HAL
open science

# Place actuelle des examens de pharmacogénétique et analyse du génotype CYP2C19 chez des patients traités par voriconazole au CHU de Rouen

Germain Tinnière

## To cite this version:

Germain Tinnière. Place actuelle des examens de pharmacogénétique et analyse du génotype CYP2C19 chez des patients traités par voriconazole au CHU de Rouen. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01108997

**HAL Id: dumas-01108997**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01108997v1**

Submitted on 23 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE ROUEN**

**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année : 2014 N°[ ]

**THESE**

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

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2014

par

**TINNIERE Germain**

*Né le 21 août 1986 à Verneuil sur Avre*

# Place actuelle des examens de pharmacogénétique et analyse du génotype CYP2C19 chez des patients traités par voriconazole au CHU de Rouen

Thèse dirigée par le Docteur Fabien LAMOUREUX

Président du jury : Professeur Jean COSTENTIN*, Professeur émérite*

Membres du jury : Docteur Jérémy BELLIEN*, MCU-PH*

Directeur de thèse : Docteur Fabien LAMOUREUX, *PH*

Co-directeur de thèse : Docteur Gilles GARGALA, *MCU-PH*

## Remerciements

Je remercie chaleureusement, le Dr Fabien LAMOUREUX, directeur de cette thèse, pour ses nombreux conseils avisés et sa pédagogie. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension.

Je tiens à remercier le Professeur Jean COSTENTIN d'avoir accepté d'être président du jury. Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Tous les membres du laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie du CHU de Rouen, j'ai beaucoup appris auprès de vous tous. Merci pour vos sourires et votre soutient.

A toutes les personnes qui ont relu cette thèse, notamment mon ami Thomas DUFLOT, nos multiples discussions et ton expérience dans le domaine de la pharmacogénétique m'ont beaucoup apporté.

*Enfin,*

A ma famille, source de motivation inépuisable. Merci à toi mon Tili, petit frère mais grand conseiller ; merci à toi mon bébé, petite sœur mais d'une maturité exemplaire, et à toi maman pour ton soutien inconditionnel.

Mon ami de grande enfance Séb, pour ton soutien en toute situation, Bordeaux – Pérou, une amitié sans frontière. Pense à embrasser la petite pour moi.

A Daniela, mi peruanita pour égayer mes derniers jours de rédaction. Prends soin de toi, j'arrive…

A tous les copains de Normandie (pour ne pas les citer Marianne, Gadou) ; de Bordeaux et d'ailleurs pour avoir parsemé ce parcours de rigolade et de moments mémorables.

**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »**

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 – 2014**
**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**
**----------**

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

**Professeur Benoit VEBER**

**Professeur Pascal JOLY**

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **M-P. AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO – J. BORDE – P. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – DESHAYES – C. FESSARD – J-P. FILLASTRE - P FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J-M. JOUANY – R. LAUMONIER – P. LAURET – M. LE FUR – J-P. LEMERCIER – J-P. LEMOINE – H. MAGARD – B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – A-M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – D. SAMSON-DOLLFUS – J-C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF- J. TESTART – J-M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L-M. WOLF**

## I – MEDECINE

**PROFESSEURS**

| | | |
|---|---|---|
| Mr Frédéric ANSELME | HCN | Cardiologie |
| Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR | HCN | Chirurgie plastique |
| Mr Bruno BACHY (surnombre) | HCN | Chirurgie pédiatrique |
| Mr Fabrice BAUER | HCN | Cardiologie |
| Mme Soumeya BEKRI | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Jacques BENICHOU | HCN | Biostatistiques et informatique médicale |
| Mr Jean-Paul BESSOU | HCN | Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire |
| Mme Françoise BEURET-BLANQUART | CRMPR | Médecine physique et de réadaptation |
| Mr Guy BONMARCHAND | HCN | Réanimation médicale |
| Mr Olivier BOYER | UFR | Immunologie |
| Mr Jean-François CAILLARD | HCN | Médecine et santé au travail (surnombre) |
| Mr François CARON | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Philippe CHASSAGNE | HB | Médecine interne (gériatrie) |
| Mr Vincent COMPERE | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mr Antoine CUVELIER | HB | Pneumologie |
| Mr Pierre CZERNICHOW | HCH | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Nicolas DACHER | HCN | Radiologie et imagerie médicale |
| Mr Stéfan DARMONI | HCN | Informatique médicale et techniques de communication |
| Mr Pierre DECHELOTTE | HCN | Nutrition |
| Mme Danièle DEHESDIN (surnombre) | HCN | Oto-rhino-laryngologie |
| Mr Jean DOUCET | HB | Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie |

| | | |
|---|---|---|
| Mr Bernard DUBRAY | CB | Radiothérapie |
| Mr Philippe DUCROTTE | HCN | Hépato-gastro-entérologie |
| Mr Frank DUJARDIN | HCN | Chirurgie orthopédique – Traumatologique |
| Mr Fabrice DUPARC | HCN | Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| Mr Bertrand DUREUIL | HCN | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale |
| Mme Hélène ELTCHANINOFF | HCN | Cardiologie |
| Mr Thierry FREBOURG | UFR | Génétique |
| Mr Pierre FREGER | HCN | Anatomie – Neurochirurgie |
| Mr Jean François GEHANNO | HCN | Médecine et santé au travail |
| Mr Emmanuel GERARDIN | HCN | Imagerie médicale |
| Mme Priscille GERARDIN | HCN | Pédopsychiatrie |
| Mr Michel GODIN | HB | Néphrologie |
| M. Guillaume GOURCEROL | HCN | Physiologie |
| Mr Philippe GRISE | HCN | Urologie |
| Mr Didier HANNEQUIN | HCN | Neurologie |
| Mr Fabrice JARDIN | CB | Hématologie |
| Mr Luc-Marie JOLY | HCN | Médecine d'urgence |
| Mr Pascal JOLY | HCN | Dermato – Vénéréologie |
| Mr Jean-Marc KUHN | HB | Endocrinologie et maladies métaboliques |
| Mme Annie LAQUERRIERE | HCN | Anatomie et cytologie pathologiques |
| Mr Vincent LAUDENBACH | HCN | Anesthésie et réanimation chirurgicale |
| Mr Joël LECHEVALLIER | HCN | Chirurgie infantile |
| Mr Hervé LEFEBVRE | HB | Endocrinologie et maladies métaboliques |
| Mr Thierry LEQUERRE | HB | Rhumatologie |
| Mr Eric LEREBOURS | HCN | Nutrition |
| Mme Anne-Marie LEROI | HCN | Physiologie |
| Mr Hervé LEVESQUE | HB | Médecine interne |
| Mme Agnès LIARD-ZMUDA | HCN | Chirurgie Infantile |
| Mr Pierre Yves LITZLER | HCN | Chirurgie cardiaque |
| Mr Bertrand MACE | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique |
| M. David MALTETE | HCN | Neurologie |
| Mr Christophe MARGUET | HCN | Pédiatrie |
| Mme Isabelle MARIE | HB | Médecine interne |
| Mr Jean-Paul MARIE | HCN | Oto-rhino-laryngologie |
| Mr Loïc MARPEAU | HCN | Gynécologie – Obstétrique |
| Mr Stéphane MARRET | HCN | Pédiatrie |
| Mme Véronique MERLE | HCN | Epidémiologie |
| Mr Pierre MICHEL | HCN | Hépato-gastro-entérologie |
| Mr Francis MICHOT | HCN | Chirurgie digestive |
| Mr Bruno MIHOUT (surnombre) | HCN | Neurologie |
| Mr Jean-François MUIR | HB | Pneumologie |
| Mr Marc MURAINE | HCN | Ophtalmologie |
| Mr Philippe MUSETTE | HCN | Dermatologie – Vénéréologie |
| Mr Christophe PEILLON | HCN | Chirurgie générale |

| | | |
|---|---|---|
| Mr Jean-Marc PERON | HCN | Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale |
| Mr Christian PFISTER | HCN | Urologie |
| Mr Jean-Christophe PLANTIER | HCN | Bactériologie – Virologie |
| Mr Didier PLISSONNIER | HCN | Chirurgie vasculaire |
| Mr Bernard PROUST | HCN | Médecine légale |
| Mr François PROUST | HCN | Neurochirurgie |
| Mme Nathalie RIVES | HCN | Biologie du développement et de la reproduction |
| Mr Jean-Christophe RICHARD | HCN | Réanimation médicale - Médecine d'urgence |
| Mr Horace ROMAN | HCN | Gynécologie – Obstétrique |
| Mr Jean-Christophe SABOURIN | HCN | Anatomie – Pathologie |
| Mr Guillaume SAVOYE | HCN | Hépato-gastrologie |
| Mme Céline SAVOYE–COLLET | HCN | Imagerie médicale |
| Mme. Pascale SCHNEIDER | HCN | Pédiatrie |
| Mr Michel SCOTTE | HCN | Chirurgie digestive |
| Mme Fabienne TAMION | HCN | Thérapeutique |
| Mme Florence THIBAUT | HCN | Psychiatrie d'adultes |
| Mr Luc THIBERVILLE | HCN | Pneumologie |
| Mr Christian THUILLEZ | HB | Pharmacologie |
| Mr Hervé TILLY | CB | Hématologie et transfusion |
| Mr François TRON (surnombre) | UFR | Immunologie |
| Mr Jean-Jacques TUECH | HCN | Chirurgie digestive |
| Mr Jean-Pierre VANNIER | HCN | Pédiatrie génétique |
| Mr Benoît VEBER | HCN | Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale |
| Mr Pierre VERA | CB | Biophysique et traitement de l'image |
| Mr Eric VERIN | CRMPR | Médecine physique et de réadaptation |
| Mr Eric VERSPYCK | HCN | Gynécologie obstétrique |
| Mr Olivier VITTECOQ | HB | Rhumatologie |
| Mr Jacques WEBER | HCN | Physiologie |

**MAITRES DE CONFERENCES**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG | HCN | Bactériologie – Virologie |
| Mr Jeremy BELLIEN | HCN | Pharmacologie |
| Mme Carole BRASSE LAGNEL | HCN | Biochimie |
| Mr Gérard BUCHONNET | HCN | Hématologie |
| Mme Mireille CASTANET | HCN | Pédiatrie |
| Mme Nathalie CHASTAN | HCN | Physiologie |
| Mme Sophie CLAEYSSENS | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Moïse COEFFIER | HCN | Nutrition |
| Mr Stéphanie DERREY | HCN | Neurochirurgie |
| Mr Eric DURAND | HCN | Cardiologie |
| Mr Manuel ETIENNE | HCN | Maladies infectieuses et tropicales |
| Mr Serge JACQUOT | UFR | Immunologie |
| Mr Joël LADNER | HCN | Epidémiologie, économie de la santé |
| Mr Jean-Baptiste LATOUCHE | UFR | Biologie cellulaire |

| | | |
|---|---|---|
| Mr Thomas MOUREZ | HCN | Bactériologie |
| Mr Jean-François MENARD | HCN | Biophysique |
| Mme Muriel QUILLARD | HCN | Biochimie et biologie moléculaire |
| Mr Vincent RICHARD | UFR | Pharmacologie |
| Mr Francis ROUSSEL | HCN | Histologie, embryologie, cytogénétique |
| Mme Pascale SAUGIER-VEBER | HCN | Génétique |
| Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN | HCN | Anatomie |
| M. Pierre-Hugues VIVIER | HCN | Imagerie Médicale |

**PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Dominique LANIEZ | UFR | Anglais |
| Mme Cristina BADULESCU | UFR | Communication |

## II - PHARMACIE

**PROFESSEURS**

| | |
|---|---|
| Mr Thierry BESSON | Chimie Thérapeutique |
| Mr Jean-Jacques BONNET | Pharmacologie |
| Mr Roland CAPRON (PU-PH) | Biophysique |
| Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite) | Pharmacologie |
| Mme Isabelle DUBUS | Biochimie |
| Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH) | Parasitologie |
| Mr Jean Pierre GOULLE | Toxicologie |
| Mr Michel GUERBET | Toxicologie |
| Mr Olivier LAFONT | Chimie organique |
| Mme Isabelle LEROUX | Physiologie |
| Mr Paul MULDER | Sciences du médicament |
| Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH) | Microbiologie |
| Mme Elisabeth SEGUIN | Pharmacognosie |
| Mr Rémi VARIN (PU-PH) | Pharmacie clinique |
| Mr Jean-Marie VAUGEOIS | Pharmacologie |
| Mr Philippe VERITE | Chimie analytique |

**MAITRES DE CONFERENCES**

| | |
|---|---|
| Mme Cécile BARBOT | Chimie Générale et Minérale |
| Mme Dominique BOUCHER | Pharmacologie |
| Mr Frédéric BOUNOURE | Pharmacie Galénique |
| Mr Abdeslam CHAGRAOUI | Physiologie |
| Mr Jean CHASTANG | Biomathématiques |
| Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation pharmaceutique et économie de la santé |
| Mme Elizabeth CHOSSON | Botanique |
| Mme Cécile CORBIERE | Biochimie |
| Mr Eric DITTMAR | Biophysique |
| Mme Nathalie DOURMAP | Pharmacologie |
| Mme Isabelle DUBUC | Pharmacologie |
| Mr Abdelhakim ELOMRI | Pharmacognosie |
| Mr François ESTOUR | Chimie Organique |
| Mr Gilles GARGALA (MCU-PH) | Parasitologie |
| Mme Najla GHARBI | Chimie analytique |
| Mme Marie-Laure GROULT | Botanique |
| Mr Hervé HUE | Biophysique et mathématiques |
| Mme Laetitia LE GOFF | Parasitologie – Immunologie |
| Mme Hong LU | Biologie |
| Mme Sabine MENAGER | Chimie organique |
| Mme Christelle MONTEIL | Toxicologie |
| Mr Mohamed SKIBA | Pharmacie galénique |
| Mme Malika SKIBA | Pharmacie galénique |

| | |
|---|---|
| Mme Christine THARASSE | Chimie thérapeutique |
| Mr Frédéric ZIEGLER | Biochimie |

**PROFESSEURS ASSOCIES**

| | |
|---|---|
| Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ | Pharmacie officinale |
| Mr Jean-François HOUIVET | Pharmacie officinale |

**PROFESSEURS CONTRACTUELS**

| | |
|---|---|
| Mme Elizabeth DE PAOLIS | Anglais |
| Mr Thierry WABLE | Communication |

**ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

| | |
|---|---|
| Mr Jérémie MARTINET | Immunologie |

**ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

| | |
|---|---|
| Mme Imane EL MEOUCHE | Microbiologie |
| Mme Juliette GAUTIER | Pharmacie galénique |
| Mr Romy RAZAKANDRAINIBE | Parasitologie |

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

| | |
|---|---|
| Mme Cécile BARBOT | Chimie Générale et minérale |
| Mr Thierry BESSON | Chimie thérapeutique |
| Mr Roland CAPRON | Biophysique |
| Mr Jean CHASTANG | Mathématiques |
| Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB | Législation et économie de la santé |
| Mme Elisabeth CHOSSON | Botanique |
| Mr Jean-Jacques BONNET | Pharmacodynamie |
| Mme Isabelle DUBUS | Biochimie |
| Mr Loïc FAVENNEC | Parasitologie |
| Mr Michel GUERBET | Toxicologie |
| Mr Olivier LAFONT | Chimie organique |
| Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET | Physiologie |
| Mme Martine PESTEL-CARON | Microbiologie |
| Mme Elisabeth SEGUIN | Pharmacognosie |
| Mr Mohamed SKIBA | Pharmacie galénique |
| Mr Rémi VARIN | Pharmacie clinique |
| Mr Philippe VERITE | Chimie analytique |

## III – MEDECINE GENERALE

**PROFESSEUR**

Mr Jean-Loup HERMIL UFR Médecine générale

**PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

Mr Pierre FAINSILBER UFR Médecine générale
Mr Alain MERCIER UFR Médecine générale
Mr Philippe NGUYEN THANH UFR Médecine générale

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

Mr Emmanuel LEFEBVRE UFR Médecine générale
Mme Elisabeth MAUVIARD UFR Médecine générale
Mme Marie Thérèse THUEUX UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

**PROFESSEURS**

Mr Serguei FETISSOV Physiologie (ADEN)
Mme Su RUAN Génie Informatique

**MAITRES DE CONFERENCES**

Mr Sahil ADRIOUCH Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mme Isabelle TOURNIER Biochimie (UMR 1079)

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS** : Mme Véronique DELAFONTAINE

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*
*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*
*CB - Centre Henri Becquerel*
*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*
*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

## Table des matières

1. Définitions et historique ..... 3

1.1 La pharmacogénétique de sa création à aujourd'hui ..... 3

1.2 La pharmacogénétique : définition-objectifs-rôles ..... 5

2. Variabilité de réponse interindividuelle ..... 6

2.1 Protéines impliquées dans la pharmacocinétique et pharmacodynamie ..... 6

2.2 Les facteurs pouvant influencer la réponse à un médicament ..... 10

2.3 Polymorphismes génétiques ..... 12

2.3.1 Localisation, type et incidences fonctionnelles ..... 12

2.3.2 Principe d'Hardy-Weinberg ..... 16

2.4 Phénotypage, génotypage: anticipation de la réponse au médicament ..... 18

2.4.1 Phénotypage ..... 18

2.4.2 Génotypage ..... 19

2.5 Analyse d'association pour le génotypage ..... 21

2.5.1 Généralité sur les réactions de polymérisation en chaîne ..... 21

2.5.2 Séquençage PCR méthode de Sanger ..... 27

2.5.3 RT-PCR : *Real-Time* PCR selon la méthode TaqMan® ..... 31

3. Principaux tests réalisables en pharmacogénétique et recommandations associées ..... 35

3.1 Test pharmacogénétique du gène IL-28B ..... 36

3.2 Test pharmacogénétique du gène CYP2C19 ..... 38

3.3 Test pharmacogénétique du gène CYP 3A5 ..... 41

3.4 Test pharmacogénétique du gène CYP2C9 ..... 43

3.5 Test pharmacogénétique du gène VKORC1 ..... 46

3.6 Test pharmacogénétique du gène TMPT ..... 48

3.7 Test pharmacogénétique du gène SLCO1B1: ..... 51

3.8 Test pharmacogénétique du gène UGT1A1: ..... 53

3.9 Test pharmacogénétique du gène CYP1A2: ..... 56

3.10 Test pharmacogénétique du gène CYP2B6 : ..... 58

3.11 Test pharmacogénétique du gène DPYD: ..... 60

3.12 Test pharmacogénétique du gène CYP2D6 : ..... 63

4. Travaux personnels: Génotypage CYP2C19*2 et *17 au CHU de Rouen ..... 66

4.1 Généralités ..... 66

4.1.1 Présentation du voriconazole (VCZ) : ..... 66

4.1.2 Présentation du CYP2C19 ..... 67

4.1.3 Expression, régulation et interactions du CYP2C19 ..... 68

4.1.4 Intérêt clinique du génotypage CYP2C19 ..... 69

4.2 Mise au point de l'analyse ..... 71

4.2.1 Pré-requis pour le développement d'un génotypage ..... 71

4.2.2 RT-PCR TaqMan CYP2C19*2 et CYP2C19*17 : ..... 74

4.3 Mise en application du génotypage CYP2C19 au CHU de Rouen après validation et analyse d'une série de patients traités par voriconazole. ..... 75

4.3.1 Objectifs de l'étude et problématique associée au voriconazole ..... 75

4.3.2 Analyse d'une série de patients traités par voriconazole ..... 75

4.4 Résultats ..... 76

4.4.1 Populations ..... 76

4.4.2 Doses optimales de Voriconazole ..... 77

4.4.3 Discussion et conclusion ..... 79

Conclusion ..... 81

Table des tableaux ..... 87

Table des illustrations ..... 88

5. Annexes ..... 89

5.1 Annexe 1: Listes des substances in vitro ..... 89

## Table des illustrations

Figure 1 Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques ..... 8
Figure 2: Origines de la variabilité interindividuelle dans la réponse au médicament..... 11
Figure 3 Mécanismes moléculaires à l'origine des différents phénotypes métaboliques. ..... 14
Figure 4 Schéma PCR ..... 24
Figure 5 Schéma de l'étape de dénaturation ..... 25
Figure 6 Schéma de l'étape d'hybridation ..... 26
Figure 7: Schéma de l'étape d'élongation grâce à la Taq polymérase ..... 26
Figure 8 Résultat méthode Sanger ..... 28
Figure 9: Mécanisme de fluorescence par la technique de transfert d'énergie par résonnance. ..... 29
Figure 10 Etapes de la méthode de Sanger adaptées à la technologie FRET. ..... 30
Figure 11: Schéma des différents types de sondes ..... 31
Figure 12: Mécanisme d'émission de la fluorescence durant l'élongation ..... 32
Figure 13: Suivi en temps réel de l'évolution des cycles par mesure de fluorescence..... 33
Figure 14 Intensité de fluorescence en fonction des cycles d'amplifications..... 33
Figure 15 Allèle X en fonction de l'allèle Y pour une lecture en point final..... 34
Figure 16 Structure du voriconazole ..... 66
Figure 17 Séquence homozygote sauvage: CYP2C19*2 CQ1F (GG)..... 71
Figure 18 Séquence hétérozygote: CYP2C19*2 CQ2F (GA) ..... 72
Figure 19 Séquence homozygote muté: CYP2C19*2 CQ3F (AA)..... 72
Figure 20 Influence du génotype du CYP2C19 sur l'activité du cytochrome (c0/dose)..... 78
Figure 21 Influence du génotype du CYP2C19 sur la dose nécessaire pour atteindre les cibles thérapeutiques. ..... 78

## Introduction

La variabilité de réponse interindividuelle aux médicaments est une expérience quotidienne en médecine. Celle-ci est valable, tant sur le plan pharmacologique (d'efficacité) que sur le plan toxicologique (toxicité, effets indésirables). En France, chaque année, la iatrogénie médicamenteuse serait responsable d'environ 128 000 hospitalisations, pour un coût global estimé à 320 millions d'euros[1]. Une enquête réalisée en 1998 par le réseau des Centres régionaux de pharmacovigilance (CRPV) montre que les effets indésirables des médicaments représentent environ 3,2 % des hospitalisations en France[2]. Une nouvelle édition de l'étude, menée en 2007, permet d'estimer globalement à 3,6% la proportion des hospitalisations dues à des effets indésirables des médicaments[3]. Les AVK (anticoagulants antivitamine K) sont les médicaments à l'origine du plus fort taux d'incidence d'hospitalisation suite à des effets indésirables ce qui représente 12,3% des hospitalisations « iatrogéniques » en 2007 et 13% en 1998[3]. Les impasses thérapeutiques, plus difficiles à appréhender, posent probablement un problème du même ordre. On estime par exemple que 35% des patients ne répondent pas aux bêtabloquants, qu'un malade sur deux ne tire que peu ou aucun profit de son traitement antidépresseur, et que moins d'un patient schizophrénique sur trois bénéficie pleinement de son traitement antipsychotique[4]. Ces chiffres mettent en avant ce phénomène de variations interindividuelles dans la réponse à un traitement qui s'inscrit par ailleurs dans un contexte de recherches d'économie des dépenses de santé.

Partant de ce constat et de différents projets de médecine personnalisée, les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse ont porté sur l'état des lieux de la pharmacogénétique en 2014 et plus précisément sur le génotypage du *CYP2C19* dans une série de patients traités par voriconazole au CHU de Rouen.

Dans un premier temps, nous définirons ce qu'est la pharmacogénétique au travers de son évolution jusqu'à aujourd'hui. On étudiera l'utilité et la praticité des tests de pharmacogénétique, leur principe et leurs intérêts respectifs dans les stratégies actuelles de mise en place de traitements personnalisés.

Dans un second temps, nous définirons les variabilités de réponse interindividuelle à un traitement, ainsi que les facteurs pouvant moduler cette réponse, en particulier les relations « génotype/phénotype » impliquées dans la réponse aux médicaments. Nous définirons ensuite les différentes méthodes utilisées pour l'anticipation de la réponse au médicament, et nous développerons plus particulièrement le génotypage par séquençage (méthode de Sanger) et par RT-PCR (*Real Time*-PCR selon la méthode TaqMan®).

Dans la troisième partie de ce document, qui porte sur mes travaux personnels, nous présenterons une liste (non exhaustive) des principaux tests pharmacogénétiques pertinents et actuellement proposés en routine hospitalière. Ces tests sont présentés sous forme de fiches synthétiques, prenant en compte les aspects pratiques et théoriques de chaque analyse. L'objectif de cette partie est de mettre à la disposition du laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie du CHU de Rouen des informations pratiques, synthétiques et essentielles relatives à chaque génotypage disponible.

La dernière partie sera dédiée à la mise en place et la mise en application du génotypage *CYP2C19* dans le laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie du CHU de Rouen. Ce test permettra *in fine* d'extrapoler le phénotype métabolique via un test génétique et constituera un outil supplémentaire pour les cliniciens afin d'ajuster certains traitements par voriconazole ou clopidogrel. Nous présenterons les résultats de cette analyse dans une série de 35 patients atteints d'aspergillose invasive et traités par voriconazole au CHU de Rouen.

# 1. Définitions et historique

## 1.1 La pharmacogénétique de sa création à aujourd'hui

La pharmacogénétique est une discipline relativement ancienne et qui s'est développée depuis les années 1990 avec l'essor des technologies et de la génomique moléculaire (PCR, PCR instantanée, "Human Genom Project", puce à ADN (*DNA-microarrays*[6]) ….

Cependant les observations de cas de variabilité interindividuelle de réponse, qu'elle soit thérapeutique ou toxique vis à vis d'une substance donnée, remontent à plusieurs siècles.

A propos du favisme, Pythagore (510 av. J-C) disait: « *ce qui peut être médicament ou nourriture pour certains, peut être poison violent pour d'autres »*. En 1902, Garrod et Oxon ont étudié l'alcaptonurie et ils ont émis l'hypothèse suivante : « l'alcaptonurie est due à un déficit d'une enzyme dans les voies azotées ». Il s'agit là d'une des premières descriptions d'un déficit enzymatique mais dont les origines exactes sont alors méconnues. En 1956, Carson a établi une relation entre un déficit enzymatique d'origine génétique et la survenue d'anémies hémolytiques chez les patients prenant de la primaquine (antipaludéen) [7]. Cette même année, Crosby a identifié la relation entre cette maladie et le favisme[8].

Le terme de « pharmacogénétique » a été proposé dès la fin des années 50, à la suite de la démonstration du caractère héréditaire de réponses anormales à certains traitements médicamenteux[9]. L'identification de l'enzyme déficitaire glucose-6-phosphate déshydrogénase dans la survenu de crise d'anémie hémolytique après la prise de médicaments dits "pro-oxydants", a permis d'identifier le caractère génétique du favisme et représente l'un des premiers exemples célèbres illustrant l'existence d'une prédisposition génétique aux effets indésirables des médicaments[10]. Depuis, de très nombreux exemples d'anomalies génétiques, à la fois responsables de variations d'expressions et/ou d'activité des protéines ont été rapportés[11]-[12]-[13].

L'essor de la pharmacogénétique fût permis grâce à la **PCR** (***P**olymerisation **C**hain **R**eaction*), décrite par Kary Bank Mullis qui lui valut de recevoir, avec un de ses confrère, le prix Nobel de chimie en 1993[14]. Dans son livre, *Dancing Naked in the Mind Field*, il relate plusieurs expériences personnelles dont certaines qui sont sujet à controverse; notamment l'usage récréationnel du LSD qui lui aurait permis de comprendre certains principes de la PCR.

Depuis, l'évolution de la PCR traditionnelle vers une PCR en temps réel (***R**eal **T**ime* PCR), de nombreux projets ont été développés. "*The Human Genome Project*" est un projet initié en 1990 qui a fortement contribué à la révolution de la pharmacogénétique. Son objectif principal était d'établir le séquençage complet du génome humain. Son achèvement a été annoncé le 14 avril 2003[15].

L'étude et les comparaisons du génome humain ont mis en évidence les **SNP** (***S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism*) qui constituent la forme la plus abondante de variations génétiques interindividuelles. Ils représentent plus de 90% de toutes les différences entre individus. C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel une seule base (Adénine, Thymine, Guanine ou Cytosine) diffère par rapport à la séquence ancestrale (ou « sauvage ») du gène. Les SNP sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome; on estime leur fréquence à environ une altération toutes les 1 000 paires de bases, ce qui en fait environ 3 000 000 dans le génome entier. Ils n'ont pas tous des conséquences fonctionnelles, mais plusieurs milliers ou dizaines de milliers peuvent en avoir.

La variabilité de réponse à un traitement peut s'expliquer par des variations d'activités et/ou d'expressions protéiques qui conditionnent l'action des médicaments. Ces dernières peuvent avoir lieux au niveau de la pharmacocinétique (variation d'expression des gènes codants pour des enzymes impliquées dans le métabolisme ainsi que dans le transport des médicaments) ou au niveau de la pharmacodynamie (variation d'expression de gènes codants pour des récepteurs cibles par exemple).

### 1.2 La pharmacogénétique : définition-objectifs-rôles

Selon l'EMEA: EMEA/CHMP/ICH/437986/2006 :

- La Pharmacogénomique (PGx) est l'étude des variations de séquence de l'ADN et de l'ARN influençant la réponse aux médicaments.
- La Pharmacogénétique (PGt) est un sous-ensemble de la pharmacogénomique et est définie comme l'étude des variations de séquence d'ADN (uniquement) influençant la réponse aux médicaments.

La pharmacogénétique a donc pour objectifs :

- d'identifier les sujets répondeurs et non-répondeurs à un médicament donné,
- d'identifier les sujets à risque de survenue d'un événement indésirable pour un médicament donné,
- de prévoir la dose la plus adaptée à chaque individu pour un médicament donné.

