

Variabilité des concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole chez le patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques : impact des facteurs génétiques et des comédications

Élodie Gautier-Veyret

▶ **To cite this version:**

Élodie Gautier-Veyret. Variabilité des concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole chez le patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques : impact des facteurs génétiques et des comédications. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01170714

HAL Id: dumas-01170714

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01170714

Submitted on 2 Jul 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.

Université Joseph Fourier
GRENOBLE
PHARMACIE

SICD1
Bibliothèques
de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2014 THESE n°

Variabilité des concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole chez le patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques : impact des facteurs génétiques et des comédications

MÉMOIRE du diplôme D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DIPLÔME D'ÉTAT

Travail effectué au sein du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie,

Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble,

sous la direction de Madame le Pr Françoise STANKE-LABESQUE

Elodie GAUTIER-VEYRET

Née le 28 mai 1985 à Bourgoin-Jallieu (38)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Pharmacie de Grenoble* le 23 juin 2014

DEVANT UN JURY COMPOSÉ DE :

Monsieur le professeur Christophe RIBUOT, président du jury

Madame le professeur Françoise STANKE-LABESQUE, directrice de Thèse

Madame le docteur Anne THIEBAUT-BERTRAND

Madame le docteur Danièle MAUBON

Monsieur le docteur Xavier FONROSE

La faculté de pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses; ces opinions sont considérées propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
DCE	BEL	Coralie	D4	-
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
DCE	BERTHOIN	Lionel	D1	-
DCE	BOSSON	Anthony	D4	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
DCE	CAVAREC	Fanny	D5	-
AHU	CHANOINE	Sébastien	D5	IAB

UFR de Pharmacie de Grenoble

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	**CHOISNARD**	**Luc**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
DCE	**CHRISTEN**	**Aude**	D3	-
PU-PH	**CORNET**	**Murielle**	D4	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	**CRESPO**	**Xenia**	D1	-
PU-PH	**DANEL**	**Vincent**	D5	SMUR SAMU
PU	**DECOUT**	**Jean-Luc**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**DELETRAZ-DELPORTE**	**Martine**	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB
MCU	**DEMEILLIERS**	**Christine**	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	**DROUET**	**Christian**	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	**DROUET**	**Emmanuel**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	**DURMORT-MEUNIER**	**Claire**	D1	I.B.S
ATER	**FALLECKER**	**Catherine**	D5	HP2-Inserm U1042
PU-PH	**FAURE**	**Patrice**	D1	HP2-Inserm U1042
AHU	**FILIOL (VAN NOOLEN)**	**Laetitia**	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	**FITE**	**Andrée**	D6	-
AHU	**GARNAUD**	**Cécile**	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PRAG	**GAUCHARD**	**Pierre-Alexis**	D3	-
MCU-PH	**GERMI**	**Raphaëlle**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	**GEZE**	**Annabelle**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**GILLY**	**Catherine**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**GODIN-RIBUOT**	**Diane**	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	**GOUBIER MATHYS**	**Laurence**	D6	-
ATER	**GRAS**	**Emmanuelle**	D5	-
Professeure Emérite	**GRILLOT**	**Renée**	D4	-
MCU	**GROSSET**	**Catherine**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**GUIEU**	**Valérie**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**HININGER-FAVIER**	**Isabelle**	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	**JOYEUX-FAURE**	**Marie**	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	**KHALEF**	**Nawel**	D5	TIMC-IMAG
MCU	**KRIVOBOK**	**Serge**	D3	IRTSV

UFR de Pharmacie de Grenoble

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

DCE	**LECERF-SCHIMDT**	**Florine**	D3	-
ATER	**LEHMANN**	**Sylvia**	D1	-
PU	**LENORMAND**	**Jean Luc**	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	**MARTIN**	**Donald**	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
DCE	**MELAINE**	**Feriel**	D1	-
MCU	**MELO DE LIMA**	**Christelle**	D4	L.E.C.A
DCE	**MORAND**	**Jessica**	D5	-
PU-PH	**MOSSUZ**	**Pascal**	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	**MOUHAMADOU**	**Bello**	D3	L.E.C.A
MCU	**NICOLLE**	**Edwige**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
DCE	**OUIDIR**	**Marion**	D3	-
MCU	**OUKACINE**	**Farid**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**PERES**	**Basile**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**PEUCHMAUR**	**Marine**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**PEYRIN**	**Éric**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**RACHIDI**	**Walid**	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	**RAVELET**	**Corinne**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**RIBUOT**	**Christophe**	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	**RIEU**	**Isabelle**	D5	-
Professeure Emérite	**ROUSSEL**	**Anne -Marie**	D1	-
PU-PH	**SEVE**	**Michel**	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	**SOUARD**	**Florence**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**TARBOURIECH**	**Nicolas**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
DCE	**THOMAS**	**Amandine**	D5	-
PAST	**TROUILLER**	**Patrice**	D5	-
MCU	**VANHAVERBEKE**	**Cécile**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**WOUESSIDJEWE**	**Denis**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

** **D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT)»**

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maitres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Ce travail de thèse représente l'aboutissement de longues années d'études au cours desquelles de nombreuses personnes ont compté pour moi. Qu'elles trouvent en ces quelques lignes l'expression de ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury :

A Monsieur le Professeur Christophe Ribuot, Président du jury

Pour avoir accepté de juger ce travail et me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour votre disponibilité, mais également pour votre bonne humeur de chaque instant qui égaye conseils, commissions et réunions en tous genres.

A Madame la Professeur Françoise Stanke-Labesque, Directrice de Thèse

Pour m'avoir accordé votre confiance depuis le début de mon internat. Un immense merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre rigueur mais surtout pour votre encadrement sans faille que ce soit au sein du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie dans le cadre du DES ou au cours de la réalisation de ce travail, comme au sein du laboratoire HP2 pour mon master 2 ou ma thèse de sciences. Par ces quelques lignes, je tiens à vous témoigner de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Anne Thiebaut-Bertrand,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury et pour votre contribution à ce travail. Merci d'avoir apporté votre expérience clinique et votre expertise dans le domaine des infections fongiques invasives à cette étude.

A Madame le Docteur Danièle Maubon,

Pour avoir accepté de juger ce travail. Merci de ta disponibilité à la fois professionnelle et personnelle, de ta sympathie mais également de ta compréhension face aux erreurs de la jeune interne que j'ai été… J'ai très apprécié mes 6 mois au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie et j'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble dans l'avenir.

A Monsieur le Docteur Xavier Fonrose,

Pour avoir accepté (avec grande joie !) de prendre part à ce jury de thèse. Merci pour tout ce que tu m'as déjà appris et tout ce que tu m'apprendras encore. Je mesure la patience dont tu as fait preuve pour m'initier aux techniques de biologie moléculaire.

Au Docteur Julia Tonini pour avoir initié cette collaboration sur les antifongiques avec le service d'Hématologie Clinique. Merci également de ta contribution à la rédaction de l'article. Plus personnellement, merci pour tous tes conseils, et pour les bons moments passés ensemble (j'ai en tête les nuits de P2T à refaire la Biologie Grenobloise).

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble et notamment les personnes qui ont contribué à ce travail : Karine, Cécile, Christel, ainsi que le Docteur Mireille Bartoli.

A mes co-internes d'hier et d'aujourd'hui qu'ils m'aient apprécié ou supporté : Cécile, Raya, Thomas, Géraldine, Marion, Laetitia, Julie M., Julie P., Lysiane, Anne-So, Yvan et tous les autres… sans oublier les ex-AHU auprès desquels j'ai beaucoup appris : Julien et Raphaël.

A mes amies pharmaciennes de différents horizons : Virginie, Edwige, Claire, Julie. Merci pour ces moments passés ensemble sur les bancs de la fac, au laboratoire de garde de Neuro-

Cardio, dans le cagibi du laboratoire d'Immunologie d'HEH ou encore sur les pistes du Burkina-Faso.

A ma famille et belle-famille pour votre aide et soutien de tous les jours. Même si beaucoup ne cernent pas tout à fait en quoi consiste mon travail, vous êtes toujours là pour moi.

A tous mes amis et amies, Céline B., Céline G., Amélie, Flavien, Vanessa, Julie, Benoit, Sébastien, Nicolas…et j'en oublie ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir. Soyez assurés que vous comptez beaucoup pour moi et que c'est aussi grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

A mes parents à qui je dois tout. Merci de m'avoir toujours soutenu dans mes choix qu'ils aient été professionnels, sportifs ou personnels. Je mesure tout ce que vous avez fait pour nous et j'espère vous le rendre au quintuple.

