

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique

**Polycopié**



# *Pharmacogénomique*

**Polyarthrite Rhumatoïde. Cancer colorectal. Epilepsie**

*Master II : Pharmaco-Toxicologie et Génétique appliquée*

**Dr N. BRIBI**

**2017**

# Sommaire

## *Avant-propos*

### **Chapitre I : Pharmacogénomique et traitement de la polyarthrite rhumatoïde**

I.	Polyarthrite rhumatoïde.....	04
I.2	Methotrexate.....	10
1.2.1	Pharmacologie du Methotrexate.....	10
1.2.2	Pharmacogénomique du Methotrexate.....	14
I.3	Azathioprine.....	17
1.3.1	Pharmacologie de l'Azathioprine.....	17
1.3.2	Pharmacogénomique de l'Azathioprine.....	20
I.4	Pharmacologie et Pharmacogénomique des anti-TNF- $\alpha$ .....	23

### **Chapitre II : Pharmacogénomique et traitement des cancers colorectaux**

II.1	Cancers colorectaux.....	29
II.1.1	Epidémiologie.....	30
II.2	Pharmacologie et Pharmacogénomique du 5-Fluorouracil.....	33
II.3	Pharmacologie et pharmacogénomique de l'Oxaliplatine .....	39
II.4	Pharmacologie et pharmacogénomique de l'Irinotécan.....	40

### **Chapitre III : Pharmacogénomique et traitement de l'Epilepsie**

III.1	Causes et signes de l'épilepsie.....	49
III.2	Traitement de l'épilepsie.....	50
III.3	Pharmacogénomique des anti-épileptiques.....	52
III.4	Barrière hémato-encéphalique.....	59

<b>Références</b> .....	63
-------------------------	----

## *Avant-propos*

Les avancées récentes de la connaissance étendue du génome humain ont entraîné d'importantes retombées scientifiques et technologiques. L'émergence des nouvelles disciplines que sont la pharmacogénétique et la pharmacogénomique en sont une illustration. La notion de pharmacogénétique s'applique à toute variabilité génétique interindividuelle qui peut influencer la réponse de l'hôte aux xénobiotiques en général. La pharmacogénomique est l'étude des facteurs génétiques qui établissent la façon dont une personne réagira à un médicament. Le terme provient des mots « pharmacologie » et « génomique », et se trouve donc à la croisée des chemins des produits pharmaceutiques et de la génétique. C'est un domaine de la génétique humaine en croissance rapide. Les scientifiques estiment que les mêmes différences génétiques qui font que chaque personne est unique (comme l'apparence, le comportement) peuvent également être les mêmes facteurs qui décident si un médicament fonctionnera contre nos maladies et s'ils auront des effets secondaires.

La pharmacogénétique s'appuie en grande partie sur l'existence de changements ponctuels de nucléotides (SNPs) qui correspondent à 10 % environ de la variabilité génétique du génome humain. Ainsi près de 1,5 million de SNPs ont été identifiés au cours de l'analyse du génome humain et une information sur les SNPs est accessible sur des bases de données électroniques. L'essor de la pharmacogénétique s'explique également par la large diffusion des techniques de biologie moléculaire permettant d'examiner les SNPs ou autres variabilités génétiques dans des laboratoires ne disposant pas d'équipements lourds très spécialisés.

L'exploration du lien entre la constitution génétique d'un individu et sa réaction aux médicaments est le champ d'investigation de la pharmacogénétique. De cette discipline est né l'espoir de pouvoir choisir le « bon » médicament pour un patient donné, c'est-à-dire la molécule qui soit, pour un individu particulier, à la fois efficace et dénuée d'effet indésirable majeur. En effet, même si des variables comme l'âge, le poids, certaines pathologies, les comédications, etc. peuvent influencer la réponse aux médicaments, la constitution génétique joue un rôle majeur persistant. Des tests permettant d'identifier certains polymorphismes génomiques garderont, une fois pratiqués chez un sujet donné, leur intérêt toute la vie durant, alors que des facteurs environnementaux comme des pathologies intercurrentes, des traitements associés, l'âge, etc. se modifient continuellement.

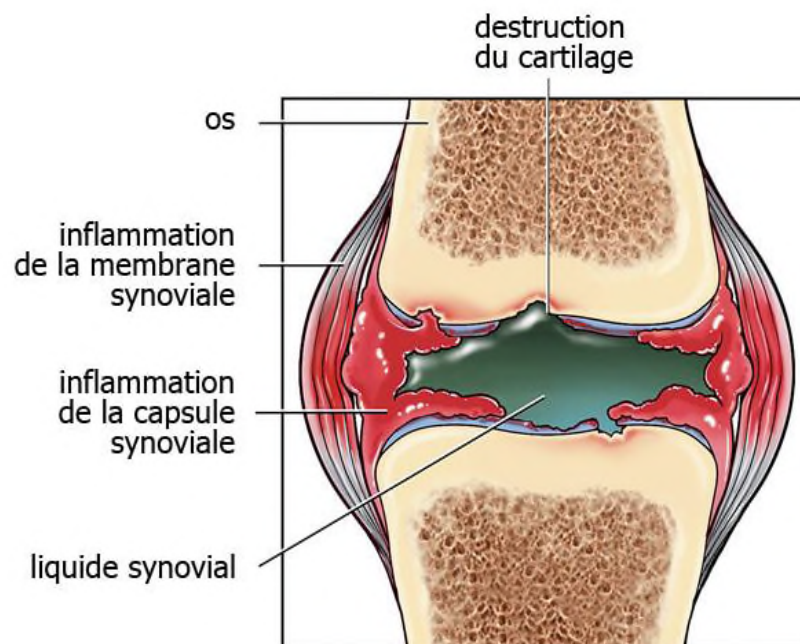
L'une des plus grandes réussites de la biologie au cours du dernier millénaire est la découverte de la génétique et l'élucidation des mécanismes de l'hérédité. L'hérédité est sans aucun doute l'un des phénomènes physiologiques les plus difficiles à comprendre chez l'être vivant. À l'aube de ce nouveau millénaire, l'humanité vient de recevoir un cadeau d'un prix inestimable : le séquençage complet du génome humain nous a permis de manufacturer un outil d'une grande puissance, capable de déverrouiller les secrets de notre héritage génétique et de définir notre place parmi l'ensemble des êtres vivants. La pharmaco-génomique vise à adapter le traitement au patient. Ce polycopié intitulé (Pharmacogénomique), dresse un résumé objectif que possible de la pharmacologie et la pharmacogénétique de la polyarthrite rhumatoïde et le cancer colorectal. Il est composé de trois chapitres très importantes dans l'évaluation et l'étude des effets thérapeutiques des anti-inflammatoires (Methotrexate, Azathioprine et les anti-TNF), des anticancéreux (5-Fluorouracil, Oxaliplatine et l'irinotecan) et des antiépileptiques (Phénytoïne, Digoxine, Phénylbarbitol). Il est principalement destiné aux étudiants en Master 2 Pharmaco-toxicologie et Génétique appliquée pour faciliter la compréhension des interactions gène-médicament issus des différents polymorphismes génétiques responsables de l'échec thérapeutique et l'apparition des effets secondaires néfastes.

## Chapitre I.

### **Pharmacogénomique et traitement de la polyarthrite rhumatoïde**

#### **I . Polyarthrite Rhumatoïde**

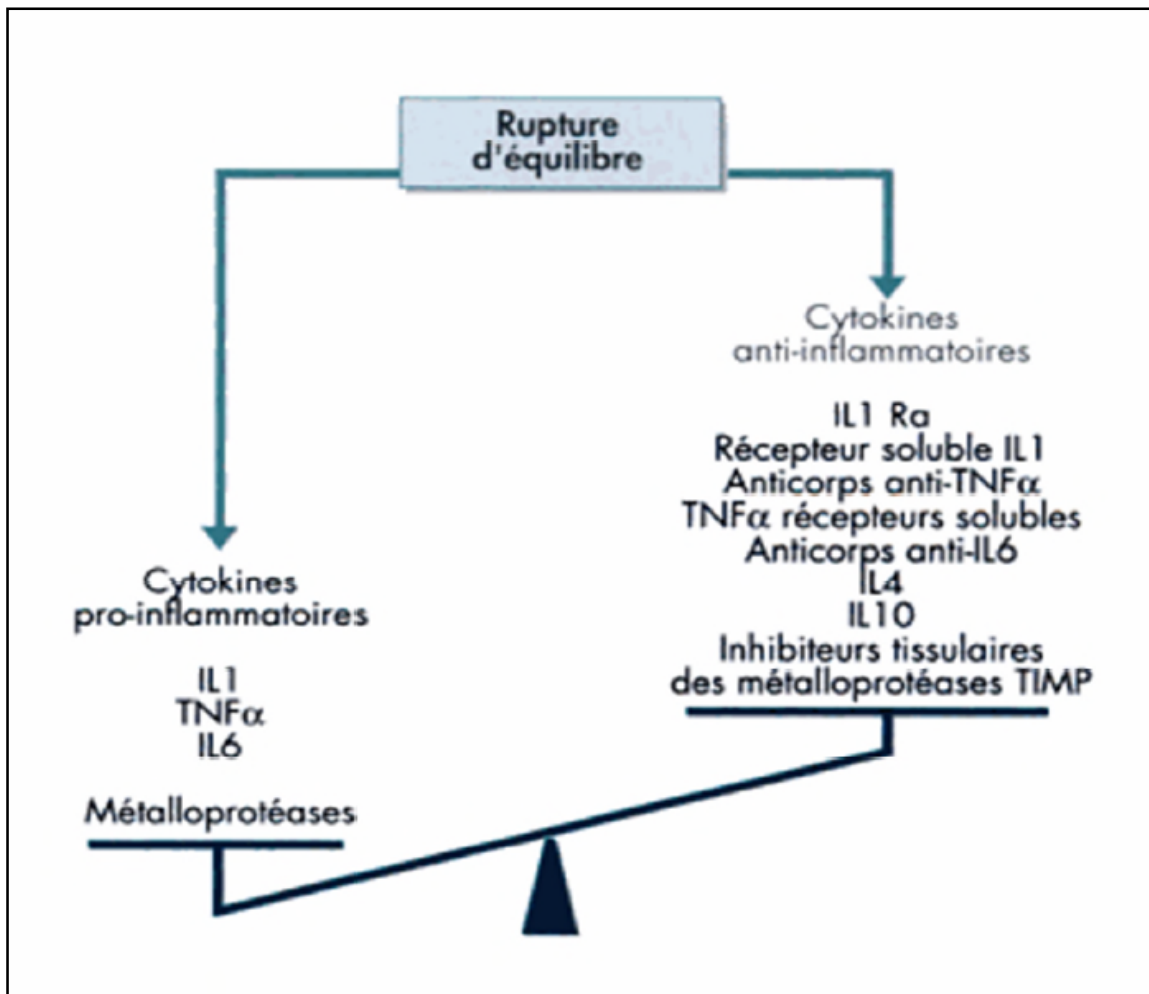
La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Autrefois appelée « polyarthrite chronique évolutive », elle est classée parmi les maladies dites systémiques (en raison de l'existence de manifestation extra-articulaires) et les maladies auto-immune (en raison de la présence d'auto-anticorps comme le facteur rhumatoïde). En effet il existe des anomalies du système immunitaire qui se manifestent par la production d'auto-anticorps. C'est aussi le plus grave des rhumatismes notamment par le risque de développer des destructions articulaires irréversibles, des déformations articulaires et un handicap parfois important. Dans la polyarthrite rhumatoïde, le dérèglement du système immunitaire produit une inflammation et une prolifération de la membrane synoviale articulaire (membrane qui tapisse l'articulation). Cette inflammation est appelée synovite rhumatoïde et est responsable des premiers symptômes que sont la douleur, la raideur et le gonflement de l'articulation. La membrane synoviale est la principale cible de la PR. La synoviale recouvre la capsule articulaire, la gaine des tendons et les bourses séreuses (figure 1).



**Figure 1 :** Arthrite ; Inflammation d'une articulation.

La polyarthrite rhumatoïde est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques (prévalence estimée entre 0,3 et 0,8 % de la population adulte). L'âge moyen du début est 50 ans. La polyarthrite rhumatoïde est trois fois plus fréquente chez la femme à cet âge mais cette différence de sex-ratio s'atténue progressivement au-delà de 70 ans. La polyarthrite rhumatoïde est une affection multifactorielle relevant de facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, neuropsychologiques et immunologiques. La synovite inflammatoire est la lésion élémentaire responsable de la destruction articulaire. Elle est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T. Plusieurs phases caractérisent l'évolution de la synovite rhumatoïde : initiation, recrutement cellulaire et inflammation, prolifération synoviale, destruction de l'articulation et réparation. Elles peuvent être individualisées de manière schématique, mais sont en réalité très intriquées.

La compréhension des conséquences de l'inflammation de la membrane synoviale est plus précise. Elle a conduit à plusieurs applications thérapeutiques en cours d'extension. L'inflammation de la synoviale réalise une synovite chronique caractérisée par l'interaction entre des cellules mononucléées issues du sang qui après migration entrent en contact avec les cellules mésenchymateuses articulaires (fibroblastes / synoviocytes) et sont à l'origine de manifestations inflammatoires. La formation de la synovite de PR réalise un pannus dont la chronicité entraîne la destruction de l'os et du cartilage. Précocement on note une hyperplasie de la membrane synoviale par prolifération des cellules bordantes c'est-à-dire proches de la cavité articulaire, une néovascularisation intense favorisant la migration des lymphocytes surtout CD 4 de phénotype mémoire dont l'accumulation forme des nodules lymphoïdes périvasculaires. Ces lymphocytes expriment des marqueurs d'activation et contribuent à la sécrétion de cytokines de type Th1 (Interféron- $\gamma$ , Interleukine 17). Secondairement, ces lymphocytes, directement et par l'intermédiaire de leurs facteurs solubles qu'ils produisent, activent les cellules résidentes, entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL-1 $\beta$ ), le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 6 (IL-6). Ces cytokines activent les cellules mésenchymateuses qui libèrent des enzymes de type métalloprotéases (figure 2), responsables des effets de dégradation articulaire. En contraste, il existe un déficit local de production des cytokines de type Th2 qui a un effet anti-inflammatoire comme l'IL-4 et l'IL-10. Cette activation cellulaire locale entraîne une accumulation cellulaire qui résulte d'une augmentation de la prolifération non compensée par l'élimination par mort cellulaire programmée ou apoptose.



**Figure 2 :** Déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoire dans la synoviales rhumatoïde

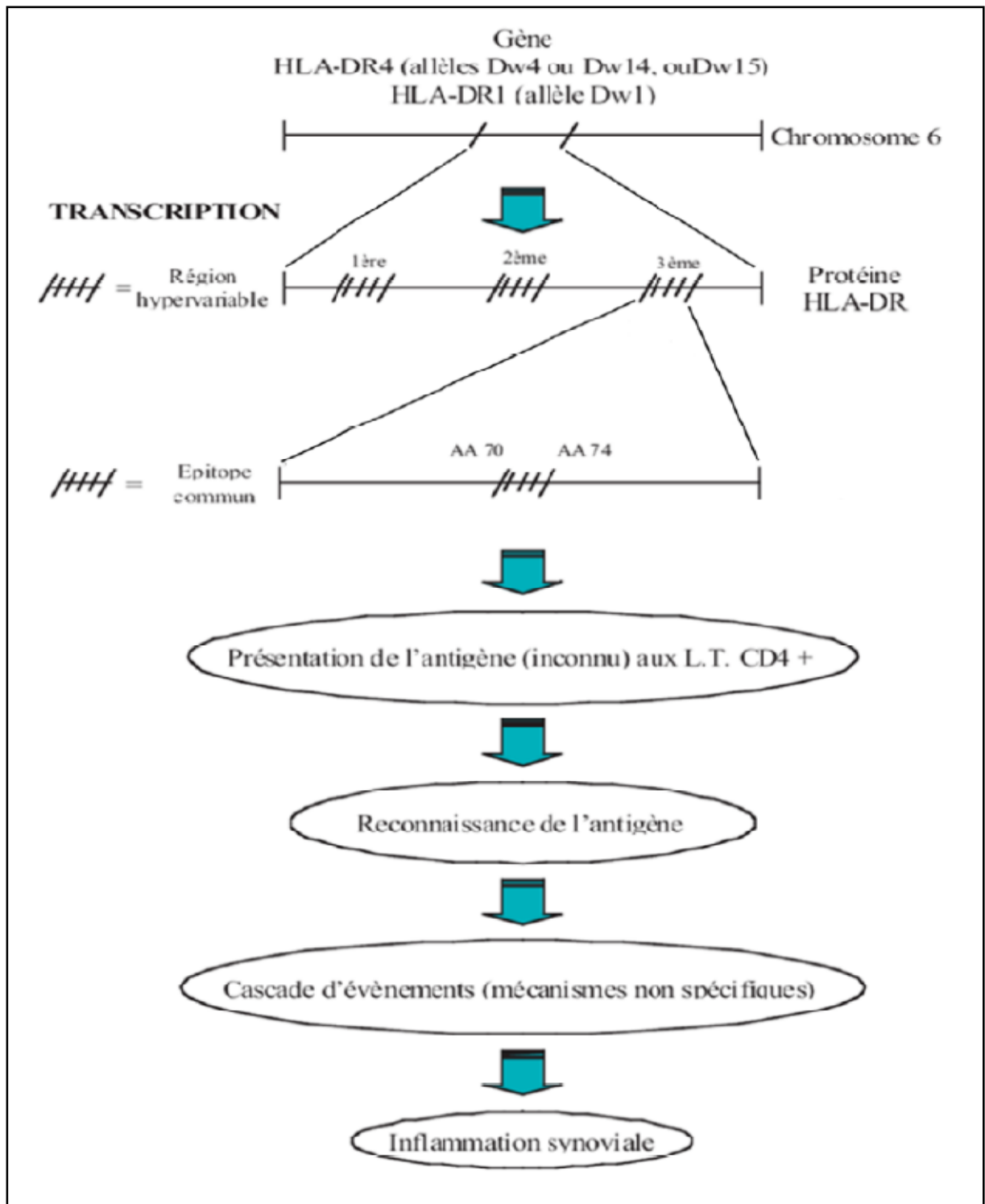
### I.1.1 Facteurs génétiques

Les études épidémiologiques effectuées sur les associations familiales et les jumeaux ont permis de montrer l'existence d'une composante polygénique de la PR et le rôle de facteurs prédictifs génétiques multiples est largement accepté. La contribution des facteurs héréditaires a d'ailleurs été évaluée à 60%. Le seul gène clairement associé à la PR fait partie du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) et code pour les HLA-DR. Les estimations actuelles portent cependant entre 6 et 10 le nombre d'autres gènes impliqués soit dans la susceptibilité, soit dans la sévérité de l'expression de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, tandis que de multiples gènes semblent impliqués dans la susceptibilité de la maladie, d'autres, y compris le *HLA-DR*, pourraient être plus importants en tant que modulateurs de la sévérité de la maladie.

### **I.1.1.1 Prédiposition génétique de la PR et gènes *HLA***

Le gène le plus incontestablement impliqué dans le déterminisme génétique de la PR est le gène *HLA-DRβ1*, codant pour la chaîne β de la molécule HLA-DR (molécule du CMH de classe II) et situé sur le chromosome 6 en 6p21. L'association à la PR d'allèles de gènes localisés dans la région HLA a été proposée pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1976 par Stastny. Quelques années plus tard, les gènes codant pour les molécules DR4 et DR1 ont été identifiés comme étant associés à la PR. A la fin des années 1990, grâce au développement d'outils de la biologie moléculaires permettant le séquençage du locus *HLA-DRβ1*, Gregersen et ses collaborateurs ont proposé l'hypothèse de l'épitope partagé pour expliquer l'association de la région codant pour les molécules de classe II du CMH avec la PR. Selon l'hypothèse formulée, les molécules HLADR seraient directement impliquées dans la physiopathologie de la PR et l'association entre HLA-DR et PR serait attribuable à des allèles de susceptibilité codant pour une séquence en acides aminés conservés, située dans la 3<sup>ème</sup> région hypervariable de la chaîne β des molécules HLA-DR (figure 3). Ce serait la présence de cette séquence (Gln-Lys-Arg-Ala-Ala, Gln-Arg-Arg-Ala-Ala ou Arg-Arg-Arg-Ala-Ala) en position 70-74, codée par les allèles DR4 (*DRβ1*\*0401, \*0404 et \*0405), DR1 (*DRβ1*\*0101 et \*0102) et DR10 (*DRβ1*\*1010), qui serait associée à une plus grande susceptibilité à développer une PR. Le risque relatif de développer la maladie varie selon les allèles à l'intérieur d'une population donnée. Par exemple, l'hétérozygotie *HLA-DRβ1*\*0401/0404 confère un risque relatif voisin de 30%. De la même façon, la susceptibilité conférée par les allèles codant pour l'épitope partagé varie à travers les populations.





**Figure 3 :** Implication des facteurs génétiques du système HLA dans phase d'initiation de PR.  
*Dw4* = *DRB1\*0401* ; *Dw14* = *DRB1\* 0404* ; *Dw15* = *DRB1\*0405* et *Dw1* = *DRB1\*0101/102*.

### I.1.1.2 Prédilection génétique de la PR et gènes non HLA

D'autres locus et d'autres gènes non HLA, ont été étudiés et se sont avérés être associés à la PR. Par exemple, des gènes candidats ont été identifiés, non seulement au niveau de la région CMH II mais aussi de la région CMH III où le gène *TNF- $\alpha$*  a été impliqué comme facteur de susceptibilité à la maladie. Plusieurs criblages génomiques ont permis d'identifier la région 1p36 en tant que locus d'intérêt pour la PR, Ce qui contient en particulier le gène *TNFR2* qui code pour le récepteur 2 au TNF $\alpha$ . Le rôle crucial de cette cytokine dans la physiopathologie de la PR et le fait que le gène *TNFR2* soit présent dans un locus d'intérêt font de ce gène un candidat majeur pour le développement de la PR. Un polymorphisme (SNP) a été localisé dans l'exon 6 et se caractérise par la substitution d'une méthionine en arginine en position 196. Cette substitution accentue la transmission intracellulaire des signaux générés par la fixation de TNF $\alpha$  sur *TNFR2*. Plusieurs études familiales réalisées sur des populations caucasiennes et japonaises ont montré une association significative de l'allèle *TNFR2* 196Arg et du génotype *TNFR2* 196Arg/Arg. Cependant, même si des preuves d'une telle implication ont été obtenues, le rôle du gène *TNFR2* reste modeste, puisqu'il semble plutôt restreint aux formes familiales de PR.

Une association entre la PR et un SNP fonctionnel du gène *PTPN22* a récemment été mise en évidence dans une étude cas-contrôle aux Etats Unis. Ce gène, localisé sur le chromosome 1 en p13, code pour une protéine tyrosine phosphatase impliquée dans la régulation négative de l'activation des cellules T transitant par le TCR. L'allèle 1858T du SNP *PTPN22*-C1858T provoque la substitution Arg620Trp au niveau de la tyrosine phosphatase et affecte un motif riche en proline impliqué dans les interactions protéine-protéine. L'association à la PR de cet allèle T a été démontrée dans plusieurs populations, toutes caucasiennes. Une association à d'autres maladies auto-immunes incluant le diabète de type I ou encore le lupus a également été rapportée. Bien que plusieurs mécanismes de gain ou de perte de fonction aient été suggérés, le mécanisme moléculaire de susceptibilité à la maladie reste à établir. Très récemment, des preuves de l'association de l'allèle T avec la PR ont été apportées dans une population caucasienne française, et plus précisément entre l'allèle T et les patients PR séropositifs pour le facteur rhumatoïde. *PTPN22* serait ainsi, plus généralement, "un gène de l'auto-immunité". Enfin, dans une population suédoise, l'allèle T a également été associé avec la présence d'anti-CCP chez les patients atteints de PR, la combinaison des deux donnant une spécificité de diagnostic très élevée de la PR. L'ensemble de ces données illustre

la complexité de la susceptibilité génétique à la PR, qui implique probablement la combinaison de variant de nombreux gènes.