L'intérêt de la pharmacogénétique est d'autant plus important que la molécule utilisée possède certaines caractéristiques :

- la fenêtre thérapeutique est étroite,
- l'efficacité est difficile à évaluer rapidement,
- la tolérance au médicament est variable et redoutée chez certains patients.

Il faut cependant garder à l'esprit la pertinence clinique des tests pratiqués afin de s'assurer que le résultat de l'essai permet d'identifier un effet suffisamment important pour impacter la réponse clinique.

Ainsi, la pharmacogénétique permet d'envisager le développement une médecine « personnalisée », prédictive de l'efficacité, du risque toxique ou potentiellement du coût[17]. Le développement de tests simples permettant d'identifier, au sein de la population, les individus susceptibles de développer de telles variabilités de réponse permet donc d'optimiser certaines prises en charge thérapeutiques[18].

## 2. Variabilité de réponse interindividuelle

Il existe une variabilité importante des effets des médicaments d'un individu à un autre: la même dose d'un médicament, administré à posologie constante et à des patients *a priori* comparables, peut produire des effets opposés : réponse thérapeutique / toxicité grave. Les polymorphismes génétiques conditionnent l'action de certains médicaments, en modulant leur pharmacocinétique et/ou leur pharmacodynamie. Les médicaments peuvent en effet être pris en charge par des transporteurs, plasmatiques ou membranaires, puis par des enzymes capables de les activer ou les inactiver. Enfin, ils agissent sur des cibles souvent de nature protéique (récepteurs, enzymes) avant d'être excrété hors de la cellule puis de l'organisme sous l'action potentielle de transporteurs protéiques (protéines d'efflux ou canaux) [19].

### 2.1 Protéines impliquées dans la pharmacocinétique et pharmacodynamie

La pharmacocinétique, permet de comprendre le devenir d'un principe actif (PA) d'un médicament dans l'organisme. Elle comprend quatre grandes étapes ADME : Absorption; Distribution; Métabolisme et Excrétion du principe actif ± ses métabolites.

Le médicament doit traverser les membranes biologiques du site d'absorption vers le sang pour pénétrer dans la circulation systémique.

Si on prend l'exemple de la pharmacocinétique d'un médicament par voie orale, la première phase est l'absorption gastro-intestinale. Au niveau de la paroi intestinale se trouvent des transporteurs transmembranaires tels que:

- SLC (S*olute Carrier*)
- ABC (ATP *Binding Cassettes*)
- MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*)

Les transporteurs de la famille SLC sont généralement des pompes d'influx c'est-à-dire que le transporteur facilite l'incorporation de la substance concernée dans la cellule, le plus souvent par le pole basal (OATP). Les protéines ABC et MRP sont généralement des pompes d'efflux qui participent à la sortie la molécule concernée hors de la cellule couplée à une consommation d'ATP (MRP, P-gp). La P-glycoprotéine (P-gp) module l'absorption de nombreux médicaments. Ces mêmes protéines peuvent également être retrouvées au niveau de barrières cellulaires telles que la barrière intestinale ou la barrière hémato-encéphalique[20]. Certains polymorphismes génétiques de ces protéines peuvent induire une variation de la clairance hépatique de certaines statines (simvastatine, pravastatine, pitavastatine, rosuvastatine), le fexofenadine et le repaglinide)[21] (*cf* chapitre 3.7).

Lors de la phase de la distribution, le principe actif est transporté par la veine porte vers le foie avant d'atteindre sa cible. La substance active peut ainsi subir une métabolisation hépatique avant d'être distribuée dans l'organisme : c'est l'effet de **premier passage hépatique**.

Le métabolisme est majoritairement hépatique avec des enzymes participant à la biotransformation des médicaments qui sont divisées en deux groupes (Figure 1[22]) :

1. Phase I : ce sont des enzymes de fonctionnalisation (oxygénases, oxydoréductases, hydrolases), qui rendent les molécules plus polaires (exemple par hydroxylation ou par désalkylation). Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 catalysent la grande majorité des réactions de phase I ;
2. les enzymes de phase II sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison, et rendent les métabolites encore plus hydrophiles, par greffage d'un radical acétyle, sulfate, glucuronate, méthyle, glutathion.

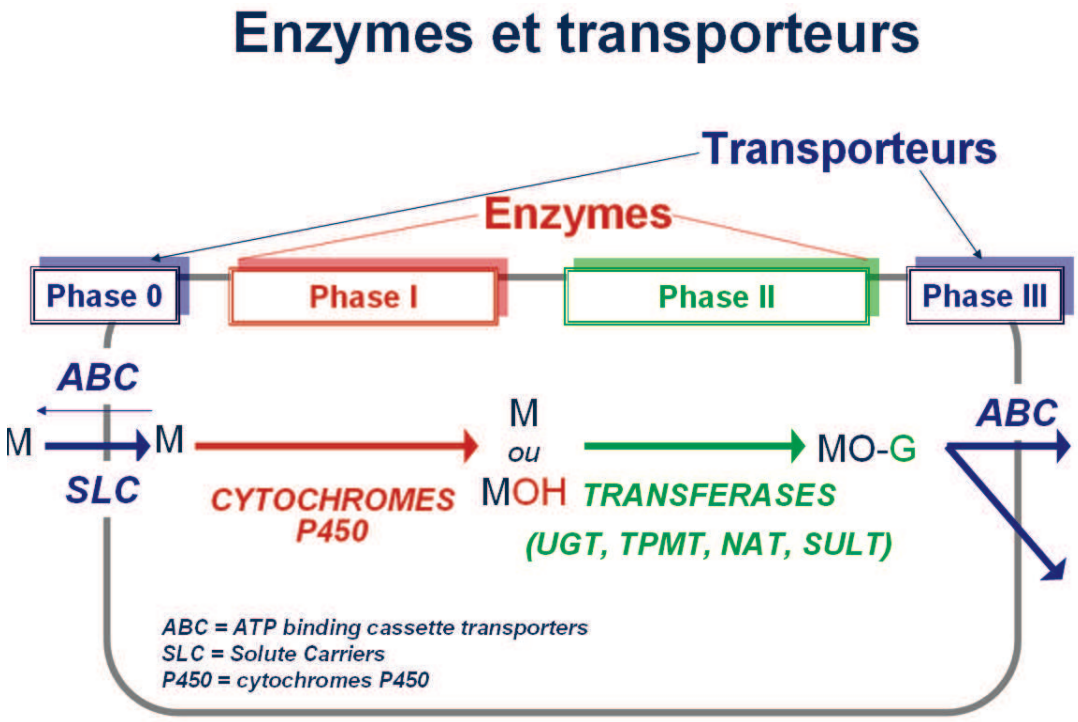



**Figure 1 Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques**

Des transporteurs vont permettre la sortie des métabolites conjugués hors de la cellule au travers de la membrane, ce sont des protéines d'efflux de phase III qui appartiennent à la même famille que la P-gp.

Les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de substances hydrosolubles plus ou moins toxiques pour être plus facilement éliminées dans la bile et dans les urines[23]. Certains médicaments sont des pro-drogues, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une métabolisation pour être efficace. C'est le cas du clopidogrel (antiagrégant plaquettaire) pour lequel plusieurs familles de cytochrome interviennent dans son métabolisme, les plus importants, au niveau fonctionnel étant le CYP3A4 et le CYP2C192[24]

La majorité des enzymes intervenant dans le métabolisme des médicaments est exprimée de façon ubiquitaire. Ainsi, on a longtemps considéré que les cytochromes P450 (CYP450) étaient principalement exprimés dans le foie, mais ils sont en fait présents dans tous les tissus en diverses proportions, où ils influencent la biodisponibilité des agents thérapeutiques et contribuent à la formation de métabolites dont la production *in situ* peut expliquer certains cas de toxicité « tissu-spécifique »[25].

La pharmacodynamie est le processus par lequel le médicament exerce des effets pharmacologiques sur l'organisme.

### 2.2 Les facteurs pouvant influencer la réponse à un médicament

Les protéines qui interviennent sur la cinétique ou la pharmacodynamique du principe actif sont classées en différentes familles au sein desquelles on retrouve certaines propriétés communes.

Les cytochromes sont des protéines enzymatiques appartenant à une superfamille comprenant plusieurs isoformes qui possèdent de fortes homologies dans leurs séquences. De plus ces isoformes avec une spécificité relative et une similitude partielle ont une activité redondante. Les gènes codant pour les CYP sont très polymorphes et les enzymes jouent un rôle clé dans l'élimination de la majorité des médicaments dans le corps humain. Les isoformes les plus fréquentes de ces enzymes : CYP3A4, 3A5, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19 et 2D6 devraient être analysés chez les participants à des essais cliniques à chaque fois que ces enzymes peuvent jouer un rôle[26]. Le cas du CYP 3A4 est particulier, car il intervient dans le métabolisme de nombreux médicaments mais peu de variants sont connus pour avoir une incidence sur son activité (CYP3A4*22) [27].

L'activité et/ou l'expression des protéines sont fonction des **facteurs physiopathologiques**, **environnementaux** et **génétiques** (figure 2).

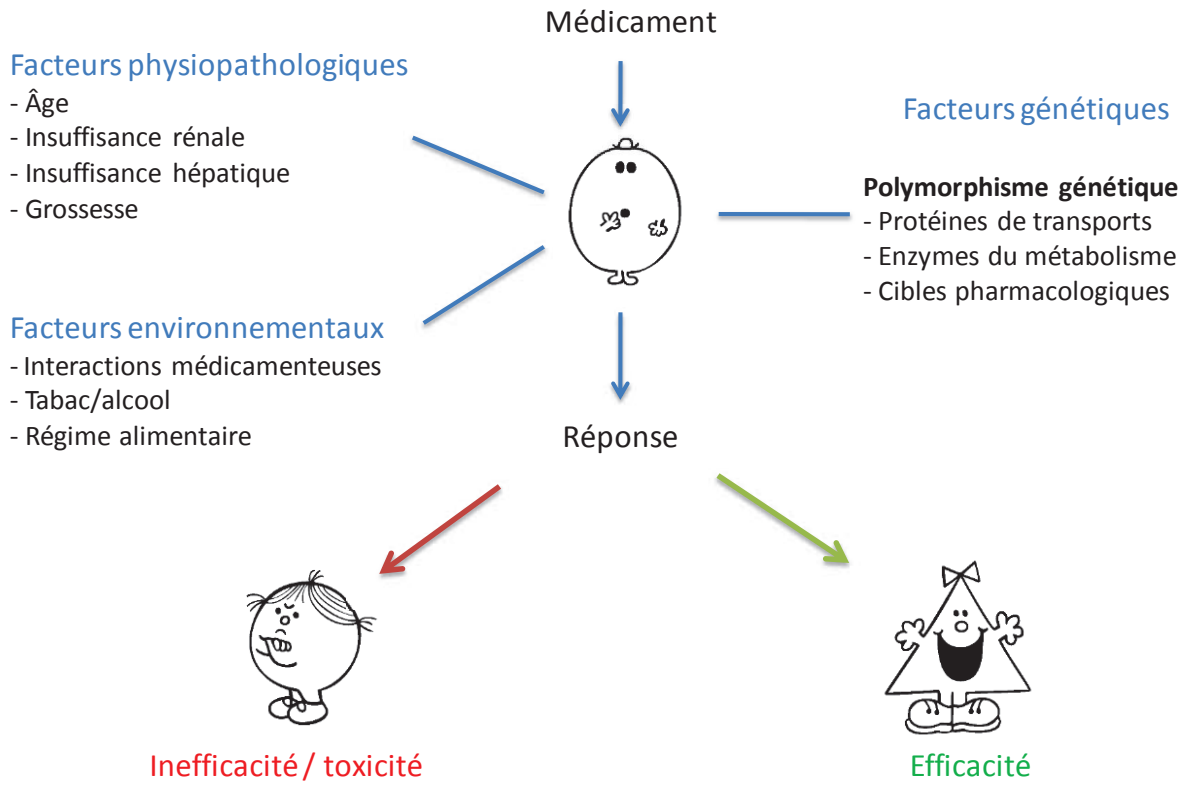



**Figure 2: Origines de la variabilité interindividuelle dans la réponse au médicament**

En effet, certains états pathologiques tels que l'insuffisance rénale, l'insuffisance hépatique, le diabète, l'inflammation… ou encore certains états physiologiques (âge, grossesse, …) sont responsables de variations d'expression ou d'activité des protéines [28-29].

D'autre part, de nombreux facteurs environnementaux sont également responsables de variations d'expression de ces protéines. Elles peuvent donc être inductibles ou répressibles, par des xénobiotiques tels que des médicaments, des polluants, des composés alimentaires (régime végétarien), ou encore par la fumée de tabac[30].

## 2.3 Polymorphismes génétiques

Le polymorphisme génétique est un des facteurs impliqué dans la variabilité interindividuelle de réponse au médicament, il se définit comme une modification fréquente de la séquence génétique, observée chez plus de 1 % de la population. De ce fait, le polymorphisme génétique peut avoir des conséquences fonctionnelles : diminution ou augmentation de l'activité, ou de l'expression des protéines d'un individu à l'autre selon une fréquence variant de 1 à 80% de la population[31].

### 2.3.1 Localisation, type et incidences fonctionnelles

Pour un individu donné, en ce qui concerne un gène ou une séquence d'ADN au niveau d'un locus précis ; on retrouve deux allèles, un provenant du père et l'autre de la mère, pouvant être identiques ou différents. Ce qui permet de définir l'état constitutionnel du gène. Sur les trois milliards de bases du génome humain, 99,9% sont identiques d'un individu à l'autre. Le 0,1% restant représentent les variations ou polymorphismes, pourcentage infime mais qui est à la base des différences entre les individus.

Les SNP représentent 90% des variations, ils peuvent se retrouver au sein de régions codantes de gènes (exon), de régions non codantes de gènes (intron), ou de régions inter-géniques (entre les gènes). La localisation du SNP n'est pas directement corrélée avec la fonctionnalité et/ou de l'expression de la protéine correspondante.

Les SNP sur des zones non-codantes peuvent avoir des répercussions sur l'expression et/ou l'activité de la protéine. On peut les retrouvent soit sur le promoteur entrainant une modification de l'expression du gène ; soit dans des régions non codantes ayant une conséquence sur l'épissage, les facteurs de transcription, ou sur les séquences d'ARN non codant. On peut distinguer plusieurs types de conséquences que les SNP engendrent au niveau du polymorphisme protéique/enzymatique correspondant:

- Des altérations majeures :
  - formation d’un codon d’arrêt dans une séquence codante, conséquence : absence de protéine ou celle-ci est tronquée et inactive ;
  - mutation au niveau d’une jonction exon-intron nécessaire à l’épissage, conséquence : formation d’une protéine de structure altérée rendant la protéine inactive.
- Des altérations mineures :
  - mutation au niveau de la séquence protéique, conséquence : variable selon la position de l’altération au niveau de la séquence de la protéine (centre actif, domaine de régulation, etc.) ;
  - mutation au niveau du promoteur ou d’une séquence régulatrice, conséquence : absence, réduction ou stimulation de la transcription du gène.
- Des altérations silencieuses :
  - mutation sans conséquence pour la séquence protéique (en raison de la dégénérescence du code génétique) ;
  - mutation survenant dans une zone non codante (introns).

Dans le cas où les SNP se retrouvent au sein des régions codantes, celles-ci ne vont pas obligatoirement modifier la séquence d'acide aminé de la protéine produite, et ce, grâce à la redondance du code génétique ; on parle alors de *mutation synonyme*. En effet lors de la traduction, plusieurs codons de trois bases d’ARNm peuvent correspondre à un même acide aminé. De ce fait un SNP n’entrainera pas nécessairement une modification au niveau de la protéine synthétisée. On parle de mutation *non synonyme* dans le cas où la séquence protéique diffère, entrainant une altération de sa fonction.

Le polymorphisme est présent dans tous types de protéines, ainsi on aura une incidence à la fois sur la cinétique[32] et/ou sur la pharmacodynamie de la substance active. D'un point de vue pharmacocinétique, avec l'exemple des enzymes; l'activité et la quantité des enzymes intervenant dans le métabolisme dépendent majoritairement de l'information portée par le gène qui les code. On va pouvoir extrapoler le phénotype métabolique correspondant à son polymorphisme génétique[32] (figure 3). La fréquence des différents phénotypes est variable en fonction de l'enzyme et de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées.

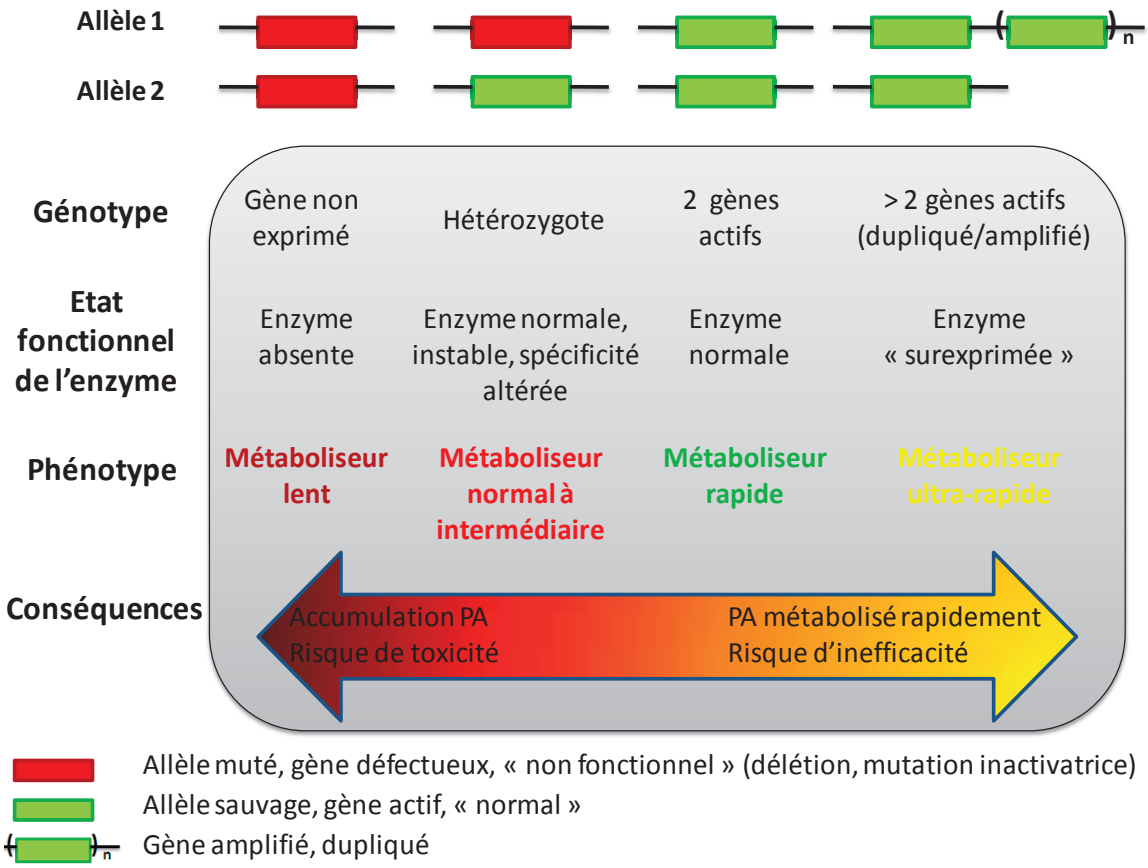



**Figure 3 Mécanismes moléculaires à l'origine des différents phénotypes métaboliques.**

Ainsi, au travers des différents phénotypes métaboliques observés on va pouvoir définir quatre groupes d'individus : (1) à la fois les métaboliseurs lents (ML) (partie de la population présentant un déficit d'activité enzymatique), (2) les métaboliseurs rapides (MR) (partie de la population présentant une activité enzymatique normale), (3) les métaboliseurs ultrarapides (MUR) (activité augmentée) et (4) les métaboliseurs intermédiaires (MI) (activité réduite).

Les effets pharmacologiques d'un médicament peuvent varier d'un individu à l'autre ou même chez un même individu indépendamment de la dose ou de la pharmacocinétique. Cette variabilité pharmacodynamique concerne aussi bien les effets bénéfiques et les effets indésirables. Elle s'exprime par l'apparition d'une réponse inhabituelle au médicament. On peut observer un patient « hypo réac tif » ou « hyper réactif » selon l'intensité de la réponse à une dose donnée.

D'un point de vue pharmacodynamique les effets des médicaments sont obtenus après interaction du composé avec des récepteurs membranaires pour 50% des médicaments environ. De nombreuses études ont identifié des polymorphismes au niveau de ces cibles.

### 2.3.2 Principe d'Hardy-Weinberg

C'est une théorie de génétique des populations, qui postule qu'au sein d'une population (idéale), il y ait un équilibre des fréquences allèliques et génotypiques d'une génération à l'autre[33]. Tout changement dans la fréquence d'un gène dans une population au cours du temps peut être détecté. Ce principe stipule essentiellement que si aucune évolution ne se produit, alors l'équilibre des fréquences allèliques restera en vigueur dans chaque génération successive des individus diploïdes à reproduction sexuée. Pour que l'équilibre demeure en vigueur (c'est à dire qu'il n'y est pas d'évolution), les cinq conditions suivantes doivent être remplies:

1. aucune mutation ne doit être ultérieure afin qu'il n'y ait pas l'émergence de nouveaux allèles dans la population,
2. pas de flux de gènes (c'est à dire pas de migration des individus dans ou hors de la population),
3. croisement aléatoire des individus (panmixie),
4. pas de sélection d'individu,
5. la population doit être la plus grande possible (loi des grands nombre, car plus l'échantillon de la population est grand plus les données statistiques seront caractéristiques de la population)

Les formules de Hardy-Weinberg nous permettent d'estimer la distribution des génotypes en fonction des fréquences allèliques dans une population donnée (ex. caucasiens, asiatiques …). Il existe deux formules:

$$\mathbf{p^2 + q^2 + 2pq = 1} \qquad \text{et} \qquad \mathbf{p + q = 1}$$

p = fréquence de l'allèle dominant dans la population

q = fréquence de l'allèle récessif de la population

$p^2$ = pourcentage d'individus homozygotes mutés

$q^2$ = pourcentage de personnes homozygotes sauvages

2pq = pourcentage d'individus hétérozygotes

Ce principe d'estimation est celui qui sera utilisé dans la troisième partie. Dans cette même partie les pourcentages des génotypes utilisés ont été déterminés grâce à une étude "*Global Minor Allele Frequency*" (MAF) de mai 2011. Cette étude est basée sur la détection de la présence ou non d'un SNP sur une population de 1000 génomes du monde, afin d'en ressortir la fréquence de l'allèle muté.

La notification pour un SNP donné est:

Ex: MAF T=0.326

C'est-à-dire que pour ce SNP, le nucléotide muté est la thymine selon une fréquence de 0.326, ensuite les deux formules algébriques permettent d'en ressortir les proportions phénotypiques.

En soit l'équilibre d'Hardy-Weinberg sert à démontrer qu'un échantillon de patients d'une même ethnie étudiée correspond à l'ensemble de la population. L'écart entre l'équilibre d'Hardy-Weinberg et la population est généralement déterminé grâce au test du $\chi^2$, où la *valeur de p* ainsi calculée doit être <u>supérieure</u> à 5% pour affirmer que les variables échantillon/population sont reliés et donc non indépendante.

## 2.4 Phénotypage, génotypage: anticipation de la réponse au médicament

Deux approches méthodologiques sont utilisées pour estimer l'activité d'une enzyme : le phénotypage et le génotypage[34].

Le phénotypage s'applique essentiellement aux polymorphismes enzymatiques intervenant dans la pharmacocinétique du médicament, principalement son métabolisme.

### 2.4.1 Phénotypage

Les méthodes de phénotypage sont basées sur l'estimation ou la mesure directe de l'activité enzymatique, après l'administration d'un substrat-test, suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et/ou de leurs métabolites[35]. Dans le cas le plus général, on détermine alors le rapport métabolique entre la quantité de substance retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s). Ce ratio est le reflet de l'activité enzymatique. Ainsi on peut définir le phénotype métabolique correspondant grâce à une comparaison aux données statistiques déterminées dans un échantillon de la population.

Lorsque l'administration directe du médicament-test à l'individu n'est pas envisageable, ces tests de phénotypage *in vivo* peuvent être remplacés par des tests *ex vivo* consistant à mesurer directement l'activité enzymatique à partir d'un échantillon biologique. Il est généralement plus adapté et surtout moins risqué de procéder à une mesure directe de l'activité enzymatique sur des tissus facile d'accès tel que les érythrocytes et leucocytes, plutôt que l'administration de médicaments-test[36].

De plus, les méthodes de phénotypage possèdent un certain nombre d'inconvénients qui en limitent l'utilisation en routine. L'absence de substrat-test spécifique, la survenue d'effets indésirables liés à son administration, la difficulté pour interpréter la valeur du rapport métabolique en cas de co-administrations de médicaments (interactions médicamenteuses) ou encore lors d'atteintes physiopathologiques chez un individu aux fonctions hépatiques et/ou rénales altérées sont autant de limitations à l'utilisation de ces tests.

Pour pallier certains inconvénients des méthodes de phénotypage cité ci-dessus, des méthodes de génotypage permettant la prédiction du phénotype des individus ont été développées. Ces méthodes sont basées sur l'identification directe des mutations génétiques à l'origine de la variabilité d'expression et d'activité de la protéine étudiée. En pratique, le génotypage d'une ou plusieurs anomalies génétiques est plus fréquemment utilisé que le phénotypage, parce qu'il est généralement plus simple à mettre en œuvre.

### 2.4.2 Génotypage

Les méthodes de génotypage reposent sur l'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire, la technique de PCR ou RT-PCR ( *Real Time*-PCR) étant généralement à la base des méthodes utilisées en routine. Ces méthodes nécessitent le recueil au préalable, par des techniques peu ou non invasives, d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux…), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique de l'individu (plus rarement l'ARN).

La stratégie de génotypage est fonction d'un certain nombre de paramètres, en particulier la nature des mutations à identifier (mutations ponctuelles, délétion ou amplification du gène…) et le nombre de mutations à identifier pour obtenir un taux d'efficacité de prédiction du phénotype le plus élevé possible (fonction de la fréquence des polymorphismes dans la population étudiée).

La stratégie adoptée tient également compte du contexte clinique dans lequel le test est prescrit :

- dans un cadre purement préventif, avant l'introduction d'un traitement médicamenteux (phénotype non connu a priori),
- ou dans un cadre diagnostique pour expliquer un accident iatrogène ou une absence de réponse à un médicament donné (suspicion d'un phénotype déficitaire ou ultra rapide par exemple).

Enfin, comme nous l'avons mentionné précédemment, il convient d'adapter la stratégie de génotypage en fonction de l'origine ethnique ou géographique des individus, des variations interethniques dans la nature et la fréquence de nombreux polymorphismes génétiques ayant été décrites[37].

## 2.5 Analyse d'association pour le génotypage

Pour introduire les techniques séquençages et de TaqMan®, nous définirons tout d'abord la technique de PCR.

### 2.5.1 Généralité sur les réactions de polymérisation en chaîne

**PCR** est l'abréviation anglaise de *Polymerase Chain Reaction,* c'est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*. Celle-ci permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques pictogrammes) de séquence spécifique d'ADN (l'amplicon) ou de séquences spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides).

Cette technique est basée sur la combinaison de deux facteurs :

1) Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation spécifique à l'ADN double brins qui sont fonction des ADN polymérases (Taq polymérase). La synthèse ce fait grâce à **l'activité 5'-exo nucléase de la Taq Polymérase**.
2) Les propriétés d'hybridation et de dissociation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique. Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces, plus fidèles…

La PCR se déroule en trois étapes : le mélange des réactifs, cycle de variations de températures via un thermocycleur puis analyse des fragments par électrophorèse.

1- **Mélange des réactifs:** échantillon d'ADN avec la séquence cible à recopier, les nucléotides (A, T, C, G), les amorces : séquences d'ADN simple brin complémentaires de part et d'autre de la région à copier et l'ADN polymérase : enzyme qui reconnaît les amorces et assemble les nucléotides pour recopier l'ADN cible.

Caractéristiques des amorces :

- Les séquences nucléotidiques des amorces doivent être spécifiques des séquences complémentaires de l'ADN simple-brin auxquelles elles vont s'apparier. De plus la spécificité de la séquence est importante dans le sens où celle-ci ne doit pas pouvoir s'apparier à une autre séquence de l'ADN que l'on souhaite répliquer.

- Les séquences des amorces doivent être choisies de sorte à **minimiser les possibilités d'appariement** entre elles : que ce soit l'appariement entre deux amorces identiques (homodimère) ou différentes (*cross dimere*) ; ou bien que ce soit la formation d'une « épingle » par une auto complémentarité de l'amorce appelée *spin hair*.

Cependant lors du *design* des amorces, il faut prendre en considération que ces phénomènes d'appariement sont soumis au même principe thermodynamique de dissociation que l'ADN sous l'effet des variations de température.

- Le procédé même de la PCR reposant, entre autres, sur des équilibres thermodynamiques, les amorces doivent avoir des températures de fusion notée Tm le plus proche possible, autrement dit dans des conditions précises le rapport entre les bases AT et GC des deux amorces ne doit pas être trop différent.