A mes deux hommes chéris, Fabien et Louka qui illuminent chaque jour de ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS **10**

INTRODUCTION **11**

PREMIÈRE PARTIE : RÉSUMÉ EN FRANÇAIS **14**

I. MATERIEL ET METHODES 15

1. Patients *15*

2. Concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole *15*

3. Génotypage *15*

4. Score génétique *16*

5. Analyses statistiques *16*

II. RESULTATS 17

1. Caractéristiques des patients *17*

2. Description de l'ensemble des concentrations résiduelles de VRC *17*

3. Déterminants de la concentration initiale de VRC *18*

4. Déterminants des concentrations suivantes de VRC *19*

III. DISCUSSION 19

DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE ORIGINAL EN ANGLAIS **22**

CONCLUSION **61**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **63**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

IFI : Infection fongique invasive

AI : Aspergillose invasive

VRC : Voriconazole

C_{min} : Concentration résiduelle

STP : Suivi thérapeutique pharmacologique

CYP : Cytochrome

IPP : Inhibiteur de la pompe à proton

C_{min}/D : Concentration résiduelle ajustée sur la dose

INTRODUCTION

Les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à haut risque de développer des infections fongiques invasives (IFI), et notamment des aspergilloses invasives (AI). Le voriconazole (VRC) constitue aujourd'hui le traitement de référence de l'AI. Malgré une efficacité supérieure à l'amphotéricine B [1], le taux de mortalité de l'AI sous VRC reste élevé, atteignant jusqu'à 56 % chez les patients allogreffés de CSH [2]. De nombreuses hypothèses sont aujourd'hui avancées pour expliquer les échecs thérapeutiques : retard de mise sous traitement en raison d'un diagnostic tardif, résistance de la souche fongique, diffusion médiocre du VRC sur le site de l'infection, ou encore exposition insuffisante au médicament antifongique.

Cette dernière hypothèse d'ordre pharmacologique fait suite à de nombreux travaux qui ont mis en évidence un lien entre les concentrations plasmatiques résiduelles (C_{min}) de VRC et l'efficacité du traitement antifongique. Ainsi, les échecs thérapeutiques sont plus fréquents chez les patients présentant une C_{min} de VRC $\leq$ 1 mg/l [3] ou < 1,7 mg/l [4] selon les auteurs.

Une fourchette comprise entre 1 et 4 à 6 mg/l a donc récemment été proposée comme cible thérapeutique[5]. Or, les C_{min} de VRC sont très fréquemment en dehors de cet intervalle thérapeutique [6, 7], notamment chez les patients allogreffés de CSH [8]. Dans ce contexte, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) du VRC semble justifié. Une équipe coréenne a d'ailleurs démontré son intérêt à travers une étude prospective randomisée, mettant en évidence une amélioration de la réponse au VRC et une réduction des arrêts de traitement en lien avec des manifestations toxiques grâce au STP [9].

La pharmacocinétique variable du VRC peut en partie être expliquée par sa voie de métabolisation dépendante du cytochrome P450 (CYP), et plus précisément des CYP2C19, 3A4, 3A5 et dans une moindre mesure du CYP2C9 [10]. En effet, du fait de polymorphismes génétiques, les activités enzymatiques de ces CYP peuvent varier considérablement, influant ainsi l'élimination du VRC et donc ses C_{min}. Pour le CYP2C19 par exemple, les polymorphismes *2 et *3 responsables d'une diminution d'activité sont associés à des C_{min} augmentées de VRC [11] ; à l'opposé, l'allèle gain de fonction *17 est associé à des C_{min} plus faibles de VRC [12]. De la même manière, des polymorphismes génétiques existent pour le CYP3A : l'allèle *22 du CYP3A4 est associé à d'une diminution d'activité du CYP3A4 [13], alors que l'allèle CYP3A5*1 est responsable de l'expression du CYP3A5 et correspond donc à un gain d'activité [14]. Néanmoins, à ce jour, l'impact du génotype du CYP3A sur les C_{min} de VRC n'a jamais été étudié.

Les interactions médicamenteuses peuvent également influencer la pharmacocinétique du VRC. En effet, les inducteurs enzymatiques tels que la phénytoïne sont associés à des C_{min} de VRC abaissées [4] ; à l'inverse, les C_{min} de VRC se trouvent augmentées en présence d'inhibiteurs enzymatiques tels que les inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) [4, 7, 15].

Néanmoins, polymorphismes génétiques et interactions médicamenteuses n'expliquent qu'une partie de la variabilité pharmacocinétique du VRC. D'autres paramètres tels que le poids [6], l'âge du patient [4, 6, 16] ou encore la survenue de diarrhée [6, 7] pourraient également contribuer à la variabilité des C_{min} de VRC, mais leur pertinence reste à démontrer puisque de nombreux résultats sont discordants d'une étude à une autre.

Une meilleure connaissance des facteurs influençant la pharmacocinétique du VRC semble donc indispensable afin d'anticiper et de limiter les variations des C_{min} et éviter ainsi la survenue de C_{min} en dehors de la cible thérapeutique. Une C_{min} initiale de VRC $\leq$ 0,35 mg/l semble constituer un marqueur prédictif de mortalité [17]. L'identification de marqueurs,

notamment génétiques, impliqués dans la variabilité pharmacocinétique du VRC pourrait alors permettre d'adapter *a priori* les premières doses de VRC, afin d'atteindre le plus tôt possible des C_{min} dans la cible thérapeutique.

De plus, la variabilité intra-individuelle du VRC étant considérable, il est recommandé de répéter régulièrement les dosages de VRC tout au long du traitement[5]. En effet, il semble important non seulement d'atteindre rapidement des C_{min} de VRC suffisantes [17], mais également de maintenir tout au long du traitement des C_{min} dans la fourchette thérapeutique [16-18]. La nécessité de répéter les dosages de VRC est, par ailleurs, confirmée par le fait que C_{min} initiales et suivantes de VRC ne sont que peu [19] ou pas corrélées [17].

Cette étude rétrospective a eu pour but de caractériser la variabilité des C_{min} de VRC tout au long du traitement antifongique dans une cohorte de patients allogreffés de CSH et d'identifier les déterminants responsables de cette variabilité en distinguant la C_{min} initiale de VRC, des C_{min} suivantes.

Ce travail est présenté sous forme d'un article scientifique actuellement soumis pour publication.

Un résumé de la méthodologie, des principaux résultats et de la discussion sont présentés dans une première partie. L'article original constitue la deuxième partie de cette thèse.

PREMIÈRE PARTIE :

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

I. Matériel et méthodes

1. Patients

Les patients allogreffés de CSH, suivis dans le service d'Hématologie Clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, ayant bénéficié, dans le cadre de leur prise en charge normale, d'au moins 3 dosages de VRC entre janvier 2011 et juin 2013 ont été sélectionnés. Les données démographiques, cliniques et pharmaceutiques concernant le traitement par VRC, ainsi que les traitements associés ont été collectés de manière rétrospective. Tous les patients avaient donné leur consentement libre, écrit et éclairé pour la réalisation d'analyses génétiques, ainsi que pour la collecte et l'utilisation de leurs données.

2. Concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole

Les C_{min} de VRC ont été mesurées à l'état d'équilibre pharmacocinétique, par une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem précédemment décrite [20]. L'intervalle thérapeutique retenu était compris entre 1 et 5 mg/l.

3. Génotypage

Le génotypage des cytochromes 2C19 et 3A a été réalisé sur des reliquats d'échantillons sanguins prélevés avant la greffe. Ces échantillons étaient initialement destinés aux analyses biologiques de routine et ont été stockés au sein d'une collection d'échantillons biologiques (DRC-2013-1983). La recherche des polymorphismes *2, *3 et *17 pour le CYP2C19 a été réalisé par séquençage direct. Les patients ont été classés en métaboliseur ultra-rapide, extensif et intermédiaire selon la classification proposée par Mega *et al* [21].

Le génotypage du CYP3A à la recherche des allèles CYP3A4*22 et CYP3A5*1 a été réalisé à l'aide d'un kit commercial de discrimination allélique Taqman™. Les patients ont été classés respectivement en métaboliseur intermédiaire ou extensif, en fonction de la présence ou non de l'allèle *22.

4. Score génétique

Un score génétique combinant les génotypes du CYP2C19 et du CYP3A a été calculé pour chacun des patients. Dans un premier temps, un score génétique spécifique à chacun des CYP a été attribué à chaque génotype observé, et dans un second temps, ces deux scores génétiques spécifiques ont été additionnés pour obtenir le score génétique combiné. L'absence de polymorphisme conférait un score génétique spécifique égal à 1 pour chacun des CYP2C19 et 3A, alors que la présence d'un allèle gain ou perte de fonction engendrait respectivement une augmentation ou une diminution de ce score. Cette fluctuation était de +/- 0,5 lorsque l'allèle était exprimé à l'état hétérozygote et de +/- 1 à l'état homozygote. Le score génétique était exprimé en unités arbitraires. Les patients étaient classés en 3 groupes selon la valeur de leur score génétique : <2, 2 et >2. Un score génétique à 2 correspondait à une activité enzymatique des CYP2C19 et 3A normale, alors qu'un score génétique < ou > à 2 reflétait respectivement des activités diminuées ou augmentées des CYP2C19 et 3A.

