  : variance ; coefficient de variation ; MDRD Modification of the diet in renal disease ; ASC aire sous la courbe ; âge en années, poids en Kg, créatinine en  $\mu\text{mol/L}$ , ASC h.mg/L ; poids/créatinine en Kg.L/ $\mu\text{mol}$ .

Des différences significatives sont observées entre les deux groupes (IR/non IR) pour l'âge, pour la créatinine, pour le calcul de la clairance par la formule du MDRD, pour le ratio poids /créatinine ainsi que pour l'exposition au Ténofovir représentée par l'Aire sous la courbe, Ces statistiques populationnelles étaient attendues puisque les deux groupes ont été séparés grâce à leur valeur de clairance.

Les patients sont plus âgés dans le groupe IR, on remarque dans le groupe non IR une répartition plus large CV (30% vs 21% pour IR) de l'âge.

### 1.1.3 Corrélation entre les différents phénotypes dans chaque population de l'étude

Dans l'étude nous avons 3 populations : la population totale, la population d'insuffisants rénaux et la population de non insuffisants rénaux. Pour chacun d'eux nous avons recherché s'il existait une corrélation entre les différents groupes phénotypiques dans chaque population (3 populations dans l'étude,).

**Tableau X Tableau récapitulatif des tests de corrélation effectués dans l'étude. (Test de corrélation de Spearman)**

	âge	poids	Créatinine μmol/L	MDRD mL/min/1,73 m <sup>2</sup>	ASC h.mg/L	poids/ créatinine
âge						
poids	A1					
Créatinine	A2	A6				
MDRD	A3	A7	A10			
ASC	A4	A8	A11	A13		
poids/créatinine	A5	A9	A12	A14	A15	

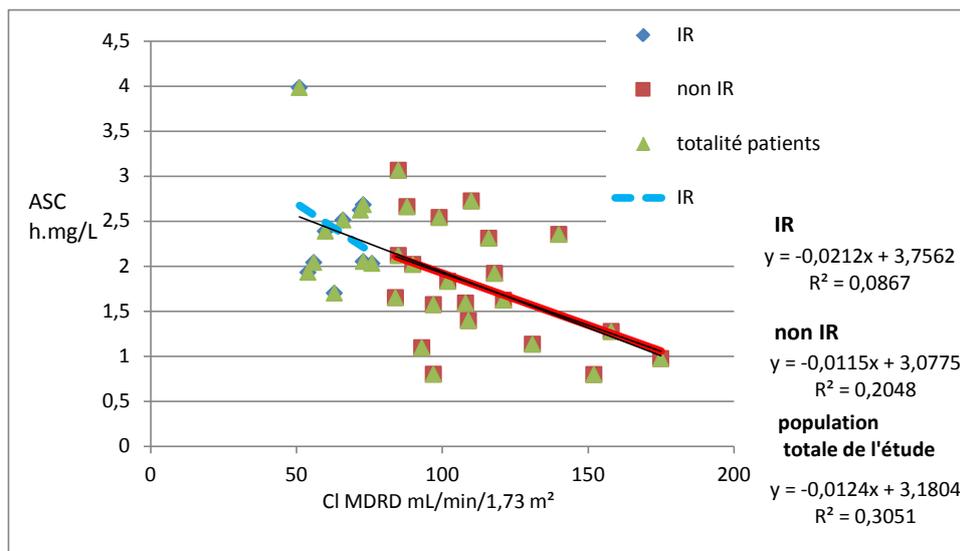
MDRD Modification of the diet in renal disease ; ASC aire sous la courbe ; grisé : différence significative ; exemple : A1 est la recherche d'une relation entre l'âge et le poids pour la population générale de l'étude (n= 31 patients), pour la population d'IR (n1=10) et pour la population de non IR (n=21) ; A2 : est la recherche d'une relation entre âge et le poids pour les 3 populations.

Nous observons une corrélation positive ( $r = 0,4$  p-value = 0,037) entre l'âge et la créatinine (A2) pour la population totale de l'étude, mais pas pour les deux populations phénotypiques d'insuffisants rénaux et de non insuffisants rénaux. La même relation est observée dans le cas A4 ( $r = 0,37$  p-value 0,037) entre âge et ASC.

Une corrélation négative  $r = -0,45$   $p\text{-value} = 0,01$  est observée entre l'âge et la clairance MDRD (A3), la clairance diminue quand l'âge augmente, l'observation n'est faite que pour la population totale mais pas en sous groupe.

Des liaisons existent entre la créatinine, la clairance MDRD et l'ASC pour la totalité de la population étudiée ainsi que pour la population non insuffisante rénale (A10 à A15). Ces dernières observations n'ont été faites que sur la population totale de l'étude. Des corrélations, d'A10 à A15 (Cf. tableau X), ont été montrées pour la population de non insuffisants rénaux mais jamais pour les 10 insuffisants rénaux. Cela peut être dû au faible nombre de patients présent dans cette dernière sous population.

Nous nous sommes attardés sur la présence d'une corrélation entre l'ASC et la clairance MDRD. (A13)



**Figure 24 Représentation graphique de la liaison entre L'ASC et la clairance approximée par la formule du MDRD. ASC : aire sous la courbe ; Cl : clairance ; IR : insuffisants rénaux ; non IR : non insuffisants rénaux.**

Le test statistique selon Spearman ne permet pas de trouver de corrélation significative entre l'ASC (représentant l'exposition au Ténofovir) et la clairance MDRD quand il s'agit du groupe IR ( $p = 0,98$ ) ou du groupe non IR ( $p = 0,08$ ), bien que le

graphique ci-dessus montre une tendance à une augmentation de l'ASC du ténofovir quand la clairance MDRD diminue. Lorsqu'il s'agit du groupe populationnel en entier la liaison est significative et négative ( $p = 0,003$  ;  $r = -0,507$ ).

Aucun patient n'a d'insuffisance rénale en dessous du seuil de  $50\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ . Ce qui correspond au seuil d'adaptation posologique.

## **1.2 Relation Phénotypes et SNPs**

### **1.2.1 Les Single nucléotide polymorphism (SNPs) d'intérêt recherchés par séquençage dans la population de l'étude.**

Pour chacun des deux groupes, IR/non IR, tel que précédemment définis, le nombre de SNPs qu'ils soient homozygotes sauvages, hétérozygotes ou bien homozygotes mutés a été défini. Les données sont retranscrites dans le Tableau XII. Ce tableau possède deux entrées, les SNPs de l'étude sont représentés par colonnes et pour chaque ligne nous retrouvons un patient. Un second tableau juxta celui des SNPs, il s'agit du tableau contenant les valeurs biologiques des 6 phénotypes étudiés. Les parties grisées(ou vertes) de ces valeurs phénotypiques montrent les patients ayant une fonction rénale altérée.  $\text{DFG} < 80\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ .

Pour faciliter l'utilisation des données et éviter la surcharge des graphiques, le tableau suivant regroupe toutes les données nécessaires des différents SNP étudiés.

Tableau XI Récapitulatif des différents SNPs de l'étude.

Dénomination Du SNP dans Cette partie	Référence SNP	Variation Position dans le gène	locus du gène et variations protéique	Fréquence allélique Allèle (%)
<b>ABCC2</b>				
<b>SNP 1</b>	rs2804402	-1019A/G	Promoteur 5'UTR	A (64) G (36)
<b>SNP 2</b>	rs717620	-24C/T	Promoteur 5'UTR	C (86,5) T (13,5)
<b>SNP 3</b>	rs2273697	1249G/A	Exon10 Val417Ile	G (85) A (15)
<b>SNP 4</b>	rs17222723	3563T/A	Exon25 Val1188Glu	T (94,2) A (5,8)
<b>SNP 5</b>	rs3740066	3972C/T	Exon 28 Ile1324Ile	C (69,1) T (30,9)
<b>SNP 6</b>	rs8187710	4544G/A	Exon 32 Cys/Tyr 1515	G (88,5) A (11,5)
<b>ABCC4</b>				
<b>SNP 7</b>	rs1926657	C/T	Intron 4	C (74) T (26)
<b>SNP 8</b>	rs2274407	1031G/T	Exon 8 304Lys/Asp	G (81) T (19)
<b>SNP 9</b>	rs1751034	3463A/G	Exon 26 Lys/lys 1116	A (77) G (23)
<b>SNP 10</b>	rs9561778	3366+1243 G>T	Intron 26	G (80) T (20)

SNP single nucleotide polymorphism; UTR: untranslated region; Val: valine; Ile: isoleucine; asp: asparagine;  
Tyr: tyrosine; Cys: cystéine.

Nous avons effectué tout d'abord une comparaison entre la population de l'étude et la population générale dont les fréquences ont été relevées sur le site du NCBI [78]. Grâce

au test du Khi2 nous mettons en évidence une différence significative entre les deux populations pour les SNPs 6 (exon 32 rs8187710 d'ABCC2) et 8 (exon 8 rs2274407 d'ABCC4).

**Tableau XII Comparaison des données de la population générale.**

SNP n°	% G	% A	p
<b>6</b> pop étude	67	33	0,004
popG	88,5	11,5	
	% C	% A	
<b>8</b> pop étude	98	2*	
popG	81	19	0,0002

\*correction de Yates ; pop G : population générale ; pop étude : population de l'étude

Le SNP n°8 présent sur l'exon 8 d'ABCC4 n'a présenté qu'un seul variant hétérozygote pour 31 patients et rend toutes évaluations, sur cet exon, impossible. En ce qui concerne le SNP n°6 de l'exon 32 d'ABCC2 nous observons cette légère différence de répartition entre les deux populations de l'étude et la population générale par rapport aux données de la littérature. Cette variation dans le sens de l'augmentation du nombre de polymorphismes ne pose pas de problème pour la réalisation de tests statistiques puisque nous avons une plus grande hétérogénéité de répartition. Cela ne nous expose pas au problème rencontré dans le cas du SNP de l'exon. Cette différence à probablement joué sur les résultats que l'on trouve par la suite. (cf. infra)

Les fréquences des autres SNPs observées entre la population générale et la population de l'étude sont similaires pour tous les autres SNPs.

Tableau XIII Données brutes de la recherche par séquençage des SNPs d'intérêts pour les 31 patients.

nom prénom	sexe	ABCC2 prom A/G	ABCC2 ex1 -24 C/T	ABCC2 10 G/A	ABCC2 25 T/A	ABCC2 28 C/T	ABCC2 32 G/A	INT4 78613 T/C	Ex8 94534 C/A/G/T	Ex 26 238593 T/C	int 26 239724	âge	poids	créatinine $\mu\text{mol/L}$	MDRD mL/min/1,73 m <sup>2</sup>	AUC h.mg/L	poids/créatinine
amfa	f	A/G	C/C	G/G	T/T	C/C	G/G	T/T	C/C	C/T	T/T	59	36	64	88	2,66	0,56
auso	f	G/G	C/C	G/A	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	C/T	T/G	29	80	45	152	0,7966	1,78
badi	m	A/A	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/A	T/T	T/T	49	69	101	72	2,62	0,68
beis	f	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/A	C/C	C/C	T/T	T/T	48	100	61	97	0,7985	1,64
bema	m	A/A	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	55	63	84	116	2,31	0,75
brri	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	50	66	109	66	2,51	0,61
caer	m	A/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	50	69	66	118	1,919	1,05
dado	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	48	64	72	108	1,59	0,89
drmo	m	A/G	C/C	G/A	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	50	66	47	175	0,971	1,40
dugu	m	A/A	C/C	G/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	64	66	84	110	2,722	0,79
fabr	f	A/G	C/C	G/A	T/T	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	39	60	52	121	1,62	1,15
firo	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	63	65	65	63	1,7	1,00
gafr	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	66	67	79	90	2,018	0,85
havi	f	G/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	38	45	62	99	2,538	0,73
kear	m	A/A	C/C	G/G	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	47	66	89	85	2,116	0,74
khmo	m	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	37	55	102	76	2,027	0,54
lade	m	A/A	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	71	73	111	60	2,386	0,66
lala	f	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/A	T/T	C/C	C/T	T/T	20	64	64	109	1,394	1,00
laph	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	46	64	89	85	3,065	0,72
lebr	m	A/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/T	46	65	101	73	2,05	0,64
lipa	m	A/A	C/C	G/G	T/T	C/C	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	50	65	75	102	1,83	0,87
meat	m	G/G	C/C	G/G	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	64	74	120	56	2,04	0,62
mibr	m	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/A	T/T	C/C	T/T	T/T	35	90	88	93	1,093	1,02
muva	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/C	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	22	42	70	140	2,352	0,60
odmi	m	G/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	31	74	85	97	1,57	0,87
pecoda	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	23	58	59	158	1,273	0,98
pije	m	G/G	C/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	46	66	139	51	3,98	0,47
poro	m	G/G	C/C	G/G	T/A	C/T	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	71	68	122	54	1,93	0,56
ridi	m	A/G	C/C	G/G	T/A	C/C	G/A	C/C	C/C	C/T	T/G	50	59	100	73	2,68	0,59
umhe	f	A/A	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/T	37	83	49	131	1,131	1,69
woro	f	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	40	57	71	84	1,65	0,80

### 1.2.2 Phénotypes et variants. La fréquence des SNPs dans la population étudiée.

Deux tableaux XIV et XV représentent pour l'un, les données numériques brutes du nombre de SNPs pour 31 patients et pour l'autre, la fréquence en pourcentage de ces SNPs en fonction des deux groupes phénotypiques IR/non IR.

**Tableau XIV Le nombre de SNPs.**

SNPs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<b>IR</b>	4	3	2	3	6	3	2	1	5	4	Hétérozygotes
	2	7	8	7	2	7	0	9	5	6	Homozygotes sauvages
	4	0	0	0	1	0	8	0	0	0	Homozygotes mutés
<b>total</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
<b>non IR</b>	11	3	9	3	12	7	10	0	4	2	Hétérozygotes
	5	17	12	18	8	14	3	21	15	18	Homozygotes sauvages
	5	1	0	0	1	0	8	0	1	1	Homozygotes mutés
<b>total</b>	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	

IR : insuffisant rénaux ; non IR : non : insuffisant rénaux ; SNP : single nucleotide polymorphism

**Tableau XV La fréquence des SNPs**

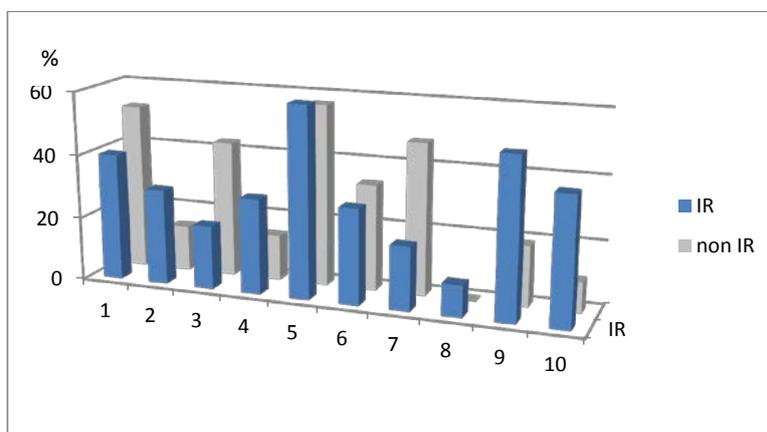
%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<b>IR</b>	40	30	20	30	60	30	20	10	50	40	Hétérozygotes
	20	70	80	70	20	70	0	90	50	60	Homozygotes sauvages
	40	0	0	0	10	0	80	0	0	0	Homozygotes mutés
<b>total</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<b>non IR</b>	52,4	14,3	42,9	14,3	57,1	33,3	47,6	0,0	19,0	9,5	Hétérozygotes
	23,8	81,0	57,1	85,7	38,1	66,7	14,3	100,0	71,4	85,7	Homozygotes sauvages
	23,8	4,8	0,0	0,0	4,8	0,0	38,1	0,0	4,8	4,8	Homozygotes mutés
<b>total</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

IR : insuffisant rénaux ; non IR : non : insuffisant rénaux ; SNP : single nucleotide polymorphism

Les trois graphiques ci-dessous représentent une comparaison de fréquence du tableau XV (Y) en fonction de chaque SNP (X) dans les deux groupes de patients, l'un ayant une fonction rénale altérée appelé « IR » (Cl MDRD < 80mL/min/1,73m<sup>2</sup>) et ceux qui ont une fonction rénale normale dit « non IR » (Cl MDRD > 80mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Le premier graphique présente cela pour les hétérozygotes, le deuxième présente cette comparaison pour les homozygotes sauvages et le dernier présente cette comparaison de fréquence pour les homozygotes mutés.

L'observation faite sur ce premier graphique est une variation pour les SNPs 7, 9 et 10 entre les 2 populations IR et non IR. Il s'agit de 3 des 4 SNPs d'ABCC4. Le SNP 8 présent sur l'exon 8 n'a pas été retenu ; un seul patient ayant été retrouvé hétérozygote pour ce polymorphisme pour 31 patients séquencés.

La tendance va vers une augmentation des hétérozygotes chez les non IR pour le SNP 7 (20% vs 47%, p = 0,45) et la tendance inverse s'observe pour les deux autres SNPs 9 et 10 (50% vs 19%, p = 0,45; 40% vs 9.5%, p = 0,17).