Formules de calcul approximatif du Tm:

Lorsque la séquence est inférieure à 20 nucléotides:

$$Tm\ (°C) = \frac{2°C * nb\ ([A]+[T])}{4°C * nb([C]+[G])}$$

Lorsque la séquence est supérieure à 20 nucléotides:

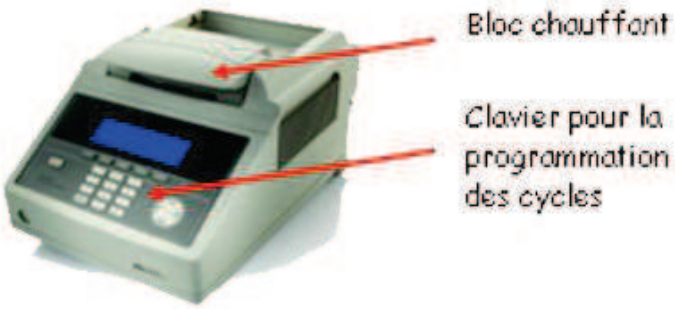
$$Tm\ (°C) = \frac{2°C * nb\ ([A]+[T])}{4°C * nb([C]+[G])} * \left(1 + \frac{N - 20}{20}\right)$$

[A]: Adénine [T]: Thymine

[C]: Cytosine [G]: Guanine

N: Nombre de nucléotides de la séquence

2- Le mélange est soumis à des **variations de températures rapides** grâce au thermocycleur:



Le thermocycleur est préprogrammé pour faire 20 à 40 cycles et chaque cycle comprend 3 étapes, comme schématisé ci-dessous (Figure 4 Schéma PCR[38]) :

1) Dénaturation
2) Hybridation
3) Elongation

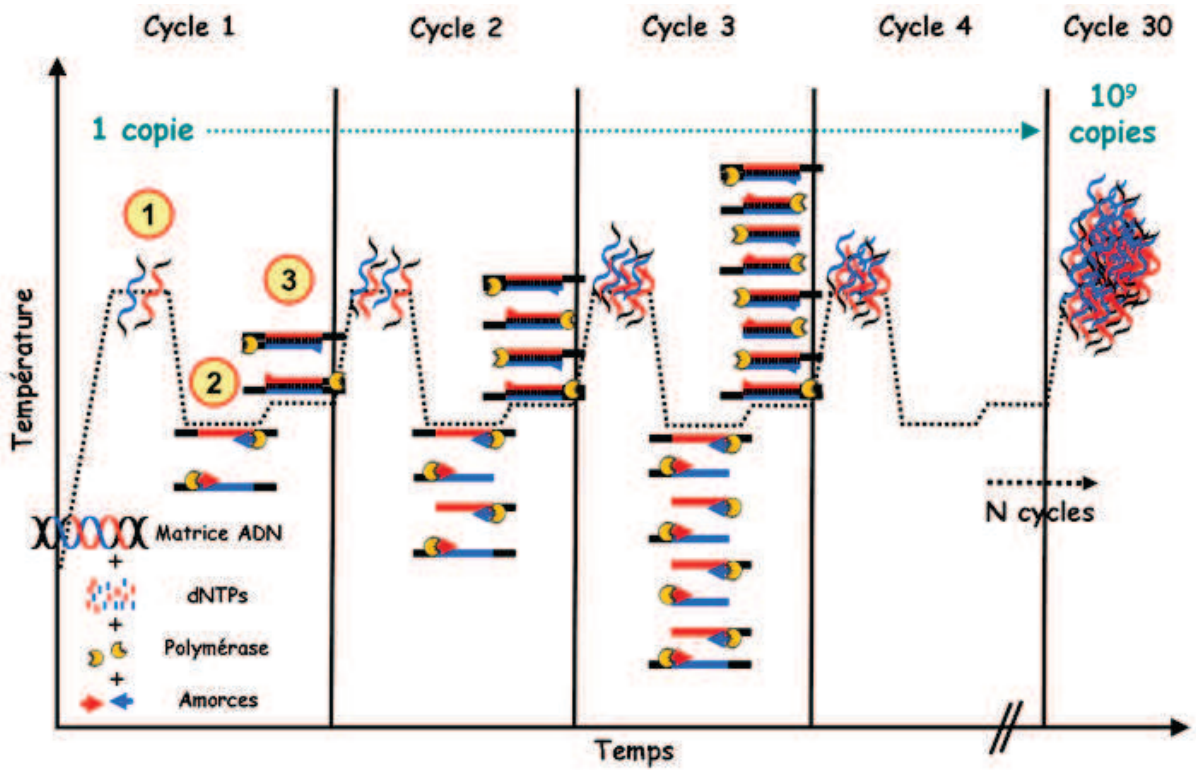



**Figure 4 Schéma PCR**

De manière plus détaillé on a :

1) Dénaturation : la température est d'environ 94°C pendant environ 1 minute, les brins d'ADN qui sont en conformation de double hélice à température ambiante se séparent ; ainsi on obtient de l'ADN monobrin (Figure 5: Schéma de l'étape de dénaturation).

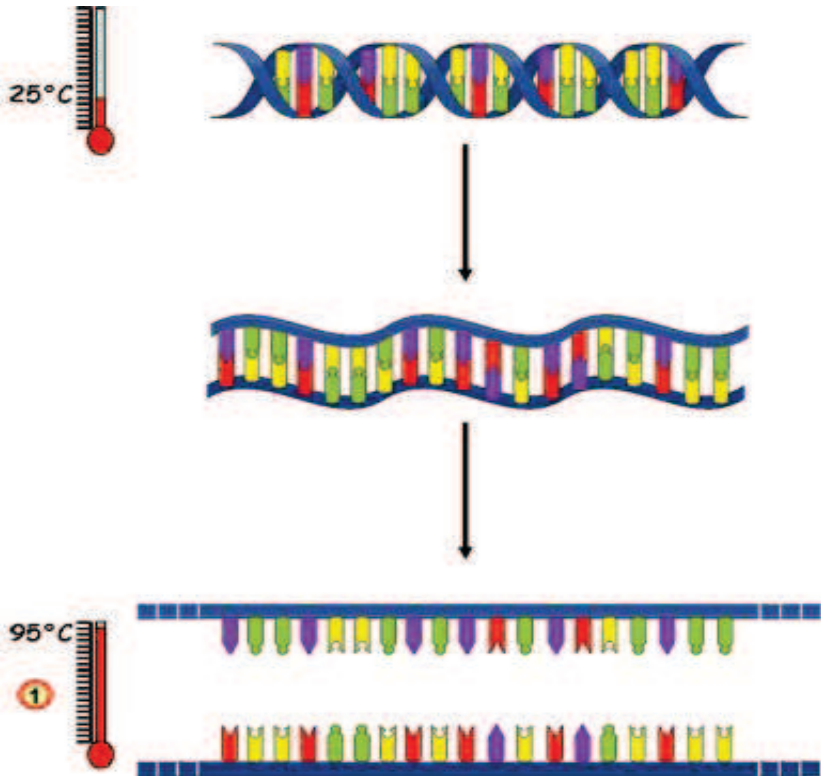



**Figure 5 Schéma de l'étape de dénaturation**

2) Hybridation : la température est alors de 40-50°C, elle permet la fixation des amorces spécifique aux fragments d'ADN monobrin ; l'amorce va alors permettre l'initiation de la Taq polymérase (Figure 6: Schéma de l'étape d'hybridation).

**Figure 6 Schéma de l'étape d'hybridation**

3) Élongation : synthèse à 72°C d'ADN par l'ADN polymérase, qui se fixe aux amorces et assemble les nucléotides présents dans le milieu réactionnel (Figure 7: Schéma de l'étape d'élongation grâce à la Taq polymérase).

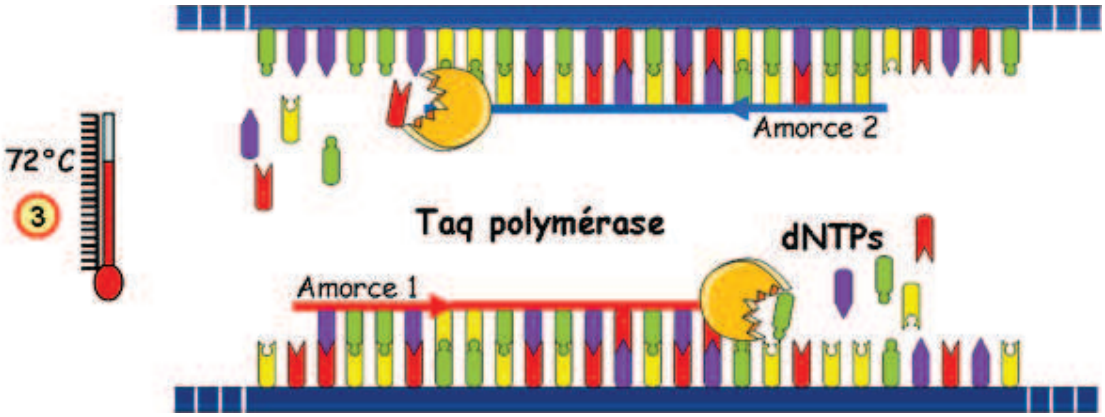



**Figure 7: Schéma de l'étape d'élongation grâce à la Taq polymérase**

A chaque cycle, le nombre de copies est doublé. En n cycles, on obtient des $2^n$ copies de la séquence cible. A partir d'une copie d'ADN cible, on pourra donc obtenir 1 milliard de copie d'ADN cible.

3- Analyse des fragments obtenus par électrophorèse

### 2.5.2 Séquençage PCR méthode de Sanger

Comme vu précédemment, le recopiage du brin matrice par une Taq polymérase est initiée par la fixation de l'amorce, complémentaire du brin matrice. Elle va ainsi permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'-3'. L'ADN polymérase va permettre l'incorporation de nucléotides (dNTPs: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel.

La spécificité de la réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par la Taq polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTPs) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTPs diffèrent des dNTPs par leur extrémité 3', celle-ci est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu.

Dans le milieu réactionnel, il y a compétition entre les dNTPs et les ddNTPs. Le rapport spécifique ddNTPs/dNTPs et l'affinité de la Taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Une migration électro-phorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille).Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. Ici, chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial (figure 8).

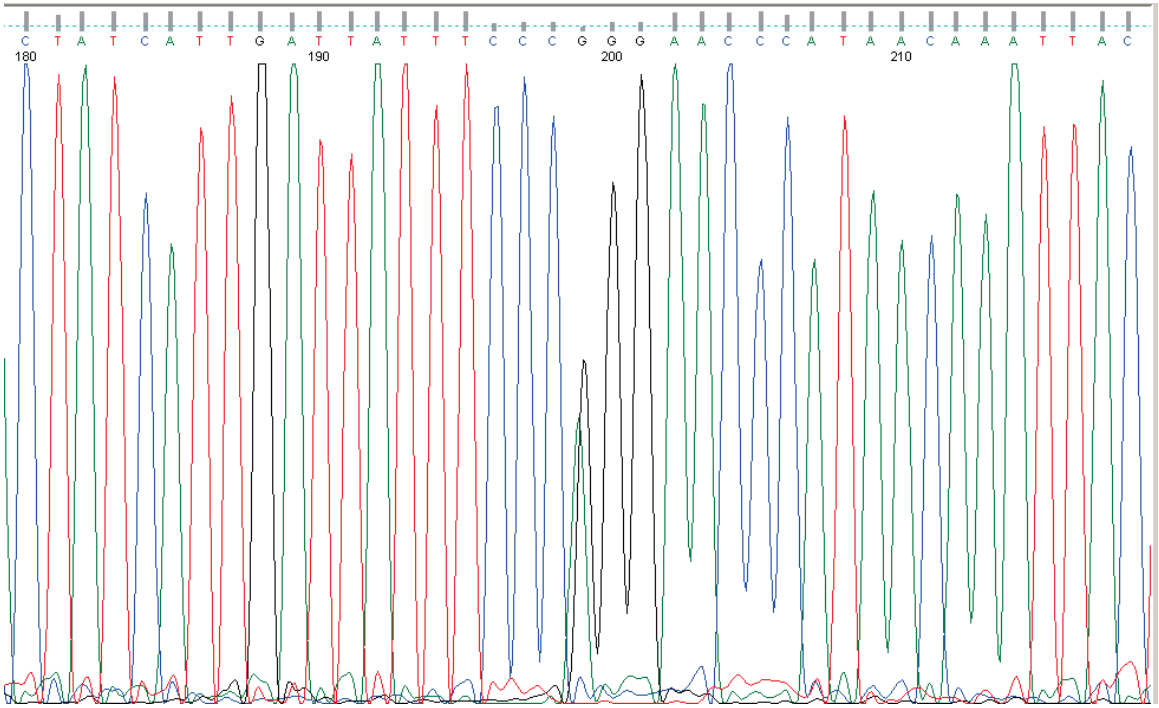



**Figure 8 Résultat de séquençage par méthode Sanger révélant une hétérozygotie G/A**

La technologie *Big Dye Terminator* (BDT issue Applied Biosystems® : ABI) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un *linker*. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé **fluorochrome donneur**, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de **fluorochrome accepteur** spécifique à chacun.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser et son énergie de fluorescence émise est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (Figure 9).

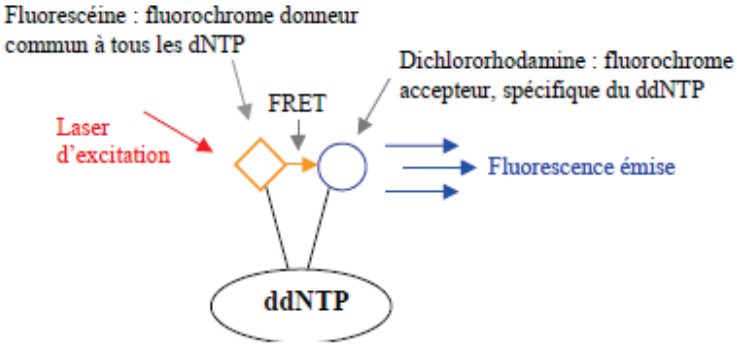



**Figure 9: Mécanisme de fluorescence par la technique de transfert d'énergie par résonnance.**

Un schéma des différentes étapes de la méthode de Sanger est proposé ci-dessous en figure 10.

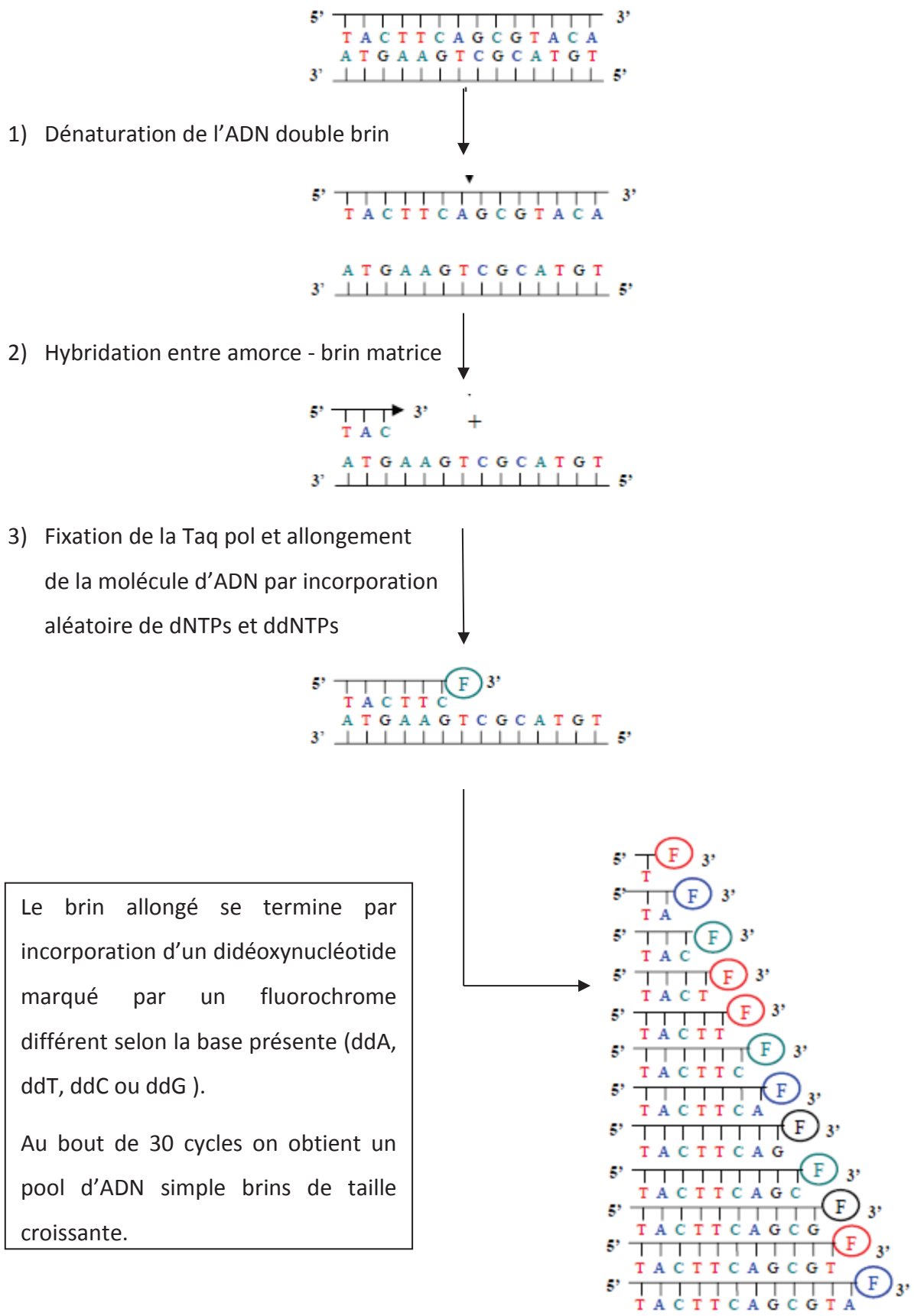



**Figure 10 Etapes de la méthode de Sanger adaptées à la technologie FRET.**

### 2.5.3 RT-PCR : *Real-Time* PCR selon la méthode TaqMan®

Comparativement à une PCR dite « traditionnelle » décrite précédemment, le principe et le milieu réactionnel sont similaires, on retrouve en plus **deux sondes** fluorescentes spécifique de la zone comprenant le SNP à identifier ; ainsi qu'un fluorochrome appelé « **ROX** » qui sert d'étalon interne.

La sonde est une courte séquence nucléotidique spécifique de la zone comprenant la mutation. Elle est composée d'un fluorochrome émetteur (*reporter*) en 5' (ex : FAM 6-carboxy-fluoresceine ou VIC) et d'un fluorochrome suppresseur (*quencher*) en 3' (ex : TAMRA 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Il existe une sonde pour l'allèle sauvage et une autre pour l'allèle muté. A l'état initial la sonde est intacte et ne possède pas de signal fluorescent car le reporteur n'émet pas dû à la présence du *quencher*.

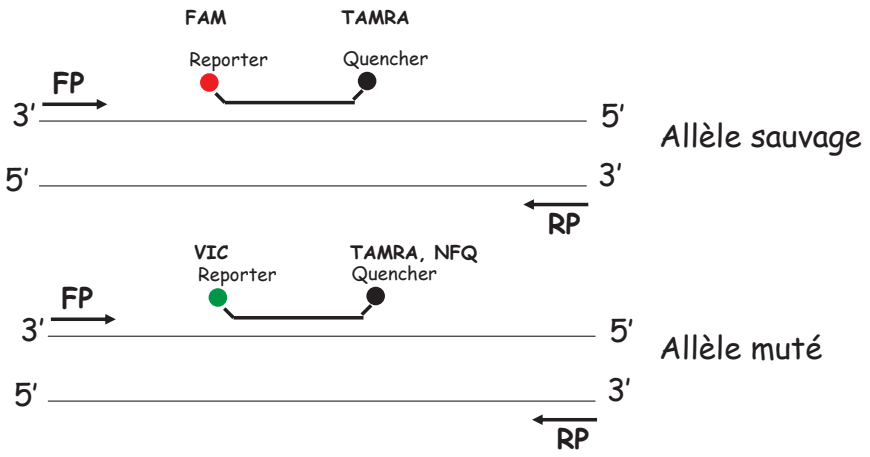



**Figure 11: Schéma des différents types de sondes**

Cette méthode de génotypage en temps réel repose sur deux principes :

- la technologie FRET (*vida supra*).
- l'activité 5'-exonucléase de la Taq Polymérase.

Lorsque l'on reprend à l'étape d'élongation ; la catalyse se fait grâce à la Taq polymérase. S'il y a présence de la sonde alors rentre en jeux l'activité 5' exonucléasique qui coupe la sonde permettant la libération du *reporter*. Ainsi lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un *reporter* émet de la fluorescence. La fluorescence est proportionnelle aux taux d'hydrolyse de la sonde hybridée donc à la quantité de produit d'amplification (Figure 12: Mécanisme d'émission de la fluorescence durant l'élongation).

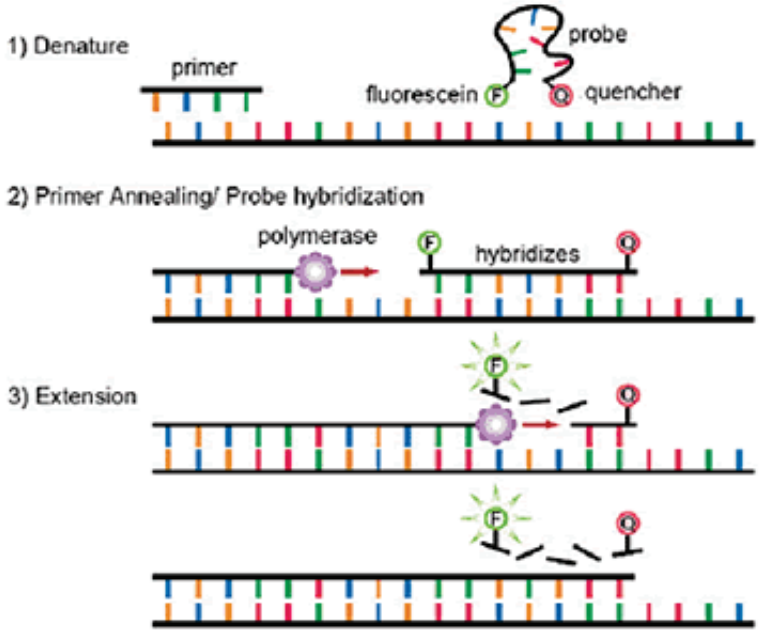



**Figure 12: Mécanisme d'émission de la fluorescence durant l'élongation**

Après l'étape finale de PCR, les produits sont dissociés lentement et les données relatives à la fluorescence sont recueillies. Le signal est proportionnel à la quantité d'amplicons et il est détecté "en temps réel". Les résultats sont exprimés grâce aux dérivées des courbes de fusion représentées par des pics de fluorescence dont le positionnement sur l'axe des abscisses correspond au Tm. Le Tm varie avec le ratio GC/AT et la taille de l'amplicon. Il est influencé par la concentration en sels (MgCl2) et la concentration en SYBR Green I.

Une courbe du suivi de la cinétique est proposée en figure 13.

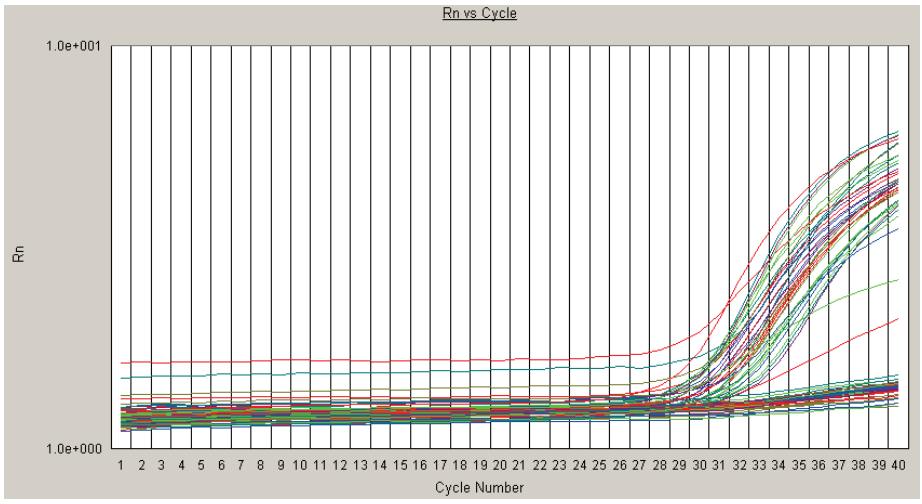



**Figure 13: Suivi en temps réel de l'évolution des cycles par mesure de fluorescence**

Puis selon la fluorescence émise (VIC ou FAM) on va pouvoir ainsi en déduire le génotype pour ensuite en extrapoler le phénotype correspondant. (Figure 14).

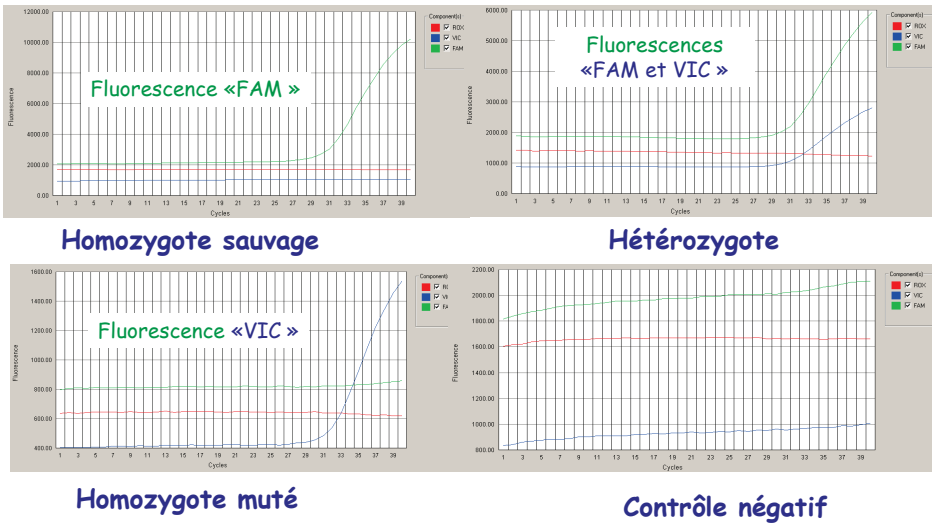



**Figure 14 Intensité de fluorescence en fonction des cycles d'amplifications**

Pour une lecture facilitée, des logiciels traitent les données pour donner un graphique de lecture en point final (Figure 15).

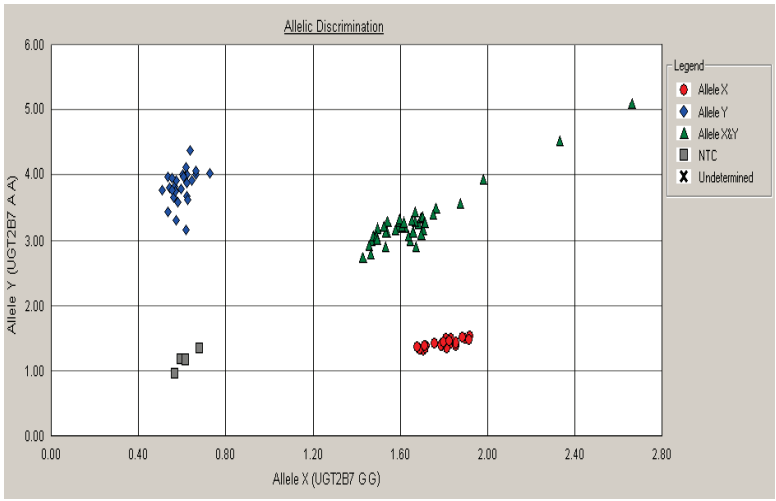



**Figure 15 Allèle X en fonction de l'allèle Y pour une lecture en point final**

Par rapport à une PCR « traditionnelle », une *RT*-PCR à l'avantage d'apporter une plus grande sécurité car les manipulations sont plus automatisées avec une intervention humaine moindre, on a alors un taux de contamination plus faible, notamment lors de l'amplification et de la détection où l'on se retrouve avec un système fermé dans lequel on a ces deux étapes sont simultanées et directement intégrées. De plus, la traçabilité est accrue grâce à des enregistrements automatisés. La qualité de la réponse est améliorée par la détection effectuée via un fluorochrome spécifique ce qui confère une grande reproductibilité. De plus le temps de l'analyse étant compris entre plusieurs dizaines de minutes et deux heures, ceci permet au final d'avoir un seuil de quantification plus bas, avec une meilleure qualité et dans des délais plus courts.

## 3. Principaux tests réalisables en pharmacogénétique et recommandations associées

Une conférence européenne sur la pharmacogénétique (San Feliu, Espagne, 2010) récente a permis de faire le point sur l'utilisation pratique de certains tests de pharmacogénétique[39]. L'objectif de cette partie est de mettre à la disposition du laboratoire des informations essentielles et relatives à chaque génotypage disponible, sous forme de fiches synthétiques. Ces fiches synthétiques permettront en pratique de retrouver facilement une information complète concernant chaque analyse qu'il s'agisse du personnel médical ou non. Pour cela et de manière à harmoniser les informations indiquées, pour chacune des fiches de génotypage un plan systématique reprend les données suivantes :

- Présentation du gène

- Justification de l'analyse pharmacogénétique

- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt

- Interprétation du résultat et conduite à tenir

- Aspects pratiques de l'analyse (modalités de prélèvement, …)

## 3.1 Test pharmacogénétique du gène IL-28B

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *IL28B*

Nom de la protéine associée : interleukine-28B, IL-28B

Noms alternatifs: cytokine Zcyto22, interféron lambda-3, IFN-lambda-3, interféron lambda-4, IFN-lambda-4, interleukine-28C, IL-28C.