5. Analyses statistiques

Les C_{min} de VRC initiales et suivantes ont été analysées séparément. Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l'aide de tests non-paramétriques (Mann-Withney pour la comparaison entre 2 groupes ou Kruskal-Wallis suivi d'un test ajusté

de Bonferroni pour la comparaison d'au moins 3 groupes). Les comparaisons de proportions ont été réalisées à l'aide du test exact de Fischer. Les corrélations entre deux variables quantitatives ont été réalisées à l'aide du test de Spearman. Une valeur de $p<0,05$ a été retenue comme significative.

II. Résultats

1. Caractéristiques des patients

33 patients ont été sélectionnés et le génotype pré-greffe a pu être déterminé pour 29 d'entre eux (88 %). Pour le CYP2C19, 37 % (n=11), 34 % (n=10) et 28 % (n=8) des patients ont été respectivement classés en métaboliseurs ultra-rapides, extensifs et intermédiaires. Pour le CYP3A, 24 % (n=7) des patients exprimaient l'allèle *22 à l'état hétérozygote, et un seul patient était expresseur du CYP3A5 (porteur de l'allèle CYP3A5*1 à l'état hétérozygote).

2. Description de l'ensemble des concentrations résiduelles de VRC

308 dosages de VRC ont été sélectionnés, représentant une médiane de 9 dosages (min-max : 3-25) par patient pour une durée médiane de suivi de 94 jours ($10^{ème}$ et $90^{ème}$ percentiles : 14-269 jours). Les coefficients de variation inter- et intra-individuels étaient respectivement de 84 % et 68 %. 42 % des C_{min} étaient situées en dehors de la fenêtre thérapeutique et 84 % des patients présentaient au moins une C_{min} en dehors de cet intervalle. Les C_{min} étaient corrélées à la dose, uniquement lorsque le VRC était administré par voie orale ($r=0,412$, $p<0,0001$).

30 modifications de posologie (soit 11 % des 275 C_{min} suivantes) chez 16 patients (soit 48 % des patients) ont été dénombrées, 70 % (n=21) étant réalisées sans changement de la

voie d'administration, 27 % (n=8) résultant d'un switch de la voie intra-veineuse (IV) vers la voie orale, 3% (n=1) étant le fait d'une interruption du traitement par VRC en raison d'un surdosage.

3. Déterminants de la concentration initiale de VRC

La voie d'administration du VRC influençait les C_{min} initiales de VRC (p=0,03), la voie IV étant associée à des C_{min} 1,7 fois supérieures à celles obtenues pour la voie orale.

L'influence des paramètres génétiques a été étudiée sur la C_{min} initiale de VRC ajustée sur la dose (VRC C_{min}/D), afin de s'affranchir de l'influence de la dose. Pour la voie orale, les ratios initiaux VRC C_{min}/D étaient également influencés par les génotypes du CYP2C19 (p=0,04) et du CYP3A4 (p=0,004). Le score génétique exerçait là encore une influence significative, les patients ayant un score génétique > 2 présentant des ratios VRC C_{min}/D initiaux inférieurs aux patients avec un score génétique < 2 (p=0,009).

L'analyse de l'ensemble des ratios VRC C_{min}/D initiaux (voies IV et orale réunies) mettait en évidence des résultats similaires : le génotype du CYP2C19 tendait à influencer les ratios VRC C_{min}/D initiaux (p=0,08), alors que le génotype du CYP3A4, de même que le score génétique combiné affectaient significativement les VRC C_{min}/D initiaux (p=0,05 et p=0,05 respectivement).

Aucun des patients présentant un score génétique <2 ne présentait une C_{min} initiale <1 mg/l, alors que la C_{min} initiale était inférieure à ce seuil d'efficacité pour 47 % des patients ayant un score génétique ≥2 (p=0,01).

4. Déterminants des concentrations suivantes de VRC

Les C_{min} suivantes de VRC restaient influencées par le score génétique (p=0,004), mais étaient également affectées par le type d'IPP associé (p<0,0001) : les C_{min} de VRC étant plus basses lorsque l'IPP était le pantoprazole comparativement à l'ésomeprazole (p<0,0001).

L'analyse des C_{min} longitudinales de VRC en fonction du score génétique montre que seule la C_{min} initiale est significativement impactée par le score génétique, le score génétique n'exerçant pas d'influence significative sur les C_{min} séquentielles suivantes.

Les traitements immunosuppresseurs par anticalcineurines, acide mycophénolique, éverolimus ou corticoïdes, de même que la présence d'inhibiteurs enzymatiques du CYP2C19 et/ou du CYP3A4 n'influençaient pas les C_{min} suivantes de VRC.

De même, la survenue de diarrhée n'a pas eu d'impact sur les C_{min} suivantes de VRC obtenues au cours d'un traitement *per os*.

III. Discussion

Notre étude a mis en évidence dans une population homogène de patients allogreffés de CSH une importante variabilité inter- et intra-individuelle des C_{min} de VRC, résultant fréquemment à des C_{min} en dehors de la fenêtre thérapeutique. Cette variabilité s'expliquait en partie par le score génétique combinant à la fois les génotypes des CYP2C19 et 3A, la voie d'administration du VRC mais également le type d'IPP associé.

Une thérapeutique antifongique adaptée et précoce améliore considérablement les taux de guérison des IFI [22, 23], et pour le VRC, une C_{min} initiale $\leq$0,35 mg/l apparaît comme étant un facteur prédictif majeur de mortalité [17]. Ces données soulignent l'importance d'obtenir rapidement une C_{min} de VRC dans la fourchette thérapeutique et laisse à penser qu'une

adaptation des doses de VRC dès la première administration pourrait constituer une approche intéressante. Nos données démontrent pour la première fois qu'un score génétique combinant les génotypes des CYP2C19 et 3A est un marqueur prédictif indépendant de la C_{min} initiale de VRC. L'impact du génotype du CYP2C19 sur la C_{min} initiale avait déjà été suggéré par une équipe coréenne mais sans atteindre la significativité [24]. Nos données ont montré des ratios VRC C_{min}/D initiaux plus élevés chez les patients métaboliseurs intermédiaire pour le CYP2C19 comparativement aux patients métaboliseurs ultrarapides. De plus, nous avons montré pour la première fois que la présence de l'allèle *22 du CYP3A4 était associée à des VRC C_{min}/D initiaux significativement supérieurs. Les polymorphismes génétiques des CYP2C19 et 3A4 étant répartis de manière indépendante dans notre cohorte, il semblait intéressant de calculer un score génétique prenant en compte les génotypes de ces deux CYP. Un score génétique <2 était associé à des ratios VRC C_{min}/D initiaux plus élevés qu'un score génétique >2. De plus, aucun des patients présentant un score génétique <2 n'avait une C_{min} initiale inférieure au seuil d'efficacité fixé à 1 mg/l, alors que 47 % des patients avec un score génétique ≥2 présentaient une C_{min} initiale insuffisante. L'individualisation des doses de VRC sur la base du génotype du CYP2C19 a récemment été proposée[25, 26]. Néanmoins, l'influence du génotype du CYP2C19 mais également du 3A4 sur la C_{min} initiale de VRC laissent à penser qu'une meilleure stratégie d'adaptation posologique basée sur ce score génétique combiné est envisageable.

Dans notre cohorte, les C_{min} suivantes de VRC restaient influencées par le score génétique, et ceci malgré les adaptations posologiques survenues au cours du STP longitudinal. Ce résultat s'explique par une fréquence relativement faible d'ajustement posologique. En effet, seulement 16 % des patients ont bénéficié de modifications de dose alors que 85 % d'entre eux ont présenté au moins une C_{min} de VRC hors fenêtre thérapeutique et auraient donc pu prétendre à une adaptation posologique. Néanmoins, l'impact du score

génétique sur les C_{min} suivantes semble moindre au cours du STP longitudinal : en effet, si la C_{min} initiale de VRC est significativement influencée par le score génétique, les C_{min} suivantes séquentielles ne le sont plus.

Les C_{min} suivantes de VRC étaient par ailleurs affectées par le type d'IPP utilisé. En effet, les C_{min} suivantes de VRC déterminées au décours d'un traitement par ésomeprazole étaient plus élevées que celles obtenues avec le pantoprazole. De tels résultats pourraient être mis sur le compte d'une moindre inhibition enzymatique du CYP2C19 par le pantoprazole par rapport à l'esomeprazole, comme cela a déjà été démontré *in vitro* [27]. Néanmoins, l'effet des IPP et notamment du pantoprazole sur les C_{min} de VRC reste sujet à controverse puisque le pantoprazole est associé tantôt à des C_{min} de VRC augmentées [4], tantôt à des C_{min} de VRC diminuées [6, 28] en comparaison à des C_{min} déterminées en l'absence d'IPP.