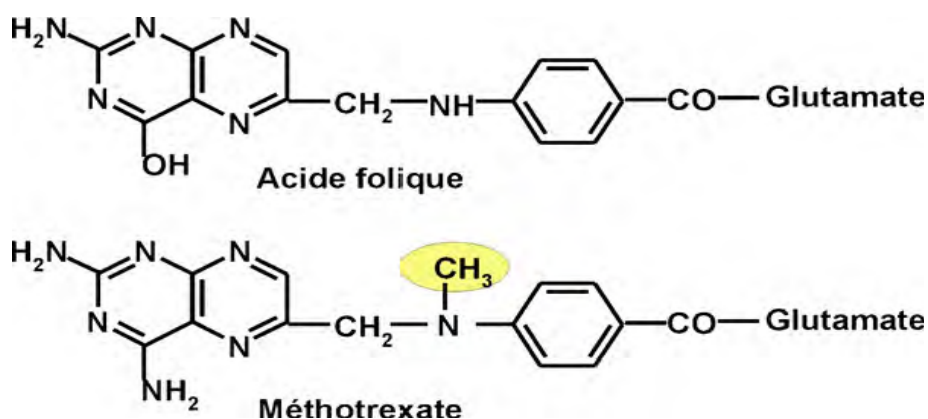
## **I.2 Pharmacologie et Pharmacogénomique du méthotrexate**

La pharmacogénomique consiste à l'utilisation de l'information génétique d'un individu pour déterminer la prescription optimale de médicaments. Le support de la variabilité génétique de la réponse aux médicaments réside dans les polymorphismes génétiques observés au niveau des transporteurs de médicaments, des enzymes les activant ou les détoxiquant et les cibles protéiques de ces médicaments. Lorsqu'un médicament est administré, il est absorbé et distribué à son site d'action, où il va interagir avec des cibles telles que des récepteurs ou des enzymes, il subit ensuite un métabolisme et enfin est excrété. Chacune de ces étapes peut présenter des variations génétiques cliniquement significatives.

Les variations interindividuelles sont plus importantes que les variations intra-individuelles. Cette constatation est compatible avec la notion que l'hérédité qui est l'un des facteurs déterminants de la réponse aux traitements. Un grand nombre des médicaments anti-inflammatoires comme les traitements de fond (méthotrexate et l'azathioprine), les biothérapies (étanercept et infliximab) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été utilisés en clinique, notamment pour l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. Pour chacun de ces médicaments, il existe une population de répondeurs et une population de non répondeurs.

### **I.2.1 Pharmacologie du méthotrexate**

Le méthotrexate (MTX) est utilisé en tant que traitement de fond de première intention en monothérapie initiale des polyarthrites récentes et comme traitement clé dans les associations de la biothérapie pour les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde (PR) précoce ou établie. Le MTX est un analogue de l'acide folique (figure 4), qui appartient à la classe des agents cytotoxiques, ses effets secondaires sont multiples et parfois très sévères, imposant une surveillance systématique, étroite, et régulière des patients. La toxicité hématologique du méthotrexate est une complication redoutable voire mortelle si elle n'est pas prise en charge à temps. Elle s'observe classiquement à des posologies très élevées, essentiellement dans des indications hématologiques, mais peut se voir aussi à faibles doses notamment en médecine interne et en rhumatologie.



**Figure 4 :** Structure moléculaire du méthotrexate et de l'acide folique.

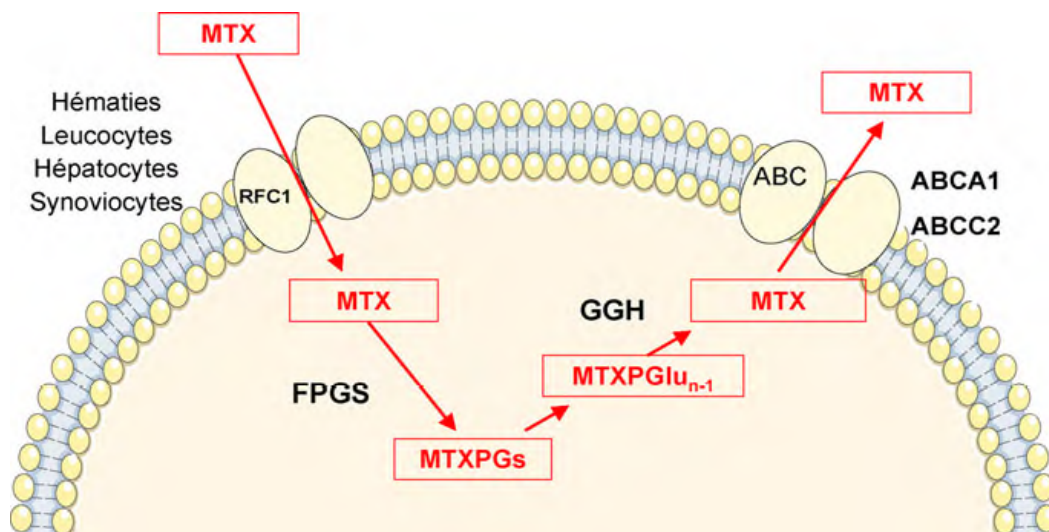
La biodisponibilité moyenne du MTX varie de 45 à 80 % ; elle n'est pas influencée par l'alimentation, les variations intra-individuelles de la biodisponibilité restent modestes. Le MTX est lié pour 35 à 50 % dans le sang à l'albumine. En cas d'hypo-albuminémie, ce qui est fréquent au cours des PR sévères, le taux de MTX libre peut être anormalement élevé. Le MTX s'accumule de façon plus importante dans le rein, le foie et les poumons, la peau et les cellules intestinales. Sa concentration dans le liquide synovial est la même que celle dans le sérum, elle est 10 fois plus grande dans la synoviale rhumatoïde et l'os cortical ou spongieux que dans le plasma. Le métabolisme du MTX dépend de la dose. Dans le cas de la PR où les doses sont faibles, peu de métabolites du MTX sont retrouvés dans le plasma. La majeure partie de la dose est excrétée telle quelle dans les urines au cours des 24 premières heures après l'administration.

Le MTX s'accumule dans les cellules sous forme de 7-OHMTX et de polyglutamates et peut y persister longtemps, notamment dans les hépatocytes et les cellules intestinales. Ceci peut expliquer des effets toxiques retardés survenant même après l'interruption du traitement. L'excrétion du MTX est principalement rénale. Aussi, toute altération de la fonction rénale peut retentir sur l'élimination du MTX et entraîner des effets toxiques. L'excrétion du MTX est également biliaire (10 à 30 %), avec un cycle entérohépatique et fécal (4 à 6 %). Le MTX est retrouvé dans la salive et dans le lait. Il ne semble pas exister de corrélation entre la pharmacocinétique du MTX, son effet clinique et les éventuels effets secondaires.

Le MTX est transporté à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du Reduced Folate Carrier (RFC) alors que l'efflux de cette molécule hors de la cellule est médiée par certains transporteurs de type ATP Binding Cassette ABC. Également connus comme les protéines multi Drug résistant transporter (MDR) ou Multi Drug résistance Associated protéines

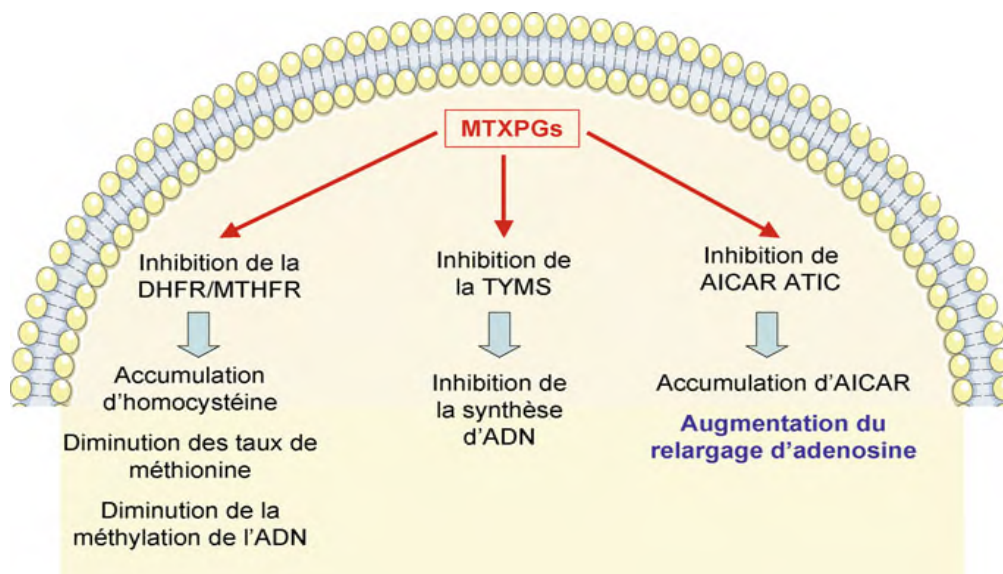
(MRP), famille de transporteurs qui ont été impliqués dans le métabolisme de nombreux traitements. Dans la cellule, le MTX fixe un ou plusieurs résidus glutamate sous l'influence de la folyl-polyglutamate synthétase (FPGS) et la forme polyglutamylée lui permet de rester plus longtemps à l'intérieur des cellules (figure 5). En parallèle à ceci, il va y avoir une régulation de l'expression d'un gène codant pour une hydrolase nommée gamma-glutamyl hydrolase (GGH) a pour rôle d'hydrolyser les chaînes polyglutamylées du MTX dans le lysosome. La forte expression de cette enzyme pourrait conduire à une diminution de l'accumulation cellulaire de MTX polyglutamylé (MTX-PGs) et donc à une activité antifolate diminuée.

Les dérivés polyglutamylés du MTX bloquent de manière plus importante les enzymes cibles ; dihydrofolate réductase (DHFR), thymidylate synthetase (TYMS) et l' aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase (AICART/ATIC). L'action du MTX-PGs sur le DHFR, enzyme-clé du métabolisme des folates et induit un déficit en bases puriques et pyrimidiques, aboutissant à un défaut de synthèse de l'ADN et un blocage du cycle cellulaire en phase S. L'enzyme méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est également inhibée par MTX-PGs mais de façon indirecte, dont le rôle de cette enzyme est La méthylation de tétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate qui intervient dans différentes voies métaboliques qui nécessitent une transméthylation, en particulier la transformation de l'homocystéine en méthionine ou d'autres processus comme la méthylation de l'ADN.



**Figure 5 :** Bases moléculaires de l'action du MTX. MTX: méthotrexate ; MTXPG : méthotrexate polyglutamylé, RFC1 : Reduced Folate Carrier 1 ; FPGS : Foly Poly Glutamyl Synthetase ; GGH: Gamma-Glutamyl Hydrolase ; ABC : Adenosine triphosphate-Binding Cassette.

Le MTX-PGs inhibe aussi La TYMS, une enzyme qui permet la méthylation du deoxyuridine monophosphate (dUMP) en thymidilate monophosphate (dTMP), jouant ainsi un rôle dans la synthèse de novo d'une base pyrimidique, la thymidine. Enfin, le MTX-PGs inhibe également plusieurs enzymes impliqués dans la synthèse des bases puriques. Ces cibles sont, en particulier, l'enzyme AICAR [ATIC] (amino imidazole carboxamide ribonucléotide transformylase), et la glycinamide ribonucleotide transformylase (GART). Sous l'action du MTX-PGs, la protéine AICAR s'accumule dans la cellule. Cette protéine AICAR et ses métabolites inhibent deux enzymes de la voie de l'adénosine, conduisant à une accumulation intracellulaire d'adénosine et d'adénine nucléotide, augmentation qui a une puissante action anti-inflammatoire (figure 6). Il a été montré que le MTX induit l'apoptose des lymphocytes T, il agit *in vivo* et *in vitro* en induisant également l'apoptose des synoviocytes dont il module l'activité collagénasique *in vitro* et réduit les dégâts cartilagineux déclenchés par les synoviocytes injectés dans le modèle de la souris SCID (*severe combined immunodeficiency*).



**Figure 6 :** Bases moléculaires de l'action du MTX. MTXPGs: méthotrexate poly-glutamylé ; DHFR: dihydro folate réductase ; MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase ; TYMS: Thymidylate synthétase ; AICAR ou ATIC: Amino Imidazole Car-boxamide Ribonucleotide transformylase.

## **I.2.2 Pharmacogénomique du méthorexate**

### **I.2.2.1 Polymorphismes des gènes codants pour les transporteurs du méthotrexate**

Les gènes qui code pour les transporteurs du MTX sont susceptibles de favoriser ou inhiber la concentration de MTX en intracellulaire. Le gène RFC1 est localisé sur le chromosome 21 et présente un polymorphisme (G80A) au niveau du codon 27, avec la substitution d'une arginine en histidine au niveau du premier domaine transmembranaire de la protéine. Les conséquences de cette substitution ne sont pas connues, mais la présence de l'allèle 80A, et plus précisément de l'homozygote AA semble être associée à une concentration plus élevée de MTX-PGs intracellulaire et à une plus grande efficacité du MTX dans la PR. Dans l'étude de Dervieux *et al* (2004), des patients atteints la PR ont le génotype de RFC 80A/A prenant MTX ont des niveaux plus élevés de MTX-PG à ceux qui ont les génotypes de RFC 80G/G ou de G/A.

La famille des transporteurs ABC joue un rôle important dans le transport cellulaire du MTX. Les polymorphismes des gènes codants pour les transporteurs ABCC1, ABCC2 et ABCB1, modifient la fonction de ces transporteurs, ce qui peut provoquer une accumulation intracellulaire du MTX réduite et, par conséquent, une diminution de l'efficacité du médicament. Un SNP (C3435T) a été identifié sur l'exon 26 du gène ABCB1. Il semble jouer un rôle dans le niveau d'expression de la protéine et dans la résistance au traitement par MTX.

### **I.2.2.2 Polymorphismes des gènes codants pour les enzymes de métabolisme du Méthotrexate**

Des polymorphismes des différents gènes impliqués dans la formation ou l'inhibition du MTX-PGs ont été mis en évidence. En théorie, une polyglutamylation défectueuse pourrait être un mécanisme potentiel de résistance au MTX. Plusieurs polymorphismes fonctionnels ont été observés sur le gène codant pour FPGS mais il n'y a pas d'argument actuellement pour leur rôle dans l'efficacité ou la toxicité du MTX. En revanche, plusieurs SNP du gène *GGH* sont connus et Semblent influencer les variations du taux intracellulaire de MTX. Un polymorphisme (C401T) du gène *GGH* a été décrit, il influence sur les niveaux de MTX-PGs chez les patients atteints par la PR. Les individus portant le génotype de *GGH* (401TT) ont des niveaux plus bas de MTX-PG par rapport aux autres groupes de génotype différent. Un autre polymorphisme de (C452T) du gène de *GGH*, conduit à un changement obligatoire de

l'affinité de GGH vers la longue chaîne du MTX-PGs et une basse activité de GGH, a été également décrite.

### **I.2.2.3 Polymorphismes des gènes codants pour les cibles d'action du méthotrexate Polyglutamylé**

#### **. Gène codant pour la dihydrofolate réductase**

La dihydrofolate réductase (DHFR) est une cible importante de MTX, et les polymorphismes du gène *DHFR* affectant la fonction ou la liaison d'enzymes au MTX qui peuvent modifier la réponse au MTX. Deux SNP dans l'extrémité 3' du gène de DHFR, (T721A et C829T), ont été décrits dans une population japonaise homozygous pour le SNP (C829T) (génotype de TT) ont eu une plus grande expression de DHFR, par rapport aux sujets hétérozygotes (CT) ou de sauvage Les fréquences d'allèle de ces SNP dans les Caucasiens sont actuellement inconnues.

#### **. Gènes codant pour le méthylène tétrahydrofolate réductase**

Les polymorphismes du gène *MTHFR* a fait l'objet de nombreuses études. C'est un gène de 19kb, localisé sur le chromosome 1, qui comprend une douzaine de SNP identifiés. Deux d'entre eux, C677T et A1298C, ont été particulièrement explorés. Ces deux polymorphismes dans le gène qui code pour l'enzyme MTHFR, qui est probablement le meilleur gène étudié dans la voie métabolique du MTX, ont une association avec la réponse et les effets indésirables du MTX dans le cancer et la PR chez l'adulte. Le polymorphisme *MTHFR* (C677T) induit une substitution d'alanine en valine, ce qui conduit à une protéine d'activité enzymatique diminuée, et entraînant une augmentation des taux plasmatiques d'homocystéine. L'étude d'Ede *et al* (2001), sur 236 patients atteints de PR sur le MTX démontre que la présence de polymorphisme *MTHFR* (C677T) est associée à un risque accru d'arrêter le traitement, en raison d'événements indésirables, tels que les symptômes gastro-intestinaux, perte de cheveux et l'hépatotoxicité. Une autre étude de Haagsma *et al* (1999), sur 106 patients atteints de PR génotypés pour le polymorphisme C677T dans le gène *MTHFR* a montré des résultats similaires. Toxicités du MTX, telles que l'augmentation des transaminases, stomatite, nausées, vomissements, perte de cheveux, fatigue, éruption cutanée et ont été plus fréquents chez les patients homozygotes ou hétérozygotes pour le polymorphisme C677T que chez les patients sans ce polymorphisme.



Le polymorphisme A1298C entraîne la substitution d'une glutamine pour une alanine au niveau du codon 429. Ce polymorphisme a été décrit en 1998, Il est associé également à une activité réduite de l'enzyme. La diminution de l'activité de l'enzyme MTHFR a pour conséquence, une augmentation du taux d'homocystéine, avec une toxicité sur le système nerveux central et le système cardiovasculaire. L'action inhibitrice du MTX sur le gène va potentialiser la diminution de l'activité de MTHFR. Les deux polymorphismes génétiques sont potentiellement des facteurs favorisant l'activité (ou la toxicité) du MTX. Dans une étude de Berkun *et al*, (2004), 93 patients atteints de PR qui prenaient le MTX ont les SNP (C677T et A1298C). Les niveaux sériques de folate et de l'homocystéine plasmatique ont été mesurés chez tous les patients. Les patients qui ont le génotype de type sauvage 1298AA sont 5 fois plus susceptibles de développer les effets indésirables liés au MTX que les patients qui ont le génotype 1298CC. Les patients avec le génotype 1298CC avaient des niveaux plus élevés d'homocystéine plasmatique que les patients avec le génotype AA ou AC.

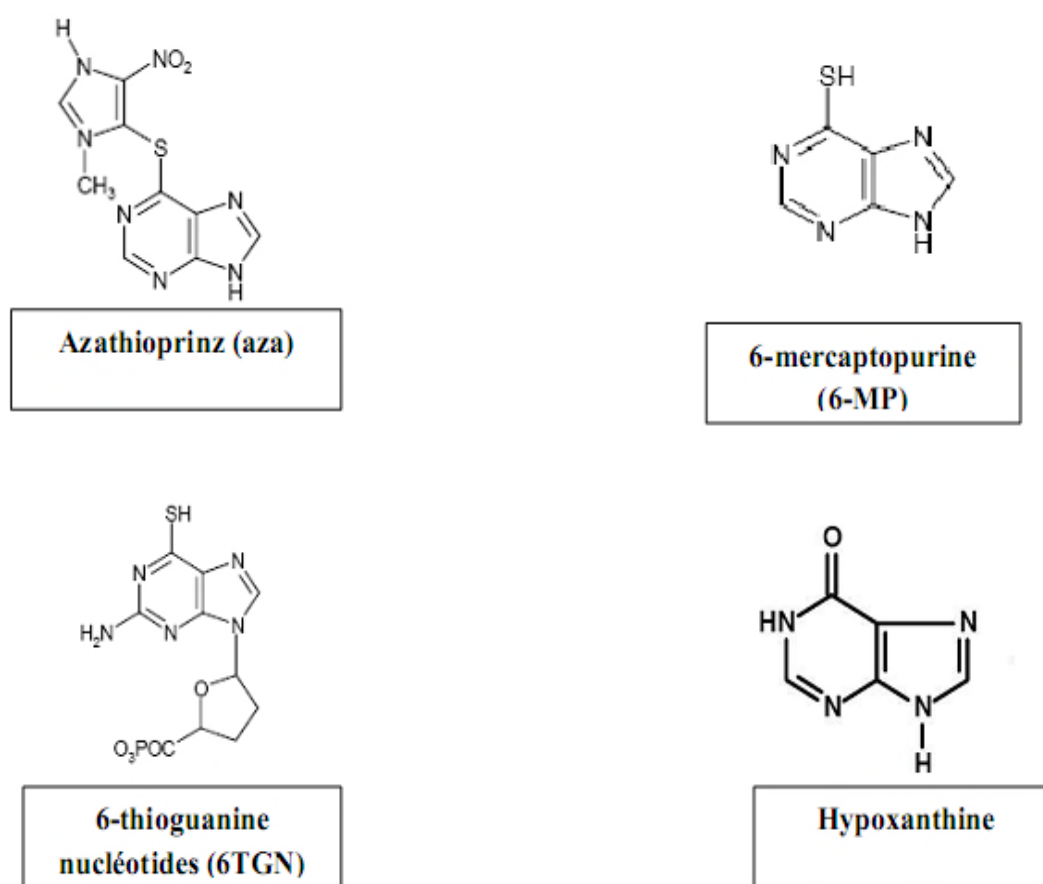
### **. Gène codant pour Thymidylate synthétase**

La thymidylate synthétase (*TYMS*) est une cible directe du MTX-PGs. Son gène a une taille de 15kb, et il est localisé sur le chromosome 18. Un polymorphisme issu de la répétition de 28 paires de bases a été observé dans une région non codante en 5'. Ce polymorphisme augmente l'activation du gène et l'activité enzymatique de la protéine. Une triple répétition (3r), est associée à une augmentation de la réplication du gène et du taux de l'enzyme TYMS. Une augmentation de l'activité de l'enzyme TYMS est susceptible de limiter l'activité du MTX et de favoriser les échappements thérapeutiques. Un autre polymorphisme comprend une délétion de six paires de base sur le nucléotide 1474 à un niveau de l'extrémité 3' du gène, cette délétion est associée à une diminution de la stabilité et de l'expression des ARN messagers et à une augmentation de l'efficacité du MTX.

## I.3 Pharmacologie et pharmacogénomique de l'azathioprine

### I.3.1 pharmacologie de l'azathioprine

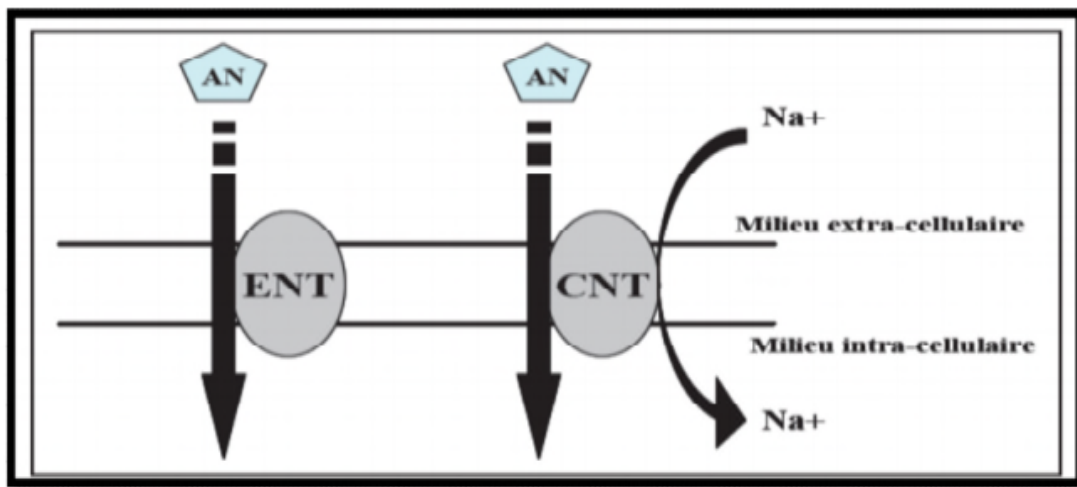
L'azathioprine (AZA) est largement utilisé pour traiter certains types de cancer, les rejets de greffe d'organe, les maladies inflammatoires de l'intestin et des maladies rhumatismales, y compris la polyarthrite rhumatoïde. L'AZA appartient à la famille des thiopurines (figure 7), qui sont des analogues de l'hypoxanthine et inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN, elles comportent aussi la 6-mercaptopurine (6-MP), et la thioguanine (TG). L'AZA est une prodrogue, dont la forme active est également la 6-mercaptopurine, qui est obtenue après métabolisation hépatique et érythrocytaire.