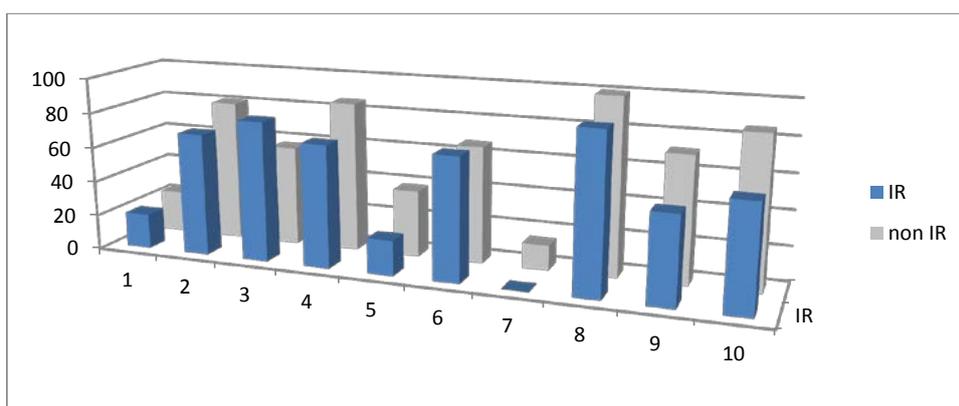


% : fréquence ; IR : insuffisance rénale ; non IR : non insuffisance rénale

**Figure 25 Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des hétérozygotes en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur).**

La tendance d'une différence de fréquence entre les deux groupes (selon la fonction rénale) observée sur le graphique précédent (figure 26), la fréquence du nombre

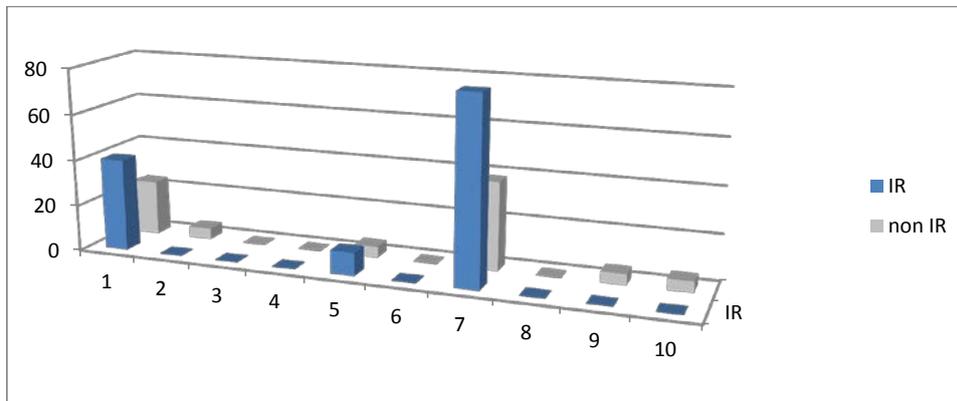
d'homozygote est augmentée dans le groupe non IR, mais moins visible ici. Néanmoins ces résultats sont interdépendants des données précédentes puisque si l'un des groupes hétérozygotes, homozygotes sauvage ou homozygotes mutés, est plus fréquent, les deux autres groupes, à l'inverse seront moins fréquents. Mais en ce qui concerne les homozygotes sauvages peu de variations entre les fréquences de deux groupes (IR/nonIR) ne sont mis en évidence.



% : fréquence ; IR : insuffisant rénaux ; non IR : non insuffisant rénaux

**Figure 26 Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des homozygotes sauvages en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur).**

Ce dernier graphique (Figure 28) montre que la différence de fréquence des homozygotes mutés entre les deux populations étudiées est importante (80% vs 38% équivalent à 8/10 et 8/21 respectivement) pour le SNP7 situé sur l'intron 4 de ABCC4, mais cette différence n'est pas significative ( $p = 0.38$ ).



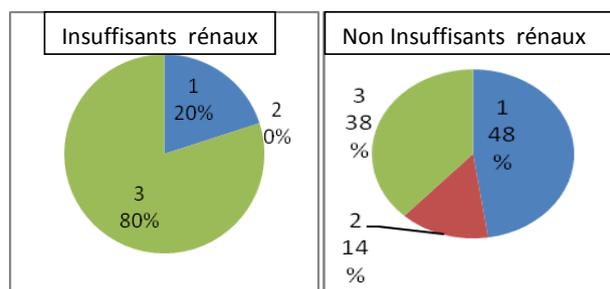
% : fréquence ; IR : insuffisant rénaux ; non IR : non insuffisant rénaux

**Figure 27** Représentation graphique des fréquences (en ordonnée) des homozygotes mutés en fonction des différents SNPs (abscisse), comparée selon la fonction rénale en Z (profondeur).

Afin de mieux voir les résultats pour le SNP7 (intron 4, rs1926657) une représentation en camembert apporte une vue d'ensemble. (Figure 29)

3 patients sur 21 non insuffisant rénaux sont homozygotes sauvages. En raison du faible nombre de patients de l'étude et de la fréquence de ce polymorphisme homozygote sauvage, il n'est pas possible de conclure sur son effet protecteur sur la survenue d'une insuffisance rénale sous Ténofovir

Les tests statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative. ( $p = 0.054$ )



**Figure 28** Représentation des fréquences des variants du SNP 7 présent sur l'intron 4 d'ABCC4 selon la population IR à gauche et non IR à droite. ({1} Hétérozygotes, {2} Homozygote sauvages, {3} Homozygotes mutés.)

Dans l'optique d'approfondir l'étude de répartition de ces fréquences nous avons réalisé des tests de Fisher en comparant les répartition par SNPs les trois critères hétérozygotes, homozygotes sauvage et homozygotes mutés en fonction de leur état rénal. Les résultats sont classés en fonction du génotype et en fonction des allèles de chaque SNP de l'étude. Les résultats sont présentés dans le tableau XVI.

**Tableau XVI Fréquences génotypiques et alléliques des dix polymorphismes de l'étude en fonction de la présence ou l'absence d'insuffisance rénale.**

Gène (protéine), position, SNP, et génotype ou allèle	Patients avec fonction rénale altérée (n=10) n (%)	Patients avec fonction rénale tubulaire normale (n=21) n (%)	P	OR	IC 95%
<b>ABCC2 (MRP2)</b>					
1019 A>G, promoteur, rs2804402					
A/A	2(20)	5(23)	1	0,80	[0.0634 ; 6.432]
A/G	4(40)	11(52)			
G/G	4(40)	5(23)			
A	8(40)	21(50)			
G	12(60)	21(50)	0,588	0,67	[0.19 ; 2.22]
-24 C >T, promoteur proche exon 1, rs717620					
C/C	7(70)	17(81)	0,651	0,56	[0.07 ; 4.84]
C/T	3(30)	3(14)			
T/T	0	1(5)			
C	17(85)	37(88)			
T	3(15)	5(12)	0,705	0,77	[0.1314 ; 5.5251]
-1249 G>A, exon 10, rs2273697					
G/G	8(80)	12(57)	0,261	2,9	[0.42 ; 34.60]
G/A	2(20)	9(43)			
A/A	0	0			
G	18(90)	33(79)			
A	2(10)	9(21)	0,478	2,42	[0.43 ; 25.44]
3563 T>A, exon 25, rs17222723					
T/T	7(70)	18(86)	0,357	0,40	[0.042 ; 3.74]
T/A	3(30)	3(14)			
A/A	0	0			
T	17(85)	39(93)			
A	3(15)	3(7)	0,377	0,44	[0.05 ; 3.64]

3972 C>T, exon 28, rs3740066					
C/C	2(20)	8(38)	0,674	0,47	[0.039 ; 3.44]
C/T	7(60)	12(57)			
T/T	1(10)	1(5)			
C	11(55)	28(66)			
T	9(45)	14(33)	0,559	0,63	[0.17 ; 2.28]
4544 G>A, exon 32, rs8187710					
G/G	7(70)	14(66)	1	1,16	[0.18 ; 9.12]
G/A	3(30)	7(33)			
A/A	0	0			
G	17 (85)	35(83)			
A	3(15)	7(17)	1	1,13	[0.222 ; 7.619]
<b>ABCC4 (MRP4)</b>					
Position intronique C>T, Int 4 78613, rs1926657					
T/T	0	3(14)	0,053	6,1	[0.8996 ; 73.427]
T/C	2 (20)	10(47)			
C/C	8(80)	8(38)			
T	2(10)	16(38)			
C	18(90)	26(62)	0,06236	0,28	[0.0223 ; 1.1974]
1031G/T Exon 8, rs2274407, 94534 C/A/G/T					
C/C	9(90)	21(100)	0,322		
C/A	1(10)	0			
A/A	0	0			
C	19(95)	42(100)			
A	1(5)	0	0,322		
3463 A/G (T/C anti sens) Exon 26, rs1751034, 238593					
T/T	5(50)	15(71)	0,23	0,28	[0.051 ; 2.1975]
T/C	5(50)	5(24)			
C/C	0	1(5)			
C	15(75)	35(83)			
T	5(25)	7(17)	0,48	0,53	[0.1149 ; 2.5877]
Position intronique 3366+1243 G>T, Intron 26, rs9561778 239724					
T/T	6(60)	18(86)	0,17	0,26	[0.0293 ; 2.0432]
T/C	4(40)	2(9)			
C/C	0	1(5)			
T	16(80)	38(90)			
C	4(20)	4(10)	0,418	0,42	[0.0701 ; 2.5956]

IC : intervalle de confiance ; OR Odd Ratio

Ces calculs n'ont pas permis de montrer une différence significative, même si pour le SNP7 de l'intron 4 de ABCC4, les calculs ont permis de s'approcher fortement de la significativité. ( $p = 0,053$ ).

### 1.2.3 Variants et phénotypes. Comparaison entre groupe présentant le SNP variant et un groupe qui ne présente pas le SNP variant.

Des groupes ont été définis en fonction de la présence ou de l'absence d'un variant. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour l'ensemble des critères phénotypes (Créatinine, Clairance MDRD, ASC du Ténofovir et Ratio poids/créatinine) pour tous les SNPs de MRP4.

Cette comparaison a permis de mettre en évidence des différences significatives entre le variant hétérozygote G/A du SNP6 situé sur l'exon 10 de ABCC2 (rs2273697) à l'opposé du variant sauvage (G/G) homozygote, pour la comparaison de la clairance MDRD. Les données nous indiquent que posséder le génotype hétérozygote pour ce SNP est protecteur puisque la clairance de la créatinine calculée par la formule du MDRD est supérieure dans le cas de la présence de l'hétérozygotie. (p=0.047)

La variation de moyenne ( $\Delta\mu$ ) entre les deux groupes G/A et G/G est de  $\Delta\mu=24\text{mL/min/1,73m}^2$ ; IC<sub>95%</sub> GA [90.80 ; 133.7] ; IC<sub>95%</sub> GG [76.64 ; 100].

**Tableau XVII Données statistiques pour l'exon 10 de ABCC2 (rs8187710), selon les deux groupes : hétérozygote et homozygote sauvage selon la clairance MDRD (mL/min/1,73m<sup>2</sup>).**

CL	N	moyenne	médiane	min	max	écart type	Cv%	IC95%
G/A	11	112,27	110,00	60,00	175,00	34,64	0,31	[90.80 ; 133.7]
G/G	20	88,35	85,00	51,00	158,00	26,72	0,30	[76.64 ; 100]

N : nombre de sujets ; CV : coefficient de variation ; IC : intervalle de confiance ; CL : clairance

Une différence significative (p = 0,018) a été trouvée pour l'ASC entre les groupes possédant le variant hétérozygote et le variant homozygotes sauvage pour le SNP situé sur l'exon 32 du gène ABCC2 (Tableau XVIII). Il semble ici que l'exposition au Ténofovir soit augmentée en présence de l'homozygotie sauvage. Ce qui confirme les données de la littérature. [19]

La variation de moyenne entre les deux groupes G/A et G/G est de ( $\Delta\mu=0.64$ ; IC<sub>95%</sub> GA [1.14 ; 1.94] ; IC<sub>95%</sub> GG [1.9 ; 2.46]).

**Tableau XVIII Données statistiques pour l'exon 32 du gène ABCC2, deux groupes : 1 hétérozygote, l'autre homozygote sauvage selon l'ASC du Ténofovir (h.mg/L).**

ASC	n	moyenne	médiane	min	max	écart type	Cv%	IC95
G/A	10	1,54	1,507	0,7966	2,68	0,64	0.414	[1.14 ; 1.94]
G/G	21	2,18	2,05	1,131	3,98	0,65	0.297	[1.9 ; 2.46]

N : nombre de sujets ; CV : coefficient de variation ; IC : intervalle de confiance ; CI : clairance

#### 1.2.4 Haplotypes et phénotypes.

Izzédine et al. montrent que certaines associations d'allèles ou haplotypes peuvent être l'origine d'effet délétères rénaux.[48]

Les différents haplotypes proposés par Izzédine et al ont été testés. D'une part en fonction de leur répartition dans chaque groupe insuffisant rénaux/ non insuffisant rénaux, aucune liaison n'a été retrouvée contrairement à ce qui avait été montrés par ces auteurs.

D'autre part nous avons recherché par haplotype une différence pour chaque marqueur phénotypique mesuré ou calculé. Trois haplotypes sur 6 : CGTT, CGAC, CATC, CGTC, CAAC, TGTT ont pu être testés, les autres étant peu présent dans la population de l'étude.

Les tests ont été effectués sur ces trois haplotypes (CGTT, CGAC, CATC) des 6, les 3 autres n'étant pas déterminés dans la population de l'étude. Deux groupes ont été constitués selon la présence ou l'absence de l'haplotype. Les différents critères phénotypiques ont été testés sur ces deux groupes. Seul CATC a montré une différence significative ( $p=0.047$ )

**Tableau XIX Répartition de l'haplotypes CATC selon la clairance MDRD (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)**

	n	min	moyenne	médiane	max	écart type	CV
<b>Présence CATC</b>	<b>11</b>	<b>60</b>	112,27	110	175	34,63	0,30
<b>Absence CATC</b>	<b>20</b>	<b>51</b>	88,35	85	158	26,72	0,302

N : nombre de sujets ; CV : coefficient de variation ; IC : intervalle de confiance ; unité mL/min/1.73m<sup>2</sup>)

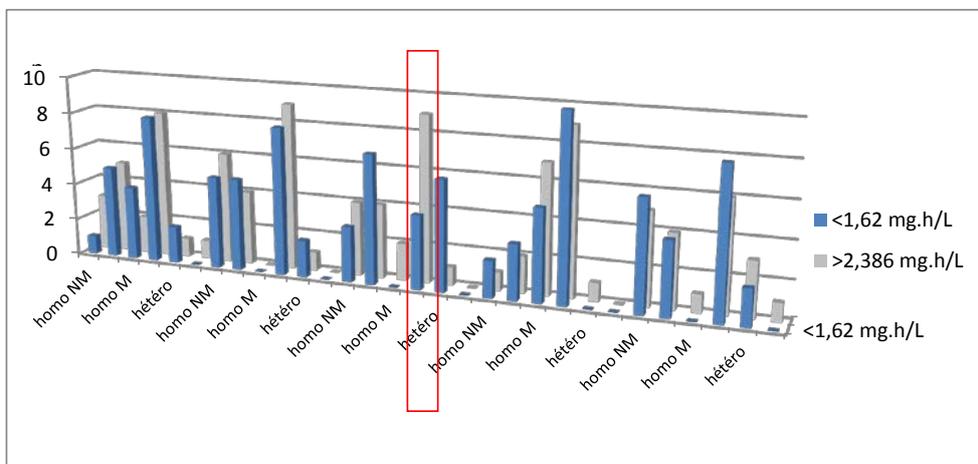
On remarque ici que les valeurs de répartition rejoignent celles réalisées pour le SNP de l'exon 10 précédemment. (cf. supra)

### **1.2.5 Comparaisons entre tiers extrêmes phénotypiques et proportion de SNPs.**

Trois groupes phénotypiques ont été définis en répartissant les valeurs de chaque marqueur (Poids, Créatinine, Clairance MDRD, ASC du Ténofovir et Ratio poids/créatinine) en 3 groupes équivalents, afin d'obtenir, un tiers inférieur et un tiers supérieur. Ainsi chaque groupe comporte 10 personnes.

Pour les deux groupes extrêmes, la répartition des différentes variations hétérozygotes ou homozygotes a été analysée.

Les tests ne permettent pas ici de mettre en évidence des différences significatives, bien que pour certaines SNPs, la répartition des polymorphismes, comme celle de l'exon 32, approche la significativité. (p=0.057) encadré sur le graphique ci-dessous.



**Figure 29 Répartition des variants pour chaque SNP selon deux groupes tiers extrême de L'Aire sous la courbe (ASC). Chaque triplet Homo NM, Hétéro, Homo M présente les variations d'un SNP. Homo : homozygotes ; hétéro : hétérozygotes ; M : muté ; NM : non muté. En ordonnée se trouve le nombre de patients. En avant le nombre de patients présents dans le groupe de valeur de l'ASC < 1,62mg.h/L et en arrière le nombre de patients présents dans le groupe de valeur de l'ASC > 2.386 mg.h/L.**

cette méthode n'a pas permis de montrer d'autres variations en entre les deux groupes phénotypique extrêmes pour les différents polymorphismes étudiés de chaque SNP.