Une étude multicentrique australienne a récemment rapporté une interaction médicamenteuse entre le VRC et les glucocorticoïdes, cette association aboutissant à des C_{min} de VRC abaissées [4]. A l'inverse, nos résultats tout comme d'autres [6, 29] ont conclu à l'absence d'effet des corticoïdes sur les C_{min} de VRC. Ces discordances peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des populations d'étude, du type et des doses de glucocorticoïdes utilisés.

En conclusion, notre étude a montré que les génotypes des CYP2C19 et 3A4 influençaient de manière indépendante les C_{min} de VRC des patients allogreffés de CSH. Ainsi, la détermination d'un score génétique combinant ces deux génotypes pourrait présenter un intérêt pour adapter *a priori* les premières doses de VRC. Si le STP du VRC a déjà prouvé son utilité notamment en terme de gain d'efficacité [9], une optimisation supplémentaire de la thérapeutique antifongique pourrait consister à individualiser les premières doses de VRC sur la base du score génétique et adapter les suivantes sur la base du STP longitudinal.

DEUXIÈME PARTIE :

ARTICLE ORIGINAL EN ANGLAIS

Variability of voriconazole plasma concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of CYP450 polymorphisms and comedications on initial and subsequent trough levels

Elodie GAUTIER-VEYRET[1,2,3], Xavier FONROSE[3], Julia TONINI[3], Anne THIEBAUT-BERTRAND[4,5], Mireille BARTOLI[3], Jean-Louis QUESADA[6], Claude-Eric BULABOIS[4,5], Jean-Yves CAHN[1,4,5], Françoise STANKE-LABESQUE[1,2,3]

[1] Univ. Grenoble Alpes, HP2, Grenoble, France

[2] INSERM U1042, HP2, Grenoble, France

[3] Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

[4] Clinique d'Hématologie, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

[5] TIMC-Therex, UMR 5525, CNRS, France

[6] Département Scientifique de la Direction de la Recherche Clinique et des Innovations (DRCI), Grenoble University Hospital, Grenoble, France

Corresponding author:

Pr Françoise Stanke-Labesque

CHU, Hôpital A. Michallon, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CS 10217, Grenoble, F-38043 cedex 9, France. INSERM U1042

Tel: 33 4 76 76 54 92

Fax: 33 4 76 76 89 38

FStanke@chu-grenoble.fr

Short running title: determinants of voriconazole trough plasma concentrations

Key-words: Voriconazole, trough concentration, CYP2C19, CYP3A4, hematopoietic stem cell transplantation

Abstract

Background

Voriconazole (VRC) plasma trough concentrations (C_{min}) are highly variable and this could affect treatment efficacy and safety in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT). We aimed to describe the intra- and inter-individual variation of VRC C_{min} throughout the course of VRC therapy and to identify the determinants of this variation.

Methods

Clinical data, medications and VRC C_{min} (n=308) of 33 AHSCT patients were retrospectively collected. Genotypes of CYP2C19, CYP3A4 and CYP3A5 were determined before allograft and a combined genetic score was calculated for each patient. The higher the genetic score the faster the metabolism of the patient.

Results

VRC C_{min} inter- and intra-individual coefficients of variation were 84 % and 68 % respectively. VRC dose (D) was correlated to VRC C_{min} ($r=0.412$, $p<0.0001$) only for oral administration. The administration route and the genetic score significantly affected initial VRC C_{min}. Considering oral therapy, patients having a genetic score <2 had higher initial VRC C_{min}/D compared to patients with a genetic score >2 ($p=0.009$). Subsequent VRC C_{min} remained influenced by the genetic score ($p=0.004$), but were also affected by pump proton inhibitor comedication ($p<0.0001$).

Conclusion

The high variability of VRC C_{min} in AHSCT patients is partially explained by the route of administration, treatment with pump proton inhibitors and the genetic score. This study suggests the interest of combined genetic score determination to individualize *a priori* the VRC dose, and underlines the need for longitudinal therapeutic drug monitoring to adapt subsequent doses to maintain VRC C_{min} within the therapeutic range.

Introduction

Recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants (AHSCT) are at high risk of developing invasive fungal infections (IFI), in particular invasive aspergillosis (IA). Voriconazole (VRC) is a broad-spectrum triazole antifungal used as the first-line treatment of IA. Despite adequate care, mortality due to IA remains very high, reaching 56 % in AHSCT patients.[1] One possible explanation for this high rate of treatment failure could be an insufficient exposure to treatment. Indeed, several studies performed in heterogeneous cohorts of patients with underlying hematological malignancy, solid organ transplantation, surgery or various chronic diseases have suggested an association between low plasma trough concentrations (VRC C_{min}) and treatment failure. For example, the lack of response to VRC therapy was more frequent in patients with VRC C_{min} ≤1mg/L (46 %) than in those with VRC C_{min} >1 mg/L (12 %).[2] Similarly, VRC C_{min} in patients failing to respond to VRC therapy were lower compared to successfully treated patients.[3] Lastly, a median VRC C_{min} >2.2 mg/L was found to be a strong predictor of microbiological or clinical success.[4] Thus, a therapeutic target between 1 and 4-6 mg/L for VRC C_{min} has recently been proposed by the British Society for Medical Mycology.[5] However, VRC C_{min} is frequently below this efficacy threshold in patients suffering from hematologic malignancies,[6, 7] notably in AHSCT patients.[8]

VRC C_{min} exhibits large inter- and intra-individual variabilities[4, 9, 10] that could be in part related to nonlinear pharmacokinetics, metabolisation via cytochrome P450 (CYP) and drug-drug interactions.[3, 11] Younger age[3, 6, 12], oral administration of VRC[3, 13] and concomitant medication with enzyme inducers like phenytoin, rifampicin or also glucocorticoids[3, 14] are associated with decreased VRC C_{min}. In this context, therapeutic drug monitoring (TDM) of VRC is of particular interest. A prospective randomized study has recently demonstrated the interest of VRC TDM, since an improvement of treatment response and a decrease of drug

discontinuation due to adverse effects was obtained in patients benefiting from TDM.[15] Nevertheless, TDM-based dose adjustment has some limits: a VRC dose change can lead to irregular changes in VRC C_{min} and TDM only allows dose adjustment *a posteriori* whereas it seems crucial to obtain adequate VRC C_{min} as soon as possible after the start of treatment.[4, 16] Indeed, an initial VRC C_{min} ≤0.35 mg/L appeared to be a strong predictor of mortality.[4] Since VRC is extensively metabolized by CYP450,[17] it could be hypothesized that genetics affecting CYP450 have a strong influence on initial VRC C_{min}. Thus, identifying relevant genetic polymorphisms could be useful when proposing *a priori* dose adjustment and to reach an adequate VRC C_{min} from the first determination. CYP 2C19, 3A4, 3A5 and to a lesser extent 2C9, are involved in VRC metabolism;[17] all of these CYPs exhibit a number of clinically relevant polymorphisms. Genetic studies focusing on the CYP2C19 genotype have already demonstrated a link between the gain-function allele *17 and an insufficient VRC C_{min},[18] or between alleles *2 and *3 and increased VRC C_{min}.[19] The impact of CYP2C19 genotype on VRC pharmacokinetics was later confirmed by several population pharmacokinetic studies.[14, 20] Moreover, the presence of a CYP2C19 polymorphism has been associated with a higher frequency of out-of-range VRC C_{min} in lung transplant cystic fibrosis patients.[21] However, the impact of CYP3A polymorphisms on VRC C_{min} has never been investigated.

The intra-individual variability of VRC C_{min} is also considerable,[4, 9, 10] requiring regular VRC C_{min} determinations throughout the duration of VRC treatment.[5] Some authors reported no correlation between the first and subsequent VRC C_{min},[9] whereas others showed that initial and subsequent VRC C_{min} were correlated only when initial VRC C_{min} was greater than 2 mg/L.[10]

This retrospective study aimed to describe the variations of VRC C_{min} throughout the course of VRC therapy in a cohort of AHSCT patients, and to identify the determinants of the variability in the first and in subsequent VRC C_{min} values.

Materiel and methods

Patients

This study was conducted in Grenoble University Hospital Center, France. Adult (>18 years old) patients who had received an AHSCT, were treated with VRC and underwent TDM of VRC between January 2011 and July 2013 were eligible. VRC C_{min} determined before the allograft or before VRC pharmacokinetic reached a steady state and patients with less than three VRC C_{min} determinations were excluded. After treatment initiation (without loading dose) or dose adjustment, a 3-day period was considered necessary to obtain a VRC C_{min} steady state. Demographic and clinical data, records concerning VRC therapy (C_{min}, daily dose and route of administration) and concomitant medications were retrospectively collected. All patients gave written informed consent for genetic analysis, sample collection and use of their data. This retrospective study realized on residual samples stored in a biological sample collection (DRC-2013-1983) was approved by the regional Ethics Committee.