**Figure 7** : Structure chimique des thiopurines et de l'hypoxanthine.

L'AZA administrée par voie orale est rapidement absorbée et atteint un taux plasmatique maximal à 2 h après la prise. Sa concentration plasmatique maximale est atteinte, en moyenne, en 2.2 h. Les demi-vies de l'AZA, de la 6-MP et les autres métabolites thiopuriques sont respectivement de 10 mn, 1 h et 5 h environ. Les métabolites sont éliminés par voie rénale; seule une faible proportion d'AZA et de 6-MP est éliminée sous

forme inchangée. Les Transporteurs équilibratifs des nucléosides (ENT) permettent le transport des nucléosides à travers la membrane cytoplasmique jusqu'à l'équilibre des concentrations intra et extracellulaires. Plusieurs membres de cette famille ont été identifiés et sont classés en fonction de leur sensibilité à différents inhibiteurs. Le transport assuré par les Transporteurs concentratifs des nucléosides (CNT) qui est couplé au transport d'un ion sodium et peut se faire contre un gradient de concentration (figure 8). Les (CNT) et les (ENT) appartiennent à la superfamille des protéines SLC (SoLute Carrier) et certaines ont été décrites comme impliqués dans l'entrée des nucléotides thiopuriniques dans les cellules.

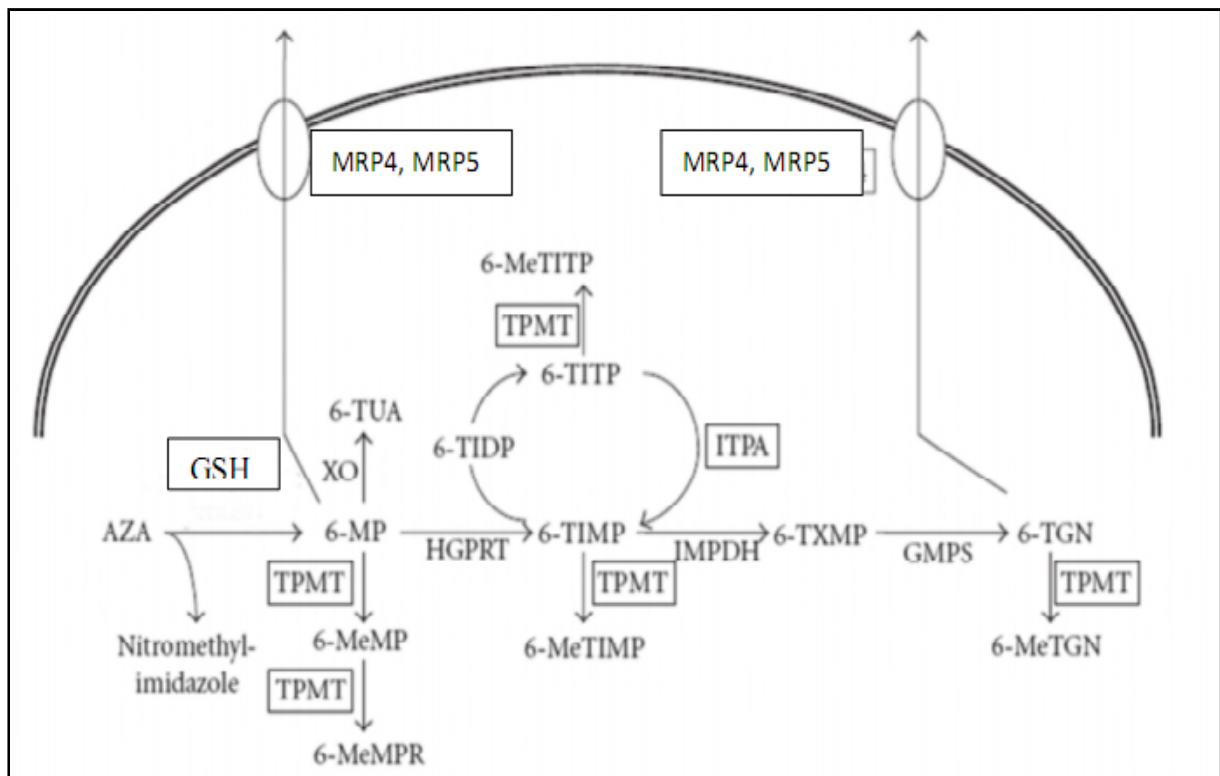


**Figure 8:** Représentation simplifiée des transporteurs ENT et CNT. AN: analogue de nucléoside; ENT: Transporteurs Equilibratifs des Nucléoside; CNT: Transporteurs Concentratifs des Nucléosides.

Les transporteurs de la superfamille des protéines ABC (*ATP-Binding Cassette*) constituent une famille de protéines membranaires, dont 49 gènes ont été identifiés chez l'homme, et sont impliqués dans des fonctions physiologiques très diverses. Parmi les membres de la superfamille des protéines ABC, ABCC4 (MRP4) et ABCC5 (MRP5) sont les plus susceptibles de jouer un rôle dans la résistance aux analogues puriniques. Au niveau physiologique, ces deux protéines ont un rôle dans la régulation des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques.

L'AZ *in vivo*, est transformé, sous l'action de plusieurs enzymes et notamment de la glutathion S-transférase (GST), en une forme active la 6-MP (figure 9). Le catabolisme de la 6-MP fait intervenir trois cascades enzymatiques. La voie de la xanthine oxydase (XO), celle-ci est la plus importante sur le plan quantitatif. Elle catalyse la formation d'acide 6-

thiopurique inactif. Cette voie catabolique est inhibée par l'allopurinol. De fait, l'association (azathioprine-allopurinol) est contre-indiquée, en raison du risque important de surdosage et d'augmentation de la toxicité de l'AZA. Il existe peu de variabilité génétique concernant la XO. La deuxième voie est celle de la thiopurine S-méthyl-transférase (TPMT). Elle permet la conversion de la 6-MP en un métabolite inactif, le 6-méthyl-mercaptopurine, en utilisant la S-adénosyl-1-méthionine comme donneur de méthyle; en l'absence de catabolisme de la 6-MP, les nucléotides toxiques de thioguanine qui ne sont pas éliminés provoquant une toxicité viscérale, et surtout hématologique. La troisième voie est concurrentielle de la précédente, sous la dépendance initiale de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT), et conduit après plusieurs transformations enzymatiques à la formation des 6-thioguanosine nucléotides qui sont les métabolites pharmacologiquement actifs de l'azathioprine. En effet, le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP est complexe.

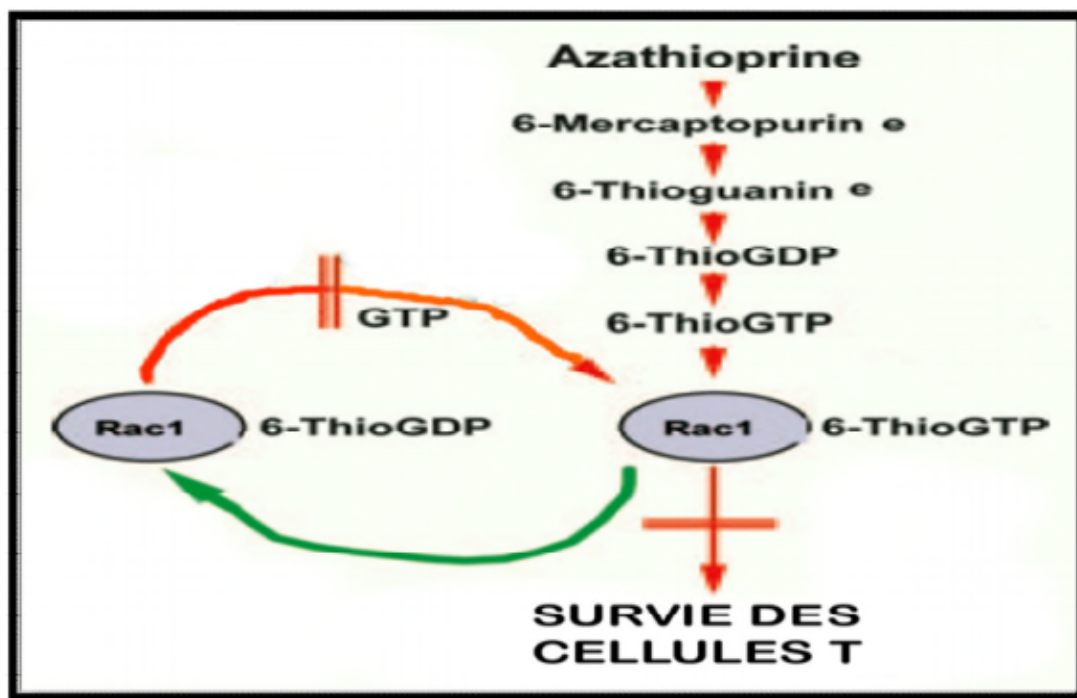


**Figure 9** : Métabolisme et transport de l'AZA.

La 6-MP, sous l'action de l'HGPRT, est initialement convertie en 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) puis en 6-thioxanthine monophosphate (6-TXMP), elle même métabolisée en 6-thioguanosine monophosphate (6-TGMP). La transformation de cette dernière fait intervenir l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) puis la guanosine monophosphate synthétase (GMPs). La 6-thioguanosine monophosphate est à l'origine de la

formation, via l'intervention de kinases et de réductases, des 6-thioguanines comprenant la 6-thioguanosine triphosphate et sa forme désoxy.

L'AZA a des actions immunosuppressive et cytotoxique qui sont dues à ses métabolites. L'effet cytotoxique est basé sur l'incorporation des 6-TGN dans l'ADN notamment des lymphocytes. La protéine RAC1 est la cible des 6-TGN tri-phosphorylés, qui agissent en inhibant celle-ci. Cette protéine joue un rôle dans la stimulation des CD28. Le 6-TGTP, lié de façon spécifique et avec une très forte affinité à la protéine RAC1, à la place de son co-substrat endogène, le GTP, inhibe l'effet anti-apoptotique de RAC1-GTP et est donc à l'origine du processus d'apoptose (figure 10).



**Figure 10 :** Effet de 6-TGN sur la protéine RAC1.

### I.3.2 Pharmacogénomique de l'azathioprine

#### I.3.2.1 Polymorphismes des gènes codants pour les transporteurs

Plusieurs travaux ont montré l'implication probable de la surexpression de protéines de transport du type MRP (Multi Drug Resistance Protein), dans la résistance aux traitements thiopuriques. Les gènes codant pour ces transporteurs représentent donc de bons candidats dans les variations interindividuelles de réponse aux thiopurines. Quatre transporteurs du type SLC ont été décrits à ce jour comme susceptibles d'assurer le transport de la 6-MP dans les cellules: SLC28A2 (CNT2), SLC28A3 (CNT3), SLC29A1 (ENT1) et SLC29A2 (ENT2). Les

gènes codant pour ces quatre transporteurs sont tous polymorphes. Il a été démontré que, pour certains variant de SLC28A2, bien que leur fonction de transport ne soit pas altérée, leur spécificité de substrat peut être modifiée. Une mutation affectant le promoteur de SLC28A2 a également été caractérisé et est à l'origine d'une augmentation de l'expression de la protéine. Une dizaine de mutations faux-sens a été identifiée sur le gène SLC28A3. Parmi elles, une seule a un impact fonctionnel sur la protéine. Cette mutation, la G1099A (Gly367Arg), affecte un domaine très conservé de la protéine impliqué dans la reconnaissance des substrats et diminue de 80 à 85 % la capacité de transport des purines et des pyrimidines.

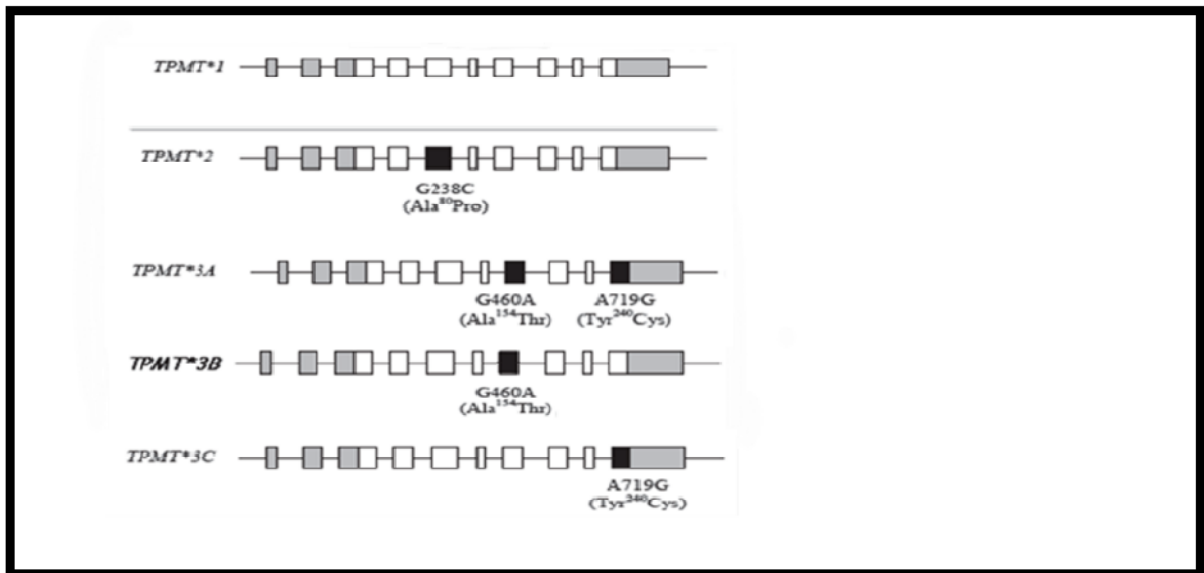
Les gènes codant pour MRP4 et MRP5 sont localisés sur le chromosome 13, en position 13q32 et au niveau du chromosome 3 en position 3q27, respectivement. De nombreuses mutations affectant la séquence codante des gènes *ABCC4* et *ABCC5* ont été décrites. Récemment il a été montré que, *ABCC4* et *ABCG2* contribueraient, en collaboration, au phénomène de résistance aux analogues des nucléosides puriniques et à la régulation de leur distribution tissulaire. Deux polymorphismes du gène *ABCC4*, A123548G (Tyr556Cys) et G139997A (Val776Ile), ont été démontrées comme altérant la capacité de transport des thiopurines. Les études concernant MRP5, moins nombreuses, ont permis de montrer que des cellules surexprimant ce transporteur deviennent *in vitro*, elles aussi résistantes à la 6-MP et à la 6-TG.

### **I.3.2.2 Polymorphismes des gènes codants pour les enzymes du métabolisme**

#### **. Gène codant pour thiopurine S-méthyl transférase**

La TPMT est une enzyme cytoplasmique de 28KDa et de 254 acides aminés. Chez l'homme, le gène localisé sur le chromosome 6q22.3 comprend dix exons dont huit sont codants. Parmi les trois principales enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AZA, seulement TPMT a été largement étudié en pharmacogénomique. L'activité de TPMT est affectée par plusieurs polymorphismes. Les homozygotes pour les allèles de type sauvage (TPMT\*1) ont des activités TPMT élevée, tandis que les homozygotes pour des allèles mutants tels que TPMT\*2 (G238C), TPMT\*3A (G460A et A719G), TPMT\*3B (G460A) et TPMT\*3C (A719G) ont peu ou pas d'activités (figure 11). Les hétérozygotes avec deux allèles de type sauvage et mutant ont une activité intermédiaire. Les patients déficients en TPMT accumulent très fortes concentrations de TG métabolites toxiques de l'AZA, qui conduit à une toxicité sévère de la moelle osseuse. Il ya eu plusieurs rapports sur l'association entre les génotypes à TPMT et la toxicité de l'AZA chez les patients atteints de maladies

rhumatismales. Dans une population de 67 patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, les mutations du gène de la TPMT n'étaient pas rares, évaluées à 6 %. Deux observations d'aplasie médullaire fatale induite par l'AZA ont été mentionnées chez des patients porteurs d'autres maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, entéropathie inflammatoire), présentant, respectivement, une mutation TPMT\*3C et TPMT\*3A.



**Figure 11 :** Polymorphismes du gène *TPMT* les plus fréquents.

Dans une étude d'observation de Corominas *et al* (2003), chez 40 patients atteints de PR traités par AZA, 60 % des patients avec TPMT allèles mutants abandonnent l'AZA en raison de la toxicité gastro-intestinale accompagnée de nausées et vomissements sévères. Les patients avec des allèles TPMT mutant développent une toxicité plus fréquemment que ceux qui n'ont pas allèles mutants, le génotypage à TPMT avant le traitement avec AZA est un prototype de la pharmacothérapie individualisée pour patients atteints de PR.

### . Gène codant pour la xanthine oxydase

La xanthine oxydase, encore appelée xanthine déshydrogénase, (XO ou XDH) intervient de façon précoce dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP, puisqu'elle prend en charge la 6-MP pour l'oxyder en 6-thioxanthine qui sera à son tour convertie en acide thiourique (ATU), métabolite inactif éliminé dans les urines. Le gène codant pour la XO, très polymorphe, est situé sur le chromosome 2 en position 2p22. A ce jour, une vingtaine de SNP ont été décrits au niveau de sa séquence codante. Leurs conséquences sur l'activité de la protéine sont variables. Ainsi, les mutations C445T (Arg149Cys) et C2729A (Thr910Lys) ont

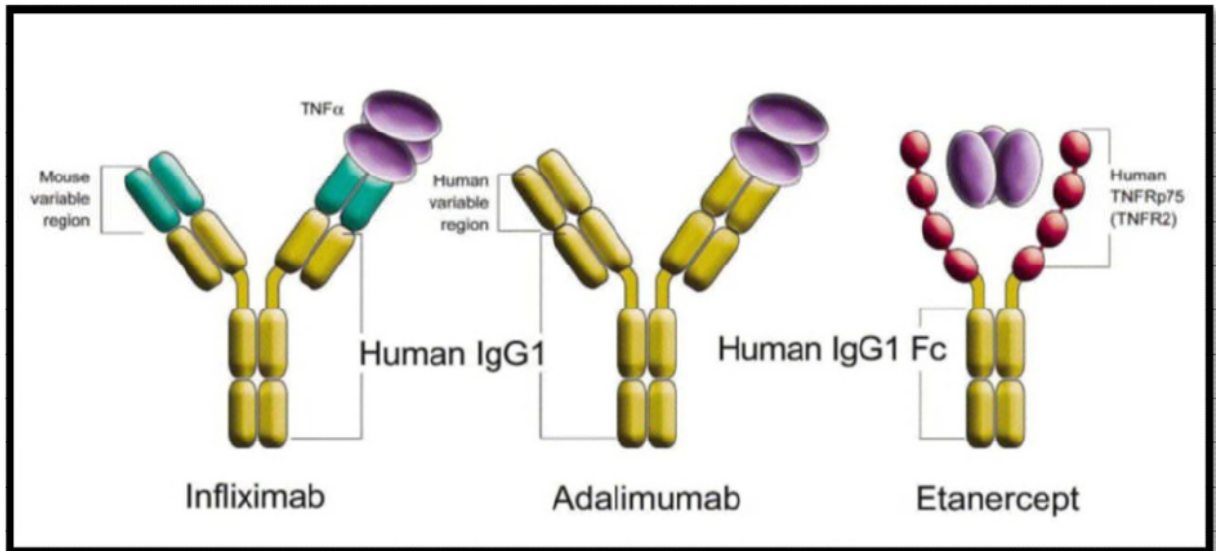
pour conséquence la synthèse d'une enzyme inactive. Les mutations C1663T (Pro555Ser), G1820A (Arg607Gln), C1868T (Thr623Ile), C2727A (Asn909Lys), C3449G (Pro1150Arg) et G3953A (Cys1318Tyr), quant à elles, ont pour conséquence une diminution de l'activité enzymatique de la XO. Enfin, deux autres mutations, A2107G (Ile703Val) et A3662G (His1221Arg), entraînent une augmentation de l'activité enzymatique.

#### **I.4 Pharmacologie et pharmacogénomique des anti-TNF**

La modulation du TNF $\alpha$  par des anticorps monoclonaux (Infliximab, Adalimumab) ou par un récepteur soluble a été le progrès majeur dans le traitement de la PR au cours des dix dernières années. Le traitement par les anti-TNF $\alpha$  a permis d'obtenir un contrôle rapide de l'inflammation traduit par une amélioration clinique, parfois spectaculaire et par une diminution également rapide dès la deuxième semaine des paramètres biologiques de l'inflammation (VS, CRP). Cette amélioration clinique a été renforcée par l'utilisation concomitante du methotrexate dont l'association aux anti-TNF est actuellement la stratégie thérapeutique la plus efficace dans la PR. Outre l'amélioration des patients, elle a permis d'obtenir un pourcentage élevé de rémission pouvant atteindre 50 % dans les PR récentes. Surtout l'utilisation des anti-TNF $\alpha$  a permis pour la première fois, de prévenir la destruction articulaire engendrée par le processus pathogénique de la PR. Des phénomènes de réparation articulaire ont même été notés dans les meilleurs cas.

Les anti-TNF $\alpha$  sont maintenant proposés de plus en plus précocement dans la prise en charge des patients atteints de PR, dès qu'il y a une insuffisance d'efficacité d'un traitement de première ligne comme le methotrexate ou dès qu'il y a des signes de sévérité, comme le développement d'érosions osseuses. Actuellement, trois anti-TNF- $\alpha$  sont disponibles en pratique et clinique : Infliximab (anticorps monoclonal chimérique) ; Adalimumab (anticorps monoclonal humain) ; et l'Etanercept (protéine de fusion consistant en un dimère de la portion extracellulaire du récepteur p75 de TNF- $\alpha$  lié à la fraction Fc d'une IgG1) (figure 12). Ces médicaments sont capables de bloquer ou d'inactiver le TNF- $\alpha$ , l'une des cytokines les plus impliquées dans la réponse inflammatoire et les destructions ostéoarticulaires.