## 2. DISCUSSION

L'objectif du travail de pharmacogénétique présenté dans cette étude a été de définir les polymorphismes génétiques d'intérêt potentiel des gènes ABCC2 et ABCC4 ainsi que la mise au point méthodologique de la recherche de ces polymorphismes pour ABCC2 et ABCC4 pour une population de patients traités par Ténofovir qui avaient des données d'exposition plasmatique au Ténofovir ainsi que des données sur l'évaluation de leur fonction rénale. Enfin nous avons analysé les données recueillies pour mettre en évidence une relation entre le phénotype et le génotype.

Une première partie de ce travail a permis la mise au point de techniques de séquençage pour la recherche des polymorphismes génétiques des gènes ABCC2 et ABCC4 retrouvés à une fréquence allélique d'au moins 5% dans la population générale. Dans une deuxième partie, les données phénotypiques d'exposition plasmatique au Ténofovir et d'évaluation de la fonction rénale ont été analysées au regard des données génotypiques de ces polymorphismes pour la protéine d'efflux MRP2 et MRP4 codée par ces 2 gènes.

Cette étude a été faite dans les conditions dites de routine clinique de la prise en charge des patients VIH traités par antirétroviraux. Le but était d'essayer d'identifier des facteurs prédictifs génotypiques de l'évolution de la fonction rénale après mise sous traitement par Ténofovir.

Au cours de cette étude préliminaire, des relations significatives ont été mises en évidence entre les 2 types de données, génotypiques d'une part et phénotypiques d'autre part. Dans cette étude deux SNPs présentés sur deux exons appartenant au gène ABCC2 ont présenté une relation significative en terme de fréquence avec les marqueurs phénotypiques de la clairance MDRD pour l'un et de l'ASC pour l'autre. Posséder l'allèle hétérozygote du SNP rs2273697, 1249 G/A situé sur l'exon 10 de ABCC2 serait probablement protecteur par rapport au polymorphisme homozygote sauvage G/G. Une clairance rénale MDRD est supérieure à celle des sujets homozygotes sauvages (la variation de moyenne entre les deux groupes est de  $\Delta\mu=24\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ;  $\text{IC}_{95\%}\text{GA}$  [90.80 ; 133.7] ;  $\text{IC}_{95\%}\text{GG}$  [76.64 ; 100]). Rappelons que les études de Izzédine et al et

Rodriguez-Novoa et al [4, 48] présentent pour ce SNP le génotype AA (homozygote variant) comme étant plus fréquent chez les patients qui ont des altérations rénales, mais sans association significative.

Posséder l'hétérozygotie G/A du SNP rs8187710, 4544 G/A situé sur l'exon 32, serait également protecteur, l'ASC est inférieure dans le groupe hétérozygote ( $\Delta\mu=0.64$ ; IC<sub>95%</sub> GA [1.14 ; 1.94] ; IC<sub>95%</sub> GG [1.9 ; 2.46]). Sachant que l'exposition plasmatique au Ténofovir est un élément de l'apparition d'une altération de la fonction rénale. [35]. Les études de Izzédine et al et Rodriguez-Novoa et al. ne montrent pas cette relation significative. [4, 48]

En observant ces résultats nous pouvons postuler que posséder la double hétérozygotie pour les exons 10 et 32 serait ainsi protecteur, aucun patient ne présente d'insuffisance rénale. A noter cependant que dans la population des 31 patients de l'étude, seules 4 personnes présentent cette double hétérozygotie. Des études complémentaires devront être réalisées en augmentant le nombre de patients pour confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs le SNP rs717620, présent sur le promoteur d'ABCC2 en -24 pour la variation C/T, tel que rapporté par Rodriguez-Novoa et al [19] et Kiser et al [70] pour augmenter l'excrétion du Ténofovir de 19%, n'a pas été retrouvé comme marqueur d'excrétion rénale du Ténofovir.

Nous n'avons mis en évidence aucune différence significative quant à l'implication des SNPs d'ABCC4 sélectionnés en rapport à l'exposition au Ténofovir. Aucune relation positive ou délétère entre les polymorphismes et le génotype des patients étudiés n'a été observée.

L'analyse des polymorphismes de ABCC2 et ABCC4 a été faite selon les séquences de référence déposées sur Genbank [79]. Chaque polymorphisme a été étudié individuellement. Pour certains, c'est le polymorphisme de référence qui est associé à un sur risque de toxicité rénale ; pour d'autres, au contraire, le polymorphisme dit « muté » est associé à ce sur risque. Ces polymorphismes ont également été étudiés de façon associée grâce à la constitution d'haplotypes. On remarque que les résultats des tests effectués sur ces haplotypes se rapprochent de ceux effectués sur certains SNPs pris individuellement. (Haplotype CATC de ABCC2 et le SNP de l'exon 10 d'ABCC2)

Cette étude a porté sur une population modeste de 31 patients. En raison de la fréquence allélique retenue pour le choix des polymorphismes d'intérêt de ABCC2, un nombre supérieur de patient devra être inclus afin d'améliorer l'efficacité de l'analyse génotype/phénotype. De plus nous n'avons pas pu comparer les groupes d'homozygotes sauvages et homozygotes variants en fonction de leur phénotype rénal (le poids, le taux de créatinine sérique, la clairance de la créatinine sérique, l'aire sous la courbe du Ténofovir et le ratio Poids/créatinine sérique). Leur présence étant trop faible dans la population de l'étude.

Il peut subsister un biais puisqu'aucune femme n'est insuffisante rénale dans l'étude. De plus l'âge est significativement plus élevé chez les hommes que chez les femmes ( $\Delta=10$  ans). Or nous savons que l'âge est lié à l'augmentation de la prévalence d'insuffisance rénale.

Selon les données de la littérature, le gène ABCC2 codant pour la protéine d'efflux MRP2 peut être impliqué dans la pharmacocinétique du Ténofovir. L'activité de MRP2 peut compléter celle de MRP4 lorsqu'elle est déficitaire soit en terme d'expression, soit en terme de fonctionnalité.[38, 47] Or les résultats de cette étude montrent l'implication de MRP2 sans montrer celle de MRP4. Ils semblent montrer l'implication de MRP2 dans la variabilité de l'efflux du Ténofovir et ses possibles conséquences sur l'exposition et le degré de l'atteinte rénale.

Plusieurs éléments peuvent être pris en compte lors de l'interprétation de ces premiers résultats.

Parmi lesquels des facteurs de confusion, tels que la co-administration de traitements, comme les IP dans le cadre du traitement de l'infection par le VIH [19-20] Un article récent mentionne une altération rénale sous Ritonavir [80] utilisé de façon courante dans le traitement anti infectieux du VIH. La co-administration d'autres traitements néphrotoxiques administrés lors de co-morbidités (diabète, hyper tension artérielle...ou coïnfection) de l'infection au VIH. La prise en compte des co-morbidités et la connaissance d'autres traitements pris par le patient est primordiale pour connaître d'éventuelles interférences intervenant dans l'élimination rénale du Ténofovir.

Pour d'autres éléments à prendre en compte, il convient de rappeler que si les anomalies de structure de protéine peuvent diminuer l'efflux du Ténofovir par défaut d'affinité, le manque d'apport énergétique due à la toxicité mitochondriale [28] pourrait être un facteur de dysfonctionnement tubulaire rénal, en amont du dysfonctionnement protéique de MRP2 et MRP4. Dean et son équipe [50] rapporte la présence de transporteur ABC (ABCB6-ABCB8) dans les mitochondries. Certains patients pourraient être plus sensibles que d'autres au Ténofovir par l'implication de ceux avec des différences d'expression ou de fonctionnalité. Peu d'études ont été réalisées sur ces 3 transporteurs mitochondriaux pour une relation de l'exposition au ténofovir et son implication dans la dégradation de la fonction rénale lors du traitement par cet antirétroviral.

Un des facteurs de confusion important est le VIH lui-même, qui est connu pour entraîner des néphropathies (HIVAN).[2]

Enfin, lors du recueil de données et lors de l'analyse des informations, il conviendrait de connaître le début de la mise en route du traitement pour comparer des patients de façon homogène selon la durée du traitement. Il est en effet admis que la prise de Ténofovir pendant 2 ans fait diminuer le DFG d'environ 10mL/min de moyenne. [31] Connaître la date d'apparition des premiers symptômes de l'atteinte rénale permettrait d'avoir plus de précisions dans les différents groupes sur le délai précédant l'insuffisance rénale.

Dans le but d'améliorer la pertinence de cette étude, le recueil des informations sur les marqueurs phénotypiques, ASC du Ténofovir et évaluation de la fonction rénale devra être plus précis. L'exposition au Ténofovir a été évaluée par le calcul de l'ASC dans cette étude. Elle a été obtenue grâce à une valeur unique de concentration plasmatique de cet antirétroviral pour un patient donné et à un temps donné après prise du traitement. Dans ces conditions, l'incertitude sur la valeur de l'ASC calculée pour chaque patient est de l'ordre de 20%. L'amélioration de cette incertitude serait apportée par 2 mesures distinctes de concentrations plasmatiques du Ténofovir pour un même patient, comme cela est déjà fait pour les autres antirétroviraux prescrits.

L'évaluation de l'état de la fonction rénale a été faite par le calcul du MDRD au jour de la détermination de la concentration plasmatique en Ténofovir. Compte tenu des

variations interindividuelles dans l'évolution de la fonction rénale après la mise sous traitement par Ténofovir telles que présentées en introduction, il pourrait s'avérer utile de prendre en compte l'évolution de celle-ci au cours du temps, et que la diminution de celle-ci soit évaluée en valeur absolue ou en pourcentage de variation. Il peut s'avérer intéressant de recueillir d'autres données biologiques telles que celles du ionogramme, la phosphaturie, le dosage de l'acide urique ainsi que la mesure de la protidémie urinaire dont la RBP rapportée à la créatinine urinaire permettrait d'évaluer de façon précoce une éventuelle tubulopathie.[28]

Ces divers éléments d'appréciation de la relation entre marqueurs phénotypiques – ASC du ténofovir et évolution de la fonction rénale après mise sous traitement – et marqueurs génotypiques des gènes ABCC2 et ABCC4 seront pris en compte dans une seconde étude réalisée chez des patients qui présentent une altération importante et rapide de leur fonction rénale.

--  
CONCLUSION  
--

## CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : M. MARTIN François

Le contrôle de l'infection par le VIH repose sur une trithérapie. Selon le dernier rapport pour la prise en charge des patients, cette trithérapie associe chez le patient naïf 2 INTI : l'Emtricitabine et le Ténofovir associés dans Truvada® ces 2 molécules sont associées à un troisième agent qui sera soit 1 IP/r, soit 1 INNTI (Atazanavir ou Efavirenz). Le ténofovir disoproxyl fumarate, commercialisé en France en 2002 et contenu dans les spécialités Viread et Truvada, est connu pour entraîner une diminution de la fonction rénale, objectivée par une diminution du DFG. Les atteintes rénales sont de type tubulopathies ; quelques rares cas de Syndrome de Fanconi ont été rapportés. Cependant, l'évolution de la fonction rénale est variable d'un patient à l'autre. Pour certains la fonction rénale se stabilise après diminution alors que pour d'autres, sa dégradation est régulière et continue dans le temps, lors du traitement par ténofovir. Parmi les hypothèses pouvant expliquer cette différence interindividuelle, l'existence de polymorphismes (SNPs) de transporteurs d'efflux ont été proposés.

Le but de ce travail était dans un premier temps de développer les méthodes de biologie moléculaire pour la recherche de SNPs de deux transporteurs d'efflux MRP2 et MRP4 codés respectivement par les gènes ABCC2 et ABCC4. Dans un deuxième temps, les fréquences alléliques et génotypiques ont été analysées dans une population de 31 patients au regard de la fonction rénale et de l'exposition plasmatique au ténofovir. Les polymorphismes étudiés ont été choisis pour leur fréquence au moins égale à 5%. 6 SNPs ont été recherchés pour le gène ABCC2 et 4 pour le gène ABCC4.

Dans cette étude, pour ABCC2, les SNPs de l'exon 10 (rs2273697, 1249G/A) et de l'exon 32 (rs8187710, 4544G/A) ont montré leur implication respective avec la

clairance rénale et l'exposition au ténofovir. Pour l'exon 10, être porteur de l'hétérozygotie G/A est plus fréquent pour des valeurs de clairance de la créatinine élevée contrairement aux homozygotes sauvages G/G. Pour le SNP rs8187710 (4544G/A) de l'exon 32, le génotype sauvage G/G est plus fréquemment rencontré quand l'exposition plasmatique au ténofovir est élevée. Le SNP -24C/T situé sur le promoteur du gène ABCC2, rapporté comme protecteur pour sa forme T n'a pas montré d'implication dans cette étude. Pour ABCC4, il n'a pas été mis en évidence de relation significative selon ces critères étudiés.

Ces premiers résultats ont été obtenus pour une population restreinte de 31 patients. Cette étude devra être complétée avec un nombre supérieur de patients permettant de prendre en compte diverses variables telles les antirétroviraux associés dans la trithérapie, la durée du traitement et l'évolution de la fonction rénale après mise sous traitement par ténofovir.

**Le Président de la thèse,**

Nom : M. TOD

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 26.10.2011  
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**

--  
**ANNEXES**  
--

**LES RÉTROVIRUS**

**Les oncovirus** HTLV1 et 2

**Les lentivirus** FIV, BIV, HIV

**Les spumavirus**

## ANNEXE B RESUME DES TRAITEMENT DU VIH

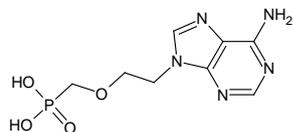
DCI Spécialités Doses habituelles	Doses habituelles chez l'adulte	Précautions d'emploi, intolérance
<b>INHIBITEURS NUCLÉOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE</b>		
Abacavir (ABC)** Ziagen®	300 mg x 2/j ou 600 mg x 1/j	L'initiation d'Abacavir ne peut être envisagée que chez des patients négatifs pour HLA B*5701. Le risque de survenue d'un syndrome d'hypersensibilité à l'Abacavir est proche de zéro chez les sujets non porteurs de l'allèle HLA B*5701. En cas d'hypersensibilité avérée ou suspectée, l'Abacavir doit être arrêté et sa réintroduction est formellement et définitivement contre-indiquée.
Emtricitabine (FTC)** Emtriva®	200 mg x 1/j	Tenir compte d'une éventuelle co-infection par le VHB
Didanosine (ddI) Videx®	≥ 60 kg : 400 mg x 1/j < 60 kg : 250 mg x 1/j à jeun	Risque de neuropathie périphérique, de pancréatite. Surveillance de la lipase sérique
Lamivudine (3TC)** Épivir®	150 mg x 2/j ou 300 mg x 1/j	Tenir compte d'une éventuelle co-infection par le VHB
Stavudine (d4T) Zérit®	30 mg x 2/j	Risque de neuropathie, risque de lipoatrophie Pas d'indication dans un premier traitement antirétroviral
Zidovudine (AZT)** Rétrovir®	300 mg x 2/j	Surveillance NFS (hémoglobine, neutrophiles)
<b>INHIBITEUR NUCLÉOTIDIQUE DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE</b>		
Ténofovir (TDF)** Viread®	245 mg x 1/j au cours d'un repas	Risque de néphrotoxicité (insuffisance rénale et syndrome de Fanconi). La surveillance rénale (clairance de la créatinine, protéinurie et mesure de la phosphorémie) est recommandée avant l'initiation du traitement par Ténofovir, puis toutes les 4 semaines pendant la première année de traitement, puis tous les 3 mois les années suivantes
<b>INHIBITEURS NON NUCLÉOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE</b>		
Efavirenz (EFV)** Sustiva® au coucher	600 mg x 1/j	Signes neuropsychiques, souvent transitoires, à l'introduction du traitement Risque d'éruption cutanée Inactif sur VIH-2 et VIH-1 du groupe O

		Contre-indiqué chez la femme enceinte ou n'utilisant pas de contraception efficace
Névirapine (NVP) Viramune®	200 mg x 1/j pendant 14 jours puis 200 mg x 2/j	Inactif sur VIH-2 et VIH-1 du groupe O Non recommandé si CD4 > 400/mm <sup>3</sup> chez les hommes et > 250/mm <sup>3</sup> chez les femmes en raison d'une majoration du risque d'hépatotoxicité. Au cours des 16 premières semaines de traitement, il est nécessaire de surveiller les transaminases tous les 15 jours en raison de la survenue possible d'une hépatite médicamenteuse. Il ne faut pas entreprendre simultanément un traitement comportant de l'Abacavir et de la Névirapine
Étravirine (ETV) Intence®	200 mg x 2/j 429	Ne pas utiliser dans les infections par le VIH-2 ou le VIH-1 du groupe O Bonne tolérance mais recul limité
<b>INHIBITEURS DE LA PROTÉASES VIRALES</b>		
Atazanavir/Ritonavir Reyataz®/Norvir®	300/100 mg x 1/j au cours des repas	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Hyperbilirubinémie non conjuguée Troubles digestifs Interactions médicamenteuses multiples, notamment avec les inhibiteurs de la pompe à protons
Darunavir/Ritonavir Prezista®/Norvir®	800/100 mg x 1/j 600/100 mg x 2/j	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Troubles digestifs
Indinavir/Ritonavir Crixivan®/Norvir®	400-600/100 mg x 2/j	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Risque de coliques néphrétiques Nécessité d'une hydratation abondante, même en 2 prises par jour à dose réduite en association avec Ritonavir Effets rétinopie-like (xérodémie, ongles incarnés)
Fosamprenavir/ Ritonavir Telzir®/ Norvir®	700/100 mg x 2/j	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Risque de rash Troubles digestifs d'intensité modérée
Lopinavir/Ritonavir Kaletra®	400/100 mg x 2/j	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Troubles digestifs fréquents, mais habituellement d'intensité modérée
Saquinavir/Ritonavir Invirase®/Norvir®	1 000/100 mg x 2/j	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Troubles digestifs Allongement de l'espace QT
Tipranavir/Ritonavir Aptivus®/Norvir®	500/200 mg x 2/J	Dyslipidémie, hyperglycémie, lipodystrophie Troubles digestifs, cytolysse hépatique

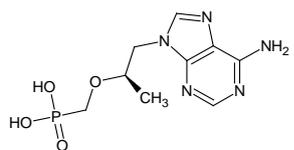
		Interactions médicamenteuses multiples
<b>INHIBITEUR DE FUSION</b>		
Enfuvirtide (T-20) Fuzéon®	90 mg x 2/j SC	Réactions au point d'injection Myalgies, pneumonies
<b>INHIBITEUR DE CCR5</b>		
Maraviroc Celsentri®	150 à 600 mg x 2/j 703	Détermination préalable du tropisme de la souche virale pour le corécepteur CCR5. Dose à adapter en fonction des antirétroviraux et autres médicaments associés
<b>INHIBITEUR D'INTÉGRASE</b>		
Raltégravir Isentress®	400 mg x 2/j 690	Bonne tolérance clinique et biologique. À utiliser avec prudence en cas de co-administration avec de puissants inducteurs de l'UGT1A1 (comme la rifampicine)
* pour 30 jours de traitement (sans intégrer le prix du Norvir®, 54 € pour 100 mg x 2/j, pour les IP/r).		
** disponible également au sein de formes combinées.		