Classification of invasive aspergillosis

IFI were classified as possible, probable or proven according to the guidelines from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/ European Invasive Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases - Mycoses Study Group criteria (EORTC/MSG).[22]

Measurement of plasma VRC trough concentration

VRC C_{min} were measured by a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method.[23] Briefly, after protein precipitation, samples were injected into a 2-dimensional chromatographic system. In the first step, samples were cleaned in a perfusion chromatography column before being eluted and transferred to an analytical column. Finally, compounds were detected by tandem mass spectrometry. The plasma drug standard curve ranged from 0.1 to 20 mg/L. The therapeutic range was between 1 and 5 mg/L.

Genotyping

Genotyping was performed on residual samples from routine biological analyses collected before the allograft. DNA was extracted from white blood cells using Macherey-Nagel NucleoSpin™ Blood L kit (Hoerd, France).

CYP2C19 genotyping

The quality and quantity of DNA was checked with the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific®, Illkirch, France). CYP2C19 genotyping was realized by direct sequencing after DNA amplification using specific primers for *2, *3 (associated with low CYP2C19 activity) and *17 alleles (associated with increased CYP2C19 activity) (see supplemental data, Table E1). The presence of the wild-type allele CYP2C19*1 was inferred in the absence of CYP2C19*2, CYP2C19*3 and CYP2C19*17. Patients were classified as ultra-rapid (URM), extensive (EM) or intermediate metabolizer (IM) according to the established genotype-phenotype relationships proposed by Mega and colleagues (see supplemental data, Table E2).[24]

CYP3A genotyping

The CYP3A4*22 allele (associated with low CYP3A4 activity) and the CYP3A5*1 allele (associated with CYP3A5 expression) were studied using the Taqman® allelic discrimination assay (Life Technologies™, Illkirch, France). Patients were classified as intermediate metabolizers (IM) if they had the *22 allele and extensive metabolizer (EM) if not.

Determination of genetic score

To evaluate the impact of both CYP2C19 and CYP3A genotypes, a combined genetic score was calculated for each patient. First, a specific genetic score was separately attributed to each CYP2C19 and CYP3A genotype and both specific scores were then added to obtain the combined genetic score (see Table 2). Briefly, the specific genetic score for each cytochrome was determined as follows: the absence of any polymorphism (genotype *1/*1 for CYP2C19, absence of CYP3A4*22 and the presence of CYP3A5*3/*3 for CYP3A) conferred a score equal to 1, whereas the presence of a gain or a loss-of-function allele inferred respectively an increase or a decrease in the genetic score. The fluctuation of the genetic score was +/- 0.5 when the gain or the loss-of-function allele was heterozygous or +/- 1 when the gain or the loss-of-function allele was homozygous. The genetic score was expressed in arbitrary units. Patients were classified into three categories of genetic score: <2, 2 and >2. A genetic score equal to 2 corresponds to normal CYP2C19 and CYP3A activities (or the association of one gain-of-function allele and one loss-of-function allele), whereas a genetic score < or >2 reflects diminished or increased CYP2C19 and CYP3A activities respectively.

Data analysis

Statistical analyses were performed using Statview software, version 5.0 (SAS® Intitute, North Carolina). Quantitative data are expressed as median and 10^{th} and 90^{th} percentiles. Statistical analyses were performed separately on the initial VRC C_{min} and on the subsequent VRC C_{min}. Comparisons between groups (male *versus* female, intravenous (IV) therapy *vs.* oral therapy, CYP2C19 and CYP3A phenotypes, genetic score) were performed with non-parametric tests (Mann-Whitney test to compare 2 groups, or Kruskal-Wallis test followed by Bonferroni adjusted t test to compare at least 3 groups). A Wilcoxon rank test was used for the comparison of pairwise series. As the numbers of VRC C_{min} determinations varied among patients, the frequency of VRC $C_{min} \leq$1mg/L was calculated for each patient. The percentages of VRC $C_{min} \leq$1mg/L according to the genetic score groups were compared using Fisher's test at the first VRC C_{min} determination and using the Mann-Whitney test for subsequent VRC C_{min}. A Spearman test was used to study the correlation between two quantitative variables. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism using the online method of Rodriguez *et al.*[25] Univariate and multivariate linear regression analyses were used to identify the determinants contributing to the variability of VRC C_{min}. A p-value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Population characteristics

Thirty-three AHSCT patients were included in our study. Table 1 summarizes their demographic characteristics, hematological diagnoses and conditioning regimens. All patients received VRC therapy for IA, except 1 patient who had invasive candidiasis. The

classification of IA is detailed in Table 1, but for 2 patients IA could not be retrospectively classified.

CYP450 polymorphisms

Genotyping was performed for 88 % of patients (n=29) (blood samples before the allograft were not available for other patients). The proportions of CYP2C19 and 3A genotypes are described in the supplemental data (Tables E2 and E3). For CYP2C19, 37 % (n=11), 34 % (n=10) and 28 % (n=8) of patients were classified as URM, EM and IM respectively. All patients classified as IM for CYP2C19 expressed the *2 allele, while no *3 allele was detected in our cohort. The CYP3A4*22 polymorphism was detected in 24 % (n=7) of patients, and a single patient expressed CYP3A5. The Hardy-Weinberg equilibrium was respected for each allele (CYP2C19*2: χ^2=0.74, p=0.39; CYP2C19*17: χ^2=0.34, p=0.56; CYP3A4*22: χ^2=0.55, p=0.46) and no linkage disequilibrium was detected between CYP3A4 and CYP2C19 genotypes (p=0.46). Concerning the combined genetic score, 34 % of patients (n=10) had a genetic score <2, 34 % (n=10) had a genetic score equal to 2 and 31 % (n=9) a genetic score >2 (Table 2).

VRC therapeutic drug monitoring

A total of 308 VRC C_{min} were analysed (Table 3), representing a median of 9 dosages per patient (range: 3-25) for a median follow-up duration of VRC C_{min} TDM of 94 (14-269) days. The median delay between two VRC C_{min} determinations was 7 (4-21) days. The description of VRC C_{min}, proportion of oral VRC therapy and comedications are detailed in Table 3. The inter-individual coefficient of variation (CV) was 84 %, whereas the median intra-individual CV was 68 % (ranging from 14 to 185 %). Forty-two percent of VRC C_{min} were out of the

therapeutic range and 85 % (n=28) of patients had at least one inadequate VRC C_{min} during their course of treatment. Figure 1a illustrates this high intra and inter individual variability.

During the course of treatment of the 33 patients, 30 VRC dose adjustments for 16 patients were performed, representing 11% of 275 follow-up VRC C_{min} for 48 % of patients. Seventy percent (n=21) of these dose modifications were realized without changing the VRC route of administration, while 27 % (n=8) resulted from an IV-to-oral switch, and 3 % (n=1) were discontinuations of VRC therapy due to an overdose.

Figure 1b shows the relationships between VRC daily dose (expressed in mg per day) and VRC C_{min} for both routes of administration. Considering oral administration, VRC C_{min} presented a CV of 72 % and was weakly correlated to VRC daily dose ($r=0.412$, $p<0.0001$), while IV administration led to a VRC C_{min} CV of 101 %, and no correlation was found with daily dose ($r=0.096$, $p=0.5$).

Initial VRC trough concentrations

The description of initial VRC C_{min} is detailed in Table 3. Thirty-nine percent of initial VRC C_{min} were out of the therapeutic range with the majority under the lower therapeutic limit: 33 % being <1 mg/L and 6 % being >5 mg/L. VRC IV administration was associated with higher initial VRC C_{min} compared to oral treatment (IV: 1.7 mg/L (0.3-5.9) *versus* oral: 1.0 mg/L (0.1-2.9); $p=0.03$). Sex, age and body mass index (BMI) had no impact on initial VRC C_{min} ($p=0.5$, $p=0.8$, $p=0.3$ respectively).

Influence of CYP450 polymorphisms

The influence of CYP450 polymorphisms was studied on initial VRC C_{min} adjusted on VRC dose (VRC C_{min}/D) to overcome the influence of VRC dose. After oral administration, the CYP2C19 phenotype affected initial VRC C_{min}/D (Kruskal Wallis test: p=0.04) with higher initial VRC C_{min}/D in IM compared to URM patients (post-hoc test: p=0.007, figure 2a). Similarly, the presence of the *22 allele for CYP3A4 was associated with statistically significant increased VRC C_{min}/D (figure 2c). The combined genetic score influenced VRC C_{min}/D (Kruskal Wallis test: p=0.01), with a genetic score >2 associated with a lower VRC C_{min}/D compared to a genetic score <2 (post-hoc test: p=0.009, figure 2e).

Studying all initial VRC C_{min} independently of VRC route of administration provided similar results: a trend towards an influence of the CYP2C19 phenotype (Kruskal Wallis test: p=0.08, figure 2b), an influence of the *22 allele (Man-Whitney test: p=0.05, figure 2d) and of the genetic score (Kruskal Wallis test p=0.05, figure 2f) on the first VRC C_{min}/D.