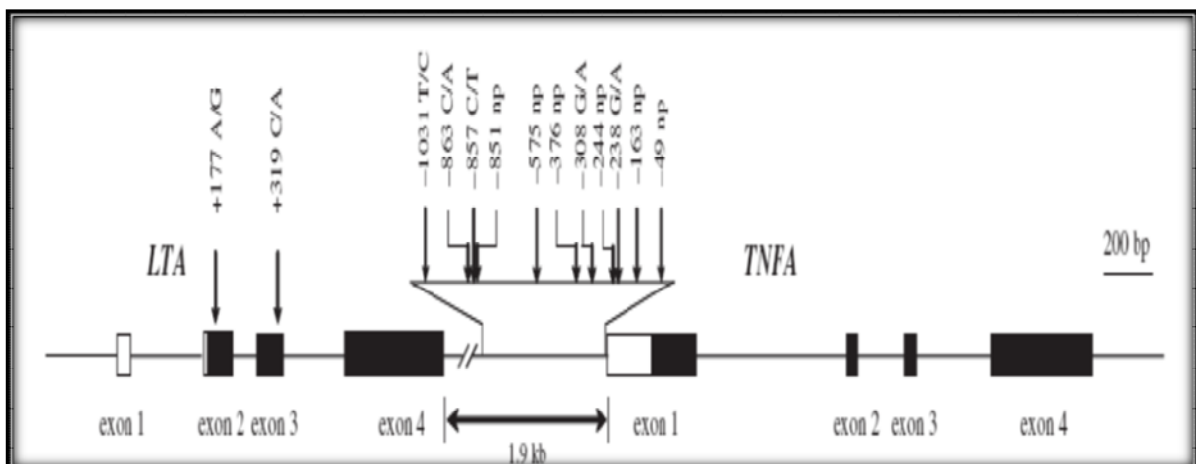




**Figure 12:** Structure des l'anti TNF $\alpha$ .

#### I.4.1 Polymorphismes des gènes codants pour les *TNFA* et *LTA*

Les locus des *TNFA* et *LTA* sont situés dans la région de classe III du système HLA entre les gènes HLA-B et HLA-DR du chromosome 6 (figure 13). Cette région est hautement polymorphique avec plusieurs polymorphismes simples nucléotide (SNP) en position -1031, -863, -857, -851, -575, -376, -308, -244, -238, -163 plusieurs microsatellites du locus *TNFA*, et deux SNPs non-synonyme dans la région *LTA*, à des positions +177 (Arg13Cys) et +319 (Tyr60Asn). Le polymorphisme le plus étudié est le SNP en G308A, chez des patients sous biothérapie. Des études ont décrit une association du génotype 308GG *TNFA* avec une meilleure réponse. Une analyse de génotype 308 TNF- $\alpha$  de 59 patients traitées par Infiximab a montré que les patients de génotype 308G/G étaient meilleurs répondeurs que ceux de génotype 308A/G ou A/AV.



**Figure 13:** Polymorphismes simple nucléotide (SNPs) de locus *TNFA* et *LTA*

#### **I.4.2 polymorphismes des gènes codants pour les récepteurs du TNF- $\alpha$**

Les deux récepteurs du TNF $\alpha$ , TNFRI et TNFRII, sont codés par des gènes (*TNFRSF1A* et *TNFRSF1B*) respectivement localisés sur les chromosomes 12 et 11. Quelques SNPs ont été analysés, *TNFRSF1A* aux positions -609, -580, -383 et +36 ; et *TNFRSF1B* à +676. Ce dernier SNP est considéré par certains comme un gène de prédisposition et de sévérité pour la PR. Ce SNP situé dans l'exon 6 (T676G) est à l'origine d'une substitution d'acide aminé dans le quatrième domaine riche en cystéine du domaine extracellulaire et peut affecter le site de liaison pour l'enzyme de conversion du TNF- $\alpha$ . La plupart de ces études se sont axées sur le gène *TNFRSF1B*, chez 66 patients italiens caucasiens atteints de PR sous anti-TNF $\alpha$  (Infliximab et Etanercept), l'allèle rare était associé à un faible taux de réponse et également observé avec l'infliximab chez 78 patients français atteints de PR ou chez 58 patients grecs. Cependant, dans une large cohorte de 234 patients néerlandais, aucune association n'a été observée entre ce SNP et la réponse à l'Infliximab ou à l'Etanercept. Dans une population nord-américaine atteinte de PR traitée par étanercept, aucune association n'a été observée pour les SNPs du *TNFRSF1A* (-609, -580 et -383) et *TNFRSF1B*.

#### **I.4.3 Polymorphismes des gènes codants pour les récepteurs Fc des anti-TNF- $\alpha$**

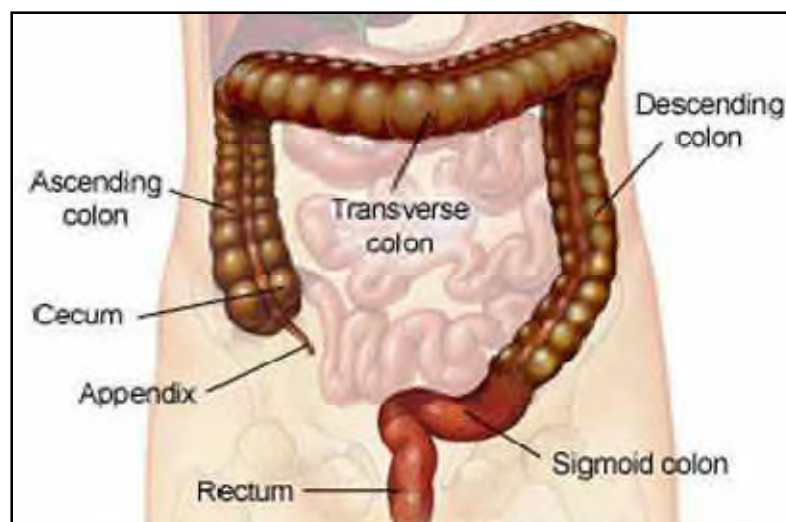
Les anti-TNF- $\alpha$  contiennent la fraction Fc qui pourrait moduler leurs effets. Ainsi, les polymorphismes du récepteur Fc (FcR) altéreraient les fonctions du récepteur en augmentant ou en diminuant son affinité pour les immunoglobulines. Trois classes de FcR qui sont capables de liaison aux anticorps IgG sont identifiées : Fc-RI (CD64), Fc-RII (CD32), et Fc-RIII (CD16), Fc-RII et Fc-RIII ont de multiples isoformes (Fc-RIIA, B et C ; Fc-RIIIA et B). Pour les récepteurs suivants, les SNPs ont été décrits : FCGR2A, FCGR3A, et FCGR3B, et analysés comme des facteurs prédictifs. Les génotypes FCGR3A 158 Phe/Phe et FCGR2A 131Arg/Arg de faible affinité étaient respectivement associés à une réponse à l'ACR50 à la 6<sup>ème</sup> semaine et à l'ACR20 à la 30<sup>ème</sup> semaine, chez 91 patients espagnols atteints de PR. De plus, dans une population nord-américaine hétérogène de patients atteints de PR et de rhumatisme psoriasique, le même génotype FCGR3A 158Phe/Phe était associé à une bonne réponse aux anti-TNF- $\alpha$ . Toutefois, dans une plus grande population PR, aucune association n'a été retrouvée entre la réponse à l'Etanercept et les SNP suivants FCGR2A His131Arg, FCGR3A Phe176Val. Chez 78 patients français atteints de PR, aucune association n'a été

observée entre la réponse à l'Infliximab et le SNP FCGR3A Val212Phe. Ainsi dans la PR, ces polymorphismes n'ont pas permis de prédire la réponse aux anti-TNF.

Le méthotrexate, l'azathioprine et les anti-TNF sont des médicaments utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Plusieurs polymorphismes génétiques expliquent une partie de la susceptibilité d'un patient atteint de la PR à ces médicaments. Certains variants alléliques des gènes codants pour des transporteurs comme la famille des ABC peuvent influencer l'efficacité de l'AZA et le MTX. Les enzymes intervenant dans le métabolisme des médicaments peuvent avoir des SNP influencent la toxicité et l'efficacité de ces médicaments. Les effets d'un médicament dépendent à des polymorphismes des enzymes cibles exemple de la Méthylène-tétra-hydro-folate réductase enzyme inhibée par le MTX. Et des polymorphismes du gène *TNF- $\alpha$*  qui influencent la posologie des anti-TNF. Le développement de la pharmacogénomique et la meilleure connaissance physiopathologique de la polyarthrite rhumatoïde devraient permettre d'avoir un traitement avec un meilleur rapport efficacité/tolérance. Mais malgré que la pharmacogénomique est un domaine en pleine expansion, les résultats restent encore assez peu significatifs, sans applications cliniques actuellement. Il est nécessaire d'explorer maintenant les polymorphismes présents sur tous les gènes impliqués dans le déterminisme de l'action des médicaments, enzymes du métabolisme, spécifiques et généraux, transporteurs divers, protéines cibles des médicaments comme le méthotrexate, l'azathioprine et les anti-TNF. L'évolution des techniques de la biologie moléculaire et de la pharmacogénomique devrait permettre, dans un futur proche, le développement d'une médecine dite « sur mesure », offrant la possibilité d'individualiser les traitements médicamenteux en fonction du génotype des individus, et d'obtenir le profil pharmacogénétique de chaque patient, Ainsi, une « carte d'identité génotypique » permettant de préciser la pathogénie de la maladie, les capacités métaboliques et de transport, et la fonctionnalité des récepteurs ou des cibles thérapeutiques, pourrait être établie pour chaque individu.

## **Chapitre II. Pharmacogénomique et traitement des cancers colorectaux**

L'intestin fait partie du tube gastro-intestinal. Il joue un rôle central dans la digestion et l'absorption des nutriments. Depuis la bouche, les aliments passent par l'œsophage puis dans l'estomac et l'intestin grêle, qui mesure entre trois et cinq mètres de long (figure 14). A mesure que la nourriture traverse les organes digestifs, elle est progressivement réduite en particules de plus en plus petites, afin de permettre le passage dans l'organisme des nutriments (graisses, protéines, sucres...). Le processus s'achève dans le côlon, long d'environ 1,5 mètre. C'est là aussi qu'une grande partie du liquide est absorbée. Les selles épaissies parviennent au sigmoïde, situé à la fin du côlon, avant de passer par le rectum (environ 15 cm de long) et le canal anal juste en dessous (environ quatre cm). Elles sont ensuite évacuées par l'anus. Les parois de l'anus renferment deux sphincters, externe et interne, en partie sous contrôle à volonté. Ils fonctionnent comme des valves et s'ouvrent lors de la défécation.



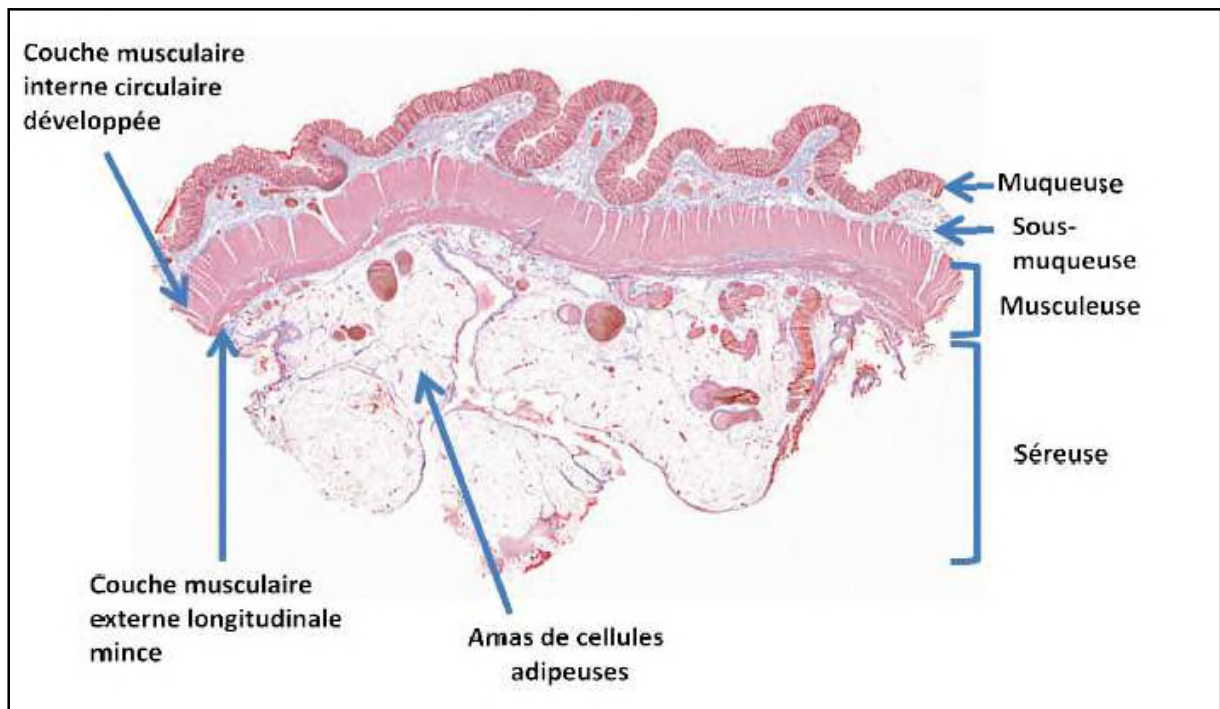
**Figure14** : Schéma anatomique du colon et du rectum.

La paroi du colon et du rectum présente de l'intérieur vers l'extérieur les couches suivantes (figure 15):

- Les différentes couches musculuses (circulaires et longitudinales) qui mélangent le contenu intestinal et le font avancer (mouvement péristaltique de l'intestin).
- Une muqueuse « tapissée » de nombreuses glandes recouvre la paroi interne du côlon.

Elle présente d'innombrables petits creux (ou cryptes intestinales). Entre la couche de muqueuse et la couche musculuse interne se trouve la sous-muqueuse, une couche péristaltique constituée de tissu conjonctif souple, innervé et contenant des vaisseaux.

- Les quatre derniers centimètres du rectum forment le canal anal. Cette partie marque la transition progressive de la muqueuse vers la peau externe « normale ».

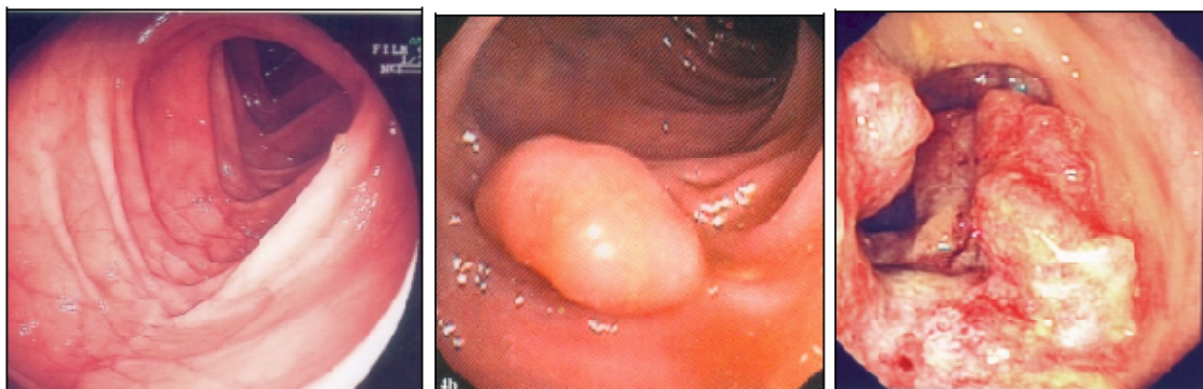


**Figure 15** : Schéma histologique montrant les différentes couches de la paroi du gros intestin.

La musculaire du colon se compose de deux couches une est circulaire, homogène, et bien développée et l'autre est une couche longitudinale condensé sous forme de trois bandelettes, nommés teania coli, elle est infiltrée par des minces filaments nerveux issus de plexus sous muqueux. Sachant que la musculaire du rectum ne se caractérise que par une seule couche continue et unique. La tunique externe: la couche extérieure est une couche adventice, qui entoure la couche musculaire. Elle est constituée de tissu conjonctif lâche parsemé de fibroblastes et de collagène, ainsi que d'une quantité variable d'adipocytes. Egalement elle contient des nerfs et de gros vaisseaux sanguins et lymphatiques, au niveau de certains segments du colon et du rectum cette adventice est recouverte par une fine couche donnée par le péritoine viscérale dite mésothorium. Cette dernière portant le nom d'une séreuse, là où l'adventic n'est pas recouvert de mésothelium elle se fond aux tissus adjacents.

## II.1 Cancers colorectaux

Les cancers colorectaux peuvent se développer à partir de différentes cellules. Plus de 95% d'entre eux apparaissent toutefois dans la muqueuse du côlon et du rectum. Environ 5 % des maladies cancéreuses colorectales se développent à partir d'autres types de cellules (que celles de la muqueuse intestinale). Le renouvellement constant des cellules de la muqueuse intestinale peut conduire à une surproduction cellulaire. Le cancer du côlon « gros intestin » est le cancer le plus fréquent du tube digestif. Il résulte de l'accumulation de mutations dans différents gènes au sein des cellules constitutives de la couche la plus interne de la paroi colique appelée « muqueuse ». Ces mutations sont responsables de la prolifération excessive et anarchique de ces cellules qui aboutit à la formation de petites tumeurs initialement bénignes appelées « adénomes » ou « polypes adénomateux ». Ces polypes peuvent se transformer secondairement en tumeurs malignes c'est-à-dire cancéreuses (également appelées « adénocarcinomes ») qui ont la capacité d'infiltrer progressivement l'épaisseur de la paroi colique puis de diffuser à distance du côlon pour donner naissance à des métastases (tumeurs « filles », localisées à distance du côlon, par exemple dans le foie ou les poumons) par envahissement des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. Plusieurs années d'évolution sont nécessaires pour qu'un petit adénome se transforme éventuellement en un cancer invasif. Cette séquence adénome-cancer permet d'expliquer en partie l'efficacité du dépistage qui permet non seulement de faire le diagnostic des cancers à un stade plus précoce mais également de diminuer leur fréquence grâce à l'identification et à l'exérèse (généralement au cours de la coloscopie) des polypes adénomateux avant qu'ils ne se transforment (figure 16).



**Colon normal**

**Petit polype du colon**

**Cancer du colon**

**Figure 16:** Photographie de coloscopie de trois colons.

## II.1.1 Epidémiologie

Les cancers du côlon et du rectum sont très fréquents dans les pays occidentaux où ils représentent la deuxième cause de cancer chez la femme (après le cancer du sein) et la troisième chez l'homme (après les cancers de la prostate et du poumon). Chez l'homme, on estime 187 600 nouveaux cas de cancer, avec 42 152 nouveaux cas de cancer colorectal estimés en 2012. Les taux d'incidences standardisés sont de 38,4 chez l'homme et de 23,7 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes de 1,62. Avec 17 722 décès, dont 52 % chez l'homme. Les taux de mortalité standardisés sont de 13,3 chez l'homme et de 7,9 chez la femme, sachant que la majorité des nouveaux cas de cancer du côlon-rectum estimés surviennent chez les personnes âgées de 50 ans et plus. Avant 50 ans, les taux d'incidence sont faibles et proches entre les deux sexes puis les taux augmentent avec l'âge, plus rapidement chez l'homme que chez la Femme. Le cancer du côlon est beaucoup moins fréquent en Afrique et en Asie mais le risque augmente rapidement chez les populations migrantes qui quittent ces pays pour un pays « occidental », ce qui indique que le mode de vie (en particulier l'alimentation et l'activité physique) interfère avec ce risque.

De nombreuses études épidémiologiques d'observation ou d'intervention ont permis de préciser les facteurs « environnementaux » pouvant favoriser ou diminuer l'incidence du cancer du côlon. Ce dernier est lié au mode de vie, l'obésité, la consommation d'alcool, du tabac, et une grande consommation de la viande transformée ou rouge. Tous ces facteurs augmentent le risque de développer ce type de cancer, tandis qu'un exercice physique quotidien et une alimentation riche en fruits, légumes et céréales, les fibres alimentaires, les fruits, les vitamines A, C, D et E, le calcium, les folates, le café auraient un rôle protecteur alors que la sédentarité, les graisses, les viandes, les protéines, un apport calorique élevé, l'alcool et le tabac seraient des facteurs favorisants. L'aspirine et les anti-inflammatoires ont un effet protecteur sur le développement du cancer colorectal et des adénomes. Des études ont été faites précisent le bénéfice potentiel d'une prévention qui ne sera pas annulé par les effets secondaires de l'aspirine.

Dans environ 5 % des cas environ, le cancer du côlon survient dans le contexte d'une maladie génétique de prédisposition. On parle de forme « héréditaire. Deux grandes maladies génétiques de prédisposition sont connues : la polypose adénomateuse familiale (minoritaire et responsable de 1 % de l'ensemble des cancers colorectaux) et le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (« *Hereditary Non Polyposis Colo-rectal Cancer*», responsable de 3 à 5 % des cas). Le diagnostic de cancer du côlon « héréditaire » doit être évoqué soit en présence



d'une polypose, c'est-à-dire en cas d'association à de multiples polypes ; soit en cas de diagnostic à un âge inhabituellement jeune (inférieur à 60 ans) et/ou d'agrégation familiale de cancers du côlon ou rectum ou d'autres types de cancers, notamment du corps de l'utérus. Dans de telles situations, il est important de demander l'avis d'un médecin généticien qui pourra décider de mettre en œuvre une recherche de mutation prédisposante.

## **II.2 Traitement des cancers colorectaux**

Malgré des avancées notables, les cancers colorectaux sont toujours une des principales causes de décès par cancer. Le traitement dépendra de l'état général de santé, ainsi que du type, et du stade du cancer. Pour le cancer colorectal, il pourrait comprendre une combinaison de chirurgie, de radiothérapie, de chimiothérapie et de thérapie biologique. En association avec la chirurgie, mise en œuvre dans les stades les plus précoces, les traitements médicamenteux ont une place déterminante. Leur choix provient des études cliniques et les posologies sont adaptées à la surface corporelle. Les doses doivent être les plus élevées possibles afin d'obtenir une efficacité maximale (effet dose intensité) dans ces maladies redoutables. Cependant, du fait de leur toxicité importante et de leurs effets indésirables parfois très graves, souvent chez des patients affaiblis, l'emploi de ces molécules anticancéreuses demande un suivi très rigoureux par les cliniciens. Ce suivi thérapeutique était jusqu'à présent réalisé par la mise en évidence des effets indésirables cliniques ou biologiques et plus rarement, pour certains médicaments, par le dosage sanguin du médicament. Ce dosage des molécules au cours du traitement permet parfois d'évaluer le phénotype de certaines enzymes participant au métabolisme du médicament, quand ce n'est pas l'enzyme elle-même dont l'activité est mesurée.

Les variations individuelles des concentrations des molécules, de leurs activités et de leurs effets indésirables sont encore trop souvent mises sur le compte de « la variabilité humaine » face aux xénobiotiques. Il faut désormais envisager l'implication des facteurs génétiques pour chaque malade. En effet, un déficit métabolique peut entraîner un surdosage toxique ou au contraire, un défaut du métabolisme d'une prodrogue ou un échec thérapeutique. À l'inverse, les métaboliseurs rapides éliminent le principe actif trop rapidement, le rendant inefficace, et les prodrogues ont une toxicité accrue. Il faut également prendre en compte les récepteurs cellulaires et les mécanismes d'efflux des xénobiotiques qui sont eux aussi génétiquement déterminés. L'association de plusieurs molécules se surajoute à cette complexité. S'il faut cependant garder à l'esprit la complexité des métabolismes



médicamenteux et les nombreuses enzymes responsables en amont du traitement, la biologie moléculaire permet pour chaque patient de mieux choisir le traitement le plus efficace et sa posologie et de mieux prévoir les effets indésirables. Nous nous sommes intéressés aux cytotoxiques les plus utilisés (5-fluorouracile, oxaliplatine, irinotécan) dans le cancer colorectal afin de dégager les principales implications pharmacogénétiques les concernant.