Tableau extrait du rapport YENI 2010[2]

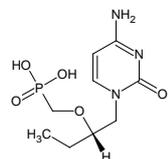
ANNEXE C ASPECT MOLECULAIRE DE CERTAINS TRAITEMENT VIH ET VHB



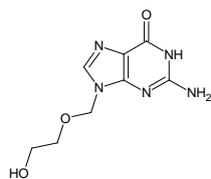
Adefovir      Inhibiteur nucléotidique



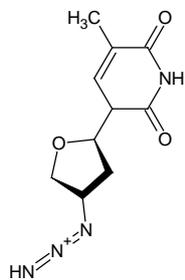
Ténofovir      Inhibiteur nucléotidique



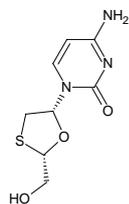
Cidofovir      Inhibiteur nucléosidique



Aciclovir      Action contre l'HSV (herpes simplex virus)



Zidovudine      Inhibiteur nucléosidique



Lamivudine

FCPRM©

## ANNEXE D CALCUL DES CLAIRANCES

La clairance peut être calculée par deux formules. Elle nécessite le dosage de la créatininémie par méthode enzymatique qui permet une évaluation spécifique de la créatinine plasmatique (créatininase, créatine désaminase).

- Formule de Cockroft et Gault (mL/min):

$$CL = \left( \frac{(140 - \text{age}) \times \text{poids}}{\text{créatininémie} * a} \right) \quad \text{avec } a = 0,814 \text{ chez l'homme}$$

$a = 0,85 \text{ chez la femme}$

Cette formule, utilisée depuis 1976, est sujette aux variations interindividuelles (poids, âge et fonction rénale) et n'est plus un estimateur correct lorsque la personne est à un âge extrême de la vie, est dénutrie ou obèse.

- La Société Française de Néphrologie recommande depuis 2009 l'utilisation de la formule MDRD (modification of diet in renal disease), pour évaluer la fonction rénale des patients notamment des patients obèses, des sujets âgés et des sujets jeunes [81-83].

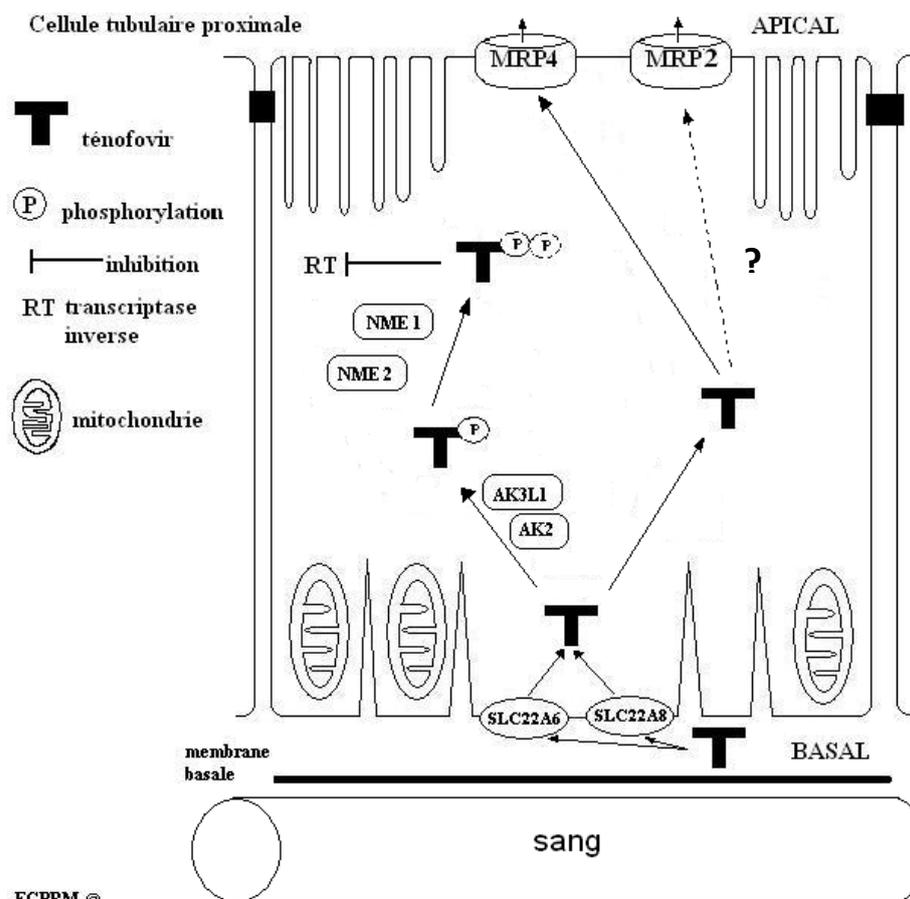
Clairance de la créatinine approximée par la formule du MDRD (mL/min/1,73m<sup>2</sup>):

$$CL = 186,3 \left( \frac{\text{Créatininémie}}{88,4} \right)^{-1,134} \times \text{age}^{-0,203} \quad \text{femme} \times 0,742$$

$\text{noir} \times 1,21$

Ces formules sont utilisées pour calculer la clairance rénale lors de la mise en place du traitement et du suivi thérapeutique.

ANNEXE E TENOFOVIR INTRA CELLULAIRE[4, 28]



## ANNEXE F ASPECT PROTEIQUE DE MRP2 MRP4[51]

Comparaison entre MRP2 et MRP4

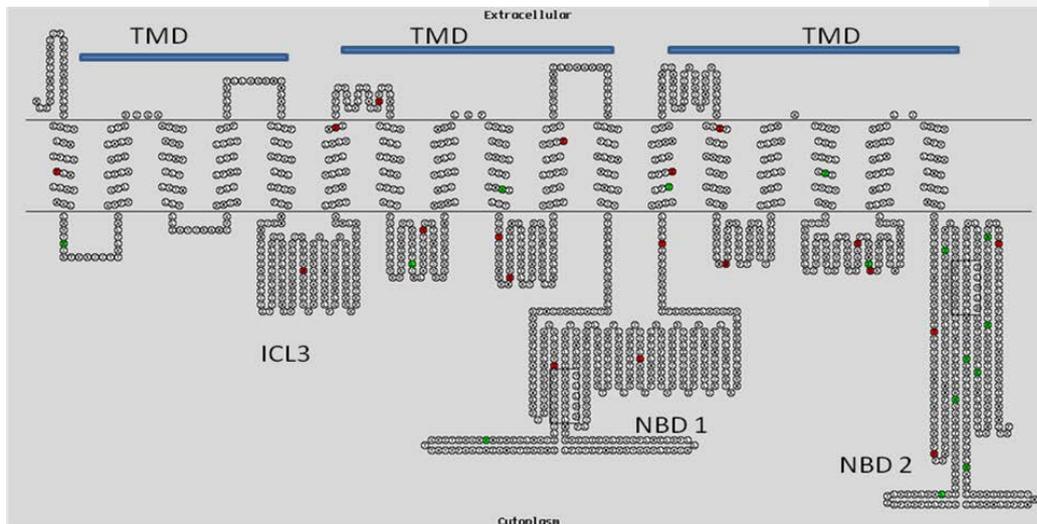


Figure représentant MRP2.[51] En rouge le variant, bleu délétion ou insertion, vert synonyme.

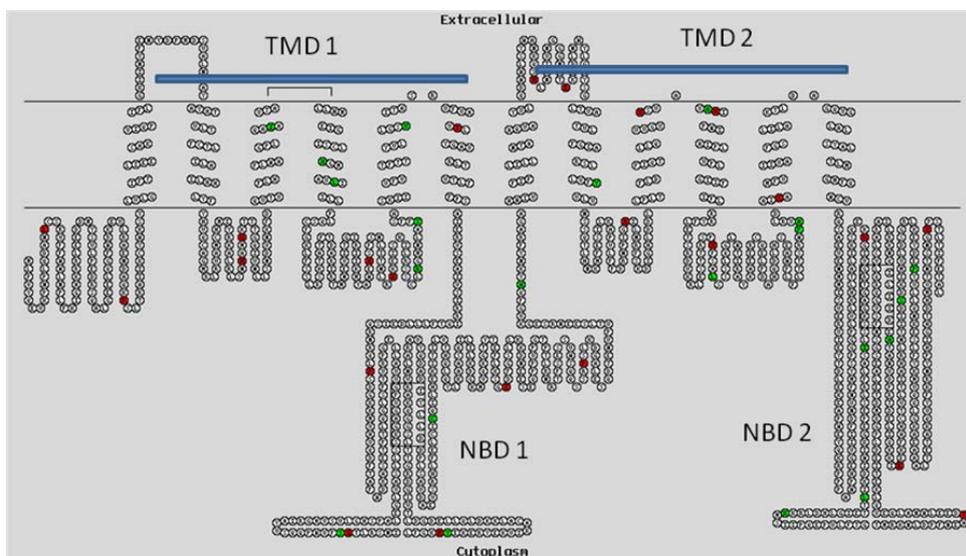
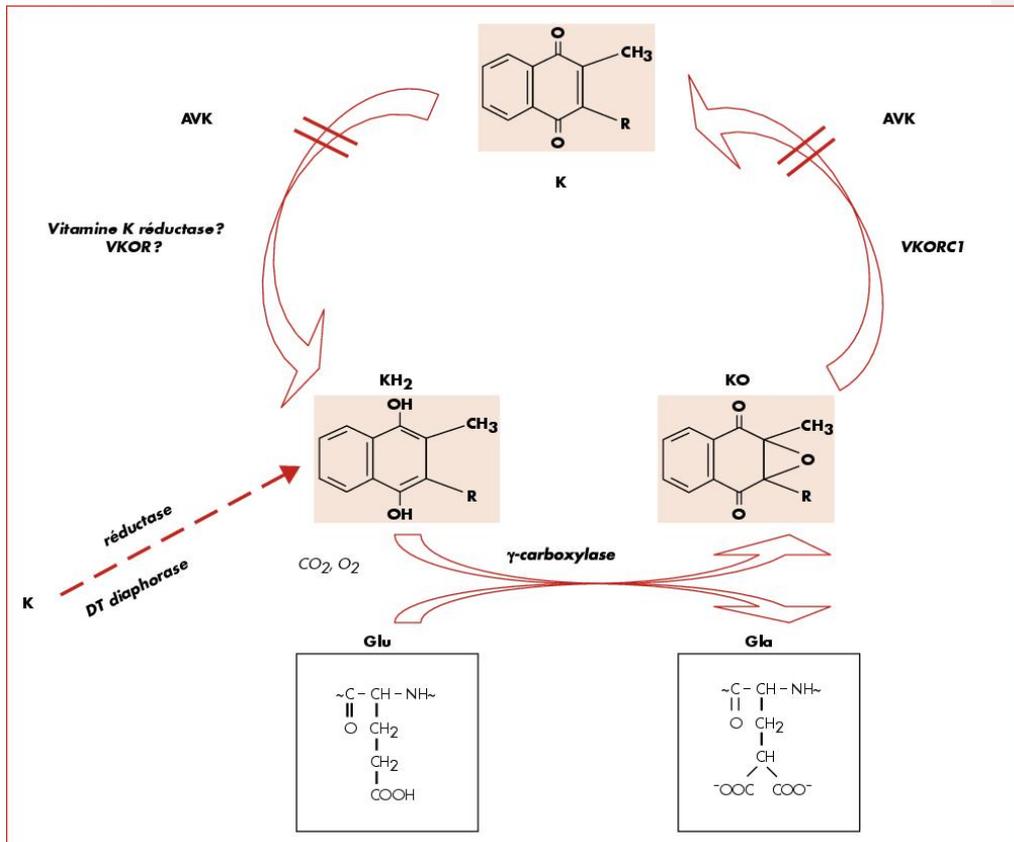


Figure représentant MRP4.[51]

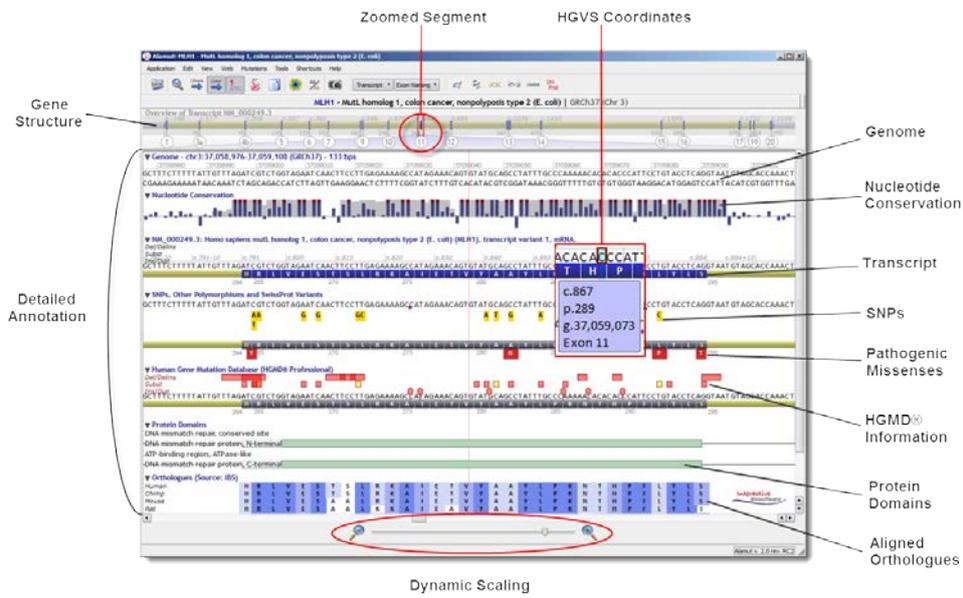
MRP4 possède une structure intramembranaire en moins par comparaison à MRP2.