**2- Propriétés et fonctions de la protéine**

C'est une protéine secrétée de 196 aa. L'interleukine-28B est une cytokine ayant une activité immuno-modulatrice, elle régule à la hausse l'expression antigénique du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I. Elle possède à la fois une puissante activité antivirale et également une activité anti-tumorale. C'est un ligand pour le récepteur hétérodimère à cytokine de classe II qui est composé de l'IL10RB et l'IL28RA. Le complexe ligand / récepteur semble être un signal à travers la voie JAK-STAT [1-2].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique de l'IL28B:**

Des polymorphismes du gène IL28B influencent la réponse à la bithérapie peg-Interféron / ribavirine chez les patients atteints d'hépatite C : mécanisme non encore clairement élucidé (hypothèse probable : gène muté codant pour une cytokine aux propriétés antivirales réduites ou mutation associée à une diminution de son expression). Test à visée prédictive de la réponse au traitement (*test a priori*) ou à visée explicative d'un échec thérapeutique (*a posteriori*).

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chromosome 19, 39 734 272- 39 735 611
- Longueur du gène : 1 340 bp
- Nombre d'Exons : 5 Nombre d'introns : 4
- N° de séquence : NM_172139.2

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

- rs12979860 C>T (localisé 3Kb en amont du gène IL28B)
- Nomenclature HGVS : NT_011109.16:g.12007005C>T
- MAF (Fréquence Allèlique Mineure): T=0.339. Soit : homozygote mutés = 11,5%, homozygotes n'ayant pas cette mutation = 43.7%, hétérozygotes = 44.8%.

La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 12979860 varie selon les populations : 0,24 chez les Occidentaux, 0,07 chez les Asiatiques et 0,65 chez les sujets d'origine Africaine.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

agcagctccgagcggtgcaggccgctgagcactgcctgggcgtccgcgatgccccgggccacgtggcggagccgagcgcaggactgcggggacgagagggcgttagagcgggc
cgcgcccgggccatgcctctcccgcccactcccgggcctcaccgatggccgcggagggatccctcctggggcggaaggagcagttgcgctgcccccagctcagcgcctcttcctcctg
cgggacaagcggcgcttatcgcatacggctaggccccctcgccagggcccctaacctctgcacagtctgggattcctggacgtggatgggtactggcagcgcacggtcgtgcctgtc
gtgtactgaaccagggagctccccgaaggcg**[C>T]**gaaccagggttgaattgcactccgcgctcccccagcaaagcccctcgccccgacctggagccgagtcctcccggcaggg
ctcccttctgtgattgaccctgagcctgcgttcgcgctgacgacggggactgcgggggtctcgtggtgggaattgtgggcgctgacataggagaggcgcctgctgggcgctaggacg
caggacccccttgggacaggaacgggtgtatgggaaccggtggggccagggtcccagggggcacaggggctgggcggtgacttacgtagcggtccctcagcgccttggcagccg
ccagcgtccggggctccagcgagcggtagtgcgagagcaggcagcgccgggggggccttctgcgatcaccgtgcacaggaccc

g = SNP rs181637919; A>G / c = SNP rs142981501; C>G / g = SNP rs117648444; A>G / c = SNP rs117436747; C>T

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression**

Non encore élucidé. Le rs12979860 semble être à l'origine d'une diminution de l'expression de la protéine IL28B et donc d'une diminution de la clairance virale spontanée ainsi que d'une modulation de la réponse au traitement.

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

Chez les patients présentant une infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) de génotype 1 et traités par bithérapie interféron pégylé - ribavirine:

- le génotype CC du rs12979860 est associé à une réponse antivirale prolongée de l'ordre de 80% alors que les génotypes TT et CT sont associés à des réponses de l'ordre de 30 à 40 % après 24 semaines de traitement [3].
- le génotype CC du rs12979860 est associé à une fréquence de clairance virale spontanée trois fois supérieure par rapport aux génotypes CT ou TT [4].

Des données récentes suggèrent également qu'au cours d'une infection chronique par le VHC de génotype 2 ou 3 traitée par l'association interféron pégylé - ribavirine, le génotype CC est associé à une réponse virologique prolongée supérieure à celle observée pour les génotypes CT ou TT [5].

Il convient chez les porteurs de l'allèle T, à l'état homozygote ou hétérozygote, de prévoir un traitement de 48 semaines ou de leur proposer une autre combinaison d'antiviraux (Trithérapie avec Boceprevir ou Telaprevir).

**V- Limites des analyses**

Le génotype rs12979860 de l'IL28B n'étant qu'un des facteurs prédictifs de réponse au traitement de l'infection par le VHC, le résultat de cette analyse est à interpréter en tenant compte des autres facteurs de réponse (génotype viral, charge virale, observance, variants rares, …).

**VI- En pratique**

**1- Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (CC, CT et TT) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : en l'absence de programme qualité externe disponible dans le commerce, participation à un échange inter-laboratoire d'ADN selon les modalités fixées par le groupe Pharmacogénétique de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT).

**2- Modalités de prélèvement :**

- Moment du prélèvement : avant ou après initiation du traitement anti-VHC
- Type de prélèvement : sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
- Acheminement: délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensables
- Info cliniques : prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement en cours ou envisagé, le contexte (réponse au traitement, rechute, …).

**Bibliographie :**

[1] Sheppard P. et al. *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R* ; Nat. Immunol. 4:63-68 (2003)
[2] Kotenko S.V., et al. *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*; Nat. Immunol. 4:69-77(2003)
[3] Ge et col. Nature 2009; 461:399-401
[4] Thomson et col., Gastroenterology 2010; 139:120-129
[5] Mangia et col., Gastroenterology 2010; 139:821-827

## 3.2 Test pharmacogénétique du gène CYP2C19

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *CYP2C19*
Nom de la protéine associée : Cytochrome P450 2C19
Noms alternatifs : limonène 6-mono oxygénase, CYPIIC19, cytochrome P450-11A, cytochrome P450-254C, méphénytoine 4-hydroxylase.

**2 - Propriétés / fonctions de la protéine**

Le CYP2C19 (490 aa) est une enzyme hépatique "clé" dans l'élimination de certains médicaments comme les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), de nombreux antidépresseurs, un anti-malarien (proguanil), le diazépam, le voriconazole ; ainsi que l'activation du clopidogrel [1] en son métabolite actif (liste de substrats in vitro: annexe 1). Il existe 3 principaux polymorphismes génétiques, le variant CYP2C19*2 qui est à l'origine d'une diminution d'activité de l'enzyme (phénotype métaboliseur lent), le variant CYP2C19*3 associé également à une réduction d'activité du CYP2C19 (principalement chez les sujets d'origine asiatique) et le variant CYP2C19*17qui engendre un phénotype métabolique de type ultra rapide [2].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP 2C19**

1) Patient allant nécessiter la pose d'un stent coronarien et recevoir du clopidogrel (test recommandé par la FDA). Test à visée prédictive de la réponse au clopidogrel ou à visée explicative d'une résistance au traitement.
2) Test à visée prédictive ou explicative d'une sur- ou sous-exposition au voriconazole. Suivre les concentrations circulantes chez les patients lents ou intermédiaires pour adaptation posologique.

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt du gène codant pour le cytochrome 2C19:**

**1- Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène : chromosome 10: 96 522 463- 96 612 671
- Longueur du gène :90,209 bp
- Nombre d'exons : 9 / Nombre d'introns : 8
- N° de séquence : NM_000769.1

**2- Détails des polymorphismes d'intérêt:**

**Identification des SNP:** CYP2C19*2 (rs4244285); CYP2C19*17 (rs12248560); CYP2C19*3 (rs4986893). Ce dernier est spécifique de la population asiatique, son génotypage est d'une pertinence moindre de par sa faible fréquence en Occident.

- CYP2C19*2

- rs4244285G>A
- Nomenclature HGVS: NT_030059.13:g.47346080G>A.
- MAF: A=0.199 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur A, selon l'étude « 1000 génomes »).

Soit : homozygotes mutés = 3.96 %, homozygotes sauvages = 64.16% et hétérozygotes = 31.87%.
La fréquence de l'allèle mineur "A" du rs 4244285 varie selon les populations: 0,15 chez les Occidentaux et les sujets d'origine africaine, 0,25 chez les sujets d'origine asiatique.

- CYP2C19*17

- rs12248560
- Nomenclature HGVS: NT_030059.13:g.47326121C>T
- MAF: T=0.152 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur T, selon l'étude « 1000 génomes »).

Soit : homozygotes mutés = 0.152 ² = 2.3 %, homozygotes sauvages = 71.9%, hétérozygotes = 25.8%.
La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 12248560 varie selon les populations: 0,23 chez les occidentaux, de l'ordre de 0,15 chez les Africains Américains et d'environ 0,04 chez les sujets d'origine Asiatique.

- CYP2C19*3

- rs4986893 G>A
- Nomenclature HGVS : NT_030059.13:g.47344874G>A
- MAF: A=0.014 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur A, selon l'étude « 1000 génomes »).

Soit : homozygotes mutés = 0.02 %, homozygotes sauvages = 97.2%, hétérozygotes = 2.7%.
La fréquence de l'allèle mineur "A" du rs 4986893 (spécifique des populations asiatiques) a une fréquence allèlique de 0,05.

**3- Séquences de référence** (pour les deux principaux variants en population occidentale)**:**

- CYP2C19*2: rs4244285

ataagtctaggaaatgattatcatctttgattctcttgtcagaattttctttctcaaatcttgtataatcagagaattactacacatgtacaataaaaatttccccatcaagatatacaat
atattttatttatatttatagttttaaattacaaccagagcttggcatattgtatctatacctttattaaatgcttttaatttaataaattattgttttctcttagATATGCAATAATTT
TCCCACTATCATTGATTATTTCCC**[G>A]**GGAACCCATAACAAATTACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATTTTGGAGAAAGTA
AAAGAACACCAAGAATCGATGGACATCAACAACCCTCGGGACTTTATTGATTGCTTCCTGATCAAAATGGAGAAGgtaaaatgttaacaaaagc
ttagttatgtgactgcttgcgtattt

- CYP2C19*17: rs12248560

ggagaactcttatttttctcatgagcatctctggggctgttttccttagataaataagtggttctatttaatgtgaagcctgttttatgaacaggatgaatgtggtatatattcagaata
actaatgtttggaagttgttttgttttgctaaaacaaagttttagcaaacgatttttttttcaaatttgtgtcttctgttctcaaag**[c>t]**atctctgatgtaagagataatgcgccacg
atgggcatcagaagacctcagctcaaatcccagttctgccagctatgagctgtgtggcaccaacaggtgtcctgttctcccagggtctccctttcccatttgaaatataaaaaataa
caattcctgccttcacgtgtttttttagggggttaaatggtaaaggtgtttatatctgctaaggtaatttacttgatatatgtttggttattgaagatatatgagttatgtta

**4- Conséquences des polymorphismes sur l'activité de la protéine et ou son niveau d'expression**

Le polymorphisme CYP2C19*3 est situé dans un site d'épissage alternatif et conduit à l'absence de détection de la protéine. Le polymorphisme CYP2C19*2 est associé à une diminution très importante de l'activité de la protéine. On distingue dans la population générale des métaboliseurs rapides (homozygotes sauvages,*1/*1), des métaboliseurs intermédiaires (hétérozygotes pour un variant allèlique, *1/*2 ou *1/*3) et des métaboliseurs lents (homozygotes mutés, *2/*2 ou *3/*3; ou doubles hétérozygotes, *2/*3 (extrêmement rare)).L'allèle CYP2C19*17, situé dans le promoteur conduit à une augmentation de l'expression du CYP2C19 et correspond à un phénotype de métaboliseur ultra-rapide (*1/*17 ou *17/*17, N.B. : fréquence de l'ordre de 30% en population occidentale). Aucune étude à ce jour, n'a les conséquences phénotypiques du génotype composite *2/*17.

**IV- Interprétation des résultats et conduite à tenir:**

Incidence clinique:

Les 3 polymorphismes CYP2C19*17, *2 et *3 sont très fonctionnels et permettent avec certains substrats de distinguer sur le plan pharmacocinétique les métaboliseurs rapides, intermédiaires et lents (en particulier pour l'oméprazole).
- la FDA a inséré dans les RCP du voriconazole une information indiquant que chez les métaboliseurs lents, le risque d'hépatotoxicité est 4 fois plus élevé.

- il semble que les patients métaboliseurs lents, homozygotes mutés (*2/*2 ou *2/*3 ou *3/*3) soient en partie résistants au clopidogrel du fait d'une absence d'activation métabolique du médicament prodroque.

Le rendu des résultats:

1) CYP2C19*1/*1: bon répondeur au clopidogrel;
   CYP2C19*1/*2: mauvais répondeur au clopidogrel, prescrire une autre molécule comme du prasugrel ou ticagrelor pour laquelle la voie CYP2C19 n'intervient pas;
   CYP2C19*2/*2: non répondeur au clopidogrel, prescrire une autre molécule comme du prasugrel ou ticagrelor pour laquelle la voie CYP2C19 n'intervient pas.

2) Voriconazole : chez les porteurs d'un variant allèlique, il convient de suivre les concentrations plasmatiques de voriconazole et d'adapter la posologie sur la base du génotype et des concentrations.

**V- Limites des analyses**

A signaler qu'il ne faut pas, en l'état actuel des connaissances augmenter les doses de clopidogrel chez les porteurs d'allèles délétères car d'une part hors AMM, d'autre part le traitement serait efficace chez les hétérozygotes selon certains auteurs (résultats controversés selon les critères de jugement considérés : agrégation plaquettaire est un critère de jugement intermédiaire (résultats négatifs) / la réponse clinique (rechute d'infarctus) semble positive chez ces patients. [3]
De plus, il faut tenir compte de la possibilité d'interactions avec des substrats du CYP2C19 (liste de substrat in vitro en annexe 1, effet inducteur/inhibiteur) : exemple des IPP qui entraînent une diminution du pouvoir anti-agrégeant du clopidogrel.

**VI- En pratique**

**1- Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 6 CIQ (rs 4244285 *1/*1, *1/*2, *2/*2; rs 12245860 *1/*1 *1/*17, *17/*17) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation à un programme international d'Evaluation externe de la qualité (ex : ECAT www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

**2- Modalités de prélèvement :**

- **Moment du prélèvement :** avant initiation du traitement pour le clopidogrel.
- **Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
- **Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
- **Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensables**
- **Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement en cours ou envisagé, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M et al.: *Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events*. N. Engl. J. Med. 360(4), 363–375 (2009).
[2] D. Suan, K. O'Connor, D. R. Booth, C. Liddle3 and G. J. Stewart : *Voriconazole toxicity related to polymorphisms in CYP2C19;* Internal Medicine Journal Volume 41, 364–365 (2011).
[3] Sibbing D, Stegherr J, Latz W et al.: *CYP450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention*. Eur. Heart J. 30(8), 916–922 (2009).

## 3.3 Test pharmacogénétique du gène CYP 3A5

**I - Présentation du gène**

**1 - noms du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *CYP3A5*
Nom de la protéine associée: cytochrome P450 3A5
Noms alternatifs: CYPIIIA5, cytochrome P450 HLp2, cytochrome P450-PCN3

**2 - Propriétés / fonctions de la protéine:**

Le CYP3A5 est une enzyme hépatique "clé" dans l'élimination de certains médicaments (liste de substrats in vitro: annexe 1). C'est une enzyme qui n'est exprimée que chez 10 à 30 % des individus d'origine occidentale en raison d'un polymorphisme dans l'intron 1 modulant l'expression du CYP3A5 par le biais d'un épissage alternatif. Le CYP3A5 est en revanche fonctionnel chez 80-90% des individus noirs africains. Ce polymorphisme contribue à une modification du métabolisme intestinal et hépatique de certains médicaments métabolisés par le CYP3A4. Des études cliniques ont montré l'influence de ce polymorphisme sur la posologie quotidienne nécessaire à une concentration à l'état d'équilibre dans la zone cible de certains immunosuppresseurs (ex : tacrolimus, sirolimus) [1].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP 3A5**

1) Il est destiné aux patients devant recevoir du tacrolimus ou du sirolimus dans un contexte de greffe rénale afin de définir la posologie nécessaire [2-3].
2) Dans le cas d'autres types de transplantation (pulmonaire ou cardiaque), il n'existe pas de recommandation posologique officielle sur la base du génotype. Cette analyse peut cependant être utile pour la compréhension des cas de sous-exposition au tacrolimus ou au sirolimus.

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt du gène CYP 3A5 codant pour la protéine cytochrome P450 3A5**

**1- Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène : chromosome 7, 99 245 818- 99 277 606
- longueur du gène: 31 789 bp
- Nombre d'Exons : 13 / Nombre d'introns : 12
- N° de séquence : NM_000777

**2- Polymorphismes d'intérêt:**

- rs 776746
- Nomenclature HGVS : NT_007933.15:g.37303382 C>T
- MAF: T=0.339 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur T, selon étude 1000 génomes). Soit : homozygote mutés = 11.5%, homozygotes sauvages = 43.7% et hétérozygotes = 44.8%. La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 776746 varie selon les populations de 5,8% chez les Caucasiens, 85% chez les Africains et 3% chez les sujets Asiatiques [4].

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

gagagcagtggatgaggtgcagtggtgtgtttgttcactagaagcaagtgggagaaagctttgcctctttgtacttcttcatcttctcccctcaagtcctcagaatccacagcgctgac
tgtggagtgctgtggagctggcatggcccatacaggcaacatgacttagtagacagatgacacagctctagatgtccatgggccccacaccaactgcccttgcagcatttagtcctt
gtgagcacttgatgatttacctgccttcaatttttcactgacctaatattctttttgataatgaagtattttaaacatataaaacattatggagagtggcataggagatacccacgtatg
taccacccagcttaacgaatgctctactgtcatttctaaccataatctctttaaagagctcttttgtctttca**[g>a]**tatctcttccctgtttggaccacattacccttcatcatatgaag
ccttgggtggctcctgtgtgagactcttgctgtgtgtcacaccctaatgaactagaacctaaggttgctgtgtgtcgtacaactaggggtatggattacataacataatgatcaaagtc
tggcttcctgggtgtggctccagctgcagaatcgggctagtgaagtttaatcagctccgttgtccccacacagAACGTATGAAGGTCAACTCCCTGTGCTGGCCATC
ACAGATCCCGACGTGATCAGAACAGTGCTAGTGAAAGAATGTTATTCTGTCTTCACAAATCGAAG

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et ou son niveau d'expression**

Le SNP du CYP3A5 (A6986G) est situé dans l'intron 3 du gène de CYP3A5 et entraîne un épissage alternatif conduisant à la formation d'une protéine tronquée. La présence de l'allèle CYP3A5*3 à l'état homozygote (GG ou CYP3A5*3 /*3) est associée à une absence d'expression de la protéine CYP3A5. A contrario, la présence d'un seul allèle CYP3A5*1 (homozygote sauvage, AA6986) a été associée à l'expression du CYP3A5, ainsi que pour les hétérozygotes qui ont une activité enzymatique (GA ou CYP3A5*1/*3) intermédiaire par rapport aux homozygotes CYP3A5*1 /*1 (AA).

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

Pour les patients qui ont bénéficié d'une transplantation rénale, le polymorphisme génétique du *CYP3A5* a montré un retentissement sur les concentrations de tacrolimus. A ce jour, plusieurs études cliniques indépendantes, ont montré que les sujets porteurs d'au moins un ou deux allèles CYP3A5*1 avaient une clairance d'élimination hépatique du tacrolimus plus importante [4-5]. A l'issu de l'analyse pharmacogénétique, le génotype *CYP3A5*, associé à une variabilité de l'activité enzymatique, peut justifier une augmentation importante des posologies quotidiennes de tacrolimus chez les patients expresseurs de l'enzyme [2]

**En pratique :** génotype CYP3A5*3/*3 = débuter le tacrolimus à 0,15 mg/Kg/j
génotype CYP3A5*3/*1 = débuter le tacrolimus à 0,20 mg/Kg/j
génotype CYP3A5*1/*1 = débuter le tacrolimus à 0,25 mg/Kg/j

**V- Limites des analyses**

Les suivi des concentrations sanguines de tacrolimus est indispensable et doit être utilisé conjointement avec les informations génétiques et cliniques pour guider la posologie.

**VI- En pratique**

**1- Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (rs 776746 *1/*1, *1/*3, *3/*3) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation à un échange d'ADN interlaboratoires en l'absence de programme international d'EEQ ECAT (www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

**2- Modalités de prélèvement :**

**- Moment du prélèvement :** avant initiation du traitement chez les patients transplantés rénaux.
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet).
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement en cours ou envisagé, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Thervet E, Loriot MA, Barbier S et al.: *Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing*. Clin. Pharmacol. Ther. 87(6), 721–726 (2010).
[2] Thervet E, et al. *Impact of cytochrome P450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients*. Transplantation,2003, 76, 1233-1235
[3] Becquemont et al, Pharmacogenomics, 2010
[4] Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B, Wang L. : *Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients.* Gene. 2013 Jan 10;512(2):226-31.
[5] Nicolas Picard, Koukeb Rouguieg-Malki, Nassim Kamar, Lionel Rostaing, Pierre Marquet: *CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients.* Transplantation. 2011 ; 91(6): 652–6.

## 3.4 Test pharmacogénétique du gène CYP2C9

**I - Présentation du gène**

**1- Nom du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *CYP2C9*
Nom de la protéine associée : cytochrome P450 2C9
Noms alternatifs : (R)-limonène 6-mono oxygénase, (S)-limonène 6-mono oxygénase, (S)-limonène 7-mono oxygénase, CYPIIC9, cytochrome P-450MP, cytochrome P450 MP-4, cytochrome P450 MP-8, cytochrome P450 PB-1, S-méphenytoine 4-hydroxylase

**2- Propriétés / fonctions de la protéine:**

Le CYP2C9 est une enzyme hépatique de phase I qui métabolise de nombreux médicaments (liste de substrats in vitro: annexe 1), parmi lesquels figurent les anticoagulants oraux (warfarine, acénocoumarol), les sulfamides hypoglycémiants, les anticonvulsivants (phénytoine), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac). Il existe 2 principaux polymorphismes génétiques à l'origine d'une diminution de l'activité enzymatique définissant l'existence de métaboliseurs lents (homozygotes mutés : *2/*2et *3/*3) ou « intermédiaires » (hétérozygotes *1/*2 et *1/*3) ou rapides (métaboliseurs « extensifs », homozygotes sauvage, *1/*1). Ces polymorphismes sont situés respectivement dans les exons 3 et 7 du gène et aboutissent à la production d'une protéine ayant une activité catalytique diminuée (respectivement 20% et 5% de l'activité normale pour les allèles CYP2C9*2 et CYP2C9*3). Les conséquences fonctionnelles sont donc surtout perceptibles avec le variant CYP2C9*3 [1-3].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP2C9**

Généralement indiqué pour les patients nécessitant un traitement anticoagulant par AVK (anti-vitamine K) ou en cas d'explication d'un surdosage aux AVK (INR> valeur cible), test conseillé par la FDA. Test également envisageable à visée explicative de cas de sur- ou sous-exposition d'autres substrats du CYP2C9 [4].

**III- Informations détaillées sur les séquences génétiques et les polymorphismes d'intérêt gène CYP 2C9 codant pour la protéine cytochrome P450 2C9:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène: chromosome10: 96 698 415- 96 749 148
- longueur du gène: 50 734 bp
- Nombre d'Exons: 9 / Nombre d'introns : 8
- N° de séquence: NM_000771

**2- Polymorphismes d'intérêts:**

**<u>Identification des SNP:</u>**

- CYP2C9*2 (rs 1799853; exon 3)

- rs 1799853 C>T
-Nomenclature HGVS : NT_030059.13:g.47506511C>T
- MAF: T=0.0682 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur T, selon Etude 1000 Genomes). Soit : homozygote mutés = 0.5%, homozygotes sauvages = 86.8%, hétérozygotes = 12.7%.

La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 1799853 varie selon les populations, la fréquence des métaboliseurs lents: Caucasiens (10%). L'allèle CYP2C9*2 est absent chez les Asiatiques et rare chez les Africains.

- CYP2C9*3 (rs1057910; exon 7)

- rs1057910 A>C
- Nomenclature HGVS : NT_030059.13:g.47545517A>C
- MAF: C=0.043 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur C, selon Etude 1000 Génomes). Soit : homozygote mutés = 0.2%, homozygotes sauvages = 91.6%, hétérozygotes = 8.2%.

**3- Séquence de référence annotée pour les polymorphismes d'intérêts:**

- rs 1799853; exon 3:

tcgggcagagcttggcccatccacatggctgcccagtgtcagcttcctctttcttgcctgggatctccctcctagtttcgtttctcttcctgttagGAATTGTTTTCAGCAATGGA
AAGAAATGGAAGGAGATCCGGCGTTTCTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC**[C>T]**GTGTTC
AAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACCAAGGgtgggtgaccctactccatatcactgaccttactggactactatcttctctactgaca
ttcttggaaacatttcaggggtggccatatctttcattatgagtcctggttgttag

- rs1057910; exon 7:

CTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCGGAGCCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGC
TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC**[A>C]**TTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCCATGCAGTGACCTGTGACATTAAATTCAGAAACTA
TCTCATTCCCAAGgtaagtttgtttctcctacactgcaactccatgttttcgaagtccccaaattcatagtatcatttttaaacctctaccatcaccgggtgagagaagtgcataa
ctcatatgtatggcagtttaactggactttctcttgtttccagtttggggct

**4- Conséquences des polymorphismes sur l'activité de la protéine et/ou son niveau d'expression:**

Il existe une bonne corrélation génotype-phénotype pour le CYP2C9, se traduisant par une différence marquée principalement entre les métaboliseurs lents et les métaboliseurs rapides en termes de pharmacocinétique, ce qui a pour conséquence de diminuer la clairance des médicaments comme la warfarine. Des cas de surdosage aux médicaments substrats du CYP2C9 (type anti-vitamine K) sont généralement observés chez les métaboliseurs lents [4].

**IV- Interprétation des résultats et conduite à tenir:**

Adaptation de posologie en fonction du génotype CYP2C9 (diminution des doses chez les métaboliseurs lents) ou explication d'un cas de surdosage aux anticoagulants oraux (warfarine, acénocoumarol,…). De façon intéressante, la fluindione n'est pas concernée par ce test car non substrat du CYP2C19, elle est cependant soumise à des variabilités de réponse d'ordre génétique impliquant sa cible pharmacologique (cf. chapitre 3.5 : VKORC1). Pour les AVK substrats du CYP2C9, le génotype CYP2C9*3/*3 s'accompagne d'une diminution d'environ 40-80% de la posologie et les hétérozygotes (CYP2C9*1/*3) d'une diminution de 20-40% de la posologie. Le génotype CYP2C9*2 ne fait pas l'objet de recommandations d'adaptation posologique et celle-ci doit tenir compte de la réponse clinique et biologique (INR, saignements, thromboses…). Dans tous les cas, il est conseillé de coupler le génotypage CYP2C9 à l'analyse du génotype VKORC1 (cf. chapitre 3.5) [5-6].

**V- Limites des analyses**

Dans le cas d'une recherche d'hypersensibilité aux AVK, il est préférable de combiner le génotypage *VKORC1* et *CYP2C9* avec des facteurs cliniques pour avoir la meilleure prédiction de la dose de warfarine à l'état d'équilibre. Après le premier INR, il est possible à partir des génotypes VKORC1 et CYP2C9 d'adapter au mieux la posologie de warfarine en consultant le site d'adaptation posologique www.warfarindosing.org ou au moyen du tableau ci-dessous [7].

**Corrélation entre la posologie de warfarine et les génotypages VKORC1 et CYP 2C9 (variants allèliques *1, *2 et *3) [8]:**

| ***VKORC1*** | ***CYP2C9*** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***(-1639G>A)*** | ****1/*1*** | ****1/*2*** | ****1/*3*** | ****2/*2*** | ****2/*3*** | ****3/*3*** |
| **GG** | 5-7 mg | 5-7 mg | 3-4 mg | 3-4 mg | 3-4 mg | 0,5-2 mg |
| **GA** | 5-7 mg | 3-4 mg | 3-4 mg | 3-4 mg | 0,5-2 mg | 0,5-2 mg |
| **AA** | 3-4 mg | 3-4 mg | 0,5-2 mg | 0,5-2 mg | 0,5-2 mg | 0,5-2 mg |

## VI- En pratique

### 1- Contrôles de qualité

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 6 CIQ ( rs 1799853 *1/*1, *1/*2, *2/*2; rs1057910 *1/*1 *1/*3, *3/*3) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation à un programme international d'Evaluation externe de la qualité (ex : ECAT www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

### 2- Modalités de prélèvement :

**- Moment du prélèvement :** avant initiation d'un traitement anticoagulant, ou après à visée explicative d'un surdosage
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement en cours ou envisagé, le contexte (réponse ou toxicité).