L'élimination des médicaments anticancéreux, essentiellement par voie rénale et biliaire, impose un métabolisme qui les rende plus hydrophiles. Cette transformation est réalisée par l'élimination des groupements les moins polaires et/ou par l'addition de groupements polaires. Ce processus fait schématiquement appel à deux étapes essentiellement enzymatiques et principalement hépatique, intestinale et rénale. Les réactions de phase I (oxydation, réduction ou hydrolyse) qui modifient la structure chimique de la molécule précèdent les réactions de phase II qui conjuguent la molécule modifiée ou non, à des groupements glucuronate, sulfate, glutathion, acétate, etc. Ces deux mécanismes permettent de limiter ou de supprimer la toxicité des molécules dans la majorité des cas mais parfois, surtout pour les mécanismes de phase I, de transformer des prodrogues en molécules actives.

Les différentes enzymes impliquées dans la phase I ou la phase II présentent des variations génétiques dont la fréquence est très différente selon les enzymes et les ethnies. Les polymorphismes peuvent être à l'origine le plus souvent d'une baisse modérée ou d'une totale inactivité de l'enzyme. L'association de différentes variantes aux différentes étapes du métabolisme d'une molécule conduit à de nombreuses possibilités qui expliquent en partie les variations individuelles dans la pharmacocinétique et l'activité des médicaments. Dans cette grande variabilité des réponses aux thérapies anticancéreuses, il faut aussi évoquer les interactions entre les différents médicaments associés dans certains protocoles.

Les cancérologues se heurtent toujours aux deux écueils majeurs de la chimiothérapie, la résistance tumorale, en grande partie liée au fait que les traitements sont décidés sur des critères statistiques d'efficacité, et la toxicité, souvent sévère, due à l'index thérapeutique étroit de tous les médicaments anticancéreux. De nouvelles approches sont nécessaires pour individualiser les traitements. La pharmacogénomique, basée sur l'étude du génome tumoral et sur des profils d'expression génique est très prometteuse dans le cadre de la prédiction d'efficacité, mais les résultats sont souvent encore trop parcellaires pour des applications en clinique. Des données disponibles sur des gènes particuliers d'intérêt, tels que TS, MTHFR, permettent d'espérer un transfert prochain à la clinique.

Le rôle des caractéristiques moléculaires des tumeurs dans la réponse aux agents anticancéreux est au premier plan des préoccupations des biologistes depuis de nombreuses années. Les tumeurs présentent un génome dont de multiples caractères sont distincts de ceux de l'hôte. Amplifications, délétions, mutations, remaniements chromosomiques constituent les altérations fondamentales permettant d'expliquer l'oncogénèse.

### **II.2.1 Pharmacologie et pharmacogénomique du 5-fluorouracil**

Le 5-fluorouracile (5-FU), médicament de plus de 50 ans, reste très largement utilisé notamment comme traitement adjuvant de la chirurgie dans les cancers colorectaux associés à l'acide folinique et à d'autres thérapies cytotoxiques dans le cadre de protocoles. Le 5-FU est un agent cytostatique de la famille des fluoropyrimidines. Il est prescrit dans de nombreuses tumeurs solides, notamment le cancer du sein ou le cancer colo-rectal où il est le médicament le plus utilisé. Le 5-FU est un analogue de l'uracile qui agit selon plusieurs mécanismes. Il peut être intégré, soit à l'ARN sous forme de FUTP (altérant profondément son métabolisme et sa stabilité), soit à l'ADN sous forme de FdUTP, provoquant une inhibition de la réplication et une fragmentation de l'ADN.

Le 5-FU présente un métabolisme relativement complexe dont l'équilibre entre les différentes voies joue un rôle très important dans l'efficacité du traitement et la survenue d'effets indésirables qui peuvent être gravissimes. La voie anabolique qui conduit à l'effet cytotoxique passe par le métabolisme intracellulaire de 5-FU en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) par l'intermédiaire de l'action successive d'une thymine phosphorylase, d'une thymidine kinase et d'une pyridine monophosphate kinase.

Dans les cellules, le 5-FU en lui-même est inactif, c'est une prodrogue. Le 5-FU présente un métabolisme relativement complexe dont l'équilibre entre les différentes voies joue un rôle très important dans l'efficacité du traitement et la survenue d'effets indésirables qui peuvent être très graves. Après son entrée dans la cellule, le 5-FU suit une voie catabolique et une voie anabolique. La voie catabolique entraîne la formation de composés inactifs ; elle est responsable de l'élimination de 60 % à 90 % de la dose administrée. L'enzyme responsable du catabolisme du 5-FU est la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) qui permet la réduction du 5-FU en 5-fluoro-5,6-dihydrouracile (FUH2), le métabolite inactif. Cette enzyme intervient aussi dans la transformation des bases pyrimidiques naturelles (uracile et thymine) en leurs dérivés dihydrogénés (dihydrouracile -UH2- et dihydrothymine). La deuxième étape du catabolisme fait intervenir la dihydropyrimidinase pour former l'acide

5-flourouréidopropionique (FUPA), qui sera métabolisé en  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine (FBA) sous l'action de l'uréidopropionase. Toutefois, son activité anti-tumorale s'exerce principalement sous la forme de FdUMP, métabolite capable d'inhiber la thymidylate synthase (TS), enzyme fondamentale de la synthèse *de novo* des pyrimidines. En effet, cette enzyme clé de la synthèse de l'ADN ne peut plus transformer la désoxyuridine en thymidine. Pour être stable le complexe doit être méthylé sous l'influence de la tétrahydrofolate réductase (MTHFR) avec le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5-10 MTHF) comme donneur de méthyl et formation de 5-méthylène-tétrahydrofolate (figure 17). La grande majorité du 5-FU est détoxifié à 80 % par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) en 5-fluorodihydro-uracile (5-FUH2), qui sera converti en fluoro- $\beta$ -alanine. Les produits de ce catabolisme ne possèdent pas d'activité anticancéreuse mais certains métabolites hépatiques du 5-FUH2 seraient hépatotoxiques.

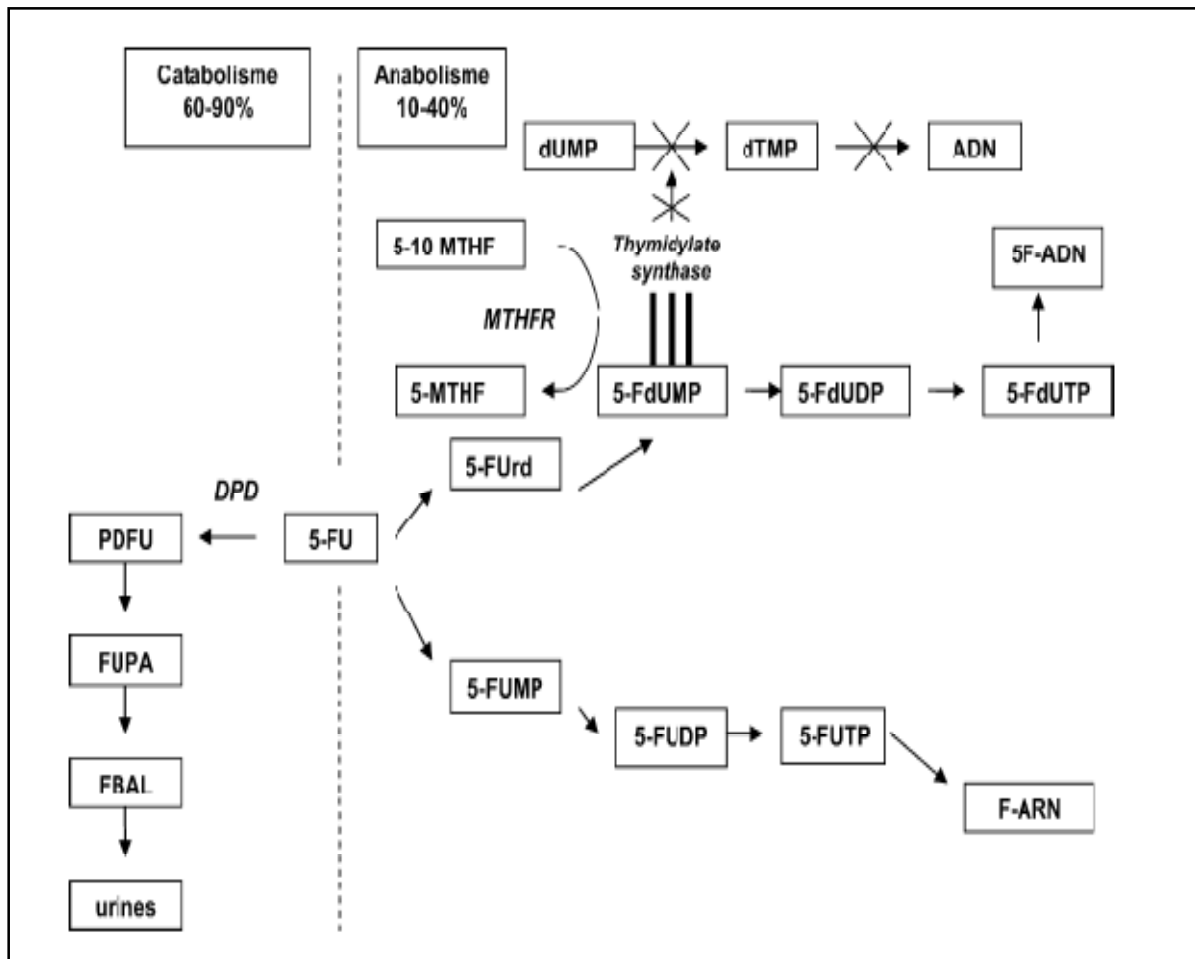


Figure 17 : Métabolisme du 5-fluorouracil.

### II.2.1.1 Thymidylate synthase

La thymidylate synthase est une cible importante dans les cancers colorectaux pour des thérapies anticancéreuses comme le 5-FU et d'autres inhibiteurs de cette enzyme. La thymidylate synthase catalyse à partir de l'UMP la formation de thymidylate à l'origine de la synthèse de l'ADN. Le 5-FU, une fois métabolisé en 5-FdUMP, se fixe sur la thymidylate synthase : la sensibilité des tumeurs au 5-FU est inversement proportionnelle à l'activité résiduelle de la thymidylate synthase, ce qui a des conséquences dans le pronostic et le choix de cette molécule. L'expression de la protéine et son activité sont sous la dépendance de facteurs génétiques relativement simples.

Le gène codant la thymidylate synthase peut contenir deux (2R) ou trois répétitions (3R) d'un motif de 28 paires de bases au niveau de la région promotrice du gène. La fréquence du génotype 3R/3R est plus faible chez les Caucasiens (38 %) que chez les Chinois ou les Japonais (67 %). La présence de trois répétitions se traduit par une augmentation de la transcription et de l'activité de la thymidylate synthase et par conséquent une plus faible inhibition de la thymidylate synthase par le 5-FU. Ainsi, la quantification des ARN messagers à l'origine de la thymidylate synthase par RT-PCR montre que leur concentration est 3,6 fois supérieure chez les patients homozygotes 3R/3R que chez les homozygotes 2R/2R. L'absence de réponse au 5-FU était plus fréquente chez les 3R/3R et les 3R/2R que les 2R/2R : respectivement 91, 85 et 50 % dans l'étude de Pullarkat et al. portant sur 50 patients atteints de cancer colorectal métastatique.

L'étude de Lacopetta et al. confirmait la relation entre le génotype 3R/3R et l'échec du traitement par le 5-FU dans le cancer colorectal par rapport aux autres génotypes. Celle de Marsh et al. mettait en évidence une médiane de survie plus faible chez des patients 3R/3R par rapport aux patients 2R/2R après une chimiothérapie à base de 5-FU pour un cancer métastaté du côlon. Par ailleurs, se surajoute un polymorphisme G/C situé à l'intérieur de la répétition R3 entraînant une altération du site de fixation du facteur de transcription USF-1 et modifiant l'expression de la thymidylate synthase. Ainsi, les patients présentant un 3G sont plus résistants à la chimiothérapie que ceux possesseurs d'un 3C, la quantité d'ARNm produite étant plus élevée, l'activité thymidylate synthase plus intense et son inhibition par le 5-FU plus difficile.

L'étude de Marcuello et al. chez 89 patients atteints d'un cancer colorectal avancé et pour les deux mutations touchant la région 5' du gène de la thymidylate synthase avait montré que les patients avec une faible expression génotypique (2R/2R, 2R/3C ou 3C/3C) avaient une

probabilité de réponse au traitement 2,9 fois supérieure aux patients présentant des génotypes de forte expression de la thymidylate synthase (2R/3G, 3C/3G et 3G/3G). La médiane de survie n'était pas atteinte après 50 mois pour les faibles expressions en thymidylate synthase alors qu'elle n'était que de 20 mois pour le groupe à forte expression. Pour le cancer gastrique, l'étude de Goekkurt et al. chez 52 patients montrait que le groupe des patients à forte expression (3R/3G, 3C/3G et 3G/3G) avaient une médiane de survie de 6 mois contre 10 mois pour les expressions plus faibles (2R/2R, 2R/3C, 3C/3C). Cependant, cette étude ne montrait pas de différences dans la réponse au traitement si chaque mutation de la région 5' était considérée isolément. À l'inverse, Dotor et al. montraient que les patients (129 cancers colorectaux) possédant le génotype R3/R3 avaient un meilleur pronostic et qu'il n'y avait pas de différence pour la mutation G>C.

Une troisième variation a été mise en évidence : il s'agit d'une délétion de six paires de bases dans la région 3' non traduite (del6). Cette délétion se traduit par une plus faible expression de l'enzyme et par conséquent une meilleure efficacité du traitement. La fréquence des génotypes donnée par Kawakami et al. était de 32,12 % pour ins6/ins6, 43,3 % pour ins6/del6, et 24,4 % pour del6/del6 (n=90). Cette perte de six paires de bases est favorable de manière significative pour le pronostic dans le cancer colorectal pour Dotor et al. D'autres études réalisées chez des patients atteints de cancers gastriques comme celle de Goekkurt et al. (n = 52) ne montrait pas de différence de réponse au traitement selon la présence ou non de ce polymorphisme. Kawakami et al. avaient étudié l'impact de la présence des allèles 3R ou 2R associés ou non à la délétion del6 et à la mutation G/C après intervention chirurgicale pour cancer gastrique chez 90 patients traités par 5-FU en adjuvant. Les associations 5' 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G et 3' ins6/ins6 étaient considérées comme associées à une expression élevée en ARNm de la thymidylate synthase tandis que les autres associations : 5' 2R/2R, 2R/3C, 3C/3C, et 3' ins6/del6, del6/del6 sont associées à une faible expression de la thymidylate synthase. Cette étude montrait que pour l'ensemble des patients le taux de survie sans rechute et le taux de survie global (avec et sans rechutes) à trois ans était respectivement de 54 et de 68 %. Les patients possédant les variants qui limitent l'expression de la synthèse de la thymidylate synthase avaient une survie à trois ans notablement plus élevée (84 versus 40 % pour l'ensemble et 76 versus 20 % en l'absence de rechute). Globalement, une expression élevée de la thymidylate synthase est désormais largement reconnue comme étant une des causes déterminantes de la résistance au 5-FU. L'analyse conjointe par biologie moléculaire des différents polymorphismes permet de façon simple d'estimer cette expression potentielle.

Cette donnée valable pour le cancer colorectal devrait être prise en compte dans le traitement et le pronostic.

### **II.2.1.2 Dihydropyrimidine déshydrogénase**

La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est la principale enzyme responsable du catabolisme du 5-FU en le transformant en dihydrofluorouracil. Cette transformation touche la majorité du 5-FU, laissant une faible part à l'anabolisme et à l'activité cytotoxique. Une activité élevée de la DPD n'améliore pas le pronostic, mais s'il est insuffisamment métabolisé, le 5-FU peut présenter des effets toxiques. Il existe différents effets indésirables liés à l'usage du 5-FU : érythrodysesthésies palmoplantaires (10 %), stomatites (10 %), hyperbilirubinémie (6 %) et surtout neutropénie grave (6 %) et diarrhées fréquentes. Dans 39 à 59 % des cas de toxicité sévère liée au 5-FU, une diminution de l'activité enzymatique de la DPD peut être détectée au niveau des leucocytes circulants. En particulier, il est retrouvé une neutropénie chez 55 % des patients déficients par opposition aux 13 % de neutropénies retrouvées chez des patients non déficients. Ce déficit d'activité est principalement d'origine génétique.

Le gène codant la DPD est localisé sur le chromosome 1 (1p22) et comprend 23 exons. Actuellement, une quarantaine de mutations ont été mises en évidence. À l'état hétérozygote, la fréquence du déficit pour cette enzyme serait de 1 à 3 % dans la population caucasienne et d'environ 0,01 % à l'état homozygote. La principale mutation en cause (environ 50 % des cas) est une mutation touchant l'exon 14 par altération du site d'épissage (IVS14 + 1G>A) et entraînant une perte de 165 nucléotides de l'ARNm de la DPD. Elle est absente dans les populations asiatiques et africaines. Il suffit qu'un seul des deux allèles soit touché pour que des effets indésirables apparaissent. Il a été montré chez une patiente hétérozygote ayant une activité de la DPD diminuée de 42 % que sa clairance est 2,5 fois plus faible avec une aire sous la courbe deux fois supérieure par rapport aux sujets normaux. Parmi les patients souffrant d'effets indésirables de grade 3 et 4, 28 % sont hétérozygotes ou homozygotes pour cette mutation. La probabilité qu'un patient porteur de cette mutation présente une toxicité au 5-FU est estimée à 87 %. Il en découle que la fréquence des toxicités sévères au 5-FU dans la population générale serait de 25 % au lieu de 31 % si on écartait les patients porteurs du déficit en DPD. Parmi les autres mutations ayant une fréquence élevée citons la Cys29Arg (C29R) située sur l'exon 2 et la mutation Ile543Val (I543V) sur l'exon 13 qui ne semblent pas avoir d'impact sur l'activité de l'enzyme. Même si la pharmacogénétique n'explique pas

l'ensemble des effets indésirables retrouvés avec le 5-FU, la fréquence du déficit enzymatique due à la mutation IVS14+1G > A et la forte morbidité, voire la mortalité associées, justifient pour de nombreux auteurs d'en effectuer systématiquement la recherche avant l'instauration du traitement. En particulier, la sensibilité au 5-FU chez les patients hétérozygotes augmentant avec l'âge (baisse physiologique de l'expression de la DPD avec l'âge), il y a tout intérêt à étendre le dépistage « systématique » chez le sujet âgé (> 70–75 ans). En l'absence de notion sur le statut DPD, l'attitude pragmatique consiste à débiter la chimiothérapie avec une dose réduite de 30 à 50 % chez les sujets âgés ou fragiles et de la majorer à 100 % en l'absence de toxicité sévère après deux à trois cycles. Ces recommandations sont valables pour le 5-FU sous toutes ses formes (IV et orale, capécitabine).

### **II.2.1.3 Méthylènetétrahydrofolate réductase**

La méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme qui régule le métabolisme des folates et de l'homocystéine et elle joue également un rôle dans la méthylation et la synthèse d'ADN. La MTHFR est également un facteur important dans l'action du 5-FU car elle réalise la conversion du 5-10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate indispensable à la synthèse de l'ADN. Il agit comme cofacteur de la conversion de la déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythymidine monophosphate (dTMP) par la thymidylate synthase. Dans le mode d'action du 5-FU, il stabilise le complexe formé par le 5-FU, le 5-fluorodéoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) sur la thymidylate synthase.

La mutation 677C > T sur le gène codant la MTHFR, à l'origine d'une substitution d'une alanine en valine, entraîne un déficit de l'activité de l'enzyme. Le variant T/T est présent dans environ 15 % de la population caucasienne, tandis que les génotypes C/T et C/C sont retrouvés dans 42 et 43 %, respectivement. Cette baisse d'activité de l'enzyme se traduit par une augmentation de la concentration de 5-10 méthylènetétrahydrofolate substrat de la méthylation du complexe cytotoxique avec la thymidylate synthase. Cette modification du métabolisme devrait se caractériser par une meilleure activité du 5-FU. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs études. Dans celle de Cohen et al., chez 43 patients traités pour cancer colorectal, le ratio entre les répondeurs et les non répondeurs étaient de 2,86, avec des taux de réponse qui sont respectivement de 47 % pour les patients C/C, 67 % pour les patients C/T et 100 % pour les patients T/T. En revanche, il n'était pas mis en évidence de différences entre les génotypes pour la fréquence des effets indésirables du traitement. Pour Jakobsen et al.,

chez 79 % des patients avec un cancer colorectal métastasé (n = 88), les taux de réponses étaient respectivement pour C/C, C/T, T/T de 34, 21 et 67 %. En associant la présence de la mutation T/T de MTHFR et l'homozygotie 3R/3R de la thymidylate synthase (n = 27), les taux de réponses étaient de 52 versus 25 % pour les patients hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle 2R et l'allèle C de MTHFR. L'absence de réponse est de 48 % pour la population T/T et 3R/3R (n = 13) versus 75 % pour le reste de la population (n = 46). Ces résultats étaient conformes aux autres études concernant la MTHFR. L'autre mutation fréquente de la MTHFR 1298A > C transforme une glutamine en alanine et les fréquences retrouvées sont pour : A/A = 48%, A/C = 42 % et C/C = 9 %. Elle n'est pas caractérisée à l'état hétérozygote ou homozygote par une hyperhomocystéinémie. Il n'est pas mis en évidence de réponses différentes au traitement par le 5-FU selon le génotype pour cette mutation.

## **II.2.2 Pharmacologie et pharmacogénomique de l'Oxaliplatine**

L'oxaliplatine associé au 5-fluorouracil a démontré son efficacité dans les cancers du côlon de stade III et IV. Cette association est régulièrement prescrite dans ces deux indications. Ce composé bloque la réplication de l'ADN et les enzymes responsables de son métabolisme, comme la glutathion S-transférase (GST), jouent un rôle dans l'efficacité de cette thérapie. La sous-classe GSTP1 est celle qui est le plus souvent étudiée sur le plan pharmacogénétique. Les glutathion S-transférases (GST) sont une superfamille d'enzymes responsables de la phase II. Elles jouent un rôle important dans la défense des cellules car elle catalyse la conjugaison de toxiques et de carcinogènes électrophiles avec du glutathion. Cette superfamille comprend cinq classes (A, P, M, T et Z). La forme GSTP1 est largement produite par les tissus épithéliaux et tout particulièrement le tissu du cancer du côlon. Les tumeurs résistantes à l'oxaliplatine présenteraient une augmentation de l'expression de cette enzyme.