## ANNEXE G CYCLE DE LA VITAMINE K ET PRINCIPE DU MODE D'ACTION DES AVK



Cycle de la vitamine K et principe du mode d'action des AVK. K : forme quinone ; KH<sub>2</sub> : forme hydroquinone ; KO : forme époxyde ; VKORC1 : sous-unité C1 du complexe vitamine K oxydoréductase (VKOR). [63]

## ANNEXE H CAPTURE D'ECRAN DU LOGICIEL ALAMUT®



## ANNEXE I les séquences recherchées et exploitées

### Le gène ABCC2 est dans le sens chromosomique

ABCC2rs2804402 A-1019G 5' NA

Chromosome 10:101541583

(appelé "prom" pour promoteur)

```

acattctggattttgcaattgcattccaatggagtcccttagcatgttccctggtttcttataatccgtagttagatctagaatttgaccagatttaaggccaatttttttag
ctaggatactgcatgggtgatgttttagctaggataaccgcatgggtggttcatgatatcatgaaaaagcatgttcttaaagcaatttaagtgcagtaaaaaaggttgggtc
aggtgggcaaggtagctcatgctgcaatcccagcccttgggaggccaagcagaggattgttgaagcctggagttgagaccagcctgggcaacatagtgagaccocgtccc
tacagaaaacattttttaattagctgggttgttggcatgtgcctgtagtcccagctactcaggaagctgaggcaggaagatcgcttgaaccocatgaggtcaaggctgcaatgaa
tcatgatggcaacactgcactctagctcaggcaacagaccaagacctgtctcaaaaaacaaaaacaaataacaaaaaagaaaaggttgggtcgatgacagtttctagcactga
tgccaccactctgtttacagaatcacccctctcctctgcccctgatgttttatcatgatcatatttacaatgcctggcaaaaggcttcatcccatattggcactactacctctcag
gcaatagaactttgaaagcctgtattatgtatataacatataggctcacactggataagctatttataacctgacttcttcaagaaagtttacatcatgtttaaaccatgtt
ttaga
    
```

Taille de l'amplicon : 479

PRIMERS Promoteur Sens : 5' agctaggataccgcatgggtgt 3'

Anti sens : 3' caccctctcctctggccctg 5'

5' cagggccagaggaggggtg 3'

	Sequence (5'>3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	AGCTAGGATACCGCATGGGTGGT	Plus	23	378	400	59.24	56.52%
Reverse primer	CAGGGCCAGAGGAGAGGGGTG	Minus	21	856	836	59.97	71.43%
Product length	479						

Commentaire [Hector Ma1]: Rs:1722  
2667  
10:101541310  
Pharmakb

Commentaire [Hector Ma2]: rs1722  
2646 10:101541363

Commentaire [Hector Ma3]: rs3469  
3955 10:101541408

Commentaire [Hector Ma4]: rs3505  
9917 10:101541430.  
.101541431

Commentaire [g5]: PRIMER.PROM  
SENS

Commentaire [ehbioch6]: rs172161  
28 10:101541537  
-1069 C>A

Commentaire [ehbioch7]: rs455934  
36 10:101541542.  
.101541543  
-1060 -/G

Commentaire [ehbioch8]: rs791064  
2 10:101541579  
-1023 G>A

Commentaire [ehbioch9]: rs2804402  
A>G NA -1019 A>G

Commentaire [Hector Ma10]: Rs  
17222533  
101541804  
-1240 C>A

Commentaire [ehbioch11]: rs73332  
129 10:101541827  
-1263 A>G

Commentaire [ehbioch12]: rs17216  
135 10:101541869  
1286 G>>A

Commentaire [g13]: PRIMER.PROM  
ANTISENS

## ABCC2 rs717620 -24C>T 5' UTR (appelé exon 1)

Chromosome 10 : 101542578

```

cattcccatttggcactacacctcaggcaaatagaacttttgaagcctgtattatgtatataacatataggctcacactggataagctattttataacctgacttctcaaag
aaagtttacatcatgtttaaaccatgttttagattctatatttttaattaaaaatctaaggaagaaggatatttcacatttctataaactctaagatcttgcagcagaagcgaac
tgcacatttaggggtgctcgcctctactgatgctgcctttgtgggtcatatgctccttagaaaaatgaaagactgtgcactcttgatttggccagctctgttgacatctt
cagtggttcctttatgtatggccactcctacagaggcctctgtactttgggaactggtgagtcctcctgtccctagggtcttttagtcacatgcccactgcttcaatgta
acatgcatctaggcaagggttaacgattaaatgggtggatgaaaggtcatcctttacgggagaacatcagatggttagataatcctgttccactttctttgatgaaacaagttaaag
aagaaacaacacaatcatattaatagaagagctctgtccagacgcagtcaggaatcagctggagaagttctgcaactctacttttgggtgagaaattacatttatcttcat
attgactcttctcagactcagaacaagtggtagttagtttaacttaggtggtcaccaacaagaaccagaaatgtagatgtgcaattggtctaaagctcaggcttttagaaagca
taattcataatatctccagaggatataagatctggaaatgtaatgcaaatattctctgcatatgttttttatatcagactcttgactagctagtcgcaaaattgcctctc
taaagagaaacaggtaaaaaaccttccaatttaattcgtgtgaggaaggagaattgtgttcataactttgctagtagaaggaagagaagatccgtgactgagctctgctgagacat
ggtgatgtgaaatgataatgataagttctagaactggcaactaatgatatggactagaagttgagcttagggatgcaactttgggcatcatgagcattgaaataattttgaaaca
actagagttgggtaatatgttttaaggaagaaagagacaccacttagaggggtgaacaagaacagtgtaacattacggagtcatagatagcaaaaaatttcaagataggggcca
atcaacagtatcaaaggtctagtggaatagaaaaaaaaggaccttagatattagtgattttagtaagggttggtgagaaagatcaactgcgaaactcctagcctcagcatcag
    
```

Taille de l'amplicon : 677 bases

PRIMERS: SENS : 5' gcactcttgatttggccagctc 3'

ANTI-SENS : 3' ccgtgtgaggaaggagaattgtgt 5'

5' acaacaattctctctcacagg 3'

	Sequence (5'>3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GCACTCTTGATTGTTGGCCAGCTC	Plus	25	236	260	59.06	52.00%
Reverse primer	ACAACAATTCTCCTCTCACACGG	Minus	25	912	888	57.23	48.00%
Product length	677						

Commentaire [L1]: Primers -24 Sens

Commentaire [Hector Ma2]: EXON1

Commentaire [Hector Ma3]: Rs1116  
40918  
101542496  
-106 A>G

Commentaire [ehbioch4]: rs717620  
C/T 5' UTR -24  
101542578

Commentaire [g5]: rs17216156  
G>A 5'UTR  
101542579  
G>A -23

Commentaire [Hector Ma6]: CODO  
N START

Commentaire [g7]: Rs593651116  
101542735 132  
G>T 134

Commentaire [Hector Ma8]: Rs  
35688626  
101542766 164 T/-

Commentaire [L9]: Primer -24  
Antisens

## ABCC2 Rs2273697 G 1249A val 417 Ile

chromosome10:101563815 situé sur l'exon 10

```

tttacatctagtggagaaacagaaaaaaacaaagtaattatggttcattgtgatgaatgtaatgacaaagtaagctcaggatattatgagagtacacaggacgaatatctaacc
caacttggtagtcacggtggttttcttaagaagttacatctcagctgacaccaaaggataaataggagtttctgggcaagaagtggtggatgggtagagttggaggaaggt
ggg)aat aagaggaagagtggtcaagaatgagagaat accatgtgtaagatttggaggcaagaagtcacagtgccctggagaagctgtgccataggagcacatcctccattgt
aatct aacttctgagcttctcttctactccctagtatccttggcttggccatgggtcctaattccaatccttatctttaggcattgaccatccaactggccaggaaggag
tacacc ttggagaaacagtgaaacctgatgtctgtggatgccagaagctcattggatgtgaccaacttcattgcacatgctgtggtcaagtgttctacagattgcttatctatctt
cttctatggagagagttgggacctcagctcttagcaggtgttgggtgatggtgcttgaatccaattaatggatactgtccacaaagagtaagaccattcaggtaaagaaaa
agtcaccagaagaatataagcttcttaaaagtgaacccttttctactctactcctaattcttaatggagagttgggcaaggcaagctggtggaagacttctaccatctc
aattgtaacttagctgtctctgagttcccttttcatctctgatgactcttaggggttatatatactcctctgcattcatgttagaggaagagcctgactggggaaggaggcta
cccagagatgctgcacataattcttccatcttgcctg
  
```

Taille de l'amplicon : 578

PRIMER Exon 10 SENS : 5' atgggtagagttggaggaaggtggg 3'

ANTISENS : 3' gggagttgggcaaggcaaacg 5'

5' gctttgccttgcccaactccc 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	ATGGGTAGAGTTGGAGGAAGGTGGG	25	59.18	56.00%
Reverse primer	GCTTTGCCTTGCCCAACTCCC	22	59.10	59.09%

Commentaire [L1]: primer s exon 10

Commentaire [ehbioch2]: rs113408  
513 10:101563698  
1132 C>A

Commentaire [Hector Ma3]: Exon10

Commentaire [ehbioch4]: rs172161  
98 10:101563785  
1219 C>T

Commentaire [ehbioch5]: rs2273697  
1249 G/A Val/Ile (417)  
10:101563815

Commentaire [ehbioch6]: rs7148802  
110:101563912  
T>G 1346

Commentaire [ehbioch7]: rs426700  
9 10:101564000  
G>A>T 1434

Commentaire [ehbioch8]: rs113646  
094 10:101564012  
1446 C>G

Commentaire [ehbioch9]: rs172225  
89 10:101564023  
C>T 1457

Commentaire [L10]: primer exon 10  
Antisens

ABCC2 rs17222723 1362 T>A Val 1188 Glu

Chromosome10:101595996

Situé sur l'exon 25.

```
aatgagtacagaaactgtcacatggatgatagccgtagatctgggggatatgggttaggctgacggaactccttaggaggttggagactcaaagctctgaggctgcagtgtgctc
tcctcacgttcaccccactctgttccccaccaaccccagctcttctcattggctcctcctcggagcctctcatcattctgctcccagacatggcactgcaggcttttgtcttgttc
agacgttaagctgtgccatcaaagggaagaatgctgggttgtggccagaaggaggaagatgggggatgcctcatgactgcggactggctgattctttacttttgtgtccagat
gttttatgtgtctacctcccgcagctgagccctctggactctgtcaccaggtcccgaatctactctcacttcagcgagaccgtatcaggtttgcccagttaccgtgcctttgagc
accagcagcgtatttctgaacacaaatgaggaggattgacaccaaccagaaatgtgtctttctcctggatcacctccaacaggtgagcctcccctgggtatttaccatgtgtgt
actttggggttctatatgtttgatattagcgtgggaggcagggcatggctagtgggtgtaaatcactctggccacacacactgtcatgctatgtaagtggagagaagaagcat
gagccttggagtcagagactgggtcccacgacagctctgcccgtttaccaagctgggtgaattgcccctgactctcctaaggagaatctccattcttctgttttgaatggccaga
acaaccctatctcacaggttccacctgtctcatggtggaagtcaaatgacatttgtgagcattttgaaccagtagtaccataaagtgtgggtgaaactgaacatcctctgttta
ctttctgagaacggatgtgagattctccatagtcacactcttctgggtagtgaaggcagtgagggtggagagaggagagtgggaatttttaggtaagaccattgatgac
agaaagggaagcttccgtctgtgaaacaggtgagcattattctccagtagccttaagccctggcaagcagtagtgcctggaagaggaagatcttttcaggaagaaaaattctt
```

Taille de l'amplicon : 586

PRIMER Exon 25 SENS : 5' ggggaagaatctgggttggc 3'

ANTISENS : 3' caccctatctcagggttccact 5'

5' aggtggaaccctgtgagatagggtg 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GGGAAGAATGCTGGGTTGTGCC	23	60.24	60.87%
Reverse primer	AGGTGGAACCTGTGAGATAGGGTG	25	59.19	56.00%

**Commentaire [g1]:** PRIMER 25  
SENS

**Commentaire [ehbioch2]:** rs17222720  
9 10:101595815  
G 3382 A

**Commentaire [Hector Ma3]:** EXON  
25

**Commentaire [ehbioch4]:** rs7255820  
0 10:101595882  
G 3449 A  
R 1150 H  
**Dubin Johnson syndrome**

**Commentaire [ehbioch5]:** rs7255820  
1 10:101595950  
A3517 T  
I 1173 F  
**Dubin Johnson syndrome**

**Commentaire [ehbioch6]:** rs8187692  
10:101595975  
3542 G/T

**Commentaire [g7]:** rs17216324  
10:101595994  
3561 G/A

**Commentaire [ehbioch8]:**  
rs17222723  
3563 T/A Val/Glu (1188)  
10:101595996

**Commentaire [ehbioch9]:** rs17222721  
6 10:101596053

**Commentaire [ehbioch10]:** rs114782  
123 10:101596112

**Commentaire [ehbioch11]:** rs360426  
66

**Commentaire [ehbioch12]:** rs74803  
823 10:101596264  
T 3831 C

**Commentaire [g13]:** PRIMER 25  
ANTI SENS

|ABCC2rs3740066 C>T ile1324 ile

chromosome10:101604207

Situé sur l'exon 28

```
atgggcccataatgggtccctaaaagtcccttcccttaactcaaaggacctaatctctcaacttagaataggaatggtttaggggatgctgggtcttgcacataccgagga
gatctacagcacaagctcatgggtatctttcttaactgaataaggtaggaactttccaaaagtcaagtctagttcagcctattaaatgcagaggccattaggtagctgggaca
ctgctaccctctcctgttctatgacacagagctcctgggtggactgttcggctgagttgccacctataaaaactacttctcatcttctccttgcaggcaccctgggtgactga
taagaggcctcggccagattggcccagcaaaggcaagatccagtttaacaactaccaagtgcggtaccgacctgagctggatctggctcctcagagggatcacttgtgacatggta
gcatggagaaggtaggtggagtgaaaggaaggctggatgggaggccttggatcaaacacaattggacagagtgagagcagctgggccttaagccttcacatttggatggagg
gaaagggtcagggcacttctctgccctgggaggtgtggggacacagtatcagaggggaaggatagcagccaggatcacacagacttaccggagctgtcggggccttctgctcag
ctcctcctgcctcctagccagctgaccagggccccttccctataaggtccacagtatgcagagaggaagtcaaggaaagaaacaggggggccaggcctggtgaaggaaactgtt
gagaatagcagtggtggaggttgcctgaaggaaagaatggcccagttctcctcccagttctcaaaagtcaggcaccctccttaggtgctgttctcctcaggacttgggtctgat
gagcaaggacgctgaggtccagatcagagctcagctcagctggtggcagacctaatcttccctctctcacttctaacaacagcatcttct
```

Taille de l'amplicon : 454

PRIMER Exon 28 SENS : 5' gtcctgggtggactattcggt 3'  
3' gtcctcctgctcctagcc 5'  
5' ggctaggagccagggaggagc 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GTCCTGGGTGGACTGTTCCGGCT	22	60.43	63.64%
Reverse primer	GGCTAGGAGGCAGGGAGGAGC	21	60.11	71.43%

- Commentaire [L1]: Primer Exon 28 SENS
- Commentaire [g2]: PRIMER 28 SENS
- Commentaire [ehbioc3]: rs1133219 77 10:101604037
- Commentaire [Hector Ma4]: EXON 28
- Commentaire [ehbioc5]: rs1721631 7 10:101604107 C3872 T
- Commentaire [ehbioc6]: rs4148400 10:101604130 A3895 C
- Commentaire [ehbioc7]: rs414840 1 10:101604162 C3927 T
- Commentaire [ehbioc8]: rs668983 62 10:101604163 C3928 T
- Commentaire [ehbioc9]: rs3740066 10:101604207 C3972 T ile 1324 ile
- Commentaire [ehbioc10]: rs172163 10 10:101604243 C4008 T
- Commentaire [ehbioc11]: rs41318 033 10:101604418 g4183 T
- Commentaire [g12]: rs55868143 10:101604420 C4185 T
- Commentaire [g13]: PRIMER 28 ANTISENS

**rs8187710 G>A cys1515 tyr**  
**Chromosome 10:101611294**  
**Situé sur l'exon 32**

agacttagagatgtcaagtaaatctggccaaaatTTTcatcaccgcaaagaaaacgaacaaggTTAagggaaactattcatalcttgagggcaaaataggaaactgtgtgtgtaac  
aattaactgggtatggggaggtggaagctcaagccgtgagaggcagatgTTgaccatagaccttccctaactgtcctgagcctcagctgctgctgtgtaaaacagccagaagctttc  
tattcctccagctgtgtcatattacaatcaaaagtcagtaattcttagaaaGCTgTTTggagatgataggcaccctTTgtaaaccaatctatccttaacaatgtgcaactctttt  
aaaaactcatgtaaatggaGcataactgctgtattcttctattacttgattctTTTgttcaaatattatttgagaattcAtccatgTTgagtggtgtagctgTggtcattgatt  
ttcactgctTTTgtagccttGctgactAtaccacaacttagtctggttattcttataaatgcttagacttgagatgctgcttctaagacttttatttcttctcctgTTTca  
gggtaatggcttagacaaCgggaagattatagagtCggcagcctgaagaactgctacaaaatccctggaccctTTTactTTTatggctaaggaagctggcattgagaatgtgaac  
agcacaaaatteCagaaggcccatgggttagaaaaggactataagaataatttcttatttaattttttttataaaatcacagaatatacaaaaagtggtataaaaatgt  
adgtTTTaaaaaaggataagtgaaaccccatgaacctactaccaggttaagaaaaataatgtcaccaggtacttgagaaaccctcgattgtctacctcgatcgtactccTTgc  
taccacccctcccaggGacaaccactgtcctgaatttcagataaattatcctTTgcctttcatttctgTTTatcaccttTgtatgtatcTTTaaacaacatataccctTTTt  
acttatgtaaatggactgactcatactgcatacatcttctatgacttgattctTTTgttcaatattatctgagattcattccatggtgatgcaaataggtgcattattTTTTtc  
actgctctgtagtctggcattgtatgaatacagcacaatgtatcagttttaaattggggatc

taille de l'amplicon: 662

Primer Exon 32 SENS : 5'gctgTTTggagatgataggcaccct 3'

Antisens : 3'ttgctaccacccctcccagg 5'  
5'cctggagggtgggtagcaa 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCTGTTTGGAGATGATAGGCACCCT	25	58.57	52.00%
Reverse primer	CCTGGGAGGGGTGGGTAGCAA	21	59.56	66.67%

**Commentaire [L1]:** Primer Exon 32  
Sens

**Commentaire [ehbioch2]:** rs7492320  
3 10:101610993  
C4243 A

**Commentaire [ehbioch3]:** rs7560325  
6 10:101610998  
C4248 A

**Commentaire [ehbioch4]:** rs7589555  
0 10:101611045  
C4295 T

**Commentaire [g5]:** rs35296652  
10:101611109..101611110  
Insertion -C  
4359 4360

**Commentaire [ehbioch6]:** rs7787783  
0 10:101611169  
A4419 T

**Commentaire [Hector Ma7]:** EXON3  
2

**Commentaire [ehbioch8]:** rs8187709  
10:101611277  
C4527 T

**Commentaire [ehbioch9]:** rs8187710  
10:101611294  
G 4544 A  
Cys 1515 tyr.

**Commentaire [g10]:** Codon stop

**Commentaire [ehbioch11]:** rs741557  
07 10:101611467  
A \*79T

**Commentaire [ehbioch12]:** rs113627  
42 10:101611493  
T/-deletion  
\*105

**Commentaire [L13]:** Primer Exon 32  
Antisens

Le gène ABCC4 est dans le sens inverse chromosomique.