## Bibliographie :

[1] Wadelius M, Chen L, Lindh J et al. *The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting*. Blood 113, 784–792 (2009)
[2] International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB et al. : *Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data* . N. Engl. J. Med. 360(8), 753–764 (2009).
[3] Schwartz U, Ritchie M, Bradford Y et al. : *Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation* . N. Engl. J. Med. 358, 999–1008 (2008).
[4] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK: *Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications* . Lancet 353(9154), 717–719 (1999).
[5] Van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F et al. : *Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: The European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy (EU-PACT) trial design* . Pharmacogenomics 10(10), 1687–1695 (2009).
[6] Becquemont et al Pharmacogenomics, 2011
[5] Nicolas Picard, Koukeb Rouguieg-Malki, Nassim Kamar, Lionel Rostaing, Pierre Marquet: *CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients.* Transplantation. 2011 ; 91(6): 652–6.
[7] Gage BF et al. *Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin.*col Ther. 2008 Sep;84(3):326-31.
[8] http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/009218s108lbl.pdf

## 3.5 Test pharmacogénétique du gène VKORC1

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *VKORC1*
Nom de la protéine associée : Vitamine K époxyde réductase complexe sous unité 1.
Nom alternatif: Vitamine K1 2,3-époxyde réductase sous unité 1.

**2 - Propriétés et fonctions de la protéine:**

La vitamine K époxyde réductase (VKORC) est un enzyme du cycle de la vitamine K, la sous unité 1 correspond à la sous-unité catalytique de la vitamine K époxyde réductase qui réduit la vitamine K époxyde 2,3 inactive en vitamine K active, elle-même nécessaire à l'activation des facteurs de la coagulation « K-dépendant » (facteurs II, VII, IX et X). Cette enzyme constitue la cible pharmacologique des médicaments antagonistes de la vitamine K (AVK), utilisés comme anticoagulants oraux (warfarine, acénocoumarol, fluindione). Le gène VKORC1 comprend 3 exons et code pour une protéine de 163 acides aminés [1].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du gène VKORC1:**

Les AVK constituent une cause majeure d'intoxication iatrogénique avec plusieurs milliers d'hospitalisations pour hémorragies induites par les AVK chaque année en France. Ce génotypage est indiqué dans la prévention des risques hémorragiques sous AVK, l'explication de certains surdosages en AVK, ainsi que l'adaptation posologique personnalisée:

- avant la mise sous traitement par AVK / à visée prédictive d'une résistance ou une hypersensibilité au traitement AVK: adaptation de la posologie de l'AVK à élaborer selon un algorithme comprenant également le génotypage du CYP2C9 (cf. chapitre 3.4 et tableau ci-dessus).
- après un surdosage en AVK lors de l'initiation du traitement : à visée explicative, en co-prescription d'un génotype CYP2C9
- patient résistant aux AVK : séquençage complet du gène à visée explicative [2].

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chromosome16: 31 102 175- 31 106 276
- Longueur du gène : 4 102 bp
- Nombre d'Exons : 3 / Nombre d'introns : 2
- N° de séquence : NM_024006.4

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

- rs9934438 c>t (localisé 1639 bp en amont du gène VKORC1), région 5'non codante, en déséquilibre de liaison complet avec 1173C>T rs17878363 (qui est généralement préféré en pratique pour la détection du SNP d'intérêt du fait de ce mode de transmission commun).
- Nomenclature HGVS : NM_024006.4:c.174-136C>T
- MAF: t=0.467 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur a, selon étude 1000 génomes). Soit : homozygote mutés = 21.8%, homozygotes sauvages = 28.4%, hétérozygotes = 49.8%.

La fréquence de l'allèle mineur "t" du rs9923231varie selon les populations : caucasiens 42%; asiatiques 90%, africains: 15%.

**3- Séquence de référence annotée pour les polymorphismes d'intérêt:**

- rs9934438

agatgaaaagcagggcctacggagtagccacgtccgggcctggtctggggagaggggaggatagggtcagtgacatggaatcctgacgtggccaaaggtgcccggtgccagga
gatcatcgac**[c>t]**cttggactaggatgggaggtcggggaacagaggatagcccaggtggcttcttggaaatcacctttctcgggcagggtccaaggcactgggttgacagtccta

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression**

Un des SNP (rs9934438) se trouve dans le promoteur et est associé à une diminution de l'expression de la protéine, à l'origine de l'hypersensibilité aux AVK. De plus, certains SNP plus rares (rs72547528, rs104894539, rs104894540, rs104894541, rs104894542, rs61742245) conduisent à une modification de la conformation tridimensionnelle de la protéine associée à une résistance aux AVK [3-4]. Ces derniers ont une prévalence moindre, de ce fait leur détection repose sur un séquençage complet du gène VKORC1.

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

1) Avant introduction de l'AVK diminuer la posologie de warfarine de 25 % par allèle A (cf. 3.4):
   * génotype -1639GG dose normale (en moyenne 6mg/j de warfarine (Coumadine®)
   * génotype -1639GA dose réduite de 28% (4 à 4,5 mg/j de warfarine (Coumadine®)
   * génotype -1639AA dose réduite de 56% (3 mg/j de warfarine (Coumadine®)

Il est préférable de combiner le génotypage VKORC1 et CYP2C9 avec des facteurs cliniques pour avoir la meilleure prédiction possible de la dose de warfarine à l'état d'équilibre[5]. Après le premier INR, il est possible en connaissance des génotypes VKORC1 et CYP2C9 de mieux adapter la posologie de warfarine en consultant le site d'adaptation posologique www.warfarindosing.org

2) Explication de résistance aux AVK : mutations dans la zone codante du gène VKORC1[6].

**V- Limites des analyses:** Les recommandations sont les celles citées au chapitre 3.4.

**VI- En pratique**

**1-Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (-1639 GG, GA et AA)) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation à un programme international d'Evaluation externe de la qualité (ex : ECAT www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

**2-Modalités de prélèvement :**

**- Moment du prélèvement :** avant initiation du traitement anticoagulant ou en cas de résistance ou en cas de surdosage.
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le(s) gène(s) à génotyper, le traitement en cours ou envisagé, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Rost S et al. *Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2.* Nature 427:537-541(2004).
[2] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF et al. : *Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose* . N. Engl. J. Med. 352(22), 2285–2293 (2005).
[3] Li T., Chang C.-Y., Jin D.-Y., Lin P.-J., Khvorova A., Stafford D.W.*Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase*. Nature 427:541-544(2004).
[4] http://omim.org/allelicVariant/608547
[5] Gage BF et al. *Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin.*col Ther. 2008 Sep;84(3):326-31.
[6] Rost S et al. *Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin.* Thromb Haemost. 2005.

## 3.6 Test pharmacogénétique du gène TMPT

**I - Présentation du gène**

**1 - noms du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *TPMT*
Nom de la protéine associée: thiopurine S-methyltransferase.
Nom alternatif: thiopurine méthyltransférase.

**2 - Propriétés / fonctions de la protéine:**

La TPMT est une enzyme de phase II qui ajoute un radical méthyl à ses substrats (enzyme de conjugaison). On ne connaît pas de substrat endogène de TPMT et les 3 médicaments connus pour être méthylés par cette enzyme sont l'azathioprine, la 6-mercaptopurine et la thioguanine. La S-méthylation de ces 3 médicaments cytotoxiques conduit à leur inactivation. Ces médicaments sont utilisés comme anticancéreux dans le traitement de consolidation de certaines formes de leucémies aigues lymphocytaires de l'enfant, encore rarement comme immunosuppresseurs en transplantation rénale (azathioprine surtout) et plus fréquemment dans le traitement de maladies auto-immunes telles que la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, la poly arthrite rhumatoïde ainsi que des pathologies dermatologiques ou pneumologiques rares (certaines formes de dermatomyosites ou de sarcoïdoses). L'activité de la TPMT est directement mesurable dans les globules rouges (phénotypage) ou indirectement par dosage des métabolites actifs de l'azathioprine [1].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique de TPMT**

Il est démontré que les différences inter-individuelles dans la réponse aux médicaments thiopurines sont largement déterminées par le polymorphisme génétique de TPMT. Les déficits d'activité TPMT sont associés à une augmentation des toxicités hématologiques (neutropénies, pancytopénies) et nécessitent un ajustement posologique. Ce test est donc indiqué (1) a priori, avant la prescription d'azathioprine, 6-mercaptopurine ou thioguanine afin de dépister les sujets déficients à risque d'hémato toxicité ; (2) a posteriori, à visée explicative d'une toxicité imputée au traitement.

**III- Informations détaillées sur les séquences génétiques et les polymorphismes d'intérêt du gène TPMT codant pour la protéine thiopurine S-methyltransferase:**

**1- Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène : chromosome 6: 18 128 545- 18 155 374
- longueur du gène: 26 830 bp
- Nombre d'Exons : 9 / Nombre d'introns : 8
- N° de séquence : NM_000367

**2- Polymorphismes d'intérêt:**

<u>Identification des SNP:</u> il existe trois SNPs rs1800462 (variant allèlique: TPMT*2), rs1142345 (variant allèlique: TPMT*3C) et rs1800460(variant allèlique: TPMT*3B). Le variant allèlique TPMT*3A correspond à la présence simultanée de deux SNPs rs1800460 et rs 1142345. Ces SNPs permettent de détecter plus de 95% des sujets génétiquement déficients, bien que l'on connaisse environ 23 variants délétères au total mais dont la fréquence allèlique reste très faible (<<1%) [2].

- rs1800462

- Nomenclature HGVS :NT_007592.15:g.18083955C>G.
- MAF: G=0.004 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur G, selon l'étude 1000 génomes). Soit, homozygote mutés = 0.0016%, homozygotes sauvages = 99.2% et hétérozygotes = 0.8%.

- rs1142345

-Nomenclature HGVS :NT_007592.15:g.18070918T>C.
-MAF: C=0.0462 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur C, selon étude 1000 génomes). Soit, homozygote mutés = 0.2%, homozygotes sauvages = 91%, hétérozygotes = 8.7%.

- rs1800460

-Nomenclature HGVS :NT_007592.15:g.18079228C>T.
-MAF: C=0.0462 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur C, selon l'étude sur 1000 génome). Soit, homozygote mutés = $0.017^2$ = 0.03%, homozygotes sauvages = 96.6%, hétérozygotes = 3.3%.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

- rs1800462 (TPMT*2):

gtgagcacttgatgatttacctgccttcaatttttcactgacctaatattcttttgataatgaagtattttaaacatataaaacattatggagagtggcataggagatacccacgtatg
taccacccagcttaacgaatgctctactgtcatttctaaccataatctctttaaagagctcttttgtctttca**[g>a]**tatctcttccctgtttggaccacattacccttcatcatatgaag
ccttgggtggctcctgtgtgagactcttgctgtgtgtcacaccctaatgaactagaacctaaggttgctgtgtgtcgtacaactaggggtatggattacataacataatgatcaaagtc

- rs1142345 (TPMT*3C)

tttgagtatttttaaaagaatccctgatgtcattcttcatagtattttaacatgttactctttcttgtttcagGTAAAATATGCAATATACGTT
GTCTTGAGAAGGTTGATGCTTTTGAAGAACGACATAAAAGTTGGGGAATTGACTGTCTTTTTGAAAAGTTAT**[T>C]**TCTACTTACAGAAA
AGTAAATGAGACATAGATAAAATAAAATCACACTGACATGTTTTTGAGGAATTGAAAATTATGCTAAAGCCTGAAAATGTAATGGATGA

- rs1800460 (TPMT*3B)

tctccacacccaggtccacacattcctctaggaggaaacgcagacgtgagatcctaataccttgacgattgttgaagtaccagcatgcaccatgggggacgctgctcatcttcttaa
agatttgatttttctcccataaaatgtttttctctttctggtagGACAAATATTGGCAAATTTGACATGATTTGGGATAGAGGA**[C>T]**CATTAGTTGCCATC
AATCCAGGTGATCGCAAATGgtaagtaatttttctttttttgtttagctgtcttaatttttttagtatactatacttttctgggttctagaaaatcagcttagacttctatgagtttg

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et ou son niveau d'expression**

Les variations interindividuelles de la toxicité et de l'efficacité thérapeutique des médicaments thiopurines sont en partie expliquées par un polymorphisme génétique qui contrôle les niveaux d'activité TPMT. Ce polymorphisme génétique est tel qu'environ 90% des Caucasiens ont une activité TPMT « normale » (élevée), 10% ont une activité intermédiaire et 1 personne sur 300 présente un déficit associé à une faible activité. Le variant allèlique TPMT*3A est le seul allèle mutant que l'on retrouve dans les populations asiatiques Sud-ouest. C'est aussi l'allèle mutant le plus commun chez les Caucasiens mais il est absent dans la population chinoise. Tous les autres allèles mutants ont été identifiés dans la population chinoise, surtout l'allèle TPMT*3C. L'allèle TPMT*3C est présent à une faible fréquence chez les Caucasiens (sauf association à TPMT*3B). Ceci suggère que TPMT*3C est la plus ancienne mutation. Son association à l'allèle TPMT*3B est à l'origine de l'allèle TPMT*3A dans le Caucase et le Sud-ouest asiatiques. L'allèle TPMT*2 semble être le plus récent à ce jour, il a été détecté que chez les Caucasiens. Les origines ethniques semblent donc jouer un rôle important dans l'utilisation clinique de médicaments thiopurines [3-4].

On distingue au plan phénotypique : (1) des métaboliseurs lents : homozygotes mutés (*2/*2, *3A/3A, *3B/*3B, *3C/*3C) ou doubles hétérozygotes (*2/*3A, *2/*3B, *2/*3C, *3A/*3B, *3C/*3B ou *3A/*3C) soit 0,3% de la population ; (2) des métaboliseurs intermédiaires (hétérozygotes pour un variant allèlique (*1/*3B, *1/*2, *1/*3A ou *1/*3C), soit 10% de la population et (3) des métaboliseurs rapides (homozygotes sauvages, 90% de la population). Il existe une excellente corrélation entre phénotype et génotype. On peut donc soit génotyper (3 principaux variants) soit phénotyper (activité de la TPMT érythrocytaire) soit les 2.

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir:**
L'adaptation posologique se fera donc en fonction du génotypage TPMT, mais aussi de la molécule utilisée et de la pathologie:
- Chez les métaboliseurs lents (homozygote muté ou chez les doubles hétérozygotes), ne pas prescrire un des trois cytotoxiques et préférer un autre médicament.
- Chez les sujets hétérozygotes le risque d'hémato-toxicité est intermédiaire entre les métaboliseurs lents et rapides ; la conduite à tenir dépend de l'indication :
-en cas de consolidation de LAL de l'enfant, garder la dose normale mais surveiller plus fréquemment la numération globulaire : des études indiquent que si ces sujets font davantage de neutropénie, ils semblent présenter par ailleurs une meilleure réponse clinique, il ne faut donc pas baisser a priori la posologie. [5]
-en transplantation rénale, préférer l'acide mycophénolique à la place de l'azathioprine.
-en cas de maladie de Crohn, diminuer la posologie d'azathioprine de moitié et suivre phénotypiquement l'activité TMPT ainsi que la concentration du métabolite actif (6-TGN) afin d'ajuster la posologie.

**V- Limites des analyses:**
Le génotypage est un facteur de prédiction nécessaire et complémentaire au phénotypage, permettant d'écarter le risque d'aplasie médullaire chez les patients métaboliseurs lents. Le terrain physiopathologique est déterminant dans le choix de la prise en charge médicamenteuse.

**VI- En pratique**

**1-Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 6 CIQ minimum (selon disponibilité des variants à l'état homozygote compte tenu de leur fréquence): rs 1800462 *1/*1, *1/*2; rs1800460 *1/*1, *1/*3B; rs 1142345 *1/*1, *1/*3C. Les CIQ sont préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation au programme international d'EEQ ECAT (www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

**2-Modalités de prélèvement :**

**- Moment du prélèvement:** avant ou après l'initiation du traitement
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement prévu ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Peng Y. et al. *Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase*. Biochemistry 47:6216-6225(2008)
[2] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7172&chooseRs=all
[3] Evans WE et al. J Clin Oncol 2001; 19:2293-2301.
[4] Adam de Beaumais T, et al. Br J Clin Pharmacol. 2011;71:575-84.
[5 Stanulla M et al. *Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia.* JAMA. 2005 Mar 23;293(12):1485-9.

## 3.7 Test pharmacogénétique du gène SLCO1B1:

**I - Présentation du gène**

**1 - noms du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *SLCO1B1*
Nom de la protéine associée: "*solute carrier organic anion transporter*" membre de la famille 1B1
Noms alternatifs: LST1, OATP1B1, OATP2, OATPC, SLC21A6.

**2 - Propriétés / fonctions de la protéine:**

Le transporteur OATP1B1, codé par le gène *SLC01B1* est un transporteur hépatocytaire d'influx. Il est exprimé au pôle basolatéral de l'hépatocyte, il capte les fractions libres des médicaments au niveau des capillaires sanguins des médicaments pour les faire pénétrer dans l'hépatocyte. Son rôle dans la clairance hépatique de médicaments (simvastatine, pravastatine, pitavastatine, rosuvastatine, fexofenadine et repaglinide) a été récemment découvert du fait d'un polymorphisme génétique, la fluvastatine ne serait pas concernée par cette mutation [1,3-5].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du gène SLCO1B1:**

C'est un facteur de risques de myopathie et de rhabdomyolise chez les patients traités par statines (les patients SLC01B1*5/*5 ont 17 fois plus de risque de développer une myotoxicité sous statine versus patients porteurs du génotype sauvage) [2].

**III- Informations détaillées sur les séquences génétiques et les polymorphismes d'intérêt du gène** SLCO1B1 codant pour la protéine OATP1B1:

**1- Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène : chromosome 12: 21 284 128- 21 392 730.
- Longueur du gène: 108 603 bp.
- Nombre d'exons : 15 / Nombre d'introns : 14
- N° de séquence : NM_006446

**2- Polymorphismes d'intérêt:**

Le principal polymorphisme, du fait de sa traduction clinique, est l'allèle SCLO1B1*5 (c.521T>C ; Val174Ala) correspondant au rs4149056. De nombreux autres polymorphismes, dont l'allèle SCOLB1B1*1b (c.388A>G ; Asn130Asp ; rs2306283) ont été décrits plus ponctuellement et leur traduction clinique reste incertaine. Certains polymorphismes résultent de la combinaison d'allèles : l'allèle *15 est la combinaison du rs4149056 et du rs2306283 [3].

- rs4149056 (SLCO1B1*5)

- Nomenclature HGVS : NT_009714.17:g.14091673T>C
- MAF: T=0.123 (fréquence allèlique moyenne de l'allèle mineur T, selon étude 1000 génomes. Soit, homozygote mutés = 1.5%, homozygotes sauvages = 76.9%, hétérozygotes = 21.6%.

La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 776746 varie selon les populations de 5,8% chez les Caucasiens, 85% chez les Africains et 3% chez les sujets asiatiques.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

agaatggactaatacaccatattgtcaaagtttgcaaagtgaatataaattacttgtacttgtaaattaaaaaaaaataagtagaataattaagagtttacaagtagttaaatttgt
aatagaaatgctaaaattaatgtttaaaatgaaacactctcttatctacatagGTTGTTTAAAGGAATCTGGGTCATACATGTGGATATATG**[T>C]**GTTCATG
GGTAATATGCTTCGTGGAATAGGGGAGACTCCCATAGTACCATTGGGGCTTTCTTACATTGATGATTTCGCTAAAGAAGGACATTCTTCTT
TGTATTTAGgtaatgtacacaaaatattaaattgtatgatcactttccctttgtctacttttgaaatagtagagttactaaacttattattttacctattagaacatatatttgggtat
atgtattgtatcatatttcttttaaaaacatggtgaataagaaccatgcattcttggcatctagtaaaattgctttataatattttcagGTATATTGAATGCAATAGCAATGA
TTGGTCCAATCATTGGCTTTACCCTGGGATCTCTGTTTTCTAAAATGTACGTGGATATTGGATATGTAGATCTAAgtaagtacaaccaga

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine:**

Le polymorphisme conduit à la production d'une protéine peu fonctionnelle. Les sujets porteurs du variant SLCO1B1*5 présentent une moindre clairance hépatique des médicaments substrats et des concentrations plus élevées de pravastatine, rosuvastatine, atorvastatine, pitavastatine, fexofenadine et repaglinide. Cependant les modifications de concentrations plasmatiques des médicaments à index thérapeutique large ne justifient pas du dépistage des polymorphismes de ce gène dans l'état actuel des connaissances.

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

Chez les patients SLCO1B1*5/*5, il est préconisé d'utiliser la dose minimale de statine recommandée, il faut prévenir le patient d'arrêter le traitement immédiatement en cas de douleurs musculaires, avec une surveillance régulière des CPK, et dans la mesure du possible éviter une association à des médicaments inhibiteurs d'OATP1B1.Recommandation forte pour la FDA [4]

| Génotype rs 4149056 | Phénotype correspondant | Implications pour la simvastatine | Dosage recommandé pour la simvastatine |
|---|---|---|---|
| TT | Activité normal | Risque de myopathie normal | La FDA recommande pas le dosage de 80mg (sauf si déjà tolérée 12 mois). Prescrire la dose de départ souhaitée et ajuster les doses de simvastatine sur la base des guidelines spécifique de la maladie. |
| TC | Activité intermédiaire | Risque de myopathie intermédiaire | La FDA ne recommande pas le dosage de 80mg. Considérer une dose plus faible et si l'efficacité est insuffisante, envisager une autre statine. |
| CC | Faible activité | Risque de myopathie élevé | La FDA ne recommande pas le dosage de 80mg. Considérer une dose plus faible ou envisager une autre statine. |

**VI- En pratique**

**1-Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (CC, CT et TT) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : en l'absence de programme qualité externe disponible dans le commerce, participation à un échange inter-laboratoire d'ADN selon les modalités fixées par le groupe Pharmacogénétique de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT).

**2-Modalités de prélèvement :**

**- Moment du prélèvement:** avant ou après l'initiation du traitement
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement prévu ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Niemi M. et al. *Transporter pharmacogenetics and statin toxicity*. Clin. Pharmacol. Ther. 87(1), 130–133 (2010).
[2] Search Collaborative Group, Link E, Parish S et al.: *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy – a genomewide study*. N. Engl. J. Med. 359(8), 789–799 (2008).
[3] Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ: *SLCO1B1 polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin*. Clin. Pharmacol. Ther. 80(4), 356–366 (2006).
[4] Wilke RA. Et al. *The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy.*Clin Pharmacol Ther. 2012 Jul;92(1):112-7.
[5 Pasanen MK, et al. *Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin.* Clin. Pharmacol. Ther. 82(6), 726–733 (2007).

## 3.8 Test pharmacogénétique du gène UGT1A1:

**I - Présentation du gène**

**1 - noms du gène et de la protéine associée:**

Nom du gène : *UGT1A1*
Nom de la protéine associée: UDP-glucuronosyltransférase 1-1
Noms alternatifs: bilirubine-spécifique UDPGT isozyme 1, UDP-glucuronosyltransférase 1-A, UDP-glucuronosyltransférase 1A1.

**2 - Propriétés / fonctions de la protéine:**

L'UGT1A1 est un enzyme hépatique de phase II (enzyme de conjugaison) qui conjugue de nombreux médicaments à l'acide glucuronique. La bilirubine est son substrat endogène le plus connu. Les gènes spécifiques des 9 isoformes de la famille UGT1A sont formés par épissage alternatif de leur premier exon, alors que les exons 2 à 4 sont communs aux UGT de la famille UGT1, les 9 protéines différentes possèdent des extrémités C-term et N-term identiques. Les différents polymorphismes génétiques sont à l'origine d'un déficit partiel de l'activité UGT1A1, pouvant être la cause de l'hyperbilirubinémie néonatale transitoire familiale (HBLRTFN), à savoir que le lait maternel est un facteur déclenchant de la maladie chez les nourrissons ayant ce déficit enzymatique. Les mutations sont identiques à celles détectées chez les patients atteints du syndrome de Gilbert [1,2].
De nombreux médicaments sont éliminés par l'UGT1A1, l'exemple le plus classique est celui du métabolite actif de l'irinotécan (SN-38), il est utilisé dans la chimiothérapie du cancer du colorectal métastasique. Des études cliniques ont montré le rôle d'un déficit en UGT1A1 dans la survenue de toxicité sévère (neutropénie et/ou diarrhée de grade III ou IV) induite par l'irinotécan [4].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du gène UGT1A1:**

Ce test est indiqué dans le dépistage avant mise en route d'un traitement par irinotécan ou à visée explicative d'une toxicité sévère de grade III à IV.

**III- Informations détaillées sur les séquences génétiques et les polymorphismes d'intérêt du gène UGT1A1 codant pour la protéine UDP-glucuronosyltransférase 1-1:**

**1- Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence:**

- Position du gène : chromosome 2: 234 668 919-234 681 945
- longueur du gène: 13 027 bp.
- Nombre d'Exons : 5 / Nombre d'introns : 4
- N° de séquence : NM_000463.2

**2- Polymorphismes d'intérêt:**

Le variant allélique le plus fréquent est UGT1A1*28 et correspond à l'insertion de 2 pb TA dans la boîte TATA du gène. Cette région dupromoteur comporte normalement (allèle sauvage) 6 répétitions « TA ». Ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison avec le SNP T-3279G. Les sujets homozygotes pour l'allèle UGT1A1*28 représentent environ 17 % de la population caucasienne et 43 % des sujets sont hétérozygotes UGT1A1*1/*28 .

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

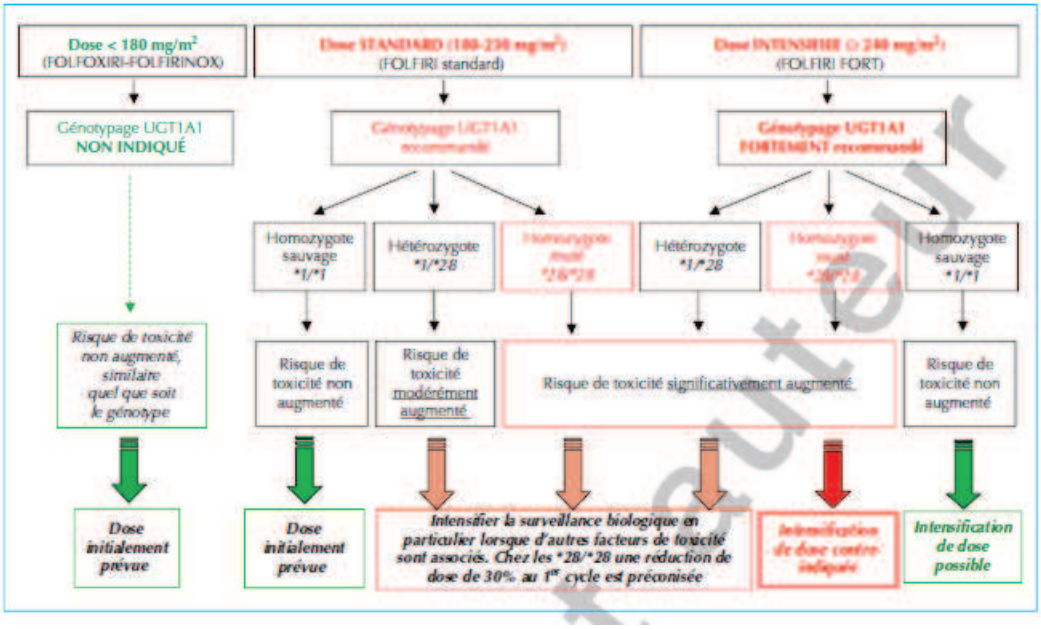
Aagcctaacttgttcactacatagtcgtccttcttcctctctggtaacacttgttggtctgtggaaatactaatttaatggatcctgaggttctggaagtactttgctgtgttcactcaag
aatgtgatttgagtatgaaattccagccagttcaactgttgttgcctattaagaaacctaataaagctccaccttctttatctctgaaagtgaactccctgctacctttgtggactgaca
gctttttatagtcacgtgacacagtcaaacattaacttggtgtatcgattggtttttgccatatatatatata**[insertion:ta]**taagtaggagagggcgaacctctggcAGGAG
CAAAGGCGCCATGGCTGTGGAGTCCCAGGGCGGACGCCCACTTGTCCTGGGCCTGCTGCTGTGTGTGCTGGGCCCAGTGGTGTCCCATG
CTGGGAAGATACTGTTGATCCCAGTGGATGGCAGCCACTGGCTGAGCATGCTTGGGGCCATCCAGCAGCTGCAGCAGAGGGGACATGA
AAT

### 4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine:

La présence de l'allèle UGT1A1*28 permet d'identifier les différents phénotypes correspondant à une activité de glucuronidation de la bilirubine (activité UGT1A1) diminuée. Les porteurs de ce variant allèlique présentent des concentrations circulantes supérieures de métabolite actif SN38. Des études de la pharmacocinétique de l'irinotécan ont montré des profils variables en fonction du génotype UGT1A1 : chez les patients homozygotes UGT1A1*28/*28 ont le plus de risques de développer des effets indésirables graves mais semblent également présenter les meilleurs résultats en terme de survie [5].

## IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir

La présence de l'allèle UGT1A1*28 à l'état homozygote expose à un risque accru d'effets indésirables graves de l'irinotécan. Cependant si les patients tolèrent la dose normale d'irinotécan, ils semblent avoir de meilleures réponses cliniques. Il faut donc se montrer prudent avant de proposer une adaptation posologique. En tout cas il ne faut pas augmenter les posologies d'irinotécan chez les patients de génotype UGT1A1*28/*28. Dans la crainte d'effet indésirable, reconsidérer le choix de l'irinotécan versus l'oxaliplatine dans la prise en charge du cancer du colon métastasé [4].
Un arbre décisionnel élaboré en 2014 par le Réseau National de Pharmacogénétique (RNPGx), résume les recommandations actuelles concernant le génotypage UGT1A1 :




## V- Limites des analyses

L'analyse génétique n'étant qu'un des facteurs prédictifs ou explicatifs des manifestations toxiques ou de l'efficacité thérapeutique de l'irinotécan, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des facteurs de réponse au traitement.