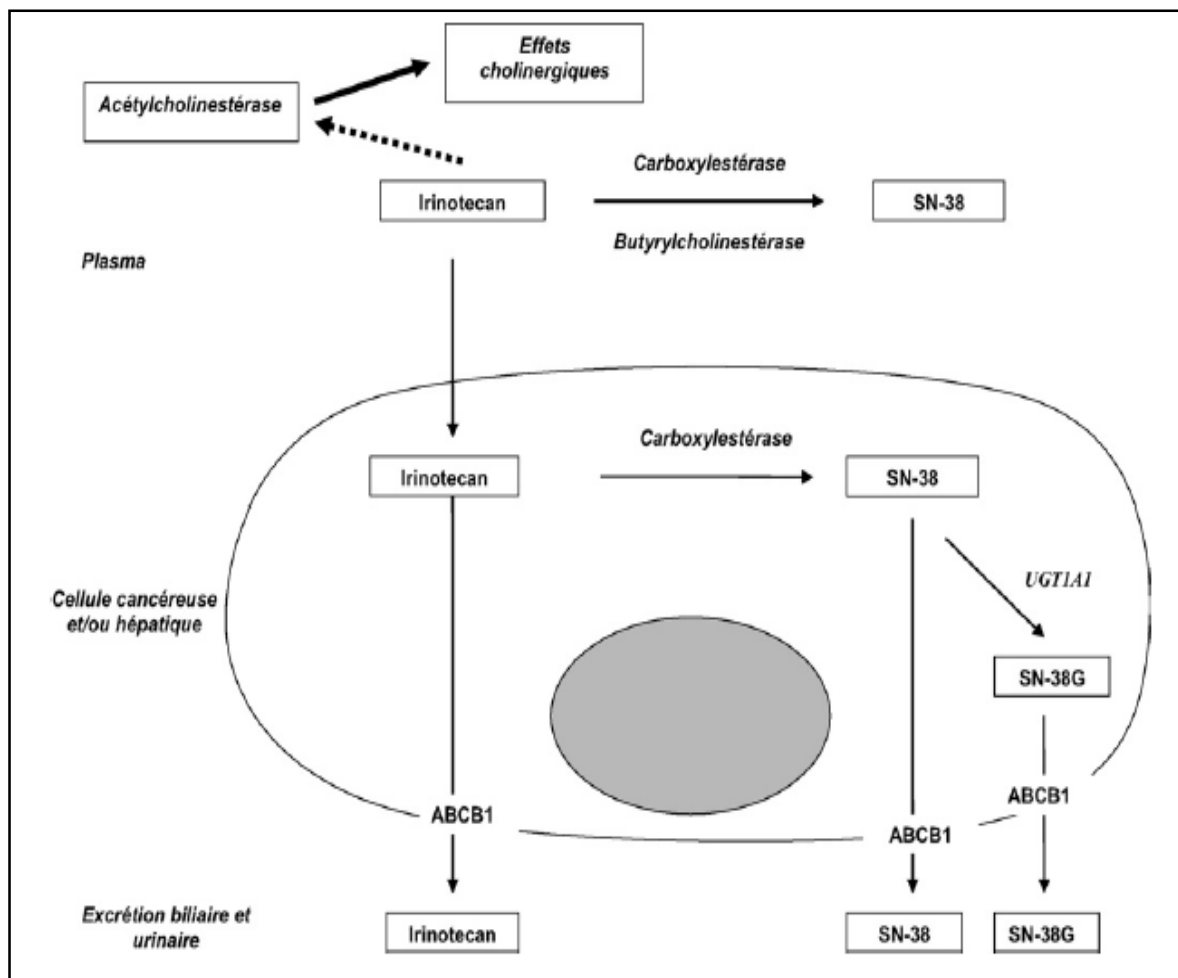
Le polymorphisme de GSTP1 correspond à une transition A > G sur l'exon 5, modifiant une isoleucine en valine (Ile105 > Val105). Cette mutation provoque une baisse de l'activité de l'enzyme et par conséquent devrait permettre une meilleure efficacité de la thérapie. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Stoeckl et al. chez 107 patients atteints de cancer colorectal métastasé traités par oxaliplatine et 5-FU. La médiane de survie était de 25 mois pour les patients Val/Val, 13 mois pour les patients Ile/Val et 8 mois pour les patients Ile/Ile. La probabilité de survie à 18 mois passait de 5 % pour les Ile/Ile à 33 % pour les hétérozygotes Ile/Val et 71% pour les homozygotes Val/Val. Dans le cancer gastrique une



étude portant sur 96 patients traités par du 5-FU/cisplatine mettait en évidence un taux de réponse de 23 % chez les patients de phénotype sauvage, 17 % chez les hétérozygotes et 67 % chez les homozygotes. Les autres mutations touchant GSTM1 et GSTT1 ne semblaient pas modifier l'action de l'oxaliplatine.

### **II.2.3 Pharmacologie et pharmacogénomique de l'Irinotécan**

L'irinotécan ou CPT-11 (Campto®) a trouvé une place importante dans le traitement des cancers colorectaux, et depuis son introduction dans l'arsenal de la chimiothérapie, la survie médiane des patients métastatiques a augmenté de plus de 50 %. Avec l'oxaliplatine, il a révolutionné la stratégie thérapeutique des cancers colorectaux, qui, pendant plus de 40 ans, était restée basée sur le seul 5-fluorouracile. L'irinotécan utilisé dans le traitement du cancer du côlon est une prodrogue dont le métabolite actif, le SN-38, inhibiteur de la topo-isomérase I, est 100 à 1000 fois plus actif que la molécule mère. L'irinotécan n'est pas directement toxique. En tant que « prodrogue », il donne le SN-38, à la fois cytotoxique et toxique, à l'origine de la diarrhée et de la myélosuppression. Ce métabolite est produit par des estérases notamment la carboxylestérase et la butyrylcholinestérase puis normalement glucuronoconjugué (SN-38 G) par une glucuronyltransférase de type 1 (UGT1) qui le rend inactif et atoxique avant d'être éliminé par la bile et les urines. Il peut subir un cycle entérohépatique en cas de déconjugaison par les glucuronidases bactériennes intestinales et redevenir actif et toxique au niveau intestinal sur les cellules à renouvellement rapide (figure 18).



**Figure 18:** Principe du métabolisme de l'irinotécan.

L'utilisation d'irinotécan s'accompagne d'effets indésirables non négligeables notamment, des effets cholinergiques très précoces lors d'utilisation de posologies élevées, antagonisés par l'atropine (salivation, bradycardie, anomalies visuelles, rhinorrhée) puis de la diarrhée dans les deux à quatre jours. Plus tardivement peuvent apparaître des troubles hématologiques potentiellement graves. L'action d'amélioration de l'atropine est en faveur d'une action inhibitrice de l'irinotécan avec l'acétylcholinestérase. Deux aspects du métabolisme du CPT-11 présentent un intérêt du point de vue pharmacogénétique, d'une part les estérases responsables de l'hydrolyse en molécule active et d'autre part la glucuroconjugaison qui facilite l'élimination.

### II.2.3.1 Estérases

L'activation de l'irinotécan est réalisée principalement par la carboxylestérase 2 (CES2), surtout localisée dans le foie et l'intestin. Cet enzyme est, sur ce substrat, beaucoup plus actif que l'autre carboxylestérase, CES1, surtout macrophagique. Rappelons toutefois que l'irinotécan reste un très mauvais substrat pour la CES2 comparativement au par-nitrophénylacétate, qui est hydrolysé 100 000 fois plus rapidement. L'activation de l'irinotécan présente une importante variabilité individuelle, que ce soit sur des modèles *ex vivo* de microsomes hépatiques ou en pharmacocinétique humaine. Ces variations peuvent être d'origine environnementale ou génétique. Des inhibiteurs de l'activité carboxylestérase n'ont pas encore été clairement identifiés, à l'exception de la nifédipine qui porte également un groupement ester carboxylique. Toutefois, la capécitabine, également activée par une carboxylestérase, ne présente pas d'interférence avec l'activation de l'irinotécan.

Trois estérases sont étudiées dans le cadre du métabolisme et des effets indésirables : la carboxylestérase ou CES (EC 3.1.1.1), l'acétylcholinestérase ou AChE (EC 3.1.1.7) et la butyrylcholinestérase ou BuChE (EC 3.1.1.8). Il existe des variations interindividuelles très importantes de l'activation du CPT-11. La proportion d'hydrolyse de l'irinotécan réalisée aux niveaux plasmatique, hépatique et directement au niveau cellulaire respectivement par la carboxylestérase et la butyrylcholinestérase n'est pas encore clairement définie. A contrario l'AChE est souvent mise en cause dans les effets cholinergiques.

### II.2.3.2 Carboxylestérasés

Les carboxylestérasés jouant un rôle dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques ont été considérées comme les principales enzymes responsables de l'hydrolyse du CPT-11 en molécule active. Les gènes codant pour les CES sont localisés en 16q13-q22 et présentent une forte homologie, faisant évoquer un gène ancestral commun. Il existe trois isoenzymes : la CES 1 présente dans le placenta et le cerveau, les CES 2 et CES 3 présentes dans de nombreux tissus principalement le foie, l'intestin et le plasma. L'isoenzyme 2 joue le principal rôle dans le métabolisme de l'irinotécan, la CES 1 n'a que peu d'affinité et la CES 3 est 12 à 26 fois moins active que la CES 2 sur le CPT-11. Il a été mis en évidence plus de onze polymorphismes sur la CES 2 avec des distributions variables en fonction de l'ethnie. Cependant, si des variations dans l'expression de l'ARNm ont été notées avec certains polymorphismes, il n'a pas encore été mis en évidence de différence dans l'activité enzymatique et le métabolisme de l'irinotécan mais les études sont limitées.

L'irinotécan, un médicament utilisé dans le traitement des cancers colorectaux avancés, est une *prodrogue* nécessitant une activation par la carboxylestérase 2 (CES2). L'existence de polymorphismes fonctionnels sur le gène codant pour cet enzyme pourrait expliquer la variabilité individuelle d'activité et/ou de toxicité de ce médicament. Des équipes de recherche ont exploré cette possibilité en recherchant des *single nucleotide polymorphisms* (SNP) et leurs conséquences fonctionnelles. Dans l'étude de Charasson *et al.*, une série de 115 échantillons d'ADN humains ont été étudiés par chromatographie à haute performance en conditions dénaturantes et séquençage de produits de PCR. Un total de 11 SNP ont été identifiés, aucun d'eux n'entraînant de variation au niveau de la séquence de la protéine. Ils sont répartis en 10 génotypes distincts s'ajoutant au type sauvage. La fonctionnalité de ces variations a été étudiée dans 60 échantillons de foie humain par mesure de l'expression du gène *CES2* par RT-PCR en temps réel et de l'activité carboxylestérase utilisant l'irinotécan comme substrat. Ces paramètres n'étaient pas significativement différents de ceux évalués dans les échantillons de génotype sauvage.

### **II.2.3.3 Butyrylcholinestérase**

La butyrylcholinestérase (BuChe) est présente dans le plasma où elle possède une activité élevée. Aucun substrat physiologique n'a pu lui être associé mais elle est responsable de l'hydrolyse de nombreux xénobiotiques (héroïne, cocaïne) et de deux curarisants rapides, la succinylcholine et la mivacurium dont la durée d'action est inversement liée à l'activité de cette enzyme. Il existe de nombreuses mutations touchant cette enzyme qui limitent son activité et sont directement à l'origine de curarisations prolongées postopératoires. Parmi les principaux variants citons : le variant atypique (4 % de la population à l'état hétérozygote et 0,3 % à l'état homozygote), le Kalow, les deux fluorures et les silencieux, rares mais à l'activité nulle. Il a été démontré que la BuChe hydrolyse l'irinotécan au niveau plasmatique. Morton *et al.* avaient montré sur du plasma de souris que la cholinestérase est responsable de 70 % de l'hydrolyse du CPT-11 et 30 % pour la carboxylestérase. Pour l'instant, il n'a pas été publié d'étude sur les variations du métabolisme, de l'efficacité ou des effets indésirables du CPT-11 en fonction de l'activité de la butyrylcholinestérase ou de ses variants. La BuChe ayant une activité uniquement plasmatique, une baisse de son action ne pourra pas être liée à l'hydrolyse en molécule active au niveau cellulaire notamment des tissus cancéreux.

#### **II.2.3.4 Acétylcholinestérase**

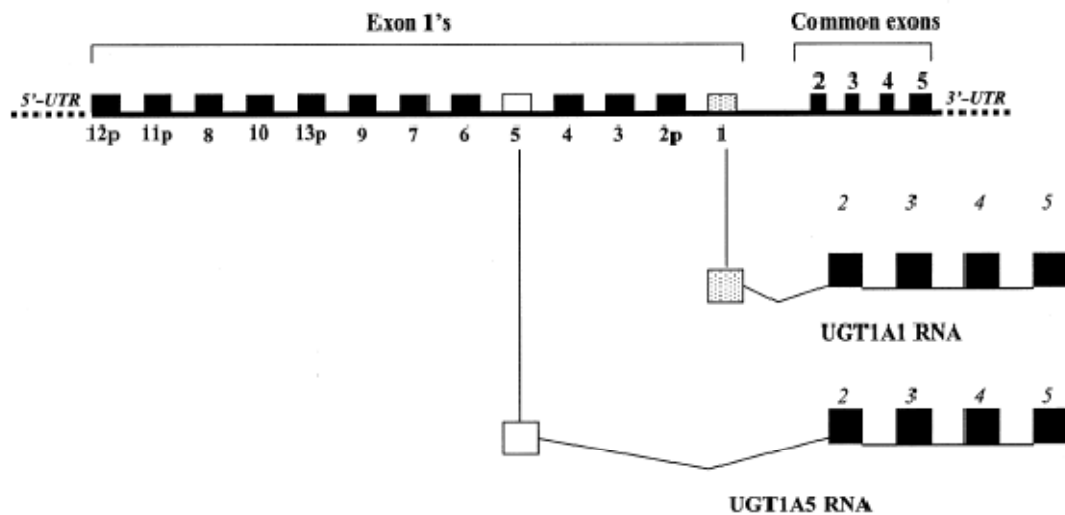
Cette enzyme est présente au niveau des synapses musculaires et du système nerveux central, elle hydrolyse l'acétylcholine en acétyl et choline. La mesure de l'activité de l'AChE érythrocytaire est classiquement utilisée comme marqueur d'une intoxication par les anticholinestérasiques comme les organophosphorés et les carbamates utilisés dans le domaine agricole ou les neurotoxiques militaires. Les effets de ces inhibiteurs sont très proches de ceux observés avec le CPT-11, eux aussi limités par l'atropine. Les effets cholinergiques de l'irinotécan sont très probablement liés, du moins en partie, à l'inhibition de l'AChE car de nombreuses études montrent que l'irinotécan est un inhibiteur de l'AChE. En revanche, son métabolite le SN-38 ne présente pas cette propriété. L'AChE n'est pas capable d'hydrolyser le CPT-11 en SN-38 contrairement à la BuChE. Les variations interindividuelles de l'activité de l'enzyme ne sont pas négligeables et 13 polymorphismes ont été mis en évidence par Hasin et al., sans qu'il ait pu les associer à une altération de l'activité. Aucune étude n'a relié des facteurs génétiques à une sensibilité aux effets cholinergiques du CPT-11 ni à celle de l'inhibition par d'autres anti-cholinestérasiques.

#### **II.2.3.5 Glucuronyltransférases**

Les glucuronyltransférases (UGT) représentent une des classes majeures des enzymes responsables de la phase II du métabolisme des xénobiotiques et de composés comme la bilirubine. Ils transfèrent un acide glucuronique provenant de l'acide uridinediphosphoglucuronique ce qui a pour conséquence d'augmenter la polarité de la nouvelle molécule et de faciliter son élimination urinaire et biliaire. Ces enzymes sont exprimées principalement au niveau hépatique mais aussi au niveau rénal, gastro-intestinal et cérébral. Les réactions de biotransformation des médicaments sont subdivisées en deux grands groupes : celles de fonctionnalisation (ou réaction de phase 1), très souvent une oxydation du substrat catalysée par un des cytochromes P450, et celles de phase 2 responsables en général d'une conjugaison du substrat. Les réactions de glucurono-conjugaison, et en particulier celles catalysées par l'UGT1A1, constituent les modifications métaboliques de phase 2 les plus fréquemment impliquées dans le métabolisme des médicaments. Le métabolite formé, dérivé glucurono-conjugué produit de la formation d'une liaison covalente entre le médicament (ou la substance endogène) substrat et l'acide UDP-glucuronique synthétisé par l'organisme à partir du glucose, est beaucoup plus hydrophile que la molécule mère ; il ne présentera plus d'activité pharmacodynamique (à la seule exception

connue d'un des métabolites glucurono-conjugués de la morphine) et pourra être facilement éliminé à la fois au niveau urinaire et dans la bile.

Les UGT se différencient en deux familles UGT1 et UGT2 dont la classification est basée sur leur degré d'homologie. L'UGT1 est codée par un gène situé sur le chromosome 2q37. De nombreuses études portant sur le polymorphisme génétique de l'UGT1 ont permis de mettre en évidence plus d'une soixantaine de mutations. Une baisse de la glucuronoconjugaison d'origine génétique, conduit à une action accrue du SN-38 non conjugué sur la paroi intestinale se traduisant par une diarrhée importante (grade 3 ou 4) et des neutropénies plus fréquentes (neutropénies de grade 3 ou 4). Cette variation du métabolisme de l'irinotécan est majoritairement associée à la même anomalie génétique que celle retrouvée dans la maladie de Gilbert qui touche la région promotrice de l'UGT1 (figure 19).



**Figure 19 :** Structure du gène de l'UGT1A correspondant aux gènes codant pour 13 isoenzymes différents, chacun de ces gènes étant composé d'un seul des exons 1 (de 12p à 1) et de 4 exons communs (2-5).

Un polymorphisme génétique est défini comme une mutation observée chez au moins 1 % de la population ; les différents allèles correspondants à ces mutations sont identifiés par un chiffre précédé d'une étoile. Ainsi, l'allèle de référence dit « sauvage » (car c'est le plus fréquemment rencontré) est dénommé UGT1A1\*1. La mutation qui a fait l'objet de plus de travaux car ses conséquences en terme de phénotypes sont significatives, correspond à l'allèle UGT1A1\*28. Il s'agit d'une modification au niveau de la séquence promotrice du gène, et

plus précisément de la « TATA box » qui est une région riche en adénine (A) et thymine (T) retrouvée au niveau du promoteur de nombreux gènes, qui comporte la séquence consensus suivante : TATAA. La « TATA box » sert notamment de site de liaison des facteurs de transcriptions (TFIID, cofacteur de la RNA polymérase II) à l'ADN, liaison nécessaire à l'initialisation de la transcription. La séquence sauvage de la TATA box de l'UGT1A1 est la suivante : (TA)<sub>6</sub> TAA. Il existe des variants avec un nombre différent de répétitions de TA, et notamment l'allèle UGT1A1\*28 qui en possède 7. La présence de ce TA supplémentaire s'accompagne d'une diminution de l'expression de l'enzyme et donc d'une moindre activité cellulaire de glucurono-conjugaison. La proportion d'individus hétérozygotes (diplotype 6/7 pour TA<sub>6</sub>/TA<sub>7</sub>) est de l'ordre de 40 %, celle d'individus homozygotes mutés (diplotype 7/7 pour TA<sub>7</sub>/TA<sub>7</sub>) de 10 %. Les 50 % « restants » correspondent pour la presque totalité au génotype 6/6. Presque, car, en considérant toujours la même région du gène (position – 40/39 par rapport à la première base de l'exon 1), d'autres variants alléliques existent : (TA<sub>8</sub>) qui s'accompagne d'une expression encore plus faible que (TA<sub>7</sub>), et (TA<sub>5</sub>) donnant une expression supérieure à celle de (TA<sub>6</sub>).

La maladie de Crigler-Najjar, également héréditaire mais relativement rare, se caractérise par l'absence d'activité de la glucuronyltransférase pour le type I et une faible activité pour le type II. Pour Ando et al., la fréquence des diarrhées de grade 3 ou 4 et des leucopénies de grade 4 étaient sept fois supérieures chez les porteurs du variant UGT1A1\*28. Pour Marcuello et al. chez 95 Caucasiens atteints de cancer colorectal, l'incidence d'une diarrhée sévère était de 70 % chez les homozygotes, 33 % chez les hétérozygotes et n'était que de 17 % chez les patients non porteurs de la mutation. Ces résultats étaient confirmés par de nombreuses publications. Parmi les autres mutations situées sur le gène UGT1A1, les UGT1A1\*6 ne semblent pas impliquées à la différence de UGT1A1\*27 (686C > A sur l'exon 1) qui a été associée à des troubles sévères chez les trois patients décrits par Ando et al. La glucuronoconjugaison du SN-38 implique non seulement la UGT1A1 mais aussi les UGT1A7 et UGT1A9. Pour l'instant les polymorphismes de ces dernières dont certains limitent la glucuronoconjugaison ne sont pas associés à des effets indésirables. Les très nombreuses études réalisées sur le sujet montrent que la présence du variant UGT1A1\*28 est un facteur évident favorisant la toxicité de l'irinotécan par la survenue d'une diarrhée et/ou d'une neutropénie sévères. L'étude préalable du génotype de la glucuronyltransférase, très simple à réaliser et peu coûteux devrait permettre dans le cadre des protocoles adoptés actuellement de prévoir les effets indésirables en limitant les posologies chez les sujets à risques, tout en permettant la poursuite du traitement.

### II.2.3.6 Transport de l'irinotécan

À côté des variations génétiques touchant le métabolisme, d'autres modifient le transport des médicaments et entraînent des variations de leurs concentrations plasmatique et tissulaire. Ainsi, pour l'irinotécan et ses métabolites, le gène MDR1 (ou ABCB1), localisé en 7q21, appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et code une protéine de 190 kD, la P-glycoprotéine (P-gp) notamment exprimée au niveau de l'intestin. L'augmentation de l'expression de ce gène et par conséquent l'augmentation de la production de cette P-glycoprotéine est associée à une résistance à des thérapies anticancéreuses (doxorubicine, vincristine, étoposide) mais aussi à certains antirétroviraux (inhibiteurs des protéases) et à la digoxine. Cette protéine membranaire expulse du cytoplasme des substrats endogènes et médicamenteux, provoquant des échecs de la thérapie et constitue de ce fait une véritable barrière à l'absorption de nombreux médicaments au niveau intestinal.

La régulation de l'expression et les mécanismes d'induction de la P-glycoprotéine produite après exposition aux cytotoxiques ne sont pas encore expliqués, mais il est proposé d'associer, dans ces cas, des inhibiteurs de cette protéine afin de rendre aux thérapies toute leur efficacité. Parmi les polymorphismes, le variant très fréquent 3435C > T sur l'exon 26 se caractérise par une expression environ quatre fois plus faible de cette protéine que la normale et les patients devraient être moins touchés par les résistances. Les populations caucasiennes et asiatiques ont une fréquence plus forte de l'allèle muté 3435C > T (40-60 %) par rapport aux populations africaines (15-25 %). Les polymorphismes 2677G > T (Ala893Ser) sur l'exon 21 et 1236C > T sur l'exon 12 sont également fréquents. Des variations de la clairance ont été décrites selon les génotypes. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, les conséquences sur le traitement ne sont pas majeures. Il en va de même avec les autres protéines de transport de l'irinotécan, ABCC1 et ABCC2, ABCG2.

Grâce à la multiplication des études de pharmacogénétique et au développement de techniques de biologie moléculaire plus rapides, des tests de détermination du polymorphisme génétique permettent de prévoir certaines réponses thérapeutiques ou de mieux appréhender les risques d'accidents médicamenteux. Ces analyses doivent se développer rapidement, notamment pour les médicaments destinés au traitement des cancers colorectaux, connus pour présenter des effets indésirables potentiellement gravissimes et au pronostic souvent péjoratif. Parmi les nombreuses mutations qui touchent les enzymes des différents cytotoxiques, seules certaines méritent d'être étudiées du fait de l'importance de leur. Les cliniciens prescripteurs, les essais cliniques et les protocoles de traitement devraient intégrer rapidement



ces données afin d'adapter les posologies et le choix des molécules. Cette forme de prise en charge doit probablement s'intensifier avec les progrès réalisés dans l'automatisation de la biologie moléculaire et sous l'influence des patients eux-mêmes lorsqu'ils prendront conscience qu'une part imprévisible du traitement peut être scientifiquement limitée. Il faut ajouter que l'avenir des tests pharmacogénétiques visant à prévoir la toxicité potentielle d'un traitement cytotoxique n'est pas compromis par l'arrivée sur le marché des molécules ciblées sur le récepteur EGF ou les anti-VEGF, dans la mesure où l'efficacité de ces thérapies n'est admise qu'en association à la chimiothérapie. Sur le plan des programmes de recherche en cours, la pharmacogénomique peut avoir un impact très important entre les phases II et III des essais cliniques. En effet, en identifiant les marqueurs génétiques corrélés à des paramètres d'efficacité prédéfinis, il sera possible de cibler le recrutement lors de la phase III afin d'inclure les patients les plus susceptibles de répondre au traitement. Cette nouvelle approche génétique de la pharmacologie présente un intérêt évident sur le plan de l'efficacité thérapeutique pour les malades mais aussi dans le cadre de l'économie de la santé.