None of the patients having a genetic score <2 presented an initial VRC C_{min} <1 mg/L while 47 % of patients having a genetic score ≥2 had an initial VRC C_{min} <1 mg/L (Fischer test: p=0.01).

In a multiple linear regression model integrating the VRC route of administration, the initial VRC dose and the combined genetic score, the combined genetic score remained an independent predictor of initial VRC C_{min} (r^2=0.33, p=0.04).

Subsequent VRC trough concentrations

Longitudinal TDM of VRC C_{min} is detailed in Table 3. 37 % of the subsequent VRC C_{min} were outside the therapeutic range, 36 % being <1 mg/L and 1% >5 mg/L. The route of administration had no impact on follow-up VRC C_{min} [IV: 0.9 mg/L (0.3-4.8) *versu*s oral: 1.4 mg/L (0.2-3.3); p=0.9].

Influence of CYP450 polymorphisms

The combined genetic score influenced subsequent VRC C_{min} or subsequent VRC C_{min}/D (Figure 3a, 3b) (Kruskal Wallis test: p=0.004 and p<0.0001, respectively), subsequent VRC C_{min} of patients having a genetic score >2 was lower than that of patients with genetic score <2 (post-hoc test: p=0.002).

Figure 3c shows the evolution of VRC C_{min} during repeated TDM in patients stratified according to the combined genetic score. As shown in Figure 2c, initial VRC C_{min} was significantly affected by the genetic score (Kruskal Wallis test: p=0.03), while at each subsequent TDM VRC C_{min} measurement, VRC C_{min} was not significantly different between the genetic score categories.

The frequency of VRC C_{min} values <1 mg/L was higher (p=0.05) in patients having a genetic score ≥2 (50% (0-100)) compared to these with a genetic score <2 (21% (0-56)).

Influence of diarrhoea

Clinical events contemporary with VRC C_{min} measurements were available for 77 % of subsequent VRC C_{min} (n=212). Since diarrhoea could impact VRC C_{min} by reducing VRC absorption, the effect of diarrhoea was investigated during *per os* VRC therapy. Among the 235 VRC C_{min} obtained during oral VRC treatment, clinical events were available for 193

VRC C_{min}. Eleven episodes of diarrhoea were reported by 9 different patients, i.e. a frequency of 6 %. VRC C_{min} was not influenced by diarrhoea (VRC C_{min} with and without diarrhoea: 1.6 mg/L (0.3-3.8) *versus* 1.3 mg/L (0.2-2.9); p=0.2). The influence of gastrointestinal graft versus host disease (GVHD) or mucositis could not be tested in our cohort because only two episodes of gastrointestinal GVHD and one of mucositis were reported during the course of VRC oral treatment.

Influence of concomitant medication

Data on concomitant treatments were available for 95 % of VRC C_{min} (n=259). Ninety-four percent (n=244) of the subsequent VRC C_{min} were determined whilst the patient was on proton pump inhibitor (PPI) treatment; esomeprazole and pantoprazole being the most frequently used PPI (Table 3). Each PPI influenced VRC C_{min} differently (Kruskal Wallis test: p<0.0001, figure 4). Post-hoc analysis revealed higher VRC C_{min} when the PPI was esomeprazole compared to pantoprazole (p<0.0001), whereas there was no statistically significant difference between rabeprazole and esomeprazole/pantoprazole. This difference was also observed after stratification according to genetic scores (data not shown).

Treatment with glucocorticoids had no impact on VRC C_{min} (1.3 mg/L (0.1-3.2) with *versus* 1.4 mg/L (0.3-3.4) without; p=0.2). Since a multi-centre study recently reported an interaction between glucocorticoids and VRC,[3] a pairwise patient analysis was realized to further explore this drug-drug interaction. Patients who benefited from VRC C_{min} determinations with and without concomitant treatment by corticoids for at least 7 days were selected (n=10). For each patient, the mean VRC C_{min} with or without glucocorticoid treatment was calculated. To overcome the influence of the route of administration, only VRC C_{min} obtained during oral therapy were used. Comparison of VRC C_{min} in these paired series confirmed the absence of any effect of glucocorticoid treatment on VRC C_{min} (Supplemental data, Figure E1).

Immunosuppressive therapies including calcineurin inhibitors, mycophenolate or everolimus had no effect on subsequent VRC C_{min}. Similarly, subsequent VRC C_{min} was not influenced by comedication with various CYP2C19 and/or CYP3A enzyme inhibitors (data not shown).

Discussion

The present study demonstrates that in a homogeneous cohort of AHSCT patients, VRC C_{min} exhibits high inter- and intra-individual variability, resulting in almost half VRC C_{min} being out of the therapeutic range. On the whole, this variability could be partially explained by a combined genetic score that takes into account both CYP2C19 and 3A genotypes, the VRC route of administration, and any comedication with PPI.

Early optimal antifungal therapy improves the clinical outcome in patients with IFI,[26, 27] but an initial VRC C_{min} $\leq$0.35 mg/L is a strong predictor of mortality.[4] These studies suggested the importance of adjusting the VRC dose right from the first administration to reach VRC C_{min} within the therapeutic range early on. Our study demonstrates for the first time that a genetic score combining both CYP2C19 and 3A4 genotypes is an independent predictor of initial VRC C_{min}. The impact of a CYP2C19 phenotype on initial VRC C_{min} was already suggested by a study on a Korean cohort of patients with hematological diseases, without reaching statistical significance.[28] In our cohort, CYP2C19 IM patients had statistically significant higher initial VRC C_{min}/D compared to CYP2C19 URM patients, confirming the importance of CYP2C19 polymorphisms on the variability of initial VRC C_{min}. In addition to CYP2C19, VRC is also metabolized through the CYP3A pathway[17] which also exhibits clinically relevant polymorphisms. For example updated tacrolimus dosage guidelines based on CYP3A4*22 and CYP3A5*3 allelic status have recently been proposed in kidney

transplantation.[29] Our study provides the first demonstration that a CYP3A4 genotype also significantly influences VRC C_{min} in AHSCT patients, since the loss-of-function allele *22 was associated with higher initial VRC C_{min}/D. Since the frequencies of CYP2C19 and CYP3A single nucleotide polymorphisms were independent of one another, it was therefore of interest to calculate a combined genetic score integrating both CYP genotypes. Interestingly, a genetic score <2 was associated with higher VRC C_{min}/D compared to a genetic score >2. Moreover, none of the patients having a genetic score <2 presented an initial VRC C_{min} inferior to the efficacy threshold fixed at 1 mg/L, while 47 % of the patients with a genetic score ≥2 had a subtherapeutic initial VRC C_{min}. These data suggest that this combined genetic score could help to individualize VRC dose from the first administration onwards, as recently suggested for CYP2C19[14, 30] and to reduce the risk of out-of-range VRC C_{min} at the first determination.

Throughout VRC treatment, repeated adequate sustained VRC C_{min} measurements, rather than a single VRC C_{min} determination have been shown to ensure treatment success.[4, 12, 31] However, few studies have focused on longitudinal VRC TDM,[4, 10, 12, 21] even though is recommended to repeat VRC C_{min} determinations during therapy[5] in view of the large VRC intra-individual variability,[4, 7] especially in AHSCT patients.[10, 32]

Follow-up VRC C_{min} remained influenced by the genetic score despite dose adjustment being made during longitudinal TDM. However, this finding could be explained by the low frequency of dose adjustments in our cohort, in fact, VRC dose adjustments were made for only 16 % of patients, while 85 % of patients had at least one VRC C_{min} outside the therapeutic range and would be likely to need a VRC dose adjustment. Nevertheless, the genetic-related variability of VRC C_{min} was slightly reduced during TDM, notably after 5 VRC C_{min} measurements although VRC C_{min} variability remained high.

Concomitant treatments are known to affect VRC C_{min}, notably drugs able to influence VRC metabolism by competition at the CYP catalytic site, such as PPI,[3, 7, 33] or by induction of protein expression such as phenytoïn.[3] In our cohort, PPI were used widely, and pantoprazole was associated with lower VRC C_{min} compared to esomeprazole. Consistent with these findings, an *in vitro* study on human liver microsomes has demonstrated that pantoprazole has a lower inhibitory potency on CYP2C19 activity compared to esomeprazole and to a lesser extent to rabeprazole.[34] Conversely, PPI exhibited no inhibition of CYP3A activity at concentrations in the same order of magnitude as the plasma levels encountered *in vivo*.[34] Thus, the reduced VRC C_{min} in patients treated with pantoprazole we observed could be explained by its lower inhibitory potency on CYP2C19 activity. However, the effect of PPI, especially pantoprazole on VRC $C_{min,}$ is far from fully understood since clinical studies investigating VRC pharmacokinetics have demonstrated either increased[3] or decreased VRC C_{min}[6, 35] in patients treated with pantoprazole compared to untreated PPI patients. Since it's well known that PPI competitively inhibit CYP2C19,[3, 7, 33, 34] taken together these results suggest that PPI treatment significantly contributes to the variability of VRC C_{min}.