## VI- En pratique

### 1-Contrôles de qualité

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (CC, CT et TT) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : participation à un programme international d'Evaluation externe de la qualité (ex : ECAT www.ecat.nl) à raison d'une fréquence de 1 à 2/an.

**2-Modalités de prélèvement :**

**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement envisagé ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Maruo Y. et al. *Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene*. Pediatrics (2000).
[2] Aono S . et al. *Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome.* Lancet. 1995 Apr 15;345(8955):958-9.
[3] Ritter JK. Et al. *Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient.* J Clin Invest. 1992 Jul;90(1):150-5.
[4] Li M. et al. *Clinical significance of UGT1A1 gene polymorphisms on irinotecan-based regimens as the treatment in metastatic colorectal cancer.* Onco Targets Ther. 2014 Sep 23;7:1653-61.
[5] Toffoli G. et al. *The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol. 2006 Jul 1;24(19):3061-8.

## 3.9 Test pharmacogénétique du gène CYP1A2:

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *CYP1A2*
Nom de la protéine associée : cytochrome P450 1A2
Noms alternatifs: CYPIA2, cytochrome P(3)450, cytochrome P450 4, cytochrome P450-P3.

**2- Propriétés et fonctions de la protéine**

C'est une protéine composée de 515 aa. Le CYP 1A2 est une enzyme hépatique clé dans l'élimination de certains médicaments comme la théophylline, la tacrine, la tizanidine, l'olanzapine et l'antipsychotique clozapine (liste de substrats in vivo: annexe 1). Le CYP1A2 est inductible, en particulier par les produits inhalés de combustion de la cigarette mais également par les viandes grillées, les brocolis et les choux de Bruxelles. L'inductibilité du CYP1A2 est en grande partie conditionnée par un SNP C734A dans l'intron 1, dénommé CYP1A2*1F. Chez les fumeurs, les porteurs à l'état homozygotes ont une activité du CYP1A2 environ 40% plus élevée que chez les autres fumeurs.

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP 1A2:**

Applications encore limitées aux cas de résistances à la clozapine chez les psychotiques fumeurs en présence de concentrations plasmatiques basses inexpliquées [1].

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chromosome 15: 75 041 184- 75 048 941.
- Longueur du gène : 7 757 bp.
- Nombre d'Exons : 7 / Nombre d'introns : 6
- N° de séquence : NM_000761.3:c.-9-154C>A.

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

Le SNP CYP1A2*1F est situé dans l'intron 1 du CYP1A2:
- rs762551
- Nomenclature HGVS : NT_010194.17:g.45832474C>A
- MAF: C=0.3522/767. Soit : homozygote mutés = 12.4%, homozygotes sauvages = 41.6%, hétérozygotes = 45.4%.

La fréquence de l'allèle mineur "C" du rs 762551 varie selon les populations : le polymorphisme CYP1A2*1F est un SNP dont la fréquence allèlique est de 0,70 chez les Caucasiens et 0,65 chez les Asiatiques.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

gagaggatggggactcatccctggaggaggtgcccctcctggtattgataaagaatgccctggggagggggcatcacaggctatttgaaccagccctgggaccttggccacctcag
tgtcactgggtagggggaactcctggtcccttgggtatatggaaggtatcagcagaaagccagcactggcagggactctttggtacaatacccagcatgcatgctgtgccaggggc
tgacaagggtgctgtccttggcttccccattttggagtggtcacttgcctctactccagccccagaagtggaaactgagatgatgtgtggaggagagagccagcgttcatgttggga
atcttgaggctcctttccagctctcagattctgtgatgctcaaagggtgagctctgtgggc**[c>a]**caggacgcatggtagatggagcttagtctttctggtatccagctgggagccaa
gcacagaacacgcatcagtgtttatcaaatgactgaggaaatgaatgaatgaatgtctccatctcaaccctcagcctggtccctcctttttccctgcagTTGGTACAGATGGC
ATTGTCCCAGTCTGTTCCCTTCTCGGCCACAGAGCTTCTCCTGGCCTCTGCCATCTTCTGCCTGGTATTCTGGGTGCTCAA

### 4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression

La mutation du CYP1A2*1F dans l'intron 1, provoque une grande inductibilité du CYP1A2, c'est l'explication la plus probable de leur activité CYP1A2 ultrarapide. Les homozygotes pour l'allèle A chez les fumeurs ont une activité du CYP1A2 environ 40% plus élevée que chez les autres fumeurs, alors que l'on observe aucune conséquence chez les non-fumeurs.

## IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir

En ce qui concerne les homozygotes pour l'allèle *1F (CYP1A2*1F/CYP1A2*1F) : chez les patients fumeurs, ils présentent une activité métabolique du CYP1A2 élevée, pouvant expliquer un sous dosage plasmatique en clozapine. Dans ce cas une augmentation des doses est conseillée. Il n'y pas de différence significative chez les hétérozygotes.

## V- Limite de l'analyse

L'analyse génétique du *CYP1A2,* complémentaire du phénotypage (caféine), est un des facteurs explicatifs d'un sous dosage plasmatique en clozapine chez les fumeurs (homozygote *1F/*1F). Il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble du terrain physiopathologique et environnementale (interactions médicamenteuses) du patient pour déterminer le choix de la prise en charge médicamenteuse.

## VI- En pratique

### 1 - Contrôles de qualité

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (CC, CA et AA) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : absence de programme qualité externe disponible dans le commerce ou d'échanges interlaboratoire organisés..

### 2 - Modalités de prélèvement :

**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement envisagé ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

## Bibliographie :

[1] Eap CB, Bender S, Jaquenoud Sirot E, Cucchia G, Jonzier-Perey M, Baumann P, Allorge D, Broly F, *Non response to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene.* J Clin Psychopharmacol. 2004 Apr;24(2):214-9.
[2] Cheng WS, Murhy TL, Smith MT, et al. Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: relevance as a test of quantitative liver function. Clin Pharmacol Ther 1990; 47: 516–524.

## 3.10 Test pharmacogénétique du gène CYP2B6 :

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *CYP2B6*
Nom de la protéine associée : cytochrome P450 2B6
Noms alternatifs: 1,4-cineole 2-exo-monooxygenase, CYPIIB6, Cytochrome P450 IIB1.

**2- Propriétés et fonctions de la protéine**

C'est une protéine composée de 491 AA aa. Le CYP2B6 est une enzyme hépatique clé dans l'élimination de certains médicaments comme le cyclophosphamide, l'efavirenz, le bupropion, mais aussi des psychostimulants tels que l'ecstasy (liste de substrats in vitro: annexe 1). Il existe une large variabilité inter-individuelle dans l'expression de CYP2B6, dont l'origine est attribuée à des polymorphismes génétiques, qui serait responsable de différences dans la pharmacocinétique des médicaments substrats de ce cytochrome avec un risque de sous efficacité ou de toxicité. ). Il existe 2 polymorphismes génétiques à l'origine d'une diminution de l'activité enzymatique définissant l'existence de métaboliseurs lents (*6/*6 et *6/*26) [1].

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP2B6:**

Le génotypage du *CYP2B6*6* (rs 3745274) est actuellement indiqué dans la prise en charge de l'infection par le VIH avant l'introduction de l'efavirenz pour prévenir un risque de surdosage et de neurotoxicité.

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chromosome 19: 41 524 301 – 41 497 204.
- Longueur du gène : 27 097 bp.
- Nombre d'Exons : 9 / Nombre d'introns : 10
- N° de séquence : NM_000767.4:c.516 G>T

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

- rs 3745274
- Nomenclature HGVS : NT_011109.16:g.13781059 G>T
- MAF: T=0.268/583. Soit, homozygote mutés = 7.2%, homozygotes sauvages = 53.6%, hétérozygotes = 39.2%.

La fréquence de l'allèle mineur "T" du rs 3745274 varie selon les populations : fréquence allélique de 0,21 chez les occidentaux et 0,45 chez les patients d'origine africaine.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

Ggtgcagagtgagaaccggctgcatggactctatagctgtgttgcctgggtctaaatcctggcctcagtaatgagtagctgtgcaactttggtcaaattactcagcctctcggtctgc
ccatctataaactggagctaataatcaaattgcatctgcctcacattgttgtagtgagagttcaatggaattacgcgtgacgtgctggtacataattagctgttacggttattctcatgt
ttaccattactgagtgatggcagacaatcacacagagataggtgacagcctgatgttccccaggcacttcagtctgtgtccttgacctgctgcttcttcctagGGGCCCTCATGG
ACCCCACCTTCCTCTTCCA[G>T]TCCATTACCGCCAACATCATCTGCTCCATCGTCTTTGGAAAACGATTCCACTACCAAGATCAAGAGTTC
CTGAAGATGCTGAACTTGTTCTACCAGACTTTTTCACTCATCAGCTCTGTATTCGGCCAGgtcagggagacggagagggacagggggtgtgggggtga
ggtgaacacccagaacacacgagaaaaggatgacctgtcttgggggctcagaaatgcagcttatccttggaagaaacgcagacatgtgaagaatcagggacatggagacctgg
agggaggagagacggtgagacagggatagagacactgagagagagaatgaggcgtgatggggaggcagaaatagagtcagagagagactgagagaaggaagatgagcaaa
aacaagacaaagaagagcagaaatc.

### 4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression

Les conséquences fonctionnelles du SNP CYP2B6*6 (rs3745274) chez l'homme sont principalement sur la pharmacocinétique de l'efavirenz (EFV). De nombreuses études ont montré que le variant allèlique CYP2B6*6 (rs3745274) est associé à une augmentation des concentrations résiduelles plasmatiques d'EFV et une fréquence accrue d'effets indésirables neurologiques. De plus l'allongement de la demi-vie de l'EFZ chez les patients homozygotes *6/*6 entraîne un risque accrue de mutation du VIH [1].

## IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir

Chez les patients ayant le génotype homozygote CYP2B6*6/CYP2B6*6 ou hétérozygote CYP2B6*6/CYP2B6*26, le risque de surdosage et d'effet indésirable neurologique est significatif; il est recommandé de réduire la posologie de départ et de contrôler les concentrations résiduelles plasmatiques à l'état d'équilibre pour optimiser l'ajustement de posologie. En cas de dépassement du seuil de concentrations thérapeutiques, il faut arrêter l'EFZ avant les autres antirétroviraux pour limiter le risque de résistance du VIH à l'EFZ [1].

## VI- En pratique

### Contrôles de qualité

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ (GG, GT et TT) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : absence de programme qualité externe disponible dans le commerce ou d'échanges inter-laboratoires d'ADN organisés actuellement.

### Modalités de prélèvement :

**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement envisagé ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

## Bibliographie :

[1] Gatanaga H, et al. *Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26.* Clin Infect Dis. 2007 Nov 1;45(9):1230-7.

## 3.11 Test pharmacogénétique du gène DPYD:

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *DPYD*
Nom de la protéine associée : dihydropyriminidine déshydrogénase.
Noms alternatifs: dihydrothymine déshydrogénase, dihydrouracil déshydrogénase.

**2- Propriétés et fonctions de la protéine**

La DPYD est une enzyme hydroxylant des substrats endogènes (thymine et uracile) ainsi que des analogues médicamenteux cytotoxiques (5-fluorouracile (5-FU) et capécitabine (analogues de l'uracile)). La DYPD semble reliée à la toxicité du 5-FU ou ses dérivés qui peut être grave, voire mortelle (aplasie, diarrhée profuse, mucite).

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du DPYD:**

Avant l'initiation d'une chimiothérapie par 5-FU ou capécitabine pour détecter les patients à risque de toxicité grave. A l'heure actuelle les données ne permettent pas de recommander ce test génétique de façon systématique car des patients présentant le variant délétères n'ont pas tous une toxicité au 5-FU ou ses dérivés. La valeur prédictive positive du test pour prédire une toxicité grade 3 ou 4 est de 0,46. Il est donc difficile de proposer une réduction de posologie du 5-FU ou ses dérivés car une telle réduction permettant de diminuer les risques de toxicité pourrait également diminuer les chances de guérison du patient [1].

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chromosome 1: 97543300-98386615.
- Longueur du gène : 515 aa.
- Nombre d'Exons : 7 Nombre d'introns : 6
- N° de séquence : NM_000761.3:c.-9-154C>A.

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

<u>Identification des SNP:</u> De nombreux polymorphismes ont été identifiés. Le variant dont la fonctionnalité est bien établie et qui influence en partie la réponse au 5-FU est l'allèle DPYD*2A. Le SNP d'intérêt est situé dans un site d'épissage alternatif, il occasionne une délétion de 165 pb correspondant à l'exon 14 [1]. Deux autres SNP d'une fréquence moindre : *13 (exon 13) et rs67376798 (exon 22) sont également décrit chez les patients déficient [3].

- rs3918290 (DPYD*2A)

- Nomenclature HGVS : NM_000110.3:c.1905+1G>A
- MAF: a=0.0030/15. Soit : homozygote mutés = 0.0009%, homozygotes sauvages = 99.4%, hétérozygotes = 0.6%.

La fréquence de l'allèle mineur "a" du rs 762551 varie selon les populations : le polymorphisme DPYD*2A est un SNP dont la fréquence allèlique est de 1%.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

- rs3918290 (DPYD*2A)

taataaagattatagcttttctttgtcaaaaggagactcaatatctttactctttcatcagGACATTGTGACAAATGTTTCCCCCAGAATCATCCGGGGAACCACC
TCTGGCCCCATGTATGGCCCTGGACAAAGCTCCTTTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGAGAAAACGGCTGCATATTGGTGTCAAAGTGTC
ACTGAACTAAAGGCTGACTTTCCAGACAAC**[g>a]**taagtgtgatttaacatctaaaacaagagaattggcataagttggtgaatgtttatttaaacatccaattcata
ggcttataaatattaatgtgtatattttattaaagaatctgccagttgctttgctgatgcatagaaagataaaaaagaaagaaaagctcaagaactcataaaaacccacacaatgtg
aagctttgttataaatgggtgccatgta

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression:**

Les conséquences sont un trouble métabolique avec une grande variabilité phénotypique, allant de l'absence de symptômes jusqu'à des troubles convulsifs moteur et un retard mental. Ce trouble métabolique est caractérisé par l'excrétion urinaire persistant de quantités excessives de l'uracile, la thymine et 5 hydroxyméthyluracile. Les patients souffrant de ces mutations montrent une réaction sévère au médicament anticancéreux 5-fluorouracile. [1-2].

| Phénotypes possibles | Génotypes |
|---|---|
| Activité DPYD élevée | Homozygotes pour l'allèle sauvage( * 1 ). |
| Activité intermédiaire (~ 3-5% des patients); carence partielle en DPYD avec un risque de toxicité. | Hétérozygote pour l'un des variants allèliques non fonctionnel : *1/*13, *1/*2A ou *1/* rs67376798 |
| Activité déficiente DPYD complète (~ 0,2 % des patients) ; risque de toxicité accrue. | Homozygote muté : *2A/*2A; *13/*13; ou rs67376798/rs67376798 |

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

Selon le CPIC *Dosing Guidelines* pour les fluoropyrimidines (5 -fluorouracile , la capécitabine ou tégafur ) recommande l'utilisation d'un autre médicament pour les patients DPYD déficient, c'est à dire homozygotes pour 3 SNP : *2A ( rs3918290 ), *13 ou rs67376798. Pour les patients hétérozygotes, il faut envisager une réduction de 50 % de la dose de départ pour les patients hétérozygotes (activité intermédiaire).

| Phenotype (genotype) | Implications pour les mesures phénotypiques | Dosage recommandé | Niveau de recommendation |
|---|---|---|---|
| Homozygote sauvage ou activité DPYD élevé ou normal | Activité PDPYD normal | UtiliseR dosage recommandé | Modéré |
| Hétérozygote ou activité intérmédiaire | Diminution de l'activité de DPYD (de 30-70 % de l'activité normale) avec risques accrus voire mortelles (dérivés des fluoropyrimidines) | Réduction de 50 % de la dose de départ. | Modéré |
| Homozygote muté ou une activité déficiente DPYD complète | Risque accru, voire mortelles des médicaments (fluoropyrimidine) | Switch thérapeutique | Elevé |

**V- Limites des analyses**

La mesure de l'activité DYPD dans les leucocytes par des méthodes de phénotypage (ratio uracile/dihydrouracile) ne semble pas plus prédictive de la toxicité du 5-FU ou ses dérivés.

Enfin il n'existe pas d'étude ayant établi une adaptation posologique protocolaire de 5-FU ou de ses dérivés en fonction du génotype ou phénotype; permettant ainsi de diminuer la toxicité de ces cytotoxiques sans perte de chance de guérison pour le patient [2].

En l'absence d'études probantes sur l'adaptation de dose du 5-FU au génotype ou phénotype DYPD il est difficile de proposer ce test en dépistage systématique. Chez les porteurs du variant DPYD*2A ; une surveillance clinique et NFS rapprochée est nécessaire, cependant pour la toxicité digestive, elle ne permet pas d'anticiper sa survenue.

## VI- En pratique

### 1 - Contrôles de qualité

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de 3 CIQ pour le rs3918290 (DPYD*2A) (GG, GA et AA) préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : absence de programme qualité externe disponible dans le commerce ou d'échanges inter-laboratoires d'ADN organisés actuellement.

### 2 - Modalités de prélèvement :

**- Moment du prélèvement:** avant ou après l'initiation du traitement
**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement prévu ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Magné N, et al. *Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity.* Br J Clin Pharmacol. 2007 Aug;64(2):237-40.
[2] Schwab M, et al. *Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group.* J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2131-8.
[3] KE Caudle, et al. *Clinical Pharmacogenetics ImplementationConsortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and FluoropyrimidineDosing.* Nature publishing group.

## 3.12 Test pharmacogénétique du gène CYP2D6 :

**I - Présentation du gène**

**1 - Nom du gène et de la protéine associée**

Nom du gène : *CYP2D6*
Nom de la protéine associée : cytochrome P450 2D6
Noms alternatifs: CYPIID6 ; Cytochrome P450-DB1 ; Debrisoquine 4-hydroxylase.

**2- Propriétés et fonctions de la protéine**

Le CYP2D6 est un enzyme hépatique (497aa) clé dans l'élimination de certains médicaments comme les antidépresseurs, les neuroleptiques, des beta-bloquants, des opiacés, (liste de substrats in vitro: annexe 1). Le CYP2D6 participe à la synthèse du métabolite actif du tamoxifène.

**II - Justification de l'analyse pharmacogénétique du CYP2B6:**

Avant mise en route de la thioridazine afin d'exclure les métaboliseurs lents.
Chez les patients résistants à un antidépresseur : identifier les métaboliseurs ultra rapides.
Chez les patientes devant être traitées par tamoxifène : identifier les métaboliseurs lents.

**III- Informations détaillées sur la séquence génétique et les polymorphismes d'intérêt:**

**1-Position, longueur, nb d'exons et d'introns, n° séquence de référence :**

- Position du gène : chr22:42,522,501-42,526,883
- Longueur du gène : 4,383 bp.
- Nombre d'Exons : 9 / Nombre d'introns : 8
- N° de séquence : NM_001025161

**2- Polymorphisme d'intérêt:**

<u>Identification des SNP:</u> il existe de très nombreux polymorphismes du CYP2D6 (plus de 40). Afin d'identifier plus de 90% des métaboliseurs lents, 4 principaux allèles déficients sont recherché CYP2D6*3(rs35742686), CYP2D6*4 (rs3892097), CYP2D6*5 (délétion du gène donc pas un SNP ; de fréquence allèlique 0,03 chez les Occidentaux et 0,06 chez les Africains) et CYP2D6*6 (rs5030655) [3]. Deux SNP, CYP2D6*10 (rs1065852) et CYP2D6*41 (rs28371725) sont à l'origine d'une activité réduite [4]. Il convient également à prendre en compte que le gène du CYP2D6 peut être dupliqué (voir répliqué jusqu'à 13 copies) ce qui dans ce cas caractérise le phénotype de métaboliseur ultrarapide La fréquence des duplications (ou davantage de copies) est de l'ordre de 0,01 chez les Caucasiens et 0,02 chez les Africains) [1-2] .

- rs35742686 (CYP2D6*3)

- Nomenclature HGVS : NM_000106.5:c.775delA
- MAF: _= 0.0056/27. Soit : homozygote mutés = 0.003%, homozygotes sauvages = 98.8%, hétérozygotes = 1.1%.

La fréquence allélique du CYP2D6*3 est de 0,01 chez les Occidentaux et 0,001 chez les Africains.

- rs3892097 (CYP2D6*4)

- Nomenclature HGVS : NM_000106.5:c.506-1G>A
- MAF: A=0.0931/465. Soit : homozygote mutés = 0.9%, homozygotes sauvages = 82.3%, hétérozygotes = 16.9%.

L'allèle CYP2D6*4 de 0,20 chez les Occidentaux et 0,04 chez les Africains

- rs5030655 (CYP2D6*6)

- Nomenclature HGVS : NM_000106.5:c.454delT
- MAF: _= 0.0048/465. Soit : homozygote mutés = 0.002%, homozygotes sauvages = 99%, hétérozygotes = 0.9%.

L'allèle CYP2D6*6 de 0,01 chez les occidentaux et 0,005 chez les Africains.

**3- Séquence de référence annotée pour le polymorphisme d'intérêt:**

- rs45593132 (CYP2D6*3)

ctgagacttgtccaggtgaacgcagagcacaggagggattgagaccccgttctgtctggtgtagGTGCTGAATGCTGTCCCCGTCCTCCTGCATATCCCAGCGCT
GGCTGGCAAGGTCCTACGCTTCCAAAAGGCTTTCCTGACCCAGCTGGATGAGCTGCTAACTGAGCAC**[A>_]**GGATGACCTGGGACCCAG
CCCAGCCCCCCCGAGACCTGACTGAGGCCTTCCTGGCAGAGATGGAGAAGgtgagagtggctgccacggtgggggcaagggtggtgggttgagcgtccc
aggaggaatgaggggaggctgggcaaaaggttggaccagtgcatcacccggcgagccgcatctgggctgacaggtgcaga

- rs3892097 (CYP2D6*4)

cgcctgcctttgtgccgccttcgccaaccactccggtgggtgatgggcagaagggcacaaagcgggaactgggaaggcgggggacggggaaggcgacccccttacccgcatctccc
acccccca**[g>a]**GACGCCCCTTTCGCCCCAACGGTCTCTTGGACAAAGCCGTGAGCAACGTGATCGCCTCCCTCACCTGCGGGCGCCGCTTCG
AGTACGACGACCCTCGCTTCCTCAGGCTGCTGGACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGAGGAGTCGGGCTTTCTG

- rs5030655 (CYP2D6*6)

ggtgggcagagacgaggtggggcaaagccctgccccagccaagggagcaaggtggatgcacaaagagtgggccctgtgaccagctggacagagccagggactgcgggagacc
agggggagcatagggttggagtgggtggtggatggtggggctaatgccttcatggccacgcgcacgtgcccgtcccacccccaggggtgttcctggcgcgctatgggcccgcgtgg
cgcgagcagaggcgcttctccgtctccaccttgcgcaacttgggcctgggcaagaagtcgctggagcag**[t>_]**gggtgaccgaggaggccgcctgcctttgtgccgccttcgccaa
ccactccggtgggtgatgggcagaagggca

**4- Conséquence du polymorphisme sur l'activité de la protéine et de son niveau d'expression**

| Génotype | Variation | Conséquence | Activité enzymatique | Fréquence(Caucasien) |
|---|---|---|---|---|
| *1 | Aucune | - | Normale | - |
| *3 | 2549 delA | Protéine tronquée | Aucune | 2% |
| *4 | 1846 G>A | Défaut d'épissage | Aucune | 12-21% |
| *5 | Deletion (11,5Kb) | Délétion du gène | Aucune | 2-7% |
| *6 | 1707 delT | Protéine tronquée | Aucune | 1% |
| *10 | 100 C>T | $Pro^{34}Ser$ ; $Ser^{486}Thr$ | Diminuée | 1-2% |
| *41 | -1584G>C ; 2988 G>A | Défaut d'épissage | Diminuée | 10-20% |
| *1/2xN | Recombinaison | Amplification du gène | **Augmentée** | 1-10% |

Les allèles délétères conduisent soit à l'absence de protéine (délétion du gène ou épissage alternatif) soit une protéine dénuée d'activité. L'activité du CYP2D6 dans la population Occidentale peut se repartir schématiquement en 3 groupes :

1. les métaboliseurs lents (homozygotes pour des allèles délétères ou doubles hétérozygotes) qui représentent environ 7% des sujets Caucasiens.
2. les métaboliseurs rapides soit homozygotes sauvages, soit hétérozygotes pour des allèles délétères (on ne distingue pas aisément des métaboliseurs intermédiaires ni sur le plan phénotypiques ni sur le plan génotypique)
3. les métaboliseurs ultra rapides qui ont une duplication (ou davantage) du gène, qui représentent environ 1% des sujets Caucasiens et 3% des sujets Africains. La caractérisation du phénotype de métaboliseur ultrarapide (UM) n'est pas très claire car en comparant par phénotypage il est beaucoup plus difficile d'individualiser un groupe de sujet dont l'activité est nettement différente des métaboliseurs rapides.

Conséquence clinique du polymorphisme : (1) les métaboliseurs lents sont plus exposés aux effets indésirables de certains antidépresseurs et neuroleptiques et à risque d'inefficacité du tamoxifène, (2) les métaboliseurs ultrarapides sont plus résistants aux antidépresseurs.

**IV- Interprétation du résultat et conduite à tenir**

- Avant mise en route de la thioridazine : déconseiller l'utilisation chez les métaboliseurs lents
- Chez les patients résistants à un antidépresseur : si métaboliseur ultra rapide, vérifier que les concentrations plasmatiques sont basses et augmenter la posologie au delà des limites supérieures préconisées dans les RCP jusqu'à atteindre des concentrations circulantes normales.
- Chez les patientes traités par tamoxifène (cancer du sein à récepteur estrogène positif) : chez les métaboliseurs lents déconseiller l'emploi du tamoxifène (efficacité réduite) et préférer un inhibiteur d'aromatase [3].

**VI- En pratique**

**1 - Contrôles de qualité**

- CIQ : à chaque série d'analyse, passage de CIQ préalablement génotypés par une technique de référence (séquençage).
- CEQ : absence de programme qualité externe disponible dans le commerce ou d'échanges inter-laboratoires d'ADN organisés actuellement.

**2 - Modalités de prélèvement :**

**- Type de prélèvement :** sang total sur tube EDTA (bouchon Violet)
**- Acheminement:** délai maximum 48h à température ambiante, congelé si délai supérieur.
**- Consentement écrit signé du patient et du médecin prescripteur indispensable**
**- Info cliniques :** prescription médicale détaillée précisant le gène à génotyper, le traitement envisagé ou en cours, le contexte (réponse ou toxicité).

**Bibliographie :**

[1] Becquemont L, Alfirevic A, Amstutz U, Brauch H, Jacqz-Aigrain E, Laurent-Puig P, Molina MA, Niemi M, Schwab M, Somogyi AA, Thervet E, Maitland-van der Zee AH, van Kuilenburg AB, van Schaik RH, Verstuyft C, Wadelius M, Daly AK. *Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. 2011;12:113-24.
[2] Gaedigk A, etal. *The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype.* Clin Pharmacol Ther. 2008 Feb;83(2):234-42.
[3] Schroth W, et al. *Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes.* J Clin Oncol. 2007 Nov 20;25(33):5187-93.
[4] Qi Pei, et al. *Cytochrome P450 2D6*10 genotype affects the pharmacokinetics of dimemorfan in healthy Chinese subjects.* Eur J Drug Metab Pharmacokinet

# 4. Travaux personnels: Génotypage CYP2C19*2 et *17 au CHU de Rouen

## 4.1 Généralités

### 4.1.1 Présentation du voriconazole (VCZ) :

Le Voriconazole (VCZ) est un médicament antifongique à large spectre de la famille des triazolés. Il est indiqué depuis 2002 dans le traitement des fongémies sévères, en particulier les aspergilloses invasives[40].

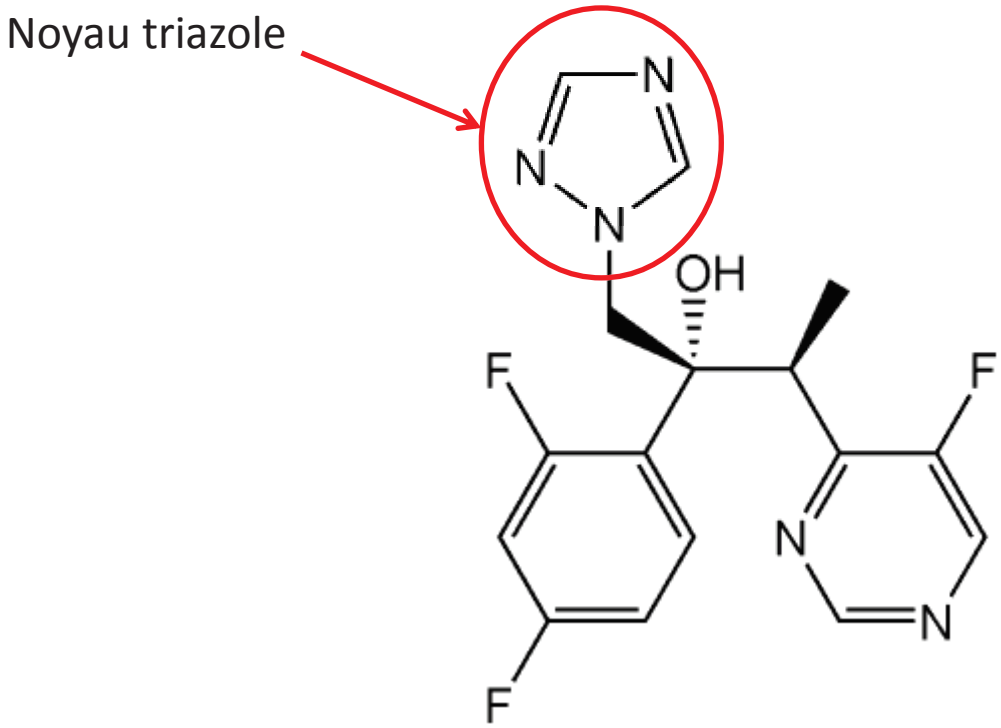



**Figure 16 Structure du voriconazole**

Le VCZ exerce son action anti-fongique sur la membrane cellulaire. Son activité thérapeutique est liée à l'inhibition de la conversion du lanostérol en ergostérol, composé spécifique des membranes fongique. L'inhibition de la 14-$\alpha$ lanostérol déméthylase est dépendante du CYP450 fongique, le voriconazole a montré une plus grande sélectivité pour les enzymes du cytochrome P450 fongiques que pour les autres systèmes enzymatiques du cytochrome P450 mammifères[41].