## **Chapitre III. Pharmacologie et Pharmacogénétique de l'épilepsie**

Une “crise épileptique” est l’expression clinique d’une décharge anormale et excessive des cellules nerveuses du cerveau. Il s’agit d’un trouble momentané de l’activité électrique qui peut être soit local, soit généralisé. Au moment de la crise, le cerveau ne peut plus fonctionner correctement et envoie des messages erronés au corps. Une crise peut rester isolée et ne plus se reproduire. Lorsqu’elle est causée par un facteur passager et médicalement explicable, on parle de crise provoquée. Une “épilepsie” est définie par la survenue répétée de crises épileptiques non provoquées. Le type de la crise dépendra de la région du cerveau qui est touchée la première, du lieu où la perturbation se diffuse et de la vitesse à laquelle elle va se propager. Les crises peuvent être également généralisées d’emblée, c’est à dire que la perturbation touche les deux hémisphères du cerveau (moitié droite et moitié gauche du cerveau) dès le début ou quasi instantanément. Les épilepsies sont actuellement définies en “syndrômes”, c’est à dire un ensemble de caractéristiques tenant compte de l’âge, du type de crises, de la cause, de troubles associés...

### **III.1 Causes et signes de l'épilepsie**

L’épilepsie n’est pas une maladie mentale. Entre les crises, le cerveau fonctionne généralement tout à fait normalement. Les crises d’épilepsie peuvent être causées par une cicatrice au cerveau résultant par exemple d’un accident, d’une infection, d’un manque d’oxygène, de troubles vasculaires. Plus rarement, elles peuvent être dues à une tumeur. Dans d’autres cas, elles peuvent être liées à des changements biochimiques ou hormonaux. Ces différentes causes sont des facteurs externes. Dans bien des cas cependant, on ne peut pas identifier une cause spécifique, la tendance à faire des crises existe parce que le cerveau est très sensible avec un seuil de crise très bas. Ce seuil abaissé est l’expression d’une membrane cellulaire instable liée à la maturation du cerveau ou due à une sensibilité individuelle le plus souvent d’origine génétique. Il s’agit là de facteurs internes. On appelle épilepsie idiopathique le type le plus courant de cette maladie. Elle concerne six personnes atteintes sur dix et n’a pas de causes connues. Lorsqu’on peut en déterminer la cause, on parle d’épilepsie secondaire ou épilepsie symptomatique. Un manque d’oxygène (anoxie) ou un traumatisme à la naissance, un coup sévère à la tête, une attaque cérébrale privant le cerveau d’oxygène, une infection comme la méningite ou une tumeur cérébrale peuvent en être à l’origine.

Les manifestations cliniques des crises sont variables et dépendent de la localisation de la perturbation à l'origine dans le cerveau et de sa propagation. On observe des symptômes passagers, comme une désorientation ou une perte de conscience, et des troubles du mouvement ou des sensations (visuelles, auditives, gustatives), ainsi que de la fonction mentale ou de l'humeur. Les personnes souffrant de crises ont tendance à avoir davantage de problèmes physiques (fractures ou hématomes par exemple), et une fréquence plus élevée d'autres maladies et problèmes psychosociaux. L'épilepsie temporale est la cause la plus fréquente d'épilepsie réfractaire au traitement médical. Elle est associée à de nombreuses perturbations co-morbides comme, par exemple, des troubles mnésiques, des troubles d'apprentissage, un absentéisme accru, la dépression et le suicide. Depuis longtemps déjà l'on a noté que la plupart des patients opérés pour une épilepsie temporale réfractaire avaient subi en bas âge une convulsion fébrile prolongée. Cependant, un lien physiopathologique n'avait jamais pu être établi entre les convulsions fébriles et l'épilepsie tant chez l'humain que dans les modèles animaux. Et ce bien que de nombreuses études rétrospectives aient montré une association nette entre les deux phénomènes.

On estime que, dans la population générale, la proportion de personnes souffrant d'épilepsie évolutive (c'est-à-dire présentant des crises chroniques ou devant être traitées) se situe entre 4 et 10 pour 1000 personnes. Toutefois, certaines études dans les pays en développement conduisent à penser que le chiffre réel se situe entre 6 et 10 pour 1000. À l'échelle mondiale, environ 50 millions de personnes souffrent d'épilepsie. Dans les pays développés, le nombre annuel des nouveaux cas se situe entre 40 et 70 pour 100 000 habitants. Dans les pays en développement, les chiffres sont fréquemment deux fois plus élevés en raison du risque accru de souffrir d'états pathologiques entraînant des lésions cérébrales définitives. On recense près de 90 % des cas d'épilepsie dans les pays en développement.

### **III.2 Traitement de l'épilepsie**

Les antiépileptiques de premières générations sont pour la plupart de « mauvais sujets » en ce qui concerne leurs propriétés pharmacocinétiques : cinétique d'ordre zéro, liaison aux protéines sériques majeure, interférence avec le cytochrome P450 (CYP). De nombreuses interférences d'ordre pharmacocinétique ont été décrites avec d'autres antiépileptiques ou d'autres médicaments. Les anticonvulsivants sont fortement liés à l'albumine et donc sujets aux déplacements de leurs sites de fixation, soit par un autre anticonvulsivant soit par d'autres

molécules. En fait, cela n'est cliniquement important qu'en ce qui concerne surtout la phénytoïne et encore dans des circonstances particulières : association avec le valproate, patients très hypoalbuminémiques (enfants porteurs d'un paludisme grave), insuffisance rénale associée. La plupart des interactions d'ordre pharmacocinétique sont liées à des interactions au niveau du métabolisme (CYP). En effet, la plupart des anticonvulsivants sont lentement métabolisés par ce cytochrome et des interactions importantes peuvent être observées, conduisant le plus souvent à une baisse de concentration par induction enzymatique.

À l'heure actuelle, on dispose d'une vingtaine d'antiépileptiques dans le traitement de l'épilepsie. Néanmoins, 1/3 des patients épileptiques développent une épilepsie réfractaire, avec des crises persistantes malgré l'essai de traitements différents et souvent multiples. Parmi les 2/3 des patients répondant aux antiépileptiques, seuls 50 % répondent au premier antiépileptique et environ 15 % au deuxième. Actuellement, il est impossible de prédire de façon précise quels patients répondront à un antiépileptique particulier ou aux antiépileptiques en général. De même, la dose optimale pour une molécule donnée est très variable d'un patient à l'autre, et il est difficile de la prédire sur les seuls critères cliniques. Même si les crises sont bien contrôlées, de nombreux patients souffrent d'effets secondaires qui peuvent être graves et parfois fatals. De façon générale, les effets secondaires liés au traitement par antiépileptiques représentent une indication importante d'hospitalisation. L'identification de facteurs génétiques qui influencent la réponse à ces médicaments permettrait donc de prédire la réponse individuelle à un stade précoce du traitement. Ceci permettrait un meilleur contrôle des crises, une diminution des effets secondaires et, donc, une meilleure qualité de vie pour les patients épileptiques. De plus, une meilleure compréhension de l'architecture génétique de la réponse aux antiépileptiques pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux mécanismes d'action, et donc stimuler le développement d'antiépileptiques innovants et plus efficaces.

### **III.2.1 Phénytoïne**

La phénytoïne est un des anticonvulsivants de référence malgré de nombreuses propriétés défavorables : absence d'hydrosolubilité, cinétique non-linéaire, interférences médicamenteuses nombreuses et potentiellement graves, délai d'action important. La fosphénytoïne palie le premier défaut. C'est une forme hydrosoluble qui se transforme en phénytoïne avec une demi-vie de sept à 15 minutes, demi-vie qu'il faut additionner au délai

d'action de la phénytoïne ainsi formée. La phénytoïne agit principalement en inhibant l'ouverture des canaux sodiques neuronaux dépendant du voltage. La phénytoïne est un acide faible, majoritairement ionisé au pH de l'organisme. Elle est fortement liée aux protéines sériques (albumine et dans une moindre mesure alpha-1 glycoprotéine acide) avec une liaison dépendante de la concentration. La liaison à l'albumine fait intervenir les sites spécifiques suivants : site de la warfarine, des benzodiazépines, du tamoxifène et de la digoxine. Lorsque la concentration augmente, il y a saturation des sites de fixation ce qui conduit rapidement à une concentration libre (concentration active) potentiellement toxique. Il en va de même en cas d'hypoalbuminémie.

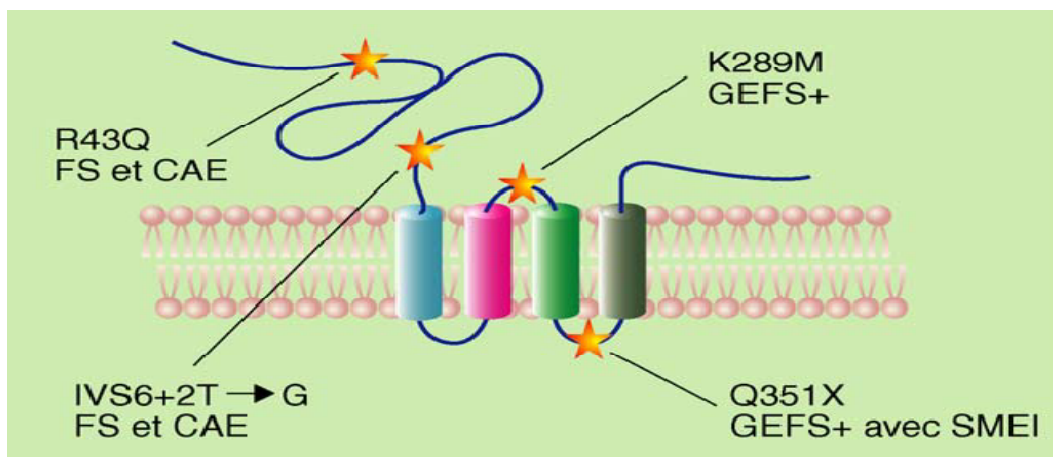
La phénytoïne passe assez rapidement la BHE avec un temps moyen de passage jusqu'au récepteur de moins de dix à 15 minutes. La fosphénytoïne est elle-même liée à plus de 97 % aux protéines sériques et en particulier à l'albumine avec une fois encore une liaison non-linéaire et donc une augmentation très importante de la concentration libre en cas d'hypoalbuminémie. Le rapport de concentration entre liquide céphalorachidien (LCR) et sang à l'équilibre est d'environ 0,2. La phénytoïne est par ailleurs transportée hors du système nerveux par la P-glycoprotéine au niveau de la BHE chez les patients porteurs du gène MDR1. Le métabolisme de la phénytoïne est hépatique et passe par les CYP2C19 et CYP2C9. Ce métabolisme est saturable, ce qui explique la cinétique non-linéaire de type Michaelis-Menten. Par ailleurs, la phénytoïne est inducteur du CYP2B6 et des CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7.

### **III.3 Pharmacogénétique du devenir des antiépileptiques**

L'épilepsie se prête particulièrement bien à l'étude pharmacogénétique : (1) elle représente la plus fréquente des maladies neurologiques chroniques graves, avec une prévalence entre 3 et 16/1000 et une incidence de 50/100 000 par an; (2) il existe une grande variabilité inter-individuelle dans la réponse aux antiépileptiques ; (3) l'efficacité du traitement est quantifiable (fréquence des crises épileptiques) ; et (4) on dispose d'échelles validées pour la classification des crises épileptiques et des effets secondaires. Cependant, ce n'est que depuis quelques années que des études systématisées en pharmacogénétique de l'épilepsie ont été débutées, et ce n'est que récemment que la première association génétique validée avec des implications cliniques directes a été identifiée. D'un point de vue clinique, les phénotypes les plus intéressants à étudier sont l'efficacité des antiépileptiques, l'épilepsie

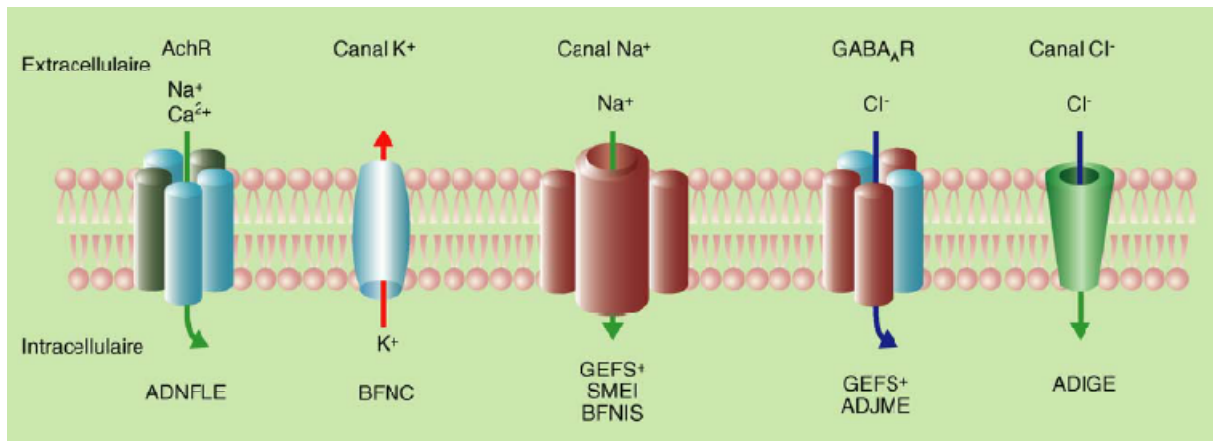
réfractaire, les effets secondaires aux antiépileptiques, et la dose optimale des antiépileptiques.

La pharmacogénétique est susceptible d'influencer la tolérance individuelle, mais probablement aussi la réponse thérapeutique, d'un sujet donné. Ceci est illustré en épileptologie par les channelopathies héréditaires. Depuis la première description d'une épilepsie idiopathique à hérédité monogénique, d'autres épilepsies monogéniques, focales et généralisées, ont été décrites chez l'homme. Les gènes décrits codent dans leur grande majorité pour des canaux ioniques voltage- ou ligand dépendants dont certains sont des cibles connues de certains AE. Les canaux sodiques, potassiques et chlores sont des canaux voltage-dépendants, les récepteurs acide gamma-aminobutyrique (GABA) A et les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont des canaux ioniques ligand-dépendants. Les canaux calciques pourraient également être impliqués : le rôle de deux mutations différentes du canal calcique est discuté dans une famille allemande comportant un patient présentant une épilepsie myoclonique juvénile, dans une famille franco-canadienne comportant une personne atteinte d'ataxie épisodique, et chez un garçon présentant une épilepsie-absences avec ataxie et troubles cognitifs modérés. Un même syndrome clinique, comme par exemple l'épilepsie frontale nocturne autosomale dominante (ADNFLE) ou les crises néonatales familiales bénignes (BFNS), peut être associé à des mutations dans des gènes différents.



**Figure 20 :** Mutations de la sous-unité c2 du récepteur GABA A. Les positions des mutations sont indiquées par une étoile rouge. Le phénotype correspondant est indiqué en dessous des mutations. FS : crises fébriles ; GEFS+ : épilepsies généralisées avec convulsions fébriles + ; CAE : épilepsie-absences de l'enfance ; SMEI : épilepsie myoclonique sévère du nourrisson (syndrome de Dravet).

Une mutation du gène *LGII* a été retrouvée à la fois chez certains patients avec une épilepsie partielle idiopathique et chez de rares patients avec une épilepsie généralisée idiopathique. L'exemple le plus frappant est cependant celui des « épilepsies généralisées avec convulsions fébriles + », ou « GEFS+ ». Dans cette pathologie familiale transmise sur un mode autosomique dominant, une mutation peut engendrer au sein d'une même famille une grande variabilité des tableaux cliniques. En effet, peuvent coexister dans la même famille des individus ayant fait des convulsions fébriles « classiques » (disparaissant avant l'âge de 6 ans), d'autres avec des convulsions fébriles dites « + » (persistant au-delà de l'âge de 6 ans). Par ailleurs, chez des individus ayant ou non des antécédents de convulsions fébriles connus, sont observées des crises afébriles, généralisées de types variés ou partielles, pouvant se combiner variablement chez le même individu. Ainsi, des tableaux électrocliniques plus ou moins typiques d'épilepsie généralisée idiopathique, d'épilepsie myoclonostatique, d'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson et d'épilepsie partielle sont observés dans ces familles.



**Figure 21** : Canaux ioniques voltage- ou ligand-dépendants impliqués dans des épilepsies à hérédité monogénique. Les sous-unités dans lesquelles ont été identifiées des mutations sont indiquées. Les phénotypes correspondants sont mentionnés. ADIGE : épilepsie généralisée idiopathique autosomale dominante ; ADJME : épilepsie myoclonique juvénile autosomale dominante ; ADNFLÉ : épilepsie frontale nocturne autosomale dominante ; BFNC : crises néonatales familiales bénignes ; BFNIS : crises néonatales-infantiles familiales bénignes ; GEFS+ : épilepsies généralisées avec convulsions fébriles + ; SMEI : épilepsie myoclonique sévère du nourrisson (syndrome de Dravet).

### III.3.1 Absorption et distribution des antiépileptiques

En cancérologie, les transporteurs multidrogues (MDT\*), dont la P-glycoprotéine (PGP\*), sont connus comme facteurs de la pharmacorésistance. La PGP est codée chez l'homme par le gène *multidrug resistance gene 1* (MDR1), appelé dans la nouvelle nomenclature gène ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1). La protéine transporteuse PGP fonctionne comme une pompe d'extrusion (*efflux pump*) de molécules qui ont pénétré dans les cellules. Dans la barrière hématoencéphalique (BHE), la PGP semble limiter la pénétration dans le liquide céphalorachidien (LCR) de différents AE comme la carbamazépine, la phénytoïne, le phénobarbital, la lamotrigine, le felbamate. La PGP est localisée dans différents tissus : outre l'intestin où sa répartition est hétérogène, dans la BHE, le tubule rénal et le placenta. L'expression de la PGP peut être induite ou inhibée par des médicaments dont certains sont aussi inhibiteurs ou inducteurs de l'isoenzyme CYP3A4. Par ailleurs, son expression semble subir des variations d'ordre génétique : Hoffmeyer et al. ont effectué le séquençage du gène MDR-1 chez des volontaires sains (sujets caucasiens blancs) chez lesquels l'expression et la fonction de la PGP ont été déterminées dans le duodénum. Il a été retrouvé une corrélation significative entre un polymorphisme sur l'exon 26 (C3435T) du MDR-1 et le niveau d'expression de la protéine. Les individus homozygotes pour ce polymorphisme avaient une expression significativement plus basse du MDR-1 dans le duodénum et après administration de la digoxine une concentration plasmatique plus élevée que les autres sujets de l'étude. Le niveau d'expression de la PGP dans le duodénum et les taux plasmatiques de digoxine administrée par voie orale étaient donc inversement corrélés. Cette observation pose la question si l'absorption et la concentration plasmatique de bien d'autres molécules, dont les AE, peuvent dépendre du niveau d'expression et d'activité de la PGP. L'homozygotie pour ce polymorphisme est fréquente : 24 % dans la population étudiée. On ignore actuellement si l'absorption et la concentration plasmatique des AE peuvent dépendre de la même façon du niveau d'expression et d'activité de la PGP.

### III.3.2 Interaction avec les récepteurs

Des modifications génétiques des récepteurs peuvent avoir des conséquences sur l'effet thérapeutique et la tolérance d'un médicament, comme le montrent les deux exemples suivants. La substitution de la sérine par la glycine en rapport avec un polymorphisme du gène codant pour le récepteur D3 de la dopamine prédispose aux dyskinésies tardives postneuroleptiques. Des rats de la souche WAG/Rij présentent des crises non-convulsives



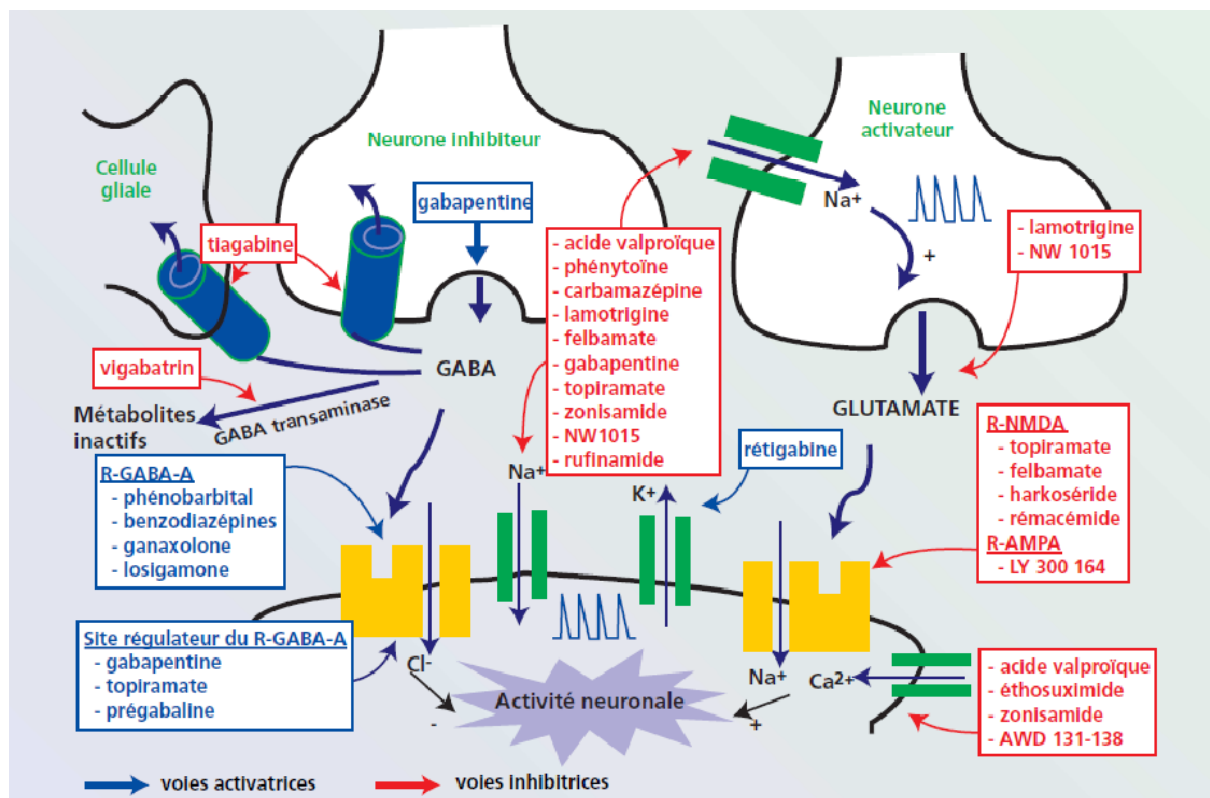
ressemblant aux absences chez l'homme. Dans cette souche de rats, une forte densité des récepteurs  $\mu$ -opioïdes (OPRM) dans des régions impliquées dans la génération des décharges de pointes-ondes a été démontrée. Le récepteur OPRM exerce une modulation de courants calciques neuronaux. Le gène humain du OPRM est cloné et localisé sur 6q24-q25. Plusieurs variantes du gène sont connues, la plus fréquente est le SNP en position 118 A > G (A118G) conduisant à la substitution de l'asparagine par l'acide aspartatique (Asn40Asp). Ce polymorphisme semble avoir des conséquences fonctionnelles puisque la variante Asp40 est caractérisée par une affinité très supérieure de la b-endorphine par rapport à la variante Asn40 et par une activation plus intense par des agonistes de canaux potassiques couplés aux protéines G. Dans une étude cas-témoins portant sur 72 patients caucasiens présentant une épilepsie absences, l'allèle Asp40 était significativement plus fréquent dans le groupe des individus avec épilepsie que dans le groupe témoins sains. Ces données suggèrent que le polymorphisme Asp40 du récepteur OPRM est facteur de susceptibilité d'épilepsie-absences en modifiant une excitabilité neuronale accrue dans le thalamus. Il sera intéressant de vérifier si la réponse thérapeutique en cas d'épilepsie-absences est modifiée en fonction de la présence ou l'absence du polymorphisme A118G.