Another drug-drug interaction, between VRC and glucocorticoids, leading to reduced VRC C_{min} has been suggested by a single study,[3] and proposed to be the result of CYP induction by glucocorticoids. However, our data and other studies[6, 36] did not support such an interaction, and in the present study, steroid use induced no significant change on VRC C_{min} both in the overall analysis performed with all VRC C_{min} and in the pairwise patient analysis. These conflicting results could be explained by the heterogeneity of the studied populations, the type and the dose of glucocorticoid. Indeed, AHSCT patients in our study preferentially received prednisone, prednisolone or also methylprednisolone at low and decreasing doses; whereas the effect of glucocorticoid was previously demonstrated in an heterogeneous population

including patients suffering from autoimmune diseases for whom dexamethasone treatment was more frequent and glucocorticoid doses higher.[3]

In our cohort, sex, age and BMI had no impact on VRC C_{min}, whereas previous studies have identified age[3, 6, 12] and BMI as factors influencing VRC C_{min}.[3, 6] However, patients of these latter studies were much older and had a higher BMI than those of our cohort, which could contribute to explaining these discrepancies. Moreover, the influence of BMI or body weight on VRC C_{min} remains to be further explored since although excess weight has been associated with either reduced VRC C_{min}[3] or toxic VRC C_{min},[6] other works using a population pharmacokinetic approach did not report any effect of body weight on VRC pharmacokinetics.[14, 20, 37] In addition, we found no effect of diarrhoea on VRC C_{min}, as previously described.[7] The influence of diarrhoea was studied in a subgroup with C_{min} determined during VRC oral administration, since a decreased absorption could be hypothesized, as previously described for posaconazole.[38] In contrast, Hoenigl and colleagues[6] identified diarrhoea as a factor associated with toxic levels of VRC C_{min} but their cohort included patients with hematological malignancies and/or admitted in an intensive care unit and the two routes of VRC administration were not distinguished.

There are several limitations of our study. First, this study was retrospective, performed in a single center and the number of patients was small. Second, the delay between blood sampling and the last VRC administration was rarely available, so VRC C_{min} determined at inappropriate times could not be excluded and could contribute to the observed variability. Nevertheless, our data provide the groundwork for a multicenter prospective trial to confirm the clinical interest of a combined genetic score to adjust the first VRC doses.

In conclusion, our data confirm the influence of CYP2C19 and provide strong evidence that CYP3A genotypes also influence VRC exposure in AHSCT patients. In this regard, the determination of a genetic score taking into account both CYP genotypes could be of clinical interest to adjust *a priori* the first VRC doses. An improvement in the efficacy and safety of VRC therapy thanks to TDM has already been demonstrated.[15] A further improvement could be expected with an approach that combines individualization of the initial VRC doses according to the genetic score and adaptation of following doses according to longitudinal TDM to manage drug-drug interactions.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of 33 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients who experienced therapeutic drug monitoring of voriconazole

	n (%) or median (10^{th}-90^{th} percentiles)
Demographics	
Age, years [a]	52.2 (35.1-60.1)
% male	20 (61)
Body mass index, kg/m² [a]	22.5 (16.6-31.4)
Classification of IFI[b]	
Proven IFI	2 (6)
Probable IFI	15 (46)
Possible IFI	14 (42)
Not determined	2 (6)
Hematological diagnoses	
Acute myeloid leukemia	22 (67)
Acute lymphoblastic leukemia	5 (15)
Non-Hodgkin lymphoma	3 (9)
Chronic lymphocytic leukemia	2 (6)
Myelodysplastic syndrome	1 (3)
Conditioning regimens	
Myeloablative	8 (24)
Non myeloablative	25 (76)
Matching	
yes	22 (67)
no	11 (33)

IFI, invasive fungal infection. [a] Data are expressed as median (10^{th}-90^{th} percentiles). [b] All patients were treated for invasive pulmonary aspergillosis, except one patient who had invasive candida infection.

Table 2. Calculated combined genetic score (number of patients) according to CYP2C19 and CYP3A genotypes

		CYP2C19			
		*2/*1	*1/*1	*17/*1	*17/*17
	CYP specific genetic score	0.5	1	1.5	2
CYP3A 3A4*22/*1 3A5*3/*3	0.5	**1 (n=3)**	**1.5 (n=2)**	**2 (n=2)**	**2.5 (n=0)**
3A4*1/*1 3A5*3/*3	1	**1.5 (n=5)**	**2 (n=8)**	**2.5 (n=7)**	**3 (n=1)**
3A4*1/*1 3A5*1/*3	1.5	**2 (n=0)**	**2.5 (n=0)**	**3 (n=0)**	**3.5 (n=1)**

Grey levels indicate the 3 genetic score categories: genetic score <2 in light grey, genetic score equal to 2 in medium grey and genetic score >2 in dark grey.

Table 3. Voriconazole plasma trough concentrations

	VRC C_{min}		
	All (n=308)	Initial (n=33)	Following (n=275)
Mean, mg/L	1.6	1.9	1.6
Median, mg/L	1.3	1.4	3.0
Range, mg/L	<0.1-9.7	<0.1-9.7	<0.1-8.1
≤1 mg/L, %	40	33	36
>5 mg/L, %	2	6	1
Frequency of VRC oral therapy [a], %	82	58	85
Determination during hospitalization, %	29	64	25
VRC dosing, mg/day [b]	400 (400-600)	400 (400-617)	400 (400-600)
Concomitant treatment, %			
Cyclosporine/Tacrolimus/others[c]	47/13/40	73/9/18	44/14/42
Enzyme inhibitor[d]	41	15	44
Glucocorticoid[e]	29	18	30
Esomeprazole/Pantoprazole/Rabeprazole/no PPI	40/55/3/2	42/49/3/6	40/55/3/2

VRC, voriconazole; PPI, pump proton inhibitor. [a] Only the tablet form was used for oral VRC therapy. [b] Data was expressed as median (10^{th}-90^{th} percentiles). [c] Others included immunosuppressive therapy by mycophenolate, everolimus or absence of immunosuppressive therapy. [d] Enzyme inhibitors included dihydropyridine, macrolide, verapamil, amiodarone, amitriptyline, citalopram, metronidazole (all of these drugs being CYP2C19 and/or CYP3A inhibitors). [e] Glucocorticoids used were prednisone, prednisolone and methylprednisolone.

Acknowledgments

We thank Christel Roche for her excellent technical assistance, Alison Foote for editing the manuscript and Dr Martine Chauvet, Pr Dominique Leroux, Céline Suchaud, Dr Dominique Masson and Dr Beatrice Bardy for their collaboration.

Funding

No specific funding has been received for this study since all the data were generated as part of routine hospital care.

Transparency declaration

None conflict of interest declared.

References

1. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1882-9.
2. Pascual A, Calandra T, Bolay S et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 201-11.
3. Dolton MJ, Ray JE, Chen SC et al. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4793-9.
4. Miyakis S, van Hal SJ, Ray J et al. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 927-33.
5. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**:1162-76.
6. Hoenigl M, Duettmann W, Raggam RB et al. Potential factors for inadequate voriconazole plasma concentrations in intensive care unit patients and patients with hematological malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3262-7.
7. Racil Z, Winterova J, Kouba M et al. Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses* 2012; **55**: 483-92.
8. Trifilio S, Ortiz R, Pennick G et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 509-13.
9. Miyakis S, van Hal SJ, Solvag CJ et al. Clinician ordering practices for voriconazole therapeutic drug monitoring: experiences of a referral laboratory. *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 661-4.
10. Trifilio SM, Yarnold PR, Scheetz MH et al. Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1793-6.

11. Nivoix Y, Levêque D, Herbrecht R et al. The enzymatic basis of drug-drug interactions with systemic triazole antifungals. *Clin Pharmacokinet* 2008; **47**: 779-92.
12. Mitsani D, Nguyen MH, Shields RK et al. Prospective, observational study of voriconazole therapeutic drug monitoring among lung transplant recipients receiving prophylaxis: factors impacting levels of and associations between serum troughs, efficacy, and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2371-7.
13. Hope WW. Population pharmacokinetics of voriconazole in adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 526-31.
14. Dolton MJ, Mikus G, Weiss J et al. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**:1633-41.
15. Park WB, Kim NH, Kim KH et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 1080-7.
16. Andes D, Lepak A. Editorial commentary: Antifungal therapeutic drug monitoring progress: getting it right the first time. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 391-3.
17. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 540-7.
18. Hassan A, Burhenne J, Riedel KD et al. Modulators of very low voriconazole concentrations in routine therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 86-93.
19. Narita A, Muramatsu H, Sakaguchi H et al. Correlation of CYP2C19 phenotype with voriconazole plasma concentration in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; **35**: e219-23.
20. Wang T, Chen S, Sun J et al. Identification of factors influencing the pharmacokinetics of voriconazole and the optimization of dosage regimens based on Monte Carlo simulation in patients with invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 463-70.
21. Berge M, Guillemain R, Trégouet DA et al. Effect of cytochrome P450 2C19 genotype on voriconazole exposure in cystic fibrosis lung transplant patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; **67**: 253-60.
22. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious

Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813-21.