Le VCZ est utilisé principalement dans les infections fongiques invasives dont le dosage varie la voie d'administration. Il est important de constater que la posologie par voie orale indiquée dans les RCP du produit contrairement à la voie IV ne tient pas compte du poids du patient malgré une biodisponibilité orale proche de 100%.

**Tableau 1 Posologies de VCZ recommandées dans le RCP du produit**

| | Voie IV | Voie orale | |
|---|---|---|---|
| | | Patients > 40 kg | Patients < 40 kg |
| Dose de Charge | 6 mg / kg / 12 heures | 400 mg / 12 heures | 200 mg / 12 heures |
| Dose d'entretien | 4 mg / kg / 12 heures | 200 mg / 12 heures | 100 mg / 12 heures |

Afin d'assurer une bonne efficacité du traitement, un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est recommandé 3 à 5 jours après l'initiation du traitement pour vérifier que la posologie est adaptée au patient par voie IV et 5 à 7 jours lors d'un traitement par voie orale. L'utilisation d'une dose de charge est généralement recommandée à l'initiation du traitement et permet de réduire ce délai à 48-72h en accélérant l'obtention des concentrations à l'équilibre.

### 4.1.2 Présentation du CYP2C19

Le gène CYP2C19 appartient à la grande famille des cytochromes P450, de la famille 2, de la sous-famille C, du polypeptide 19. Il appartient au groupe de gènes des cytochromes P450 sur le chromosome 10q23.33. L'enzyme CYP2C19 contribue au métabolisme d'un grand nombre de médicaments et des catégories de médicaments tels que certains antidépresseurs[42], des benzodiazépines[43], méphénytoïne[44], les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) [45], le clopidogrel pro médicament antiplaquettaire[46], et le voriconazole[47]. Les variabilités interindividuelles phénotypiques de métabolisation des substrats du CYP2C19 sont fonctions à la fois des polymorphismes génétiques du CYP2C19 et de leur expression.

Pour rappel de la fiche CYP219 du chapitre 3, les génotypes corrélés aux phénotypes métaboliques sont décrit dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2 Relation génotype-phénotype du CYP2C19**

| Phénotype | Génotype du CYP2C19 |
|---|---|
| Métaboliseurs ultra rapide (MUR) | *1/*17, *17/*17 |
| Métaboliseurs rapide (MR) | *1/*1 |
| Métaboliseurs intermédiaire (MI) | *1/*2, *1/*3 |
| Métaboliseurs lents (ML) | *2/*2, *3/*3, *2/*3 |

### 4.1.3 Expression, régulation et interactions du CYP2C19

Le CYP2C19 est principalement exprimé dans le foie et, dans une moindre mesure, dans l'intestin grêle[48]. L'expression constitutive du CYP2C19 est principalement régie par les facteurs hépatiques nucléaires 4 alpha (HNF4alpha, HNF4A) et 3 gamma (HNF3gamma , FOXA3 ) [49]-[50] et l'activation de la transcription est régulée par les récepteurs nucléaire CAR (NR1I3), RPX (NR1I2), et GRalpha (NR3C1) [51]-[52]. Ces récepteurs sont inductibles aux hormones endogènes et à certains médicaments tels que la rifampicine[53]. En plus de la rifampicine, il y a d'autres médicaments qui induisent le CYP2C19, tel que le ritonavir, le nelfinavir, le millepertuis, la dexaméthasone[54]. Les femmes utilisant une contraception orale hormonale peuvent présenter une activité du CYP2C19 réduite, cela par le biais d'une down régulation[55].

Certains inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS, par exemple, la fluoxétine, fluvoxamine) [56] et les IPPs (par exemple, l'oméprazole et lansoprazole) [57]-[58]-[59] vont avoir un effet inhibiteur sur le CYP2C19, ce qui peut provoquer des interactions médicamenteuses lors de l'administration en concomitance de médicaments métabolisé par le CYP2C19. Par exemple, les premières études ont suggéré que l'oméprazole (IPP) diminue les effets antiplaquettaires, d'un point de vue pharmacodynamique, du clopidogrel et une augmentation des risques cardiovasculaires correspondants[60]. Cependant, il n'a pas encore été clairement identifié que les modifications de l'agrégation plaquettaire ex vivo soient cliniquement significatives en raison de l'administration concomitante d'oméprazole et de clopidogrel [61].

### 4.1.4 Intérêt clinique du génotypage CYP2C19

Un certain nombre de technologies de génotypage ont été mises au point pour identifier les variants alléliques du CYP2C19, notamment par CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), ces méthodes sont reconnues auprès des administrations légales.

Des sociétés savantes de pharmacogénétique ont également émis des recommandations au cours des dernières années : en particulier, le CPIC (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) ainsi que le DPWG (*Dutch Pharmacogenetics Working Group*). En outre, une récente revue de pharmacogénétique clinique fournit les recommandations posologiques pour le clopidogrel et d'autres médicaments métabolisés par le CYP2C19[50], dans une autre revue on retrouve les recommandations posologiques concernant les antidépresseurs métabolisés par le CYP2C19 et/ou le CYP2D6[63].

Une synthèse des recommandations concernant le clopidogrel ainsi que du voriconazole a été rédigée sous forme de tableau, cela en fonction du génotype et du phénotype associés, ainsi que des recommandations en vigueurs et du niveau de recommandation (pharmGKB.org consulté le 09/2013, Guidelines regarding the use of pharmacogenomic tests).

Le tableau ci-dessous regroupe les recommandations selon la DPWG qui a évalué l'impact du génotype CYP2C19 pour le voriconazole. Il préconise notamment, pour les métaboliseurs lents et intermédiaire du CYP2C19 de surveiller les concentrations plamsatiques de façon rapprochée.

**Tableau 3. Recommandations selon la DPWG qui a évalué les doses thérapeutiques pour le voriconazole en fonction du génotype du CYP2C19**

| Phénotype (génotype) | Dose thérapeutique recommandée | Niveau des recommandations |
|---|---|---|
| **ML:** *2/* 2, *2/*3, *3/*3. | Surveiller les concentrations sériques | Forte |
| **IM:** *1/*2, *1/*3, *17/*2, *17/*3 | Surveiller les concentrations sériques | Moyenne |
| **UM:** *17/*17 *1/*17 | Aucune | Moyenne |

Le tableau suivant résume les recommandations thérapeutiques selon le CPIC pour le clopidogrel basées sur le phénotype du CYP2C19. Les recommandations thérapeutiques mis à jour sont ciblées pour les patients atteints de syndromes coronariens aigus subissant une intervention coronarienne percutanée (SCA / ICP).

**Tableau 4 Recommandations thérapeutiques selon le CPIC pour le clopidogrel basées sur le phénotype du CYP2C19:**

| Phénotype susceptible | Génotypes | Implications pour le clopidogrel | Recommandations thérapeutiques | Niveau de recommannda tions |
|---|---|---|---|---|
| Métaboliseur ultra-rapide (UM) concerne 5-30% des patients. | *1/*17, *17/*17. | Augmentation de l'inhibition plaquettaire, une diminution de l'agrégation plaquettaire résiduelle. | Posologie et administration recommandé pour le clopidogrel.[1] | Forte |
| Métaboliseur rapide (EM) (~ 35-50% des patients). | *1/*1 | Inhibition plaquettaire normale, l'agrégation plaquettaire résiduelle normale | Posologie et administration recommandé pour le clopidogrel. | Forte |
| Métaboliseur intermédiaire (IM) (~ 18-45% des patients) | *1/*2, *1/*3, *2/*17. | Inhibition plaquettaire réduite, augmentation de l'agrégation plaquettaire résiduelle; risque accru d'événements cardiovasculaires indésirables | Un traitement alternatif antiplaquettaire (si aucune contre-indication), par exemple, le prasugrel, ou le ticagrelor. | Moyenne |
| Métaboliseurs lents (ML) (~ 2-15% des patients). | *2/*2, *2/*3, *3/3*. | Inhibition plaquettaire significativement réduite, augmentation de l'agrégation plaquettaire résiduelle; risque accru d'événements cardiovasculaires indésirables | Un traitement alternatif antiplaquettaire (si aucune contre-indication), par exemple, le prasugrel, ou le ticagrelor | Forte |
| [1] L'allèle CYP2C19 * 17 (rs12248560) peut être associée à un risque accru de saignement[i] | | | | |

## 4.2 Mise au point de l'analyse

### 4.2.1 Pré-requis pour le développement d'un génotypage

Pour que le génotypage soit possible et réalisable, que ce soit pour une RT-PCR ou un séquençage, il faut respecter certains critères physico-chimiques des réactifs (amorces, sondes et conditions de PCR).

Par ailleurs, la spécificité du test de RT-PCR doit être validée :

- La spécificité des séquences des couples d'amorces et de sondes de PCR vis à vis des zones d'ADN ciblées est vérifiée au moyen du système BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool)* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).
- Pour chaque série analytique, des contrôles internes de qualité (de chaque génotype existant : (rs 4244285 *1/*1, *1/*2, *2/*2; rs 12245860 *1/*1 *1/*17, *17/*17) sont analysés après validation préalable par séquençage Sanger.

Les trois figures suivantes représentent les résultats des séquences des génotypes possibles du *CYP2C19*2* (rs 4244285) *:* *1/*1, *1/*2, *2/*2.

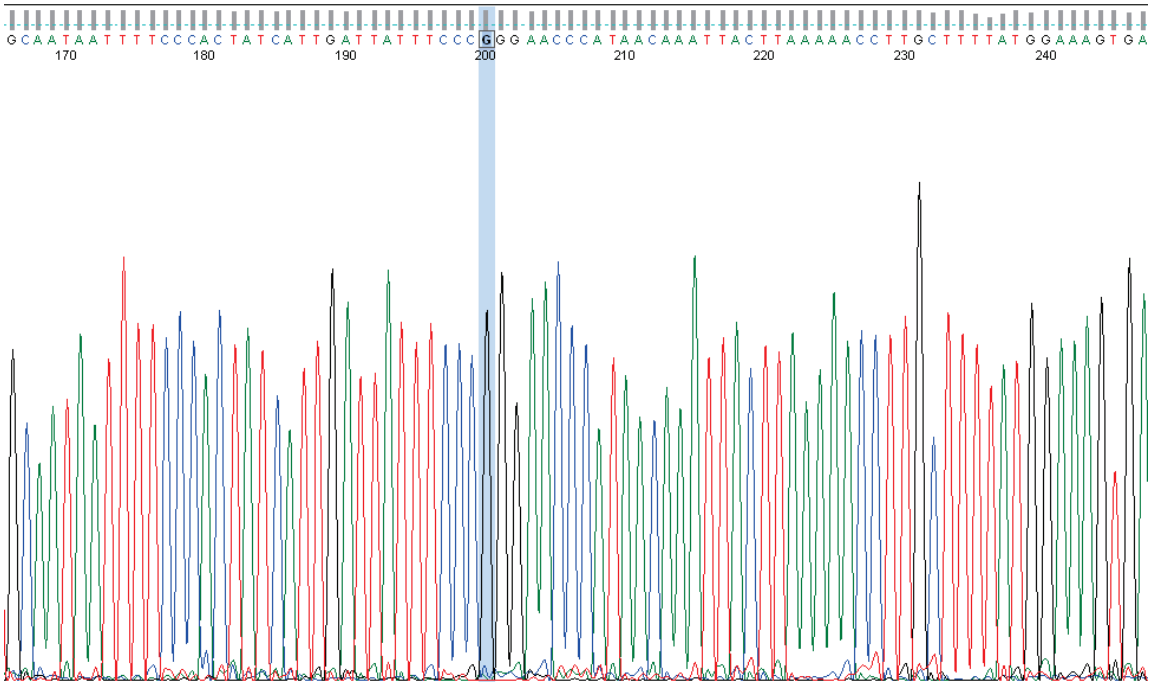



**Figure 17 Séquence homozygote sauvage: CYP2C19*2 CQ1F (GG)**

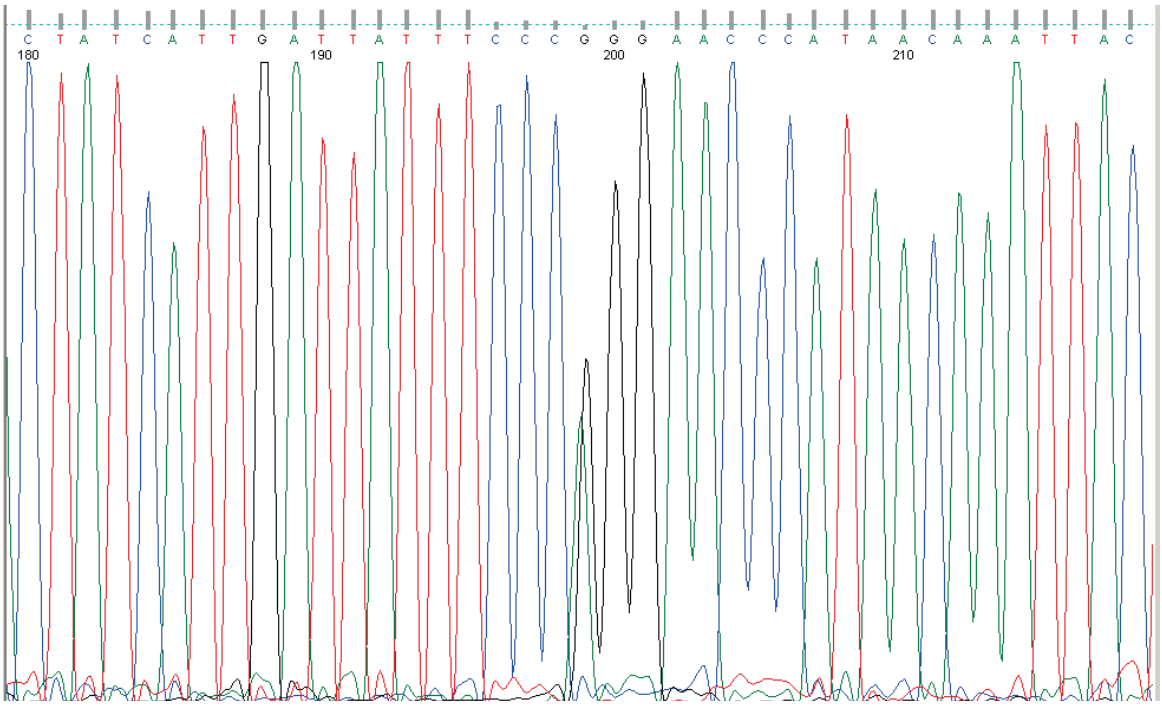



**Figure 18 Séquence hétérozygote: CYP2C19*2 CQ2F (GA)**

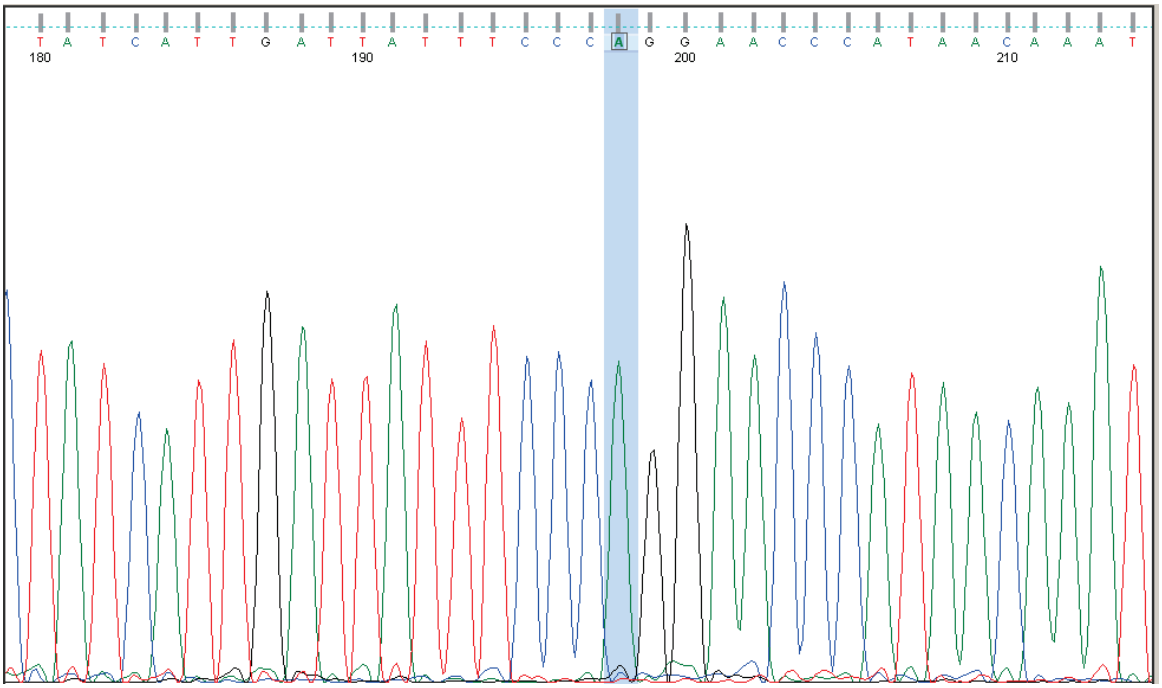



**Figure 19 Séquence homozygote muté: CYP2C19*2 CQ3F (AA)**

#### 4.2.1.1 RT-PCR TaqMan®

Le tableau ci-dessous résume les critères nécessaires ainsi que les conditions d'acceptabilités des amorces, des sondes et de l'amplicon pour la mise au point d'un génotypage par la technique RT-PCR TaqMan. Pour rappel le Tm est la température de fusion (Tm), c'est une valeur spécifique à une séquence nucléotidique. Elle correspond à la température optimale d'hybridation de chaque séquence et est fonction de sa longueur, des conditions du milieu, ainsi que du rapport en nucléotides AT/CG (GC%).

**Tableau 5 RT-PCR critères des sondes/amorces/amplicons**

<table>
<tr><th>Amorces</th><th>Sonde</th><th>Amplicon</th></tr>
<tr><td>Tm:<br>- compris entre 55 et 60°C<br>-pas plus de 2°C de différence entre les Tm des deux amorces.</td><td>Tm:<br>- compris entre 65 et 67°C<br>- doit être supérieur de 10°C par rapport au Tm des amorces</td><td rowspan="5">Idéalement doit être compris entre 50 et 150 bp mais peut aller jusqu'à 300 bp.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Le pourcentage de Guanine et de Cytosine doit être idéalement compris entre 40-60%, mais peut aller de 20-80%.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Longueur comprise entre 9 et 40 bp.</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Interactions<br>- absence d'interaction entre les amorces (cross dimere et spin hair),<br>- complémentarité spécifique entre l'amorce et la séquence d'ADN à génotyper.</td><td>Extrémité 5':<br>- Reporter,<br>- pas de Guanine car effet quencher<br>Extrémité 3':<br>- Quencher<br>Pas plus de 4 Guanines contigus</td></tr>
<tr><td>Pas plus de 4 Guanines contigus</td></tr>
<tr><td>Une proportion de Guanines inférieure à celle des Cytosines</td></tr>
</table>

#### 4.2.1.2 Séquençage

Le tableau ci-dessous résume les critères nécessaires ainsi que les conditions d'acceptabilités des amorces pour la validation d'un génotypage par séquençage.

**Tableau 6 Sanger: critères des amorces**

| Critères des amorces | Conditions d'acceptabilités |
|---|---|
| Interactions | - absence d'interaction entre les amorces (*cross dimere, homodimere* et *spin hair)*,<br>- complémentarité spécifique entre l'amorce et la séquence d'ADN à génotyper. |
| Tm | - doit être proche de 60°C,<br>- doit être proche ente les deux amorces. |
| GC% | - doit être compris entre 30 et 40%. |
| Longueur de la séquence | - doit être comprise entre 20 et 30 bases. |

### 4.2.2 RT-PCR TaqMan CYP2C19*2 et CYP2C19*17 :

Séquence annotée du SNP d'intérêt rs4244285 (chr10:96541416-96541816) et avec SNP (N):

**Séquence:** site UCSC genome browser, http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway (consulté le 09/13)

**Annotations:** Site NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4244285, (consulté le 09/13)

## CYP2C19*2 :

Séquence annotée :

<N>tttaataaatt<N>ttgttttctcttagATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTGATTAT<N>TCC<N>**[G/A]**GGAAC
CCATAACAAATTACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATTTTGGAGAAAGTAAAAGAACACCAAGAAT
CGATGGACATCAACAACCCTCGGGACTTTAT<N>GATTG<N>TTCCTGATCAAAATGGAGAAGg<N>

[G>A]: CYP2C19*2 (G>A) EXON 5 rs4244285

Amorces déterminées pour la réaction de PCR en temps réel TaqMan:

Brin sens: 5'-GATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTG-3'

Brin anti-sens: 3'- GGTGTTCTTTTACTTTCTCCAAAATATCAC-5'

(www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

Sondes pour RT-PCR TaqMan:

La séquence spécifique de la sonde pour l'allèle G est:

5'-FAM-TTATTTCCC**G**GGAACC-3'

La séquence spécifique de la sonde pour l'allèle A est:

5'-VIC-ATTATTTCCC**A**GGAACC-3'

## CYP2C19*17:

Pour la RT-PCR TaqMan *17 (rs12248560 C806T), nous utilisons au laboratoire un kit préconçu et fourni par la société Applied Biosystems® (ref Cat. # 4362691).

Les conditions de l'analyse de RT-PCR Taqman® sont identiques pour les allèles *2 et *17 et sont celles décrites dans le tableau ci-dessous. Elles sont déterminées par rapport aux recommandations et suivant les caractéristiques de l'appareil (ABI Prism 7000®).

**Tableau 7 Conditions de l'analyse de RT-PCR Taqman® CYP2C19 sur ABI Prism 7000®**

| | |
|---|---|
| **Phase 1:** dénaturation initiale | 94°C / 10 min |
| **Phase 2**: cycles PCR<br>- Etape 1 : Dénaturation<br>- Etape 2 : Elongation | 40 cyles<br>92°C 10 sec<br>60°c / 1min |
| Collection de données | Phase 2 / étape 2 |

## 4.3 Mise en application du génotypage CYP2C19 au CHU de Rouen après validation et analyse d'une série de patients traités par voriconazole.

### 4.3.1 Objectifs de l'étude et problématique associée au voriconazole

En pratique clinique, chez les patients atteint par une aspergilose invasive on observe une grande variabilité d'exposition au voriconazole (VCZ) ; son utilisation est limitée par une marge thérapeutique étroite et une variabilité interindividuelle significative. En effet, de nombreux patient présentent des concentrations plasmatiques toxiques ou sous-thérapeutiques (sous exposition malgré une bonne observance du traitement). Le Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) est particulièrement impliqué dans le métabolisme du VCZ. Cette variabilité de réponse est largement attribuée aux polymorphismes du CYP2C19. Cependant, la posologie indiquée dans les RCP du produit ne tient pas compte des polymorphismes du CYP2C19 (cf Tableau 1 Posologies de VCZ recommandées dans le RCP du produit) et contrairement à la voie d'administration IV il n'est pas mentionné de posologie en fonction du poids pour la forme orale.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier l'impact des polymorphismes CYP2C19*2 et *17 sur la dose nécessaire pour atteindre des concentrations thérapeutiques à l'équilibre.

### 4.3.2 Analyse d'une série de patients traités par voriconazole

Cette étude rétrospective porte sur les dossiers de patients traités par VCZ pour aspergillose invasive et génotypés pour le CYP2C19 depuis 2012 au sein du laboratoire de Pharmacologie du CHU de Rouen.

Les patients traités par VCZ au CHU de Rouen bénéficient d'un suivi thérapeutique systématisé, basé sur un suivi régulier de la concentration résiduelle de VCZ à l'équilibre et associé dans certains cas à une recherche des polymorphismes CYP2C19 *2 et/ou *17.

Au total, 190 concentrations résiduelles ont été mesurées entre 2012 et 2014, chez 63 patients dont 31 ont bénéficié d'un génotypage du CYP2C19.

## 4.4 Résultats

### 4.4.1 Populations

En fonction du génotype CYP2C19 obtenu pour chaque patient, nous avons étudié les doses nécessaires pour atteindre une concentration résiduelle dans l'intervalle thérapeutique de 1-5,5 µg/mL, tel que décrit précédemment dans la littérature [64] (Suan et al., 2011).

Sur les 190 concentrations résiduelles mesurées chez 63 patients, 68 étaient inférieures à 1 mg/L (soit 36% des cas inférieurs au seuil d'efficacité thérapeutique), 90 étaient comprises entre 1 et 5 mg/L et 32 étaient supérieurs à 5 mg/L (soit 17% des cas en zone toxique). Cette grande hétérogénéité de résultats reflète la variabilité d'exposition au VCZ et la proportion relativement faible de patients (<50%) qui atteignent les cibles thérapeutiques de 1 à 5 ng/µL largement admises au niveau international.

**Tableau 8 Caractéristiques des patients inclus et génotypés**

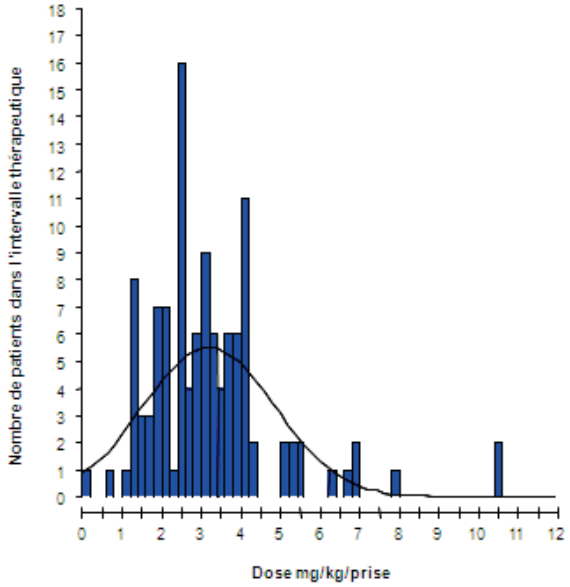
| Paramètres | *17/*17 | *17/*1 | *1/*1 | *1/*2 | *2/*2 |
|---|---|---|---|---|---|
| **n** | 3 | 12 | 11 | 5 | 1 |
| **Poids, kg** | 45 ± 9 | 62 ± 18 | 64 ± 14 | 60 ± 17 | 67 ± 0 |
| **Génotype, %** | 9.6 | 37.7 | 34.5 | 15.2 | 3 |
| **Dose / kg / 12 h** | 7.23 ± 0.80 | 3.45 ± 0.17 | 2.67 ± 0.31 | 3.32 ± 0.74 | 1.77 ± 0.41 |
| **C0 / Dose / kg / 12 h** | 0.33 ± 0.11 | 0.32 ± 0.32 | 1.43 ± 1.4 | 1.17 ± 0.62 | 2.07 ± 0.4 |

Dans la population étudiée, 9.6 % des individus étaient homozygotes pour le variant *17, 37.7 % étaient hétérozygotes *1/*17, 34.5 % était homozygotes sauvages, 15.2% étaient homozygotes *1/*2 et 3% étaient homozygotes mutés *2/*2.

### 4.4.2 Doses optimales de Voriconazole

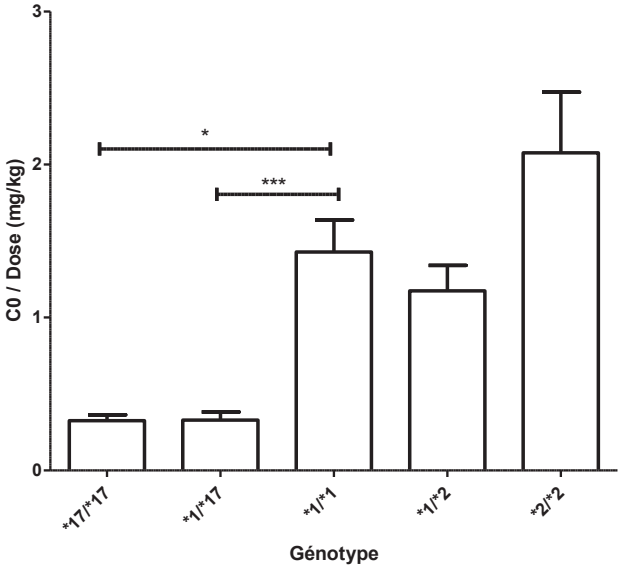
La figure ci-dessous est un histogramme de la distribution des doses par kilogramme de masse corporelle et par prise pour 90 dosages de VCZ situés dans l'intervalle thérapeutique. L'histogramme ainsi obtenu est comparé au profil « en cloche » d'une répartition gaussienne. Cette répartition diffère significativement de la répartition normale d'une distribution gaussienne. Elle permet de constater la grande variabilité des doses nécessaires en mg/kg de VCZ par voie orale pour atteindre les concentrations thérapeutiques.