### **III.3.3 Mécanismes d'action des antiépileptiques**

Les mécanismes d'action des antiépileptiques ont été le plus souvent découverts après leur sélection, en raison de propriétés anti-convulsivantes, parmi plusieurs milliers de molécules. Dans certains cas, en particulier celui du vigabatrin, la découverte du nouvel antiépileptique a été la conséquence d'une analyse de la relation structure/activité fondée sur un mécanisme d'action prédéterminé. Le mécanisme d'action des antiépileptiques est soutenu par la physiopathologie de la maladie épileptique, qui résulte d'une hyperexcitabilité neuronale conduisant à des décharges anormales de potentiel d'action, responsables de la survenue des crises convulsives (figure 22). Cette hyperexcitabilité neuronale résulte d'un déséquilibre entre la diminution de l'activité du système inhibiteur GABA-ergique et l'activation de la transmission excitatrice glutamatergique, liée à l'activation excessive des canaux sodiques voltage-dépendants des neurones glutamatergiques. L'effet pharmacologique des antiépileptiques, toutes générations confondues, résulte soit d'un renforcement du système inhibiteur GABA-ergique, par action sur différentes cibles permettant d'activer ce système, soit d'une inhibition du système excitateur, en particulier par le blocage des canaux sodiques voltage-dépendants. Certains antiépileptiques de la troisième génération répondent à ces deux

types de mécanismes d'action. Différentes cibles pharmacologiques peuvent être utilisées pour induire un renforcement du système GABA-ergique. Le vigabatrin ou gamma-vinyl-GABA, un analogue du GABA, joue le rôle de faux substrat pour la GABA-transaminase, la principale enzyme de catabolisme du GABA, qu'il inhibe ainsi de manière sélective et irréversible, provoquant une augmentation parallèle des taux cérébraux de GABA, démontrée expérimentalement.

La gabapentine, en dépit de sa structure moléculaire proche du GABA, ne semble pas agir directement sur le récepteur GABA. Elle renforcerait l'action GABA-ergique par son action sur un site cérébral spécifique, qui reste toutefois à déterminer. Une augmentation de la libération du GABA ainsi qu'une inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants ont également été suggérées pour expliquer l'action anticonvulsivante de la gabapentine. La tiagabine renforce la voie GABA-ergique en inhibant de manière spécifique la recapture neuronale et gliale du GABA, avec pour conséquence un accroissement des concentrations et du temps de présence synaptiques du GABA, provoquant une augmentation de son effet post-synaptique.



**Figure 22 :** Cibles d'action moléculaires des différentes générations d'antiépileptiques sur la voie inhibitrice GABA-ergique et la voie activatrice glutamatergique.

### III.3.4 Métabolisme des médicaments antiépileptiques

Le métabolisme des médicaments comprend d'une part des réactions dites de phase I (oxydation, réduction, hydrolyse) et, d'autre part, des réactions dites de phase II, réactions de conjugaison qui aboutissent à la liaison d'une molécule endogène (acide glycuronique, acide aminé tel que le glycofolle, glutathion, radicaux acétyl- ou méthyl-, etc.) au xénobiotique ou à ses métabolites issus des réactions de phase I. La phase I précède souvent, mais pas toujours, la phase II dans la transformation d'une molécule. Les principales réactions de phase I du métabolisme des médicaments dépendent essentiellement des CYP. Elles transforment les médicaments, les toxiques et certains produits endogènes. Les CYP sont présents dans la quasi-totalité des tissus mais sont présents de manière plus importante dans le foie. Les cytochromes sont divisés en familles (1, 2, 3, 4 ...), en sous-familles (A, B, C ...) et sous-sous familles (1, 2, 3 ...) en fonction du degré d'homologie dans la séquence des acides aminés de ces protéines. Ces enzymes ont une plus ou moins grande spécificité pour les substrats qu'elles transforment. La plupart des réactions catalysées par des cytochromes donnent naissance à des métabolites inactifs, d'autres peuvent donner naissance à des métabolites toxiques qui doivent être transformés pour éviter des lésions tissulaires. Dans d'autres cas enfin, la réaction donne naissance à une molécule active à partir de la molécule-mère inactive : il s'agit de l'activation des prodrogues. L'activité métabolique des cytochromes est très variable. Cette variabilité s'observe au cours de la maturation chez l'enfant : activité basse chez le nouveau-né par immaturité et augmentation de l'activité en fonction de l'âge, mais aussi en raison des phénomènes d'induction, d'auto-induction, d'inhibition et de déterminisme génétique. Les mutations génétiques sont à l'origine de la synthèse d'enzymes en moindre quantité, ou moins efficaces, qui font des patients des métaboliseurs lents, sujets à une accumulation de la molécule-mère. La phénytoïne est principalement métabolisée par le cytochrome P450 CYP2C9, qui présente un polymorphisme génétique. Récemment, deux allèles de ce cytochrome ont été identifiés : CYP2C9\*2 (Arg 144Cys) et CYP2C9\*3 (Ile 359 Leu). [Les numéros croissants précédés d'une étoile, au-delà de 1, indiquent chacun un polymorphisme différent dont le numéro augmente dans l'ordre chronologique de sa découverte ; on n'indique rien pour le type sauvage \*1, car cela signifie qu'il n'y a aucune des mutations décrites (donc nécessairement \*1/\*1). On peut indiquer entre parenthèses la base mutée (C = cytosine, A = adénine, T = thymine ; exemple pour A remplacée par C : A> C pour \*3/\* (C/C) et \*3/\* (C/A)].

Des signes d'intoxication par des doses moyennes de phénytoïne sont principalement à craindre chez les patients homozygotes\* ou hétérozygotes\* porteurs d'un allèle variant CYP2C9\*3 ou \*2.27-31 L'hydroxylation du phénobarbital coségrège avec le polymorphisme du CYP2C19. Cependant, la pharmacocinétique du phénobarbital ne diffère pas significativement entre les métaboliseurs lents et les métaboliseurs rapides de la phénytoïne. Le polymorphisme du CYP2C19 ne semble pas avoir de conséquence importante sur le maniement du phénobarbital. Ho et al.<sup>32</sup> indiquent le rôle de polymorphismes du CYP2C9 dans la biotransformation de l'acide valproïque en son métabolite hépatotoxique 4-ene- VPA et ses métabolites inactifs 4-OH-VPA et 5-OHVPA. Les génotypes hétéro- et homozygotes de 2C (\*) 2 et 2C (\*) 3 réduisent de 28 à 73 % la formation des trois métabolites. Les polymorphismes du CYP2C9 sont ainsi susceptibles d'avoir un impact significatif sur la biotransformation du valproate. Les répercussions sur l'hépatotoxicité et la tératogénicité de cette molécule ne sont pour l'instant pas précisées. Contrairement à la plupart des autres AE dont le métabolisme est dépendant des CYP, la lamotrigine est principalement éliminée par une réaction de phase II du métabolisme, la glycuconjugaison, dépendante de l'uridyl glycuronyl transférase (UGT 1A4). Des allèles variants ont été décrits, mais il n'a pas été mis en évidence de polymorphisme génétique cliniquement pertinent de l'UGT1A4 en rapport avec des modifications du métabolisme et/ou de l'élimination de la lamotrigine.

### **III.4 Barrière hémato-encéphalique**

La BHE, située dans les cellules endothéliales des capillaires encéphaliques, agit d'une façon passive comme une membrane phospholipidique, s'opposant à la pénétration de molécules hydrophiles, polaires, de grande taille ou liées à des protéines, alors que des substances lipophiles, non polaires (non ionisées) passent facilement la BHE par diffusion passive. Du côté opposé à la lumière vasculaire, les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale avec laquelle entrent en contact des prolongements des cellules gliales. Pour pénétrer dans le LCR, un médicament doit traverser la barrière hémato-LCR (BHL) par les plexus choroïdes, où les cellules endothéliales sont fenêtrées et dépourvues de jonctions serrées (*tight junctions*). Dans les plexus choroïdes, ce sont les cellules épithéliales disposées à la surface des cellules endothéliales et le plus souvent jointes par des jonctions serrées qui exercent le rôle de barrière vis-à-vis des molécules hydrosolubles. Classiquement, la BHE a été considérée comme une barrière passive, mais récemment ont été mis en évidence des mécanismes de transport actif favorisant dans le cerveau l'entrée et la sortie de molécules. La

PGP-170, une glycoprotéine transmembranaire ATP-dépendante, décrite en 1976 comme un facteur de chimiorésistance dans une grande variété de cancers et exprimée dans plusieurs tissus excréteurs comme le foie, les reins et l'intestin, est codée chez l'homme par le gène MDR1. La PGP se comporte comme une pompe active orientée vers l'extérieur de la cellule, ayant pour substrats une grande variété de substances hydrophobes. Sa fonction physiologique pourrait être la protection contre les xénobiotiques de l'environnement. En effet, des souris ayant une délétion MDR1a n'ont pas d'anomalie physiologique apparente. Mais, lorsqu'elles sont exposées à des substances lipophiles, on observe une augmentation considérable de la concentration cérébrale de ces substances, entraînant des signes de neurotoxicité.

La famille des protéines MRP (*multidrug resistance associated protein*) est de découverte plus récente (MRP 1 découverte en 1992 dans des cellules cancéreuses) et compte actuellement sept membres (MRP 1 à 7). Tout comme la PGP, la MRP est retrouvée dans différents tissus normaux, dont la BHE et la BHL. Les substrats des MRP sont des anions organiques mais aussi des molécules organiques neutres. La spécificité de la PGP et de la MRP pour leurs substrats est relative, certaines molécules pouvant être transportées par l'un ou l'autre des transporteurs. Le rôle fonctionnel de la MRP semble également être celui d'une pompe active protectrice : lorsqu'on inhibe expérimentalement des MRP par le probénécide ou le MK-571, on obtient une augmentation de la pénétration encéphalique de certaines substances et la diminution de l'excrétion de certaines molécules par des cellules endothéliales encéphaliques isolées.

La localisation des MDT à l'intérieur des cellules endothéliales est discutée. A priori, ils semblent situés dans l'endothélium du côté de la lumière vasculaire. Ainsi, par leur fonction de pompe, les MDT rejettent leur substrat de la cellule endothéliale dans le flux sanguin. En diminuant la concentration endothéliale de ces molécules, les MDT peuvent favoriser en outre indirectement l'influx de molécules de l'espace encéphalique extracellulaire vers les cellules endothéliales, d'où elles peuvent faire ultérieurement l'objet d'un transport vers le flux sanguin. Le rôle physiologique des MDT qui se dessine ainsi est celui d'un mécanisme de défense actif, limitant dans le cerveau l'accumulation de xénobiotiques lipophiles.

C'est en 1995 que l'on a décrit une surexpression dans l'encéphale du gène MDR1, codant pour la PGP, chez une majorité de patients épileptiques pharmacorésistants ayant bénéficié d'une chirurgie de leur épilepsie. Par la suite, ceci a également été démontré pour la MRP. En étudiant du tissu humain provenant de dysplasies neuronales, une anomalie du développement fréquemment associée à une épilepsie pharmacorésistante, Sisodiya et al. ont

mis en évidence une surexpression de MRP 1 dans des neurones dysplasiques, dans la glie, ainsi que dans des zones périvasculaires. D'autre part, en déterminant l'expression de PGP et de MRP1 dans le tissu épileptogène dans trois causes classiques d'épilepsie pharmacorésistante (dysplasie neuronale, dysembryoplasie neuroépithéliale, sclérose méiotemporale) et en la comparant avec l'expression de la PGP et de la MRP dans du tissu adjacent histologiquement normal, il a été constaté dans les trois types de lésion une surexpression à la fois de la PGP et de la MRP dans des astrocytes activés du tissu épileptogène, ainsi qu'une surexpression de MRP1 dans des neurones d'une dysplasie. Étant donné que la BHE peut être temporairement non fonctionnelle au cours d'une crise d'épilepsie, une surexpression de MDT dans les prolongements gliaux périvasculaires pourrait constituer un mécanisme adaptatif en jouant le rôle d'une « deuxième barrière » pour une durée inconnue.

L'observation de la prédominance de la surexpression astrocytaire de la PGP et de la MRP dans des zones périvasculaires est en accord avec cette idée. Sisodiya et al. ont émis l'hypothèse que la surexpression des MDT pourrait diminuer la concentration extracellulaire des AED à proximité de la zone épileptogène, contribuant ainsi à la pharmacorésistance. La surexpression de MDT semble pouvoir faire partie des caractéristiques constitutives des dysplasies focales, mais en dehors de ce contexte elle paraît induite par des crises focales. Par exemple chez le rat, des crises provoquées par le kaïnate induisent une surexpression transitoire de la PGP dans l'astroglie et les cellules endothéliales dans l'hippocampe. On ignore si on peut rapprocher ce résultat expérimental de l'observation du nombre élevé de crises avant instauration d'un traitement antiépileptique comme facteur prédictif d'épilepsie réfractaire.

Il existe un polymorphisme connu du gène de la PGP en position 3435 (C>T). Le génotype CC du polymorphisme C3435T est associé à une augmentation à la fois de la présence et de l'activité de la protéine PGP. Or, en comparant dans un groupe de 315 patients épileptiques les sujets pharmacorésistants avec les répondeurs, il s'avère que le génotype CC est surreprésenté chez les patients avec épilepsie pharmacorésistante.<sup>38</sup> Cette étude est la première à démontrer un facteur de risque génétique de pharmacorésistance lié aux MDT. Une *up-regulation* de MDT, transportant activement vers le flux sanguin des AE après leur pénétration dans la cellule endothéliale, pourrait être une cause parmi d'autres de pharmacorésistance. Cependant, on ignore actuellement si les MDT correspondent à une conséquence des épilepsies pharmacorésistantes ou à un facteur causal significatif.

### III.3.4 Pharmacogénétique des effets indésirables des antiépileptiques

L'hémato-, l'hépto- et la dermatotoxicité, ainsi que la tératogénicité, comptent parmi les effets indésirables potentiellement graves des AE. Leur prévention par l'analyse génétique serait un progrès majeur. Chez une femme ayant un premier enfant avec un spina bifida, le risque est augmenté en cas de grossesses ultérieures, risque qui peut d'ailleurs être diminué par l'administration préconceptionnelle de folates. Plusieurs facteurs de cette susceptibilité génétique sont discutés. De 5 à 15 % de la population occidentale est homozygote pour la mutation ponctuelle (C677>T), ce qui a pour conséquence un déficit partiel de l'enzyme clé du métabolisme folique, la 5,10- méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). La MTHFR constitue avec la vitamine B12 un cofacteur de méthylation de l'homocystéine en méthionine, acide aminé dont le rôle pour la fermeture du tube neural est connu chez les rongeurs. Les patients présentant un spina bifida sont presque deux fois plus souvent homozygotes pour cette mutation (C677>T) que les sujets témoins. Ce polymorphisme est confirmé comme facteur de risque de spina bifida, surtout s'il est associé à une faible concentration en folates érythrocytaires. Le valproate inhibe la MTHFR, ce qui entraîne une diminution de la méthionine. Par ailleurs, dans une lignée de souris connue pour sa susceptibilité au spina bifida, le valproate diminue l'expression de la *folate binding proteine 1* (FBP-1). Cette FBP-1 joue un rôle critique dans la formation du tube neural. Si le rôle favorisant du polymorphisme de la MTHFR est confirmé, il sera possible de concevoir un test génétique pour détecter les grossesses à risque et d'envisager des mesures préventives.

L'analyse des études cliniques comparant l'efficacité en monothérapie des quatre principaux antiépileptiques de la première et deuxième génération permet d'aboutir à la conclusion que 70 % des patients épileptiques sont bien contrôlés, le critère d'évaluation étant l'absence de crise pendant au moins un an. Le corollaire de ces études est que 30 % des patients épileptiques peuvent être considérés comme partiellement ou totalement résistants, la pharmaco-résistance se définissant comme la persistance de crises malgré la prescription, bien conduite et bien observée, d'un traitement antiépileptique. Si cette proportion de patients épileptiques pharmaco-résistants justifie, à elle seule, le développement de nouveaux agents pharmacologiques, d'autres raisons peuvent également être avancées.

## Références

- Amin AR** (2002) - Effets possibles de la pharmacogénomique sur le développement des médicaments et sur la pratique rhumatologique. *Rhum.* (69), p: 1-3.
- Bamba S**, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, and Andoh A (2011) - Immunomodulators and Immuno-suppressants for Japanese Patients with Ulcerative Colitis. *ISRN Gastroenterolog.* p: 1-5.
- Bijlsma JWJ** et Jacobs JWG (2009) - Le méthotrexate est toujours le traitement de référence de la polyarthrite rhumatoïde. *Rhumatisme.* (76), p: 819–822.
- Bordet R** (2002)- Pharmacologie des antiépileptiques : d’une génération à l’autre. *La Lettre du Pharmacologue.* (16), p :35-41.
- Carli P**, Landais C, Aletti M, Cournac JM, Poisnel E, Paris JF (2009)- Traitement actuel de la polyarthrite rhumatoïde. *médecine interne.* (30), p: 1067–1079.
- Carmant L** (2007)- Nouveau modèle animal d’épilepsie temporale. *Medecine/Science.* (23), p: 929-33.
- Charasson V**, Bellott R, Robert J. (2005)- Pharmacogénétique de l’irinotécan : la carboxylestérase 2. *Oncologie* (7), p: 55-61.
- Chevalier X**, Flipo R-M, Goupille P, Shaevevbeke T, Sibilica J (2002) - Précis de rhumatologie. *Masson.* Paris. p (755):361.
- Combe B** (2006) - Qu’est-ce que la polyarthrite rhumatoïde? Immuno-Rhumatologie. *Journal de L’AFP (Association Française des Polyarthrites).*
- Combe B** et Flipo RM (2008) - Traitement de la polyarthrite rhumatoïde de l’adulte. *DIU Web Etudes approfondies des polyarthrites et maladies systémiques.* p: 5-9.
- Criswell LA**, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J, Tiwari HK, Edberg JC, Kimberly RP, Moreland LW, Seldin MF, and Bridges SL (2004) - The Influence of Genetic Variation in the HLA–DRB1 and *LTA–TNF* Regions on the Response to Treatment of Early Rheumatoid Arthritis With Methotrexate or Etanercept. *Arthritis & Rheumatism.* (50), p: 2750–2756.
- Depondt C** (2013)- Pharmacogénétique de l’épilepsie Science ou fiction? *médecine/sciences.* (29), p : 189-93
- Foulquier C** (2007) - Genèse des cibles des auto-anticorps anti-protéines citrullinées dans le tissu synovial rhumatoïde : peptidyl-arginine désiminases et fibrine citrullinée. *thèse de doctorat.* Université Paul Sabartier-Toulouse III. p: 8-10.



- Kang CP**, Lee KW, Yoo DH, Kang C and Bae SC (2005) - The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor  $\alpha$  gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. (44), p: 547–552.
- Khan M-F**, Bardi T, Meyer O, Orcel P, Lioté F (2006) - L'actualité rhumatologique. 43<sup>ème</sup> Ed. *Elsevier Masson*. France. (541), p: 414-415.
- Mann M-W** et Pons G (2005)- Pharmacogénétique et traitements antiépileptiques. *EMC-Neurologie*. (2), p : 308–321.
- Marotte H** et Miossec P (2010) - Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux anti-TNF alpha dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rhumatisme*. (77), p: 448–457.
- Martinez A**, Salido M, Bonilla G, Pascual-Salcedo D, Fernandez-Arquero M, de Miguel S, Balsa A, de la Concha EG, and Fernandez-Gutierrez B (2004) - Association of the Major Histocompatibility Complex With Response to Infliximab Therapy in Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis & Rheumatism*. (50), p: 1077–1082.
- Morel J**, Miossec P, Combe B (2004) - Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC-Rhumatologie Orthopédie*. (1), p: 218–230.
- Morere J-F** et Mitry E (2010)- Les cancers digestifs des sujets âgés. Springer, 2010, p : 26.
- Ngo S**, Sauvetre G, Vittecoq O, Lévesque H, Marie I (2010) - Aplasie médullaire induite par l'azathioprine : intérêt de la recherche systématique d'une mutation du gène de la thiopurine S-méthyltransférase. *Medecine interne*. (32), p: 373-376.
- Navarro V**, Mazoit J-X (2009)- Pharmacologie des agents utilisés dans l'état de mal épileptique. *Réanimation*. (18),p : 60-69.
- Perdriger A**, Rihouey D, Verdier MC (2010) - Pharmacogénomique et traitement de la polyarthrite rhumatoïde. *Rhumatisme Monographies*. (77), p: 341–345.
- Poppe D**, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S, Strand D, Tanaka S, Galle PR, Bustelo XR, and Neurath MF (2006) - Azathioprine Suppresses Ezrin-Radixin-Moesin-Dependent T Cell-APC Conjugation through Inhibition of Vav Guanosine Exchange Activity on Rac Proteins. *J Immunol*. (176), p: 640-651.
- Puisset F**, Chatelut E. UDP-glucuronosyl-transférase 1A1 et pharmacogénétique de l'irinotécan. *Oncologie* (2005) 7: 49-54.
- Ranganathan P**, Culverhouse R, Marsh S, Ahluwalia R, Shannon WD, Eisen S and McLeod HL (2004) - Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subject and patient with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. (5), p: 559-569.

- Ranganathan P** and McLeod HL (2006) - Methotrexate Pharmacogenetics .The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism*. (54), p: 1366-1377.
- Reutenauer S**, Chauveau D, Récher C (2009) - Surdosage au méthotrexate : complications, prise, en charge et prévention. *Réanimation*. (18), p: 654-658.
- Robert J** (2004) - Pharmacogénétique et pharmacogénomique des cancers. *Pathologie Biologie*. (52), p: 332-337.
- Serraj K**, Federici L, Maloisel F, Alt M, Andrès E (2007) - Pancytopénie sous méthotrexate à faibles doses : étude de cinq observations et revue de la littérature. *médecine interne*. (28), p: 584-588.
- Tardif JC** (2009) - Génétique; la genèse de futur. Pharmacogénomique. *Le spécialiste*. (11), p: 32-33.
- Taniguchi A** and Kamatani N (2004) - Pharmacogenetic approaches to rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal*. (4), p: 350-353.
- Thervet E**, Anglicheau D, Beaune P et Legendre C (2004) – Pharmacogénétique des immunosuppresseurs. Flammarion Médecine-Sciences-Actualités Néphrologiques. p:271-282.
- Wolf A**, Burnat P, Garcia-Hejel C, Ceppa F (2009) - Étude pharmacologique et pharmacogénétique de deux immunomodulateurs : l’azathioprine et 6-mercaptopurine. Stratégies de prévention des complications. *Gastroentérologie clinique et biologique*. (33), p: 176-187.



Le polycopié intitulé (Pharmacogénomique), dresse un résumé objectif que possible de la pharmacologie et la pharmacogénétique de la polyarthrite rhumatoïde, le cancer colorectal et de l'épilepsie. Il est composé de trois chapitres très importantes dans l'évaluation et l'étude des effets thérapeutiques des anti-inflammatoires (Methotrexate, Azathioprine et les anti-TNF), des anticancéreux (5-Fluorouracil, Oxaliplatine et l'irinotecan) et des antiépileptiques (Phénytoïne, Digoxine, Phénylbarbitol). Il est principalement destiné aux étudiants en Master 2 Pharmaco-toxicologie et Génétique appliquée pour faciliter la compréhension des interactions gène-médicament issus des différents polymorphismes génétiques responsables de l'échec thérapeutique et l'appariation des effets secondaires néfastes.