ABCC4 rs1926657 T>C

Situé sur le chromosome 13 : 94672957

Intron 4

catatgccctcaccctccatctattcagtaaggaagttaaacaggcatgtctcagctcacacaaccacccctatactgtacacttggagctcccagctccacagctcataaacatctgggctattcaactagcagagagactggg  
ctctggccacggctaagtggtctataccataacggccactcctctgctcagaactgtacaacactagaaggcagatgtctccagacaccaagcattgcttggctctgagctaggacaccacttccgactgtggcagtgagctga  
agtccaaacacatcacagcagccctgctgagcaaaggggtggaggccagagcttgggttagttaaagccactggcatctgcatggccctggacagtaagcaggtatcagaaggggaagggcccagaaggtgtgggtgggggt  
gctacaagtcttggctgatgcggggcacaggtcaaggccccaagccttaacagagagctgggtctgaggaggagtgagctgaatagagctactgaaggtcaagctgaggtgaggtactgaaattctaccagaccagagtg  
cggaaa:ctcattcattatcattaacacacctggcatacgttgaaacac:agagagatcatgtcttagaattcaagagcactatccagagaaataatttcaaacagggcaattttgctcccaggagagatggcaacgactg  
gaggca:tactggtttacaactagaggagccttccggtatctagtggg:agaggccacagatgcttcaacatcttaaatgcacggagcagctctccatccc:aaaaagaattatttagccctaaatgtcaagtctacc  
aggttgagcactaaaaagagtttaactcctaaactgccaagaaaaaceagcactcctaacagggcctgcaaatgacacatgtttgaatcttgagcccatcaagtttagagaagctggaaaacactgaaaattccaagt  
tctgcctaacaagcataaaaaacaggcctatgagtcagccagttaatgtgattggagtaaaattcaactcttttagaattatcaga

Taille de l'amplicon 469

SENS: 5' **ctggcatctgcatggccctgg** 3'

5' CTGGCATCTGCATGGCCCTGG 3'

ANTI SENS: 3' CAATGCACGGAGCAGCCTCTCC 5'

5' GGAGAGGCTGCTCCGTGCATTG 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CTGGCATCTGCATGGCCCTGG	21	60.11	66.67%
Reverse primer	GGAGAGGCTGCTCCGTGCATTG	22	60.11	63.64%

- Commentaire [g1]: Primer sens
- Commentaire [g2]: rs9524842  
13:95874769  
-11202 C/G  
78800 post ATG
- Commentaire [g3]: rs4773849  
13:95874783  
C/T -11216  
78786 POST ATG
- Commentaire [g4]: rs78634487  
13:95874819  
-11252 G/A  
78750
- Commentaire [g5]: rs1926656  
78627 post ATG  
G>A 11375  
78627
- Commentaire [e6]: rs1926657  
A/C  
dans le même sens ncbi et séquence 12440  
78613 post ATG
- Commentaire [g7]: primer anti sens

ABCC4 rs2274407 G>T  
Chromosome 13: 94657036

**Exon 8**

gcatgcacagaataacaaggaaaacatctacagaggaaagaactatatttcaaacagggatagctaagtgaagttagggcattcttctgaccaagaagcagagacccccagcaagctcttctccagcccacagaagaa  
tcatactcaactcatactcactacttctcattgggttaacataagagatgaaatctattgctttctgcttttagacagcttagacatttaaccccctgcagttaccacctgtacataaaaagccctgtgccactgctttatgtt  
gctgccaacaaatgaatcacaatgctgattgctttaccgcctctatctaagataggggaagtacaca caacattcggaaatggcggcagctttggattatgagagagttaaatgtcattacatggaacatagtgatgctaaataa  
aaggagacatcattctactcaaatgcacctacaacttaaaatggcatctgacacaaactggattctcggatgctgacgattgcctctgaca ccctctcaatggctgaggggaagaagagggtaacgctcagccgacagcccc  
atacagctcactgccagaacagcggctggctgtgactcactgccaggagcagtaggtggtgaaggtcacaacacagatgatttgcctgactgaaaaatgaagccaaattcatccctgaggcaggaactctcagaa  
tcttggaaatctccttctgaaagagagtacaggtttataaaaagcagtgatgtcaaccagataaaagtggctcacgctgcaatctcagcactttgggagctgaggtggatgaattgtttgaaccaggagttgagaccatcctgg  
gcaacaacacaaaaaagtcaaaaggtgagaggtggccaggaaactaccaagaaatcataagaagtatcatgtgctggaatgcaacaactaatcaaatatttaaccaaaagccaaaaaaatacatatttgtttttgaga  
cagagttcactcttgcgccaggcaatggtgcatctcagctcactgcaactccgctcctgttcaagcattctcctgctcagcctcctcaagtagctaggattacaggcatgtgccaccagcccagcaaatgttgtatttta  
gtagagacagggttaccatgttggccaggctggtctcaactcctgacctcaggtgatccaccgctcagcctc

- Commentaire [g1]: rs3818493  
13:95858686 pp11
- Commentaire [g2]: rs3818494  
13:95858704 pp18
- Commentaire [g3]: rs11568702  
13:95858778 pp92
- Commentaire [g4]: rs11568701 G>A
- Commentaire [g5]: rs11568703  
13:95858912 C>T
- Commentaire [g6]: rs2274405 T>C
- Commentaire [g7]: rs2274406 T>C
- Commentaire [e8]: exon8
- Commentaire [e9]: rs2274407  
15%T 84%G

**Taille de l'amplicon 684**

SENS: 5'TGGAATGGCGGCACGTTTTGG 3' CAAAACGTGCCGCCATTCCA 5'

antisens: 3' TCACTTGTGCGCCAGGCA 5' 5' TGCCTGGGCGACAAGAGTGA 3'

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	TGGAATGGCGGCACGTTTTGG	21	58.80	57.14%
Reverse primer	TGCCTGGGCGACAAGAGTGA	20	57.99	60.00%



ABCC4 rs1751034

[-/C/T] anti sens

G>A sens

Chromosome 13 :

## Exon 26

```

cctccaccatcagagcaaacactcactgggtctgtgtgaaatacaccacacactctcacaatggtgatcgttaaggaagatgaagcagaagtgcagagagatggaattccgtctctcatgttctcctgctattctttaacaacctct
ggttaaatcattcaccaagagctagattctaaaagtaccacaaagccaactataagtttttaactctcacagcccaagttcacagaagccctcatggaggtaatcaccttgagaaggtagcttagttctacagcaaat
tccaactaagacacttaaaatccacatctcccatagaaacctcccagtgctaaacaacaatgcatcattttgtctttatggttatcagtgataaaactgtggcatcttagtacagaaatctatctgctgaagtattataaatatc
acacacacacacacacacacacagagagagagagaaatgaacaaagctggatctctgatgaaaatacctgttgaaaatctctgcataaaaaacatgctctattgggtgaaaaaaaaaacaactcttcatccaattaaaaaagc
aataagagtaaaagcaataaacatagtagctcttataaaaggggcaggttaaggacgctatgactgcatacctggaggtatgattgacatctctccttaaatcgtgaagtccaatttcagttgtcaagatcttcaatccaatttt
acctcgggtctgacaatctaaaaaggctgagatgagggaaacttttccagctccggtctctccacaatccaaactacagagagatccaggcggcaggattaaaaaaaaaaaaaacacaggatgcagcaaaactaggag
aaaacttcggttttgaagaagaattaaggacattctataggtagtagtctaaaggttcccaacctcagcactgatccttctgagctggatactcttcatttggaaagctgccccaggcattgtggagggttcgctagcatccc
tggaccctactgcatagataccaggagcacactcccaaatgataccacaaaatgtcactgacaaagctcctctggggcaaaactcccctgggtgagatccactgttcaaaaaaggttgaaataacagaaatctgtttactg

```

Taille de l'amplicon 778

Primer exon 26 sens 5' **aaagccctcatggaggtaatcacc** 3' 5' AAAGCCCTTCATGGAGGTAATCACC 3' à commander

anti sens 3' **ttcattttggaagctgccccagg** 5' 5' CCTGGGGCAGCTTCCAAAATGAA 3' à commander

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	AAAGCCCTTCATGGAGGTAATCACC	25	56.77	48.00%
Reverse primer	CCTGGGGCAGCTTCCAAAATGAA	23	57.76	52.17%

- Commentaire [g1]:** Primer sens
- Commentaire [g2]:** rs56938225  
13:95714579  
G 3745 A
- Commentaire [g3]:** rs931110  
13:95714596  
G 3728 A
- Commentaire [f4]:** 13:95714622  
rs56695310  
G 3702 T
- Commentaire [f5]:** 13:95714667  
rs61967191  
C 3656 A
- Commentaire [f6]:** Insertion ENTRE  
3579...3578  
-/CACACACA  
13:95714745..95714746  
rs35514875
- Commentaire [f7]:** INSERTION  
-/CACA 3575...3574  
13:95714749..95714750  
rs72382353
- Commentaire [f8]:** INSERTION  
-/CACACACA 3574...3573  
13:95714750..95714751  
rs5805900
- Commentaire [f9]:** INSERTION  
-/CACA 3573...3572
- Commentaire [f10]:** INSERTION  
-/CACA 3562...3561
- Commentaire [g11]:** rs111268334  
T>C
- Commentaire [e12]:** rs1751034=gg  
57270423
- Commentaire [e13]:** exon 26  
(116096...116251)
- Commentaire [g14]:** primer antisens
- Commentaire [g15]:** Primer sens
- Commentaire [g16]:** primer antisens

## ANNEXE J SNP CHECK ABCC2

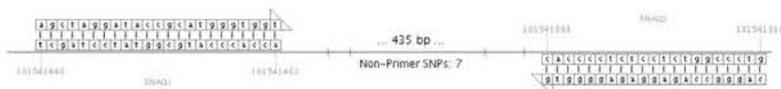
### SNPCheck Results Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
5NA	agtaggtatccgcatggggggf	23/0	CAGGGCCAGAGGAGAGG GGTG	21/0	10	479 bp 101541440. 101541918	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Wed, Feb 16 09:13:07 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Wed, Feb 16 09:13:17 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HepMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

### 5NA



### 5NA(1)

Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 1

### 5NA(2)

Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 37

### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs17216128	10:101541537	126	127	yes
rs45593436	10:101541542. 101541543	127	127	yes
rs7910642	10:101541579	116	132	yes
rs2804402	10:101541583	100	132	yes
rs17222533	10:101541804	126	127	no
rs73332129	10:101541827	130	132	yes
rs17216135	10:101541869	126	127	no

## SNPCheck Results

### Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
abcc2-24	gcacckctgtgattgtggccagctc	25/0	acaacaattctctctccacaagg	25/0	10	677 bp 101542273.. 101542949	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database/s: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Wed, Feb 16 11:28:33 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Wed, Feb 16 11:28:43 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

#### abcc2-24



**abcc2-24(1)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 16

**abcc2-24(2)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 388

#### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs111640918	10:101542496	132	132	no
rs717620	10:101542578	86	132	yes
rs17216156	10:101542579	126	132	yes
rs59365116	10:101542735	129	130	yes
rs35688626	10:101542766	126	126	no

## SNPCheck Results

### Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
rs3740066	gtcctgggtggaactgfcggctg	23/0	gctggctaggaggcaggaggagc	24/0	10	457 bp 101604010.. 101604466	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database/s: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Wed, Feb 16 10:20:32 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Wed, Feb 16 10:21:28 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

rs3740066



rs3740066(1)  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 3

rs3740066(2)  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 75

#### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs113321977	10:101604037	132	132	no
rs17216317	10:101604107	126	132	yes
rs4148400	10:101604130	110	132	yes
rs4148401	10:101604162	110	126	yes
rs66898362	10:101604163	130	130	yes
rs3740066	10:101604207	107	132	yes
rs17216310	10:101604243	126	127	yes
rs41318033	10:101604418	127	127	no
rs65868143	10:101604420	129	132	yes

**SNPCheck Results**  
Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
rs2273697	atgggtagatggaggagggggg	25/0	ccagcttgccttgczaaacctcc	25/0	10	581 bp 101563555, 101564135	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database's dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
Check completed: Wed, Feb 16 09:49:14 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Wed, Feb 16 09:50:49 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
Classified as: no variation  
Longer than 10bps

rs2273697



rs2273697(1)  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 37

rs2273697(2)  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 16

**Non-Primer SNPs**

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs113408513	10:101563698	132	132	no
rs17216190	10:101563785	126	132	yes
rs2273697	10:101563815	100	132	yes
rs71488021	10:101563912	130	130	no
rs4267009	10:101564000	111	132	yes
rs113646094	10:101564012	132	132	yes

rs17222589	10:101564023	126	132	yes
------------	--------------	-----	-----	-----

**SNPCheck Results**  
Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
rs8187710	gctgttggagatgatggcaacc	24/0	ccctggggggggggtagcaagg	24/0	10	663 bp 101609611, 101611623	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database's dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
Check completed: Tue, Feb 15 10:09:43 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Tue, Feb 15 10:10:23 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
Classified as: no variation  
Longer than 10bps

rs8187710



rs8187710(1)  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 14

rs8187710(2)  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 46

**Non-Primer SNPs**

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs74923203	10:101610993	131	132	yes
rs75603256	10:101610998	131	132	yes
rs75896560	10:101611045	131	131	yes
rs35296652	10:101611109	126	126	no
	101611110			
rs77877630	10:101611169	131	132	yes

rs8187709	10:101611277	123	132	yes
rs8187710	10:101611294	123	132	yes
rs24155707	10:101611467	130	132	yes
rs11362742	10:101611493	120	120	no

## SNPCheck Results

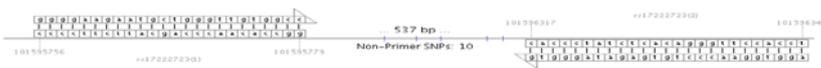
### Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
rs17222723	ggggagaaatgctggggtggcc	2/0	aggfagaacctgtgagatagggtg	2/0	10	686 bp 101596756. 101596341	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1 Source Database/s: dbSNP 132 Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Wed, Feb 16 10:09:30 GMT SNPCheck version: 2.1 PDF Generated: Wed, Feb 16 10:09:41 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

### rs17222723



**rs17222723(1)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 23

**rs17222723(2)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 23

### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs17222709	10:101595815	126	127	yes
rs72568200	10:101595882	130	132	yes
rs72568201	10:101595950	130	132	yes
rs8187692	10:101595975	123	132	yes
rs17216324	10:101595994	126	127	no
rs17222723	10:101595996	126	132	yes

rs17222716	10:101596053	126	127	no
rs114782123	10:101596112	132	132	yes
rs36842666	10:101596225	126	126	no
rs74803823	10:101596264	131	131	no

## ANNEXE K SNP CHECK ABCC4

### SNPCheck Results

#### Overview

Name	Primer 1	Matching/Mismatching bases	Primer 2	Matching/Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
exon4et5	GGAGAGGCTGCTCCGTG CATTG	22/0	ctggcatdgcattgccctgg	21/0	13	469 bp 95874722.. 95875190	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database/s: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Tue, Feb 22 14:20:22 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Tue, Feb 22 14:20:43 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

#### exon4et5



**exon4et5(2)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 6

**exon4et5(1)**  
 Raw BLAST Results  
 100% Hits: 1  
 Other Hits: 5

#### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs9524842	13:95874769	119	132	yes
rs4773849	13:95874783	111	132	yes
rs78634467	13:95874819	131	132	yes
rs1926656	13:95874942	92	132	yes
rs1926657	13:95874956	92	132	yes

**SNPCheck Results**  
Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
EXON8	TGCCTGGCGACAAGAG TGA	20/0	TGGAATGGCGGCACGTT TTGG	21/0	13	684 bp 95858655.. 95859338	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database/s: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Wed, Feb 23 09:13:26 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Wed, Feb 23 11:08:11 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