**Tableau 9 Histogramme de distribution des doses / kg / prise sur 90 dosages de voriconazole dans l'intervalle thérapeutique.**



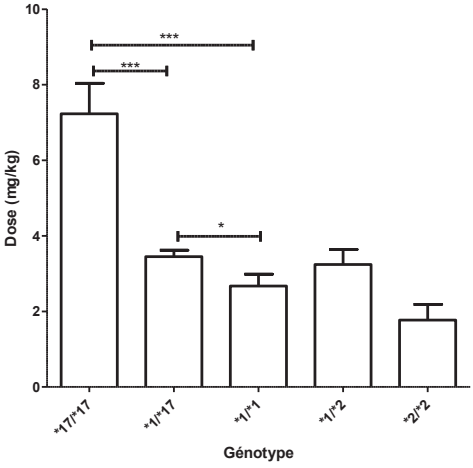

Par ailleurs, l'analyse des patients génotypés indique que le rapport C0/Dose, index d'exposition au VCZ, est corrélé avec le génotype du CYP2C19 pour les MUR (Figure 20). La moyenne du ratio C0/Dose était de 0.32, 0.33 et 1.27 pour les variants alléliques CYP2C19*17/*17, CYP2C19*17/*1, CYP2C19*1/*1, ($p<0.05$ et $p<0.001$ respectivement).

**Figure 20 Influence du génotype du CYP2C19 sur l'activité du cytochrome (c0/dose).**




Comme décrit dans la figure ci-dessous, la dose moyenne nécessaire pour atteindre une concentration résiduelle dans l'intervalle thérapeutique est significativement supérieure pour le CYP2C19*17/*17 et le CYP2C19*17/*1 comparée aux patients possédant le génotype sauvage, respectivement 7.23 mg/kg et 3.45 mg/kg *vs.* 2.67 mg/kg.

**Figure 21 Influence du génotype du CYP2C19 sur la dose nécessaire pour atteindre les cibles thérapeutiques.**



### 4.4.3 Discussion et conclusion

Les résultats de cette étude indiquent que les grandes variations inter-individuelles d'exposition au VCZ sont en grande partie attribuables aux polymorphismes génétiques du CYP2C19, en particulier l'allèle *17 qui confère un phénotype de métaboliseur ultra-rapide. Ces polymorphismes permettent d'expliquer des doses variant d'un facteur 12 d'un patient à l'autre pour obtenir des concentrations comparables. Les patients MUR, homozygotes ou hétérozygotes nécessitent des doses / kg / prise supérieures de VCZ et les patients ML homozygotes, une dose plus faible pour obtenir des concentrations plasmatiques comprises dans l'intervalle thérapeutique à l'équilibre.

Cependant, le nombre très faible de patients observé dans le groupe CYP2C19*2/*2 constitue un biais dans l'interprétation des résultats pour ce groupe. Par ailleurs, nous n'avons pas pris en compte dans cette analyse la co-administration de médicaments inhibant ou induisant le CYP2C19, susceptible de modifier la pharmacocinétique du VCZ. Cependant, l'influence de tels médicaments sur l'effet observé peut être relativisée par l'hypothèse d'une répartition homogène entre les groupes comparés.

D'autres travaux sont également nécessaires pour déterminer si le génotype est associé à la prévalence des effets indésirables potentiels et/ou à la réponse clinique ; ainsi que des études concernant le transport de ce médicament dans l'organisme.

La caractérisation du génotype du CYP2C19 pourrait présenter un intérêt clinique, notamment pour proposer la dose initiale optimale de VCZ. Les résultats de cette étude suggèrent notamment que des doses de l'ordre de 7 mg/kg/prise et 3.5 mg/kg/prise sont nécessaires chez les patients porteurs des génotypes CYP2C19*17/*17 et *1/*17 versus 2.5 mg/kg chez les patients porteurs du génotype sauvage.

Par ailleurs, les recommandations du RCP ne semblent pas adaptées car il n'est indiqué qu’une posologie « générique » par voie orale pour les patients et ces dosages ne sont pas adaptés en fonction du poids contrairement à la formulation injectable alors que la biodisponibilité, proche de 100%, est excellente pour les deux voies d’administration.

Le génotypage du CYP2C19 représente un outil potentiellement intéressant pour guider les doses de VCZ et améliorer la prise en charge clinique. Toutefois des travaux complémentaires permettront de proposer un algorithme complet prenant en compte les modifications de la cinétique du VCZ liées au génotype du CYP2C19, au poids du patient et aux prescriptions associées connues pour modifier sa cinétique.

## Conclusion

Il existe une variabilité importante des effets des médicaments d’un individu à un autre : la même dose d’un médicament donné, administré à des patients a priori comparables, pourra produire une toxicité grave chez les uns et demeurer inactive chez les autres. Cette variabilité de réponse à un traitement trouve notamment son origine au niveau des variations d’activités et/ou d’expressions des protéines qui conditionnent l’action des médicaments, au niveau pharmacocinétique comme au niveau pharmacodynamique.

La pharmacogénétique est l'étude des relations entre des variations génétiques et la réponse ou la tolérance médicamenteuse; elle permet de caractériser un patient vis-à-vis d’une molécule donnée et ainsi d’identifier les sujets répondeurs/non-répondeurs et les sujets à risque de survenue d’un événement indésirable. Elle a un rôle d’autant plus pertinent lorsque l’on est en présence de médicament avec une fenêtre thérapeutique étroite, ou encore lorsque l'efficacité est difficile à évaluer rapidement. En cela, elle fournit au clinicien un outil supplémentaire soit à visée prédictive, soit à visée explicative (inefficacité et/ou toxicité) lors de la mise en place ou le suivi d’un traitement médicamenteux.

## Bibliographie


[1] Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, 2001

[2] Pouyanne P, Haramburu F, Imbs J, and Bégaud B. *Admissions to hospital caused by adverse drug reactions: cross sectional incidence study*. BrMed J 2000 ; 320 : 1036

[3] Etude EMIR: Effets indésirables des médicaments: Incidence et risques, sur les hospitalisations liées à un effet indésirable médicamenteux. Coordination CRPV, Bordeaux, décembre 2007.

[4] Rapport de l'Agence Régionale de Santé SROS Génétique, 2012

[5] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L; French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. *Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events.*N Engl J Med. 2009 Jan 22;360(4):363-75.

[6] Van de Vijer et al. *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* N Engl J Med. 2002;347:1999–2009.

[7] Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS, *Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes*, Science, 1956;124:484–485.

[8] Crosby WH, *Favism in Sardinia* (newsletter), Blood, 1956; 11:91–92

[9] Vogel F. *Moderne Probleme der Humangenetik*. 1959; 12: 52-125.

[10] Beutler E. *Study of glucose-6-phosphate deshydrogenase: history and molecular biology*. Am J Hematol 1993; 42: 53-8.

[11] Oscarson M. *Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medecine*. Clin Chem Lab Med 2003 ; 41 :573-80.

[12] D. Allorge; M.-A. Loriot. *La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments*. Ann Biol Clin 2004, 62 : 499-511.

[13] Becquemont L. *Pharmacogenomics of adverse drug reactions: practical applications and perspectives.* Pharmacogenomics. 2009; 10:961-9.

[14] (en) « for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry [...] for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method » in Personnel de redaction, « The Nobel Prize in Chemistry 1993 [archive] », Fondation Nobel, 2012.Consulté le 21-08-2012

[15] Site de la Revue pour l'histoire du CNRS. Consulté le 21-08-2012.

[16] C. Moreau, V. Siguret, M.-A. Loriot. *Antivitamines K : pharmacologie et pharmacogénétique.* 2011 Elsevier Masson.

[17] Evans W, Relling M. *Pharmacogenomics : translating functional genomics into rational therapeutics*. Science 1999; 286:487-91.

[18] Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR,Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, Sinal CJ.,*Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer*. Drug Metab Dispos 2008; 36:205-16

[19] Jacques Robert. *Pharmacogenetics and pharmacogenomics ;* Volume 93, supplement 4, Avril 2006

[20] Brambila-Tapia AJ. *MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications.* Rev Invest Clin. 2013 Sep-Oct;65(5):445-54.

[21] Keyser CE, et al. *The SLCO1B1 c.521T>C polymorphism is associated with dose decrease or switching during statin therapy in the Rotterdam Study.* Pharmacogenet Genomics, 2014 Jan.

[22] Nicolas Picard*, Différents types d'études en pharmacogénétique*, INSERM UMR S-850 Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU Limoges Pharmacologie médicale, Faculté de Médecine de Limoges.

[23] PH Beaune, MA Loriot. *Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques*. Médecine /Sciences, 2000, 16 : 1051-1056.

[24] Bates ER, Lau WC, Angiolillo DJ., *Clopidogrel–Drug Interactions*, J Am Coll Cardiol., no 57, 2011, p. 1251-126

[25] Y. Guéguen, K. Mouzat, L. Ferrari, E. Tissandie, J.M.A. Lobaccaro, A.-M. Batt, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, M. Souidi, *Cytochromes P450: xenobiotic metabolism,regulation and clinical importance*; revue générale Ann Biol Clin 2006 ; 64 (6) : 535-48

[26] Brockmoller J., Kirchheiner J., Meisel C., Roots I. *Pharmacogenetics diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical development and in drug treatment*. Pharmacogenomics 2000; 1 : 125-51.

[27] Elens L, Nieuweboer A, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, Mathijssen RH, van Schaik RH. *CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin.* Pharmacogenomics. 2013 Jan;14(2):137-49.

[28] Xu C, Li CY, Kong AN. *Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics*. Arch Pharm Res. 2005, 28:249-68.
[29] Thasler WE, Dayoub R, Muhlbauer M, Hellerbrand C, Singer T, Grabe A, Jauch KW,Schlitt HJ, Weiss TS. *Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor*,Augmenter of liver regeneration (ALR). J Pharmacol Exp There. 2006, 316:822-9.
[30] Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, Sinal CJ. *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer*. Drug Metab Dispos 2008; 36:205-16.
[31] Gardiner SJ, Begg EJ. *Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinicalpractice*. Pharmacol Rev. 2006 58:521-90.
[32] Nebert D.W., Bingham E. *Pharmacogenomics: out of the lab and into the community*. Trends in Biotechnology 2001; Vol.19, N°12: 519-523.
[33] Jean-Louis Serre ; *Génétique des populations*, p39.
[34] Meyer UA (1991) *Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism*. Pharmacogenetics 1:66–7
[35] Daly A. *Development of analytical technology in pharmacogenetic research*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2004 ; 369 : 133-40.
[36] Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M. *Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants.* Pharmacogenetics. 2004 Jul;14(7):407-17.
[37] Gaedigk A*. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes*. Int J Clin Pharmacol There 2000; 38: 61-8.
[38] OPEN Lab ; université de Strasbourg;visité le 03-2013
[39] Becquemont L, Alfirevic A, Amstutz U, Brauch H, Jacqz-Aigrain E, Laurent-Puig P, Molina MA, Niemi M, Schwab M, Somogyi AA, Thervet E, Maitland-van der Zee AH, van Kuilenburg AB, van Schaik RH, Verstuyft C, Wadelius M, Daly AK. *Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference onPharmacogenetics and Pharmacogenomics.* 2011;12:113-24.
[40] Owusu et al., 2014
[41] http://www.vidal.fr/substances/21915/voriconazole/. Visité le 12-2014
[42] Brøsen K. *Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants*, Therapies (2004).
[43] Yasumori T, Nagata K, Yang S K, Chen L S, Murayama N, Yamazoe Y, *Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner*; Kato R in Pharmacogenetics (1993).
[44] De Morais S M, Wilkinson G R, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer U A, *The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans*, by Goldstein J A in The Journal of biological chemistry (1994).
[45] Li Xue-Qing, Andersson Tommy B, Ahlström Marie, Weidolf Lars *Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities.* Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals (2004).
[46] Hulot Jean-Sébastien, Bura Alessandra, Villard Eric, Azizi Michel, Remones Véronique, Goyenvalle Catherine, Aiach Martine, Lechat Philippe, Gaussem Pascale. *Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects.* Blood (2006).
[47] Michael J Dolton, Andrew J McLachlan; *Clinical importance of the CYP2C19*17 variant allele for voriconazole*, Br J Clin Pharmacol. 2011.
[48] Klose T S, Blaisdell J A, Goldstein J A; *Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs.* Journal of biochemical and molecular toxicology (1999).
[49] Kamiyama Yoshiteru, et al. 2007.
[50] Wortham Matthew, et al. 2007.
[51] Chen Yuping, et al 2003.
[52] Gerbal-Chaloin S, et al. 2001.
[53] Zhou H H, et al. 1990.
[54] Chen Yuping, et al. 2009.
[55] Mwinyi Jessica, et al. 2010.
[56] Jeppesen U, et al. 1996.
[57] Yu K S, et al. 2001.
[58] Tanaka M, et al. 1997.

[59] Ko J W, et al. 1997.
[60] Ho P Michael, et al. 2009.
[61] Abraham Neena S, Hlatky Mark A, Antman Elliott M, Bhatt Deepak L, Bjorkman David J, Clark Craig B, Furberg Curt D, Johnson David A, Kahi Charles J, Laine Loren, Mahaffey Kenneth W, Quigley Eamonn M, Scheiman James, Sperling Laurence S, Tomaselli Gordon F. *ACCF/ACG/AHA 2010 expert consensus document on the concomitant use of proton pump inhibitors and thienopyridines: a focused update of the ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents*, ACCF/ACG/AHA in Journal of the American College of Cardiology (2010).
[62] Swen J J, et al. 2011.
[63] Kirchheiner J, et al. 2001.
[64]Suan et al., 2011

## Table des tableaux

Tableau 1 Posologies de VCZ recommandées dans le RCP du produit ..... 67
Tableau 2 Relation génotype-phénotype du CYP2C19 ..... 68
Tableau 3. Recommandations selon la DPWG qui a évalué les doses thérapeutiques pour le voriconazole en fonction du génotype du CYP2C19 ..... 69
Tableau 4 Recommandations thérapeutiques selon le CPIC pour le clopidogrel basées sur le phénotype du CYP2C19: ..... 70
Tableau 5 RT-PCR critères des sondes/amorces/amplicons ..... 73
Tableau 6 Sanger: critères des amorces ..... 73
Tableau 7 Conditions de l'analyse de RT-PCR Taqman® CYP2C19 sur ABI Prism 7000® ..... 75
Tableau 9 Caractéristiques des patients inclus et génotypés ..... 76
Tableau 8 Histogramme de distribution des doses / kg / prise sur 90 dosages de voriconazole dans l'intervalle thérapeutique. ..... 77

## Table des illustrations

Figure 1 Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques ..... 8
Figure 2: Origines de la variabilité interindividuelle dans la réponse au médicament..... 11
Figure 3 Mécanismes moléculaires à l'origine des différents phénotypes métaboliques. ..... 14
Figure 4 Schéma PCR ..... 24
Figure 5 Schéma de l'étape de dénaturation ..... 25
Figure 6 Schéma de l'étape d'hybridation ..... 26
Figure 7: Schéma de l'étape d'élongation grâce à la Taq polymérase..... 26
Figure 8 Résultat de séquençage par méthode Sanger révélant une hétérozygotie G/A ..... 28
Figure 9: Mécanisme de fluorescence par la technique de transfert d'énergie par résonnance. ..... 29
Figure 10 Etapes de la méthode de Sanger adaptées à la technologie FRET. ..... 30
Figure 11: Schéma des différents types de sondes..... 31
Figure 12: Mécanisme d'émission de la fluorescence durant l'élongation ..... 32
Figure 13: Suivi en temps réel de l'évolution des cycles par mesure de fluorescence..... 33
Figure 14 Intensité de fluorescence en fonction des cycles d'amplifications..... 33
Figure 15 Allèle X en fonction de l'allèle Y pour une lecture en point final..... 34
Figure 16 Structure du voriconazole ..... 66
Figure 17 Séquence homozygote sauvage: CYP2C19*2 CQ1F (GG)..... 71
Figure 18 Séquence hétérozygote: CYP2C19*2 CQ2F (GA) ..... 72
Figure 19 Séquence homozygote muté: CYP2C19*2 CQ3F (AA)..... 72
Figure 20 Influence du génotype du CYP2C19 sur l'activité du cytochrome (c0/dose)..... 78
Figure 21 Influence du génotype du CYP2C19 sur la dose nécessaire pour atteindre les cibles thérapeutiques. ..... 78

# Annexes

## Annexe 1: Listes des substances in vitro

(www.drug-interactions.com, consulté le 09/13)

**Substrats:**

| 1A2 | 2B6 | 2C8 | 2C9 | 2C19 | 2D6 | 2E1 | 3A4, 5, 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| amitriptyline<br>caféine<br>clomipramine<br>clozapine<br>cyclobenzaprine<br>estradiol<br>fluvoxamine<br>haloperidol<br>imipramine N-DeMe<br>mexiletine<br>naproxen<br>olanzapine<br>ondansetron<br>phenacetin→ acetaminophen→ NAPQI<br>propranolol<br>riluzole<br>ropivacaine<br>tacrine<br>theophylline<br>tizanidine<br>verapamil<br>(R)warfarin<br>zileuton<br>zolmitriptan | bupropion<br>cyclophospha-mide<br>efavirenz<br>ifosphamide<br>methadone<br>sorafenib | amodiaquin<br>cerivastatin<br>paclitaxel<br>repaglinide<br>sorafenib<br>torsemide | AINS:<br>diclofenac<br>ibuprofen<br>lornoxicam<br>meloxicam<br>S-naproxen_Nor<br>piroxicam<br>suprofen<br><br>ADO:<br>tolbutamide<br>glipizide<br><br>ARA II:<br>losartan<br>irbesartan<br><br>Sulfamides hypoglycémiants:<br>glyburide<br>glibenclamide<br>glipizide<br>glimepiride<br>tolbutamide<br><br>amitriptyline<br>celecoxib | IPP:<br>lansoprazole<br>omeprazole<br>pantoprazole<br>rabeprazole<br><br>Anti-épileptique:<br>diazepam→Nor<br>phenytoin(O)<br>S-mephenytoin<br>phenobarbitone<br><br>amitriptyline<br>carisoprodol<br>citalopram<br>chloramphenicol<br>clomipramine<br>clopidogrel<br>cyclophosphamid<br>hexobarbital<br>imipramine N-DeME<br>indomethacin<br>R-mephobarbital<br>moclobemide<br>nelfinavir<br>nilutamide<br>primidone | Beta bloquants:<br>carvedilol<br>S-metoprolol<br>propafenone<br>timolol<br><br>Antidépresseurs:<br>amitriptyline<br>clomipramine<br>desipramine<br>fluoxetine<br>imipramine<br>paroxetine<br>venlafaxine<br><br>Antipsychotiques:<br>haloperidol<br>perphenazine<br>risperidone→9OH<br>thioridazine<br>zuclopenthixol<br><br>alprenolol<br>amphetamine<br>aripiprazole<br>atomoxetine<br>bufuralol | Anesthétiques:<br>enflurane<br>halothane<br>isoflurane<br>methoxyflurane<br>sevoflurane<br><br>acetaminophen→ NAPQI<br>aniline<br>benzene<br>chlorzoxazone<br>ethanol<br>N,N-dimethylformamide<br>theophylline→8-OH | Macrolide:<br>clarithromycin<br>erythromycin (not 3A5)<br>NOT azithromycin<br>Telithromycin<br><br>Anti-arrhythmiques:<br>quinidine→3OH (not 3A5)<br><br>Bzds:<br>alprazolam<br>diazepam→3OH<br>midazolam<br>triazolam<br><br>Immuno-modulateirs:<br>cyclosporine<br>tacrolimus (FK506)<br><br>HIV Antivirals:<br>indinavir<br>nelfinavir<br>ritonavir<br>saquinavir<br><br>Prokinetic: |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | fluoxetine<br>fluvastatin<br>glyburide<br>nateglinide<br>phenytoin-4-OH2<br>rosiglitazone<br>tamoxifen<br>torsemide<br>S-warfarin | progesterone<br>proguanil<br>propranolol<br>teniposide<br>R-warfarin→8-OH | chlorpheniramine<br>chlorpromazine<br>clonidine<br>codeine (→O-desMe)<br>debrisoquine<br>dexfenfluramine<br>dextromethorphan<br>donepezil<br>duloxetine<br>encainide<br>flecainide<br>fluvoxamine<br>lidocaine<br>metoclopramide<br>methoxyamphetamin<br>e<br>mexiletine<br>minaprine<br>nebivolol<br>nortriptyline<br>ondansetron<br>oxycodone<br>perhexiline<br>phenacetin<br>phenformin<br>promethazine<br>propranolol<br>sparteine<br>tramadol | | Cisapride<br><br><u>Antihistamiques:</u><br>astemizole<br>chlorpheniramine<br>terfenadine<br><br><u>Inhibiteurs des cannaux calciques:</u><br>amlodipine<br>diltiazem<br>felodipine<br>lercanidipine<br>nifedipine2<br>nisoldipine<br>nitrendipine<br>verapamil<br><br><u>Inhibiteur de l'HMG CoA Reductase:</u><br>atorvastatin<br>cerivastatin<br>lovastatin<br>NOT pravastatin<br>simvastatin<br><br><u>Steroid 6beta-OH:</u><br>estradiol<br>hydrocortisone<br>progesterone<br>testosterone<br><br><u>Divers:</u><br>alfentanyl<br>aprepitant<br>aripiprazole<br>buspirone |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | cafergot<br>caffeine_TMU<br>cilostazol<br>cocaine<br>codeine-Ndemethylation<br>dapsone<br>dexamethasone<br>dextromethorphan<br>docetaxel<br>domperidone<br>eplerenone<br>fentanyl<br>finasteride<br>gleevec<br>haloperidol<br>irinotecan<br>LAAM<br>lidocaine<br>methadone<br>nateglinide<br>ondansetron<br>pimozide<br>propranolol<br>quetiapine<br>quinine<br>risperidone<br>NOT rosuvastatin<br>salmeterol<br>sildenafil<br>sirolimus<br>tamoxifen<br>taxol<br>terfenadine<br>trazodone<br>vincristine<br>zaleplon |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | ziprasidone<br>zolpidem |

**Inhibiteurs:** molécules qui fait concurrence avec d'autres médicaments au niveau d'une enzyme particulière, ce qui affecte le niveau optimal du métabolisme du médicament substrat et ce qui dans de nombreux cas a une incidence sur la réponse de l'individu à ce médicament substrats.
Δ : **Puissant inhibiteur**, provoque soit une augmentation supérieure à 5 fois les valeurs de l'AUC dans le plasma, soit une diminution de la clairance de 80%
Δ : **Inhibiteur modéré**, provoque soit une augmentation supérieure à 2 fois les valeurs de l'AUC dans le plasma, soit une diminution de la clairance de 50-80%.
Δ : **Inhibiteur faible,** provoque soit une augmentation comprise entre 1.25 et 2 fois les valeurs de l'AUC dans le plasma, soit une diminution de la clairance de 50.

| 1A2 | 2B6 | 2C8 | 2C9 | 2C19 | 2D6 | 2E1 | 3A4, 5, 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Δ fluvoxamine<br>Δ ciprofloxacin<br><br>Δ cimetidine<br><br>amiodarone<br>fluoroquinolones<br>furafylline<br>interferon<br>methoxsalen<br>mibefradil<br>ticlopidine | thiotepa<br>ticlopidine | Δ gemfibrozil<br><br>Δ trimethoprim<br><br>glitazones<br>montelukast<br>quercetin | Δ fluconazole<br><br>Δ amiodarone<br><br>fenofibrate<br>fluvastatin<br>fluvoxamine<br>isoniazid<br>lovastatin<br>phenylbutazone<br>probenicid<br>sertraline<br>sulfamethoxazole<br>sulfaphenazole<br>teniposide<br>voriconazole<br>zafirlukast | IPP:<br>lansoprazole<br>omeprazole<br>pantoprazole<br>rabeprazole<br><br>chloramphenicol<br>cimetidine<br>felbamate<br>fluoxetine<br>fluvoxamine<br>indomethacin<br>ketoconazole<br>modafinil<br>oxcarbazepine<br>probenicid<br>ticlopidine<br>topiramate | Δ bupropion<br>Δ cinacalcet<br>Δ fluoxetine<br>Δ paroxetine<br>Δ quinidine<br><br>Δ duloxetine<br>Δ sertraline<br>Δ terbinafine<br><br>Δ amiodarone<br>Δ cimetidine<br><br>celecoxib<br>chlorpheniramine<br>chlorpromazine<br>citalopram<br>clemastine<br>clomipramine<br>cocaine | diethyl-<br>dithiocarbamate<br>disulfiram | Antivirus HIV:<br>Δ indinavir<br>Δ nelfinavir<br>Δ ritonavir<br><br>Δ clarithromycin<br>Δ itraconazole<br>Δ ketoconazole<br>Δ nefazodone<br>Δ saquinavir<br>Δ telithromycin<br><br>Δ aprepitant<br>Δ erythromycin<br>Δ fluconazole<br>Δ pamplemouse<br>Δ verapamil<br>Δ diltiazem<br><br>Δ cimetidine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | diphenhydramine<br>doxepin<br>doxorubicin<br>escitalopram<br>halofantrine<br>halopéridol<br>réduit<br>antagonistes H1<br>hydroxyzine<br>levomepromazine<br>methadone<br>metoclopramide<br>mibefradil<br>midodrine<br>moclobemide<br>perphenazine<br>ranitidine<br>ritonavir<br>ticlopidine<br>tripelennamine | | amiodarone<br>NOT azithromycin<br>chloramphenicol<br>boceprevir<br>ciprofloxacin<br>delaviridine<br>diethyl-<br>dithiocarbamate<br>fluvoxamine<br>gestodene<br>imatinib<br>mibefradil<br>mifepristone<br>norfloxacin<br>norfluoxetine<br>starfruit<br>telaprevir<br>voriconazole |

**Inducteurs:**

| 1A2 | 2B6 | 2C8 | 2C9 | 2C19 | 2D6 | 2E1 | 3A4, 5, 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| brocoli<br>choux de buxelles<br>viande grillé<br>insuline<br>methylcholanthrene<br>modafinil<br>nafcillin<br>bêta-naphthoflavone<br>omeprazole<br>tabac | phenobarbital<br>phenytoin<br>rifampin | rifampin | rifampin<br>secobarbital | carbamazepine<br>norethindrone<br>NOT pentobarbital<br>prednisone<br>rifampicin | dexamethasone<br>rifampin | ethanol<br>isoniazid | Antivirus HIV:<br>efavirenz<br>nevirapine<br><br>barbituriques<br>carbamazepine<br>glucocorticoids<br>modafinil<br>oxcarbazepine<br>phenobarbital<br>phenytoin<br>pioglitazone<br>rifabutin<br>rifampin<br>millepertuis<br>troglitazone |

UNIVERSITÉ DE ROUEN

UNIVERSITE de ROUEN
Faculté de Médecine et de Pharmacie

# SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

**TINNIERE Germain**

**Place actuelle des examens de pharmacogénétique et analyse du génotype CYP2C19 chez des patients traités par voriconazole au CHU de Rouen.**

Thèse dirigée par le Docteur Fabien LAMOUREUX

Th. D. Pharm., Rouen, 2014, 81 p.

---

**RESUME**

Il existe une variabilité importante des effets des médicaments d'un individu à un autre : la même dose d'un médicament donné, administré à des patients a priori comparables, pourra produire une toxicité grave chez les uns et demeurer inactive chez d'autres. Cette variabilité de réponse à un traitement trouve son origine au niveau des variations d'activités et/ou d'expressions des protéines qui conditionnent l'action des médicaments, au niveau pharmacocinétique comme au niveau pharmacodynamique.

La pharmacogénétique est l'étude des relations entre des variations génétiques et la réponse ou la tolérance médicamenteuse. Elle a pour objectif d'identifier les patients à risque de toxicité ou d'échec thérapeutique pour un médicament. Elle apporte au clinicien un outil complémentaire au suivi thérapeutique pharmacologique soit à visée prédictive, soit à visée explicative (inefficacité et/ou toxicité) dans la mise en place ou le suivi d'un traitement médicamenteux.

Nous développons dans ce travail de thèse les caractéristiques des principaux tests génétiques proposés en 2014 pour anticiper ou expliquer une réponse inappropriée à certains médicaments. Ces différents tests sont présentés sous forme de fiches synthétiques permettant un accès rapide et simplifié aux informations depuis leur prescription à leur interprétation. Enfin, nous présentons les résultats du génotypage CYP2C19 dans une série de patients traités par voriconazole dans un contexte de pathologie aspergillaire au CHU de Rouen. Les résultats de ces travaux indiquent que le génotype CYP2C19 influence l'exposition au voriconazole ainsi que les doses nécessaires aux patients pour atteindre les cibles thérapeutiques.

---

**MOTS CLES** : Pharmacogénétique – Variabilité interindividuelle - Génotypage – CYP 2C19

---

**JURY**

| | |
|---|---|
| Président : | Professeur Jean COSTENTIN, Professeur émérite |
| Co-directeur de thèse : | Professeur Gilles GARGALA, MCU-PH |
| Membres : | Docteur. Jérémy BELLIEN, MCU-PH |

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 19 décembre 2014