**EXON8**



**EXONS(2)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 2

**EXONS(1)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 2  
Other Hits: 253

**Non-Primer SNPs**

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs3818493	13-95858686	107	132	yes
rs3818494	13-95858704	107	132	yes
rs11566702	13-95858770	126	131	yes
rs11568701	13-95858880	126	132	yes
rs11568703	13-95858912	126	132	yes
rs2274405	13-95868978	100	132	yes

rs2274406	13-95858996	100	132	yes
rs2274407	13-95859035	100	132	yes
rs6413442	13-95859058	116	132	yes
rs79705196	13-95859073	131	131	yes
rs3818495	13-95859160	107	132	yes
rs112178408	13-95859281	132	132	no
rs115464175	13-95859282	132	132	yes
rs72514981	13-95859288	130	130	no
rs10597066	13-95859290	119	130	no

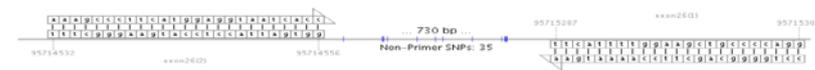
**SNPCheck Results**  
Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr	Amplified Region	Result	SNPs
exon25	CCTGGGGCAGCTTCCAA AATGAA	23/0	aaagccctcatggaggaatcacc	25/0	13	778 bp 95714532- 95715309	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1      Source Database/s: dbSNP 132      Max. Amplicon Size: 5000  
 Check completed: Tue, Feb 22 15:01:40 GMT      SNPCheck version: 2.1      PDF Generated: Tue, Feb 22 15:02:03 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
 Classified as: no variation  
 Longer than 10bps

**exon26**



**exon26(2)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 11

**exon26(1)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 12

**Non-Primer SNPs**

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs55938225	13-95714579	129	129	no
rs9311110	13-95714596	86	132	yes
rs66695310	13-95714622	129	132	yes
rs61967191	13-95714667	129	131	yes
rs35514875	13-95714745- 95714746	126	130	no

rs72382353	13-95714749- 95714750	130	130	no
rs6806900	13-95714750- 95714751	114	130	no
rs71786573	13-95714751- 95714752	130	130	no
rs68130096	13-95714762- 95714763	129	130	yes
rs5029024	13-95714763	113	132	yes
rs112163931	13-95714764	132	132	no
rs5029025	13-95714765	113	132	yes
rs4148538	13-95714849	110	110	no
rs1751033	13-95714858	89	132	yes
rs112360695	13-95714859- 95714860	132	132	no
rs1729747	13-95714891	89	132	yes
rs11568651	13-95714919	126	132	yes
rs11568656	13-95714942	121	132	yes
rs111268334	13-95714959	132	132	no
rs1751034	13-95714976	89	132	yes
rs57270423	13-95714976	129	132	yes
rs11568655	13-95715014	126	132	yes
rs111856182	13-95715037	132	132	no
rs11568652	13-95715069	126	132	yes

rs11568653	13-95715113	126	132	yes
rs9302045	13-95715132	119	132	yes
rs4148537	13-95715141- 95715151	110	110	no
rs11568654	13-95715147	126	132	yes
rs36934714	13-95715149	126	130	no
rs113552955	13-95715149	132	132	no
rs1751035	13-95715152	89	131	yes
rs69430055	13-95715152	129	130	no
rs77837431	13-95715152	131	131	no
rs115928027	13-95715194	132	132	yes
rs114281201	13-95715252	132	132	yes

## SNPCheck Results

### Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
INT26	TGGCGATGACACAGC TATTTTC	23/0	GGAGACAAGACAAAAC CCAGGC	23/0	13	418 bp 95713399.. 95713816	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1  
Check completed: Fri, Apr 8 11:49:08 BST

Source Database/s: dbSNP 132  
SNPCheck version: 2.1

Max. Amplicon Size: 5000  
PDF Generated: Fri, Apr 8 11:49:27 BST

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:  
Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes  
Classified as: no variation  
Longer than 10bps

### INT26



**INT26(1)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 0

**INT26(2)**  
Raw BLAST Results  
100% Hits: 1  
Other Hits: 110

### Non-Primer SNPs

SNP ID	Genomic Position	Build Originated	Build Updated	Validated
rs1729745	13:95713471	89	132	yes
rs1630901	13:95713510	89	132	yes
rs9561777	13:95713557.. 95713622	119	130	no
rs34843402	13:95713585	126	132	yes
rs77547541	13:95713630	131	132	yes

rs11343244	13:95713636	120	120	no
rs74714402	13:95713662	131	131	yes
rs9566458	13:95713683	119	132	yes
rs9561778	13:95713715	119	132	yes

ANNEXE L PROTOCOLE AMPLITAQ CLASSIQUE

PCR ABCC4 EXON 26 ET intron 26

Date : 01/02/2011

Operateur: François

Taille de l'amplicon

303

PATIENTS		[C] ADN en ng/µl	Exon 26	
			vol d'ADN µL 200 ng/tube	vol d'eau qsp 25 µl
1-	Durand	91,8	2,2	22,8
2-	MARTIN	113,3	1,8	23,2
3-	DUPOND	117	1,7	23,3
4-	DUPONT	97,3	2,1	22,9
5-				
6-				
7-				
8-				
9-	blanc			25,0
10-				

EAU		Exon 26	
		MIX n=	6
lot	O. le Exp. Le	15,5	93
n= nb ech+ blanc+ 1			
Tampon PCR avec MgCl2 15mM		5	30
Lot	O. le Exp. Le		
Mix dNTP 10mM MP		2	12
Lot	O. le Exp. Le		
Primer MRP4-ex26seq S (20µM) lot S7195A03 (411µM) repris le 29/06/2011 à dilué au 1/21		dilué le 1	6
Primer MRP4-ex26seq AS (20µM) lot S7207G08 (301µM) repris le 29/06/2011 à dilué au 1/15		dilué le 1	6
Amplitaq DNA pol (µL)		0,5	3
lot	O. le Exp. Le		
Volume à redistribuer		25	

Programme thermocycler	prog ABCC4 exon 26seq
Dénat initiale	94°C 5 min X1cycle
Dénaturation	94°C 1 min
Hybridation	52°C 45 secondes et 56°C
Elongation	72°C 1 min
Nb de cycles	35 cycles
Elongation finale	72°C 7 min X1cycle

## ANNEXE L Bis PROTOCOLE AVEC AMPLITAQ GOLD

### PCR ABCC2: recherche de la mutation -24C 5'UTR appelé EXON 1

Date: 24/02/2011

Opérateur: François

N°	Patients	[ADN] ng/μL	vol ADN en μL qsp 180ng	vol eau en μL qsp 20μL	
1	Tom	48,3	3,7	16,3	
2	Jerry	42,2	4,3	15,7	
3	Sylvestre	184	1,0	19,0	
4	TITI	24	7,5	12,5	
5	blanc	0		20,0	
volume en μL n= nb ech+ blanc+1			ABCC		
			MIX n=	6	[C]
H2O	lot : exp. O. le		21,6	129,6	
Tampon PCR 10X avec MgCl2 Applied Biosystems	Lot Exp O.le		5	30	1X
Mix dNTP 10mM Applied Biosystems	Lot Ouvert le		1	6	0,2 mM
ABCC2S (20μM)	reprise le lot 547045 à 857μM dilution au 1/43 diluée le	24/04/2003 ??	1	6	0,4 μM
ABCC2AS (20μM)	reprise le lot 547046 à 1738μM dilution au 1/87 diluée le	24/04/2003 ??	1	6	0,4 μM
Amplicon Gold Applied Biosystems	Lot O. le Exp.		0,4	2,4	2 U/tube
Volume à redistribuer			30		

Volume final = 50 μL

Dénat initiale	94°C 10 min X1cycle
Dénaturation	94°C 1min
Hybridation	55°C 1min
Elongation	72°C 1min
Nb de cycles	37 cycles
Elongation finale	72°C 5min X1cycle
	retour à +4°C

THERMOCYCLEUR :

Programme : ABCC

#### CONDITIONS D'ELECTROPHORESE:

GEL: Agarose 2%, TBE 1X

MIGRATION: 100v, TBE 0,5X, 20-30 min

DEPOT: 5μL d'échantillon + 2μL colorant

Ladder 100pb: 1μL

RESULTAT: taille de l'amplimère 200pb

**ANNEXE L Ter PROTOCOLE GOTAQ GREEN PCR ABCC2 Promoteur, Exon 1, Exon 10, Exon 25, Exon 28 et Exon 32**

Date :

09/07/2011

Operateur: François

PATIENTS	[C] ADN en ng/µl	MRP2		Programme thermocycler	prog ABCC2 exon 1, 25, 10, 32	prog ABCC2 Promoteur et exon 28
		vol d'ADN 150 ng/tube	vol d'eau qsp 10 µl			
1- DUPOND	64,3	2,3	7,7	Dénat initiale	94°C 4 min X1cycle	
2- DONALD	117	1,3	8,7	Dénaturation	94°C 45s	
3- MICKEY	84,3	1,8	8,2	Hybridation	60°C 45 s	62°C 45 s
4-				Elongation	72°C 1 min	
5-				Nb de cycles	30 cycles	
6- blanc			10,0	Elongation finale	72°C 5 min X1cycle	

Volume final : 30µl n= nb ech+ blanc+ 1		Promoteur		Exon 1		Exon 25		Exon 10		Exon 28		Exon 32		
lot	O. le Exp. Le	MIX n=		MIX n=		MIX n=		MIX n=		MIX n=		MIX n=		
EAU		4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	
Go Taq Green 2X Lot		15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	
Primer ABCC2 PROM S 20µM lot S5006D06 (579µM)	dilué au 1/29 le	0,5	2											repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 PROM AS 20µM lot S5006D07 (433µM)	dilué au 1/22 le	0,5	2											repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex1 S (20 µM) lot S5006D04 (552 µM)	dilué au 1/27,5 le			0,5	2									repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex1 AS (20 µM) lot S5006D05 (588µM)	dilué au 1/29 le			0,5	2									repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex 25 S (20µM) lot S5006D010 (527 µM)	dilué au 1/26,5 le					0,5	2							repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex 25 AS (20µM) lot S5006D011 (437 µM)	dilué au 1/22 le					0,5	2							repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex 10 S (20µM) lot S5006D08 (533 µM)	dilué au 1/26,5 le							0,5	2					repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex 10 AS (20µM) lot S5006D09 (540 µM)	dilué au 1/27 le							0,5	2					repris le 01/03/2011
Primer ABCC2 ex32 S (20 µM) lot S5006E02 (608 µM)	dilué au 1/30 le									0,5	2			repris le 01/03/2011

<b>Primer ABCC2 ex32 S (20 µM)</b> lot S5006E03 (714 µM)	dilué au 1/36 le									0,5	2			repris le 01/03/2011
<b>Primer ABCC2 Ex28 S 20µM</b> lot S5006D12 (572µM)	dilué au 1/29 le											0,5	2	repris le 01/032011
<b>Primer ABCC2 Ex28 AS 20µM</b> lot S5006E01 (429µM)	dilué au 1/21 le											0,5	2	repris le 01/032011
<b>Volume à redistribuer</b>		<b>20</b>												
	<i>Taille de l'amplicon</i>	479	677	586	578	454	662							

## ANNEXE M PROTOCOLE DE SEQUENÇAGE

### Réaction de séquence abi prism ABCC4

05/07/2011

Opérateur : François

1/ PCR: voir procédure du

2/ Purification enzymatique:

Dans microgodets 0,2 ml : 5 µl Produit PCR + 1,5 µl enzyme Exosap-it **lot n° 4123869 O. le 20/06/11**

3/ dilution du produit purifié:

Effectuer une dilution en ajoutant 5 µl d'eau stérile.

**Si le signal de la pcr est faible, ne pas diluer.**

3/ réaction de sequençage:

	1	2	3	4
A s	1059 Ex10 S	1059 Ex25 S	1059 Ex25 S	1059 Ex25 S
B as	1059 Ex10 AS	1059 Ex25 AS	1059 Ex25 AS	1059 Ex25 AS
C s	1060 Ex10 S	1060 Ex25 S	1060 Ex25 S	1060 Ex25 S
D as	1060 Ex 10 AS	1060 Ex 25 AS	1060 Ex 25 AS	1060 Ex 25 AS
E s	1062 Ex10 S	1062 Ex25 S	1062 Ex25 S	1062 Ex25 S
F as	1062 Ex 10 AS	1062 Ex 25 AS	1062 Ex 25 AS	1062 Ex 25 AS
G s	1064 Ex10 S	1064 Ex25 S	1064 Ex25 S	1064 Ex25 S
H as	1064 Ex 10 AS	1064 Ex 25 AS	1064 Ex 25 AS	1064 Ex 25 AS

	5	6	7	8
A s	1059 Ex10 S	1059 Ex25 S		
B as	1059 Ex10 AS	1059 Ex25 AS		
C s	1060 Ex10 S	1060 Ex25 S		
D as	1060 Ex 10 AS	1060 Ex 25 AS		
E s	1062 Ex10 S	1062 Ex25 S		
F as	1062 Ex 10 AS	1062 Ex 25 AS		
G s	1064 Ex10 S	1064 Ex25 S		
H as	1064 Ex 10 AS	1064 Ex 25 AS		

Répartir 2 µl d'amorce sens, puis antisens dans les puits correspondant en suivant le tableau ci-dessus.

Répartir 2 µl de produit de PCR purifié et dilué si nécessaire en suivant le tableau ci-dessus.

Amorces

**MRP4 intron4 S** (574µM) lot S7195A01 à 5µM Reprise le 29/06/11 diluée au **1/115** le **5/07/11**

**MRP4 intron4 AS** (483µM) lot S7195A02 à 5µM Reprise le 29/06/11 diluée au **1/97** le **5/07/11**

**MRP4 Ex8 S** (413µM) lot S5006E06 à 5µM Reprise le 08/03/11 diluée au **1/83** le **25/05/11**

**MRP4 Ex8 AS** (474µM) lot S7195A05 à 5µM Reprise le 29/06/11 diluée au **1/95** le **5/07/11**

**MRP4 Ex26seq.S** (411µM) lot S7195A03 à 5µM Reprise le 29/06/11 diluée au **1/82** le **5/07/11**

**MRP4 Ex26seq.AS** (301µM) lot S7207G08 à 5µM Reprise le 29/06/11 diluée au **1/60** le **5/07/11**

**ABCC4 Intron26 S** (458µM) lot S5006E10 à 5µM Reprise le 8/03/11 diluée au **1/92** le **25/05/11**

**ABCC4 Intron26 AS** (353µM) lot S5977B12 à 5µM Reprise le 17/05/11 diluée au **1/71** le **25/05/11**

Pré Mix 1/8 20µL

	n+1	18	
<b>Big Dye V1.1</b> lot:1011056M	2	36	ouvert le 28/06/11 Exp le 01/07/12
<b>TP 5X</b> lot:1103200	7	126	ouvert le 28/06/11
<b>EAU</b> lot:4400339	7	126	ouvert le 5/07/11 Exp le 03/2012

Étape	température en °C	durée	cycle

Dans un microgodet stérile , préparer le le prémix comme indiqué dans le tableau ci-contre

**Redistribué 16 UL de prémix dans chaque puits**

**5/ purification sur plaque lot n° 139274943**

**6/ SEQUENCEUR : CASTOR**

dénaturation initiale	96	1 min	1
dénaturation	96	10 s	30
hybridation	<b>58</b>	5s	30
élongation	60	4 min	30

ANNEXE N Explication du tableau des données brutes de la recherche par séquençage de 31 patients sous Ténofovir. Explication du tableau en annexe.

nom prénom	sexe	ABCC2 prom A/G	ABCC2 ex1 -24 C/T	ABCC2 10 G/A	ABCC2 25 T/A	ABCC2 28 C/T	ABCC2 32 G/A	INT4 78613 T/C	Ex8 94534 C/A/G/T	Ex 26 238593 T/C	int 26 239724	âge	poids	créatinine µmol/L	MDRD mL/min/1,73 m <sup>2</sup>	AUC h.mg/L	poids/ créatinine		
amfa	f	A/G	C/C	G/G	T/T	C/C	G/G	T/T	C/C	C/T	T/T	59	36	64	88	2,66	0,56		
auso	f	G/G	C/C	G/A	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	C/T	T/G	29	80	45	152	0,7966	1,78		
badi	m	A/A	C/C	G/G	T/T	C/C	G/G	C/C	C/A	T/T	T/T	49	69	101	72	2,62	0,68		
beis	f	A	ABCC2							ABCC4			48	100	61	97	0,7985	1,64	
bema	m	A	ABCC2							ABCC4			55	63	84	116	2,31	0,75	
brri	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	50	66	109	66	2,51	0,61		
caer	m	A/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	50	69	66	118	1,919	1,05		
dado	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	48	64	72	108	1,59	0,89		
drmo	m	A/G	C/C	G/A	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	50	66	47	175	0,971	1,40		
dugu	m	A/A	C/C	G/A	T/T	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	64	66	84	110	2,722	0,79		
fabr	f	A/G	C/C	G/A	T/T	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	39	60	52	121	1,62	1,15		
firo	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	63	65	65	63	1,7	1,00		
gafr	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	66	67	79	90	2,018	0,85		
havi	f	G/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	38	45	62	99	2,538	0,73		
kear	m	A/A	C/C	G/G	T/A	C/C	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T	47	66	89	85	2,116	0,74		
khmo	m	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	37	55	102	76	2,027	0,54		
lade	m	A/A	C/C	G/A	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G	71	73	111	60	2,386	0,66		
lala	f	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/A	T/T	C/C	C/T	T/T	20	64	64	109	1,394	1,00		
laph	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T	46	64	89	85	3,065	0,72		
lebr	m	A/G	C	Résultats des 10 SNPs : 6 de ABCC2 et 4 de ABCC4								T/T	T/T	46	65	101	73	2,05	0,64
lipa	m	A/A	C	Résultats des 10 SNPs : 6 de ABCC2 et 4 de ABCC4								T/T	T/T	50	65	75	102	1,83	0,87
meat	m	G/G	C	Résultats des 10 SNPs : 6 de ABCC2 et 4 de ABCC4								T/T	T/T	64	74	120	56	2,04	0,62
mibr	m	G/G	C/T	G/G	T/T	C/T	G/A	T/T	C/C	T/T	T/T	35	90	88	93	1,093	1,02		
muva	m	A/G	C/C	G/A	T/T	C/C	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T						1,60		
odmi	m	G/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T						1,87		
pecoda	m	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	T/T	T/T						1,98		
pije	m	G/G	C/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/G						1,47		
poro	m	G/G	C/C	G/G	T/A	C/T	G/A	T/C	C/C	T/T	T/T						1,56		
ridi	m	A/G	C/C	G/G	T/A	C/C	G/A	C/C	C/C	C/T	T/G						1,59		
umhe	f	A/A	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	C/C	C/C	C/T	T/T	37	83	49	131	1,131	1,69		
woro	f	A/G	C/C	G/G	T/T	C/T	G/G	T/C	C/C	T/T	T/T	40	57	71	84	1,65	0,80		

Caractéristiques démographiques et biologiques des patients  
En vert (grisé) les sujets insuffisants rénaux

## ANNEXES O COMMANDES UTILISEES AVEC LE LOGICIEL R.

### Test de fisher:

```
>fisher.test(matrix(c(8,21,12,21),2,2, byrow=TRUE))
```

### Test Wilcoxon-Mann Whitney:

```
>wilcox.test(c(37,71,46,46,50,49,50,63,64,71),c(48,55,50,50,64,66,47,46,50,35,22,31,23)  
)
```

### Corrélation de spearman:

```
>m=matrix(c(72,2.62,66,2.51,63,1.7,76,2.027,60,2.386,73,2.05,56,2.04,51,3.98,54,1.93,7  
3,2.68),10,2, byrow=TRUE)
```

```
>cor.test(m[,1], m[,2], method="spearman")
```

### T de Student:

```
>t.test(c(102,111,101,139,100,101,109,65,120,122,72,84,66),c(47,84,79,89,89,75,88,70,8  
5,59))
```

### Test du $\chi^2$ :

```
> chisq.test(matrix(c(67,33,88.5,11.5),2,2, byrow=TRUE))
```

--  
BIBLIOGRAPHIE  
--

1. INVS. Institut de veille sanitaire. Surveillance du VIH-sida en France Données du 30 septembre 2008. 2008;  
[http://www.invs.sante.fr/publications/2009/vih\\_sida\\_donnees\\_septembre2008/sida\\_vih\\_france\\_30septembre2008.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2009/vih_sida_donnees_septembre2008/sida_vih_france_30septembre2008.pdf) consulté le 17 octobre 2010.
2. YENI, P., Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH (Rapport 2010). 2010.
3. Gagnieu, M.C., et al., Population pharmacokinetics of tenofovir in AIDS patients. *J Clin Pharmacol*, 2008. **48**(11): p. 1282-8.
4. Rodríguez-Nóvoa, S., et al., Predictors of kidney tubular dysfunction in HIV-infected patients treated with tenofovir: a pharmacogenetic study. *Clinical Infectious Diseases*, 2009. **48**(11): p. e108.
5. Institut Pasteur. Le virus du sida. 2009;  
<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/sida> consulté le 22.09.2011
6. Woo, e. Dr. Joel D. Weisman dies at 66; among the first doctors to detect AIDS. *Los Angeles Times* 2009, July 23;  
<http://www.latimes.com/news/nationworld/nation/la-me-joel-weisman23-2009jul23,0,7095313.story>. consulté le 22.09.2011
7. Gottlieb, G.J., et al., A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol*, 1981. **3**(2): p. 111-4.
8. Gottlieb, M.S., et al., Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
9. Barré-Sinoussi, F., et al., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868.
10. CNRS. Sida, le combat sans répit / N°218 Mars 2008 - Le Sida  
[/presse/journal/3758.htm](http://www2.cnrs.fr/presse/journal/3758.htm), 2008; <http://www2.cnrs.fr/presse/journal/3799.htm>.

11. UNAIDS. GLOBAL FACTS & FIGURES. 2010; [http://data.unaids.org/pub/FactSheet/2009/20091124\\_FS\\_global\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/FactSheet/2009/20091124_FS_global_en.pdf). consulté le 17 octobre 2010.
12. Pons-Vigues, M., et al., [Strategies to recruit immigrant women to participate in qualitative research]. *Gac Sanit*, 2009. **23 Suppl 1**: p. 90-2.
13. Decoster, A. and J. Lemahieu. Les rétrovirus 2008; <http://anne.decoster.free.fr/d1viro/indexvir.html> consulté le 29 septembre 2011.
14. Vaubourdolle, M., infectiologie. Wolters Kluwer SA ed, ed. moniteur de l'internat. Vol. 3. 2010.
15. Gupta, S.K., et al., Prevalence of proteinuria and the development of chronic kidney disease in HIV-infected patients. *Clin Nephrol*, 2004. **61**(1): p. 1-6.
16. Wyatt, C.M., et al., Acute renal failure in hospitalized patients with HIV: risk factors and impact on in-hospital mortality. *AIDS*, 2006. **20**(4): p. 561-5.
17. Atta, M.G., et al., Antiretroviral therapy in the treatment of HIV-associated nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006. **21**(10): p. 2809.
18. CMIT, Infection à VIH et sida. in E.PILLY: VivactisPlus. 2008: p. 468-487.
19. Rodriguez-Novoa, S., P. Labarga, and V. Soriano, Pharmacogenetics of tenofovir treatment. *Pharmacogenomics*, 2009. **10**(10): p. 1675-85.
20. Kearney, B.P., J.F. Flaherty, and J. Shah, Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 2004. **43**(9): p. 595-612.
21. Robbins, B.L., et al., Metabolic pathways for activation of the antiviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in human lymphoid cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(10): p. 2304-8.
22. van Bommel, F., et al., Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology*, 2010. **51**(1): p. 73-80.
23. Balzarini, J., et al., Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human

- immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(4): p. 1499-503.
24. McColl, D.J., et al., Patterns of resistance emerging in HIV-1 from antiretroviral-experienced patients undergoing intensification therapy with tenofovir disoproxil fumarate. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004. **37**(3): p. 1340-50.
  25. Gallant, J.E., et al., Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2004. **292**(2): p. 191.
  26. Gallant, J.E., et al., Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *New England Journal of Medicine*, 2006. **354**(3): p. 251-260.
  27. DIEUSAERT, GUIDE PRATIQUE DES ANALYSES MEDICALES. MALOINE ed. 2009.
  28. Hall, A.M., et al., Tenofovir-Associated Kidney Toxicity in HIV-Infected Patients: A Review of the Evidence. *American Journal of Kidney Diseases*, 2011.
  29. Imaoka, T., et al., Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir. *Mol Pharmacol*, 2007. **71**(2): p. 619-27.
  30. Zimmermann, A.E., et al., Tenofovir-associated acute and chronic kidney disease: a case of multiple drug interactions. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(2): p. 283-90.
  31. Arribas, J.R., et al., Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naive patients: 144-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2008. **47**(1): p. 74-8.
  32. Huisman, M.T., et al., Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS*, 2002. **16**(17): p. 2295.
  33. Ray, A.S., et al., Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(10): p. 3297.
  34. Kiser, J.J., et al., The effect of lopinavir/ritonavir on the renal clearance of tenofovir in HIV-infected patients. *Clin Pharmacol Ther*, 2008. **83**(2): p. 265-72.

35. Rodríguez-Nóvoa, S., et al., Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS*, 2010. **24**(7): p. 1064.
36. Goicoechea, M., et al., Greater tenofovir-associated renal function decline with protease inhibitor-based versus nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 2008. **197**(1): p. 102.
37. Mocroft, A., et al., Estimated glomerular filtration rate, chronic kidney disease and antiretroviral drug use in HIV-positive patients. *AIDS*, 2010. **24**(11): p. 1667-78.
38. Izzedine, H., et al., Reply to Ray and Cihlar. *Journal of Infectious Diseases*, 2007. **195**(9): p. 1390.
39. Lewis, W. and M.C. Dalakas, Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Medicine*, 1995. **1**(5): p. 417-422.
40. Bagnasco, S., et al., Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1985. **248**(4): p. F522.
41. Niaudet, P. and A. Rötig, The kidney in mitochondrial cytopathies. *Kidney international*, 1997. **51**(4): p. 1000-1007.
42. Barditch-Crovo, P., et al., Phase i/ii trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(10): p. 2733-9.
43. Jullien, V., et al., Population pharmacokinetics of tenofovir in human immunodeficiency virus-infected patients taking highly active antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(8): p. 3361-6.
44. Kiser, J.J., et al., Pharmacokinetics of antiretroviral regimens containing tenofovir disoproxil fumarate and atazanavir-ritonavir in adolescents and young adults with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(2): p. 631-7.
45. Uwai, Y., et al., Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm Res*, 2007. **24**(4): p. 811-5.

46. pharmgkb.  
<http://www.wwwpharmgkb.org/do/serve?objid=PA10204&objCls=Drug> consulté le 17 octobre 2010.
47. Cihlar, T., et al., Short communication Molecular assessment of the potential for renal drug interactions between tenofovir and HIV protease inhibitors. *Antiviral therapy*, 2007. **12**: p. 267-272.
48. Izzedine, H., et al., Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2006. **194**(11): p. 1481.
- 48bis. Micoud J, Rôles des interactions interdomaines dans le comportement cellulaire de la protéine CFTR. Th Doctorat, Grenoble 1.
49. Linton, K.J., Structure and function of ABC transporters. *Physiology*, 2007. **22**(2): p. 122.
50. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 2001. **42**(7): p. 1007.
51. UCSF. Pharmacogenetics of membrane transporters.  
<http://pharmacogenetics.ucsf.edu/goals.html>> consulté en octobre 2011.
52. Pharmgkb. [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org) consulté en février 2011.
53. Sassi, Y., et al., Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest*, 2008. **118**(8): p. 2747-57.
54. Schuetz, J.D., et al., MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med*, 1999. **5**(9): p. 1048-51.
55. van de Ven, R., et al., A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2353-9.
56. Joly, La pharmacogénomique: perspectives et enjeux éthico-juridiques. *Lex Electronica*, 2004. **9**(3): p. 2-18.
57. Bearn, A.G., Archibald Edward Garrod, the reluctant geneticist. *Genetics*, 1994. **137**(1): p. 1-4.

58. Lorentz, C.P., et al. Primer on medical genomics part I: History of genetics and sequencing of the human genome. 2002: Mayo Clinic.
59. Serusclat, F. Rapport 20, Génomique et informatique : l'impact sur les thérapies et sur l'industrie pharmaceutique, Paris, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. 2000; [http://www.senat.fr/rap/o99-020/o99-020\\_mono.html#toc35](http://www.senat.fr/rap/o99-020/o99-020_mono.html#toc35) consulté en Août 2011.
60. Bourel, M. and R. Ardaillou, Pharmacogénétique et pharmacogénomique. Bulletin de l'academie nationale de médecine, 2006. **190**(1): p. 9-24.
61. Lorient, M.A. and P. Beaune, [Pharmacogenomics: the link between genes and response to drugs]. Med Sci (Paris), 2004. **20**(6-7): p. 634-6.
62. AFSSAPS, iatrogénie des AVK. Bulletin de pharmacovigilance, 2001. **mai 2001**: p. 1.
63. Siguret, V., Vitamine K: métabolisme, éléments de physiopathologie, implication dans la variabilité inter-et intra-individuelle de la réponse au traitement par les antivitamines K. Hématologie, 2006. **12**(6): p. 389-99.
64. Hall, A.M. and M.R. Wilkins, Warfarin: a case history in pharmacogenetics. Heart, 2005. **91**(5): p. 563-4.
65. D'Andrea, G., et al., A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. Blood, 2005. **105**(2): p. 645.
66. Lecomte, T., P. Laurent-Puig, and M.A. Lorient, Pharmacogénétique en hépatogastroentérologie.
67. Winter, J., et al., Cost effectiveness of thiopurine methyltransferase genotype screening in patients about to commence azathioprine therapy for treatment of inflammatory bowel disease. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2004. **20**(6): p. 593-599.
68. NCBI. SNP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> consulté en février 2011.
69. Kroetz, D.L., S.W. Yee, and K.M. Giacomini, The pharmacogenomics of membrane transporters project: research at the interface of genomics and transporter pharmacology. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(1): p. 109-16.

70. Kiser, J.J., et al., Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2008. **47**(3): p. 298-303.
71. Haenisch, S., et al., Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharmacogenetics and genomics*, 2008. **18**(4): p. 357.
72. Wojnowski, L., et al., NAD (P) H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*, 2005. **112**(24): p. 3754.
73. Abla, N., et al., The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **325**(3): p. 859-68.
74. Murabito, J.M., et al., A genome-wide association study of breast and prostate cancer in the NHLBI's Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*, 2007. **8 Suppl 1**: p. S6.
75. NCBI. Gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> consulté en février 2011.
76. NCBI. primerblast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> consulté en février 2011.
77. KOOLMAN, J. and K.-H. RÖHM, Atlas de poche de biochimie. Médecine-science, ed. Flammarion. 1995.
78. NCBI\_SNP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> consulté en octobre 2011.
79. NCBI\_genebank. [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) consulté en janvier 2011.
80. Shafi, T., et al., Ritonavir-induced acute kidney injury: kidney biopsy findings and review of literature. *Clin Nephrol*, 2011. **75 Suppl 1**: p. 60-4.
81. Société Française de Néphrologie (2009) Evaluation de la fonction rénale et de la protéinurie pour le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte., 1-4.
82. Levey, A.S., et al., A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*, 1999. **130**(6): p. 461-70.

83. Vervoort, G., H.L. Willems, and J.F. Wetzels, Assessment of glomerular filtration rate in healthy subjects and normoalbuminuric diabetic patients: validity of a new (MDRD) prediction equation. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17**(11): p. 1909-13.

L'ISPB - 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.

**MARTIN François**

## **Ténofovir, exposition et toxicité rénale.**

### **Polymorphismes des transporteurs d'efflux MRP2 et MRP4.**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2011, 177 p.

#### **RESUME**

Le Ténofovir, inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse est un des traitements de première intention de l'infection par le VIH, lors d'une trithérapie. C'est une molécule d'élimination rénale dont les effets indésirables rénaux sont établis. Deux transporteurs d'efflux, MRP2 et MRP4 ont été impliqués dans l'élimination rénale de la molécule.

Par séquençage nous avons recherché les polymorphismes de ces deux transporteurs pour les SNPs rs2804402, rs717620, rs2273697, rs17222723, rs3740066, rs8187710 d'ABCC2 et pour les SNPs rs1926657, rs2274407, rs9561778, rs1751034 d'ABCC4. Nous avons recueilli les données suivantes : le poids, l'âge, la créatinine. L'ASC et la clairance MDRD de la créatinine ont été calculés ainsi que le ratio poids /créatinine.

Ces données phénotypiques ont été mis en relation avec les génotypes, les allèles et les haplotypes des les polymorphismes des gènes ABCC2 et ABCC4 codant respectivement pour leurs protéines MRP2 et MRP4.

31 patients ont été inclus dans l'étude, 10 avaient une insuffisance rénale. Nous mettons en évidence des différences significatives entre groupe contenant le variant et le groupe ne le contenant pas, par rapport aux phénotypes étudiés. Pour ABCC2, le SNP rs2273697 (1249G/A) de l'exon 10 par son variant hétérozygote (G/A) montre augmentation de la clairance rénale de la créatinine en rapport au groupe homozygotes sauvage (G/G). Le SNP rs8187710 (4544G/A) présent sur l'exon32 présente une exposition au ténofovir plus élevée en présence du génotype G/G en rapport au groupe hétérozygote G/A.

On sait aujourd'hui que ces deux protéines d'efflux sont impliquées dans l'efflux du ténofovir, ABCC2 renforce son implication dans ce phénomène grâce à cette étude. Ces résultats permettent de proposer une étude plus complète sur ces deux protéines, notamment en augmentant la puissance de l'étude par augmentation du nombre de patient inclus et la prise en compte de traitements associés.

#### **MOTS CLES**

Sida--Médicaments  
Polymorphismes génétiques  
Rein -- Maladies  
Pharmacogénétique  
ABCC2 (MRP2)  
ABCC4 (MRP4)

#### **JURY**

M. TOD Michel, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier  
Mme GAGNIEU Marie-Claude, Praticien hospitalier - Biologiste  
M. MIAILHES Patrick, Docteur en Médecine – Praticien hospitalier

#### **DATE DE SOUTENANCE**

Vendredi 18 novembre 2011

#### **ADRESSE DE L'AUTEUR**

10, Rue Rosset – 69004 Lyon