23. Jourdil JF, Tonini J, Stanke-Labesque F. Simultaneous quantitation of azole antifungals, antibiotics, imatinib, and raltegravir in human plasma by two-dimensional high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; **919-920**: 1-9.

24. Mega JL, Close SL, Wiviott SD et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; **360**: 354-62.

25. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* 2009; **169**: 505-14.

26. Kollef M, Micek S, Hampton N et al. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1739-46.

27. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3640-5.

28. Kim SH, Lee DG, Kwon JC et al. Clinical Impact of Cytochrome P450 2C19 Genotype on the Treatment of Invasive Aspergillosis under Routine Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in a Korean Population. *Infect Chemother* 2013; **45**: 406-14.

29. Elens L, Capron A, van Schaik RH et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Ther Drug Monit* 2013; **35**: 608-16.

30. Owusu Obeng A, Egelund EF, Alsultan A et al. CYP2C19 Polymorphisms and Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole: Are We Ready for Clinical Implementation of Pharmacogenomics? *Pharmacotherapy* 2014 in press.

31. Neely M, Rushing T, Kovacs A et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 27-36.

32. Trifilio S, Pennick G, Pi J et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007; **109**: 1532-5.

33. Boyd NK, Zoellner CL, Swancutt MA et al. Utilization of omeprazole to augment subtherapeutic voriconazole concentrations for treatment of Aspergillus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6001-2.
34. Li XQ, Andersson TB, Ahlström M et al. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 821-7.
35. Johnson HJ, Han K, Capitano B et al. Voriconazole pharmacokinetics in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 852-9.
36. Chu HY, Jain R, Xie H et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 105.
37. Pascual A, Csajka C, Buclin T et al. Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 381-90.
38. Tonini J, Thiébaut A, Jourdil JF et al. Therapeutic drug monitoring of posaconazole in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients who develop gastrointestinal graft-versus-host disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 5247-52.

Legends of figures

Figure 1. Variability of voriconazole plasma trough concentrations.

(1a) Median, maximal and minimal voriconazole plasma trough concentrations in 33 post-AHSCT patients. The grey zone represents the therapeutic range.

(1b) Relationships between voriconazole dose (expressed as mg per day) and plasma trough concentration for both routes of administration. Data are presented as interquartile range (boxes), data range (whiskers) and median (horizontal line). Numbers are indicated above boxes.

Figure 2. Influence of CYP450 polymorphisms on initial voriconazole plasma trough concentrations adjusted to the dose (VRC C_{min}/D).

Influence of CYP2C19 phenotypes on initial VRC C_{min}/D ratio obtained during VRC oral treatment (PO) (2a) and on all initial VRC C_{min}/D ratio (PO+IV) (2b).

Influence of CYP3A phenotypes on initial VRC C_{min}/D ratio obtained during VRC oral treatment (PO) (2c) and on all initial VRC C_{min}/D ratio (PO+IV) (2d).

Influence of the genetic score on initial VRC C_{min}/D ratio obtained during VRC oral treatment (PO) (2e) and on all initial VRC C_{min}/D ratio (PO+IV) (2f).

Data are presented as interquartile range (boxes), data range (whiskers) and median (horizontal line). Only the significant p-value obtained for the post-hoc Bonferroni test (<0.0167) is shown. Abbreviations: VRC, voriconazole; CYP, cytochrome; PO, per os; IV, intravenous; URM, ultra-rapid metabolizer; EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer.

Figure 3. Influence of the genetic score on follow-up voriconazole plasma trough concentrations.

Follow-up VRC C_{min} (3a) or C_{min}/D ratio (3b) according to the genetic score. Data are presented as interquartile range (boxes), data range (whiskers) and median (horizontal line) and only the significant p-value obtained for post-hoc Bonferroni test (<0.0167 for three groups) is shown.

(3c) Temporal evolution of VRC trough concentrations throughout longitudinal TDM according to the genetic score. The grey zone represents the therapeutic range. Circles, triangles and squares represent the mean (+/- standard deviation) of VRC C_{min} for patients having a genetic score <2, equal to 2 and >2 respectively. The asterisk indicates a p-value <0.05 for the Kruskal Wallis test. Second, third, fourth and fifth determinations of VRC C_{min} were obtained after a median period of 7 (2.8-28), 14 (7.0-36), 35 (11-59) and 53 (20-87) days after the first determination.

Figure 4. Influence of pump proton inhibitor treatment on voriconazole plasma trough concentrations.

Data are presented as interquartile range (boxes), data range (whiskers) and median (horizontal line).

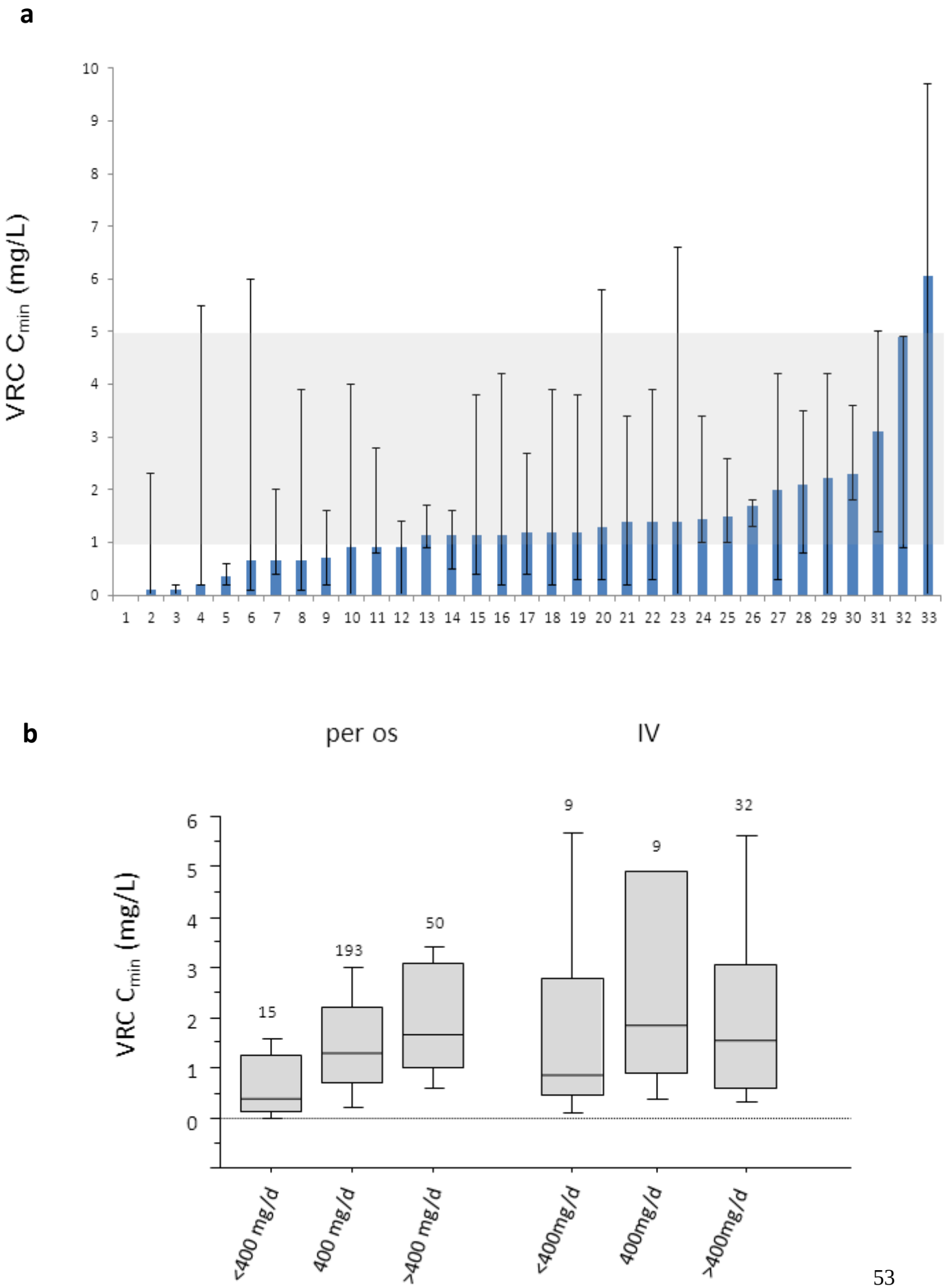

a
VRC C_{min} (mg/L)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
b
per os
IV
VRC C_{min} (mg/L)
6
5
4
3
2
1
0
15
193
50
9
9
32
<400 mg/d
400 mg/d
>400 mg/d
<400mg/d
400mg/d
>400mg/d

Figure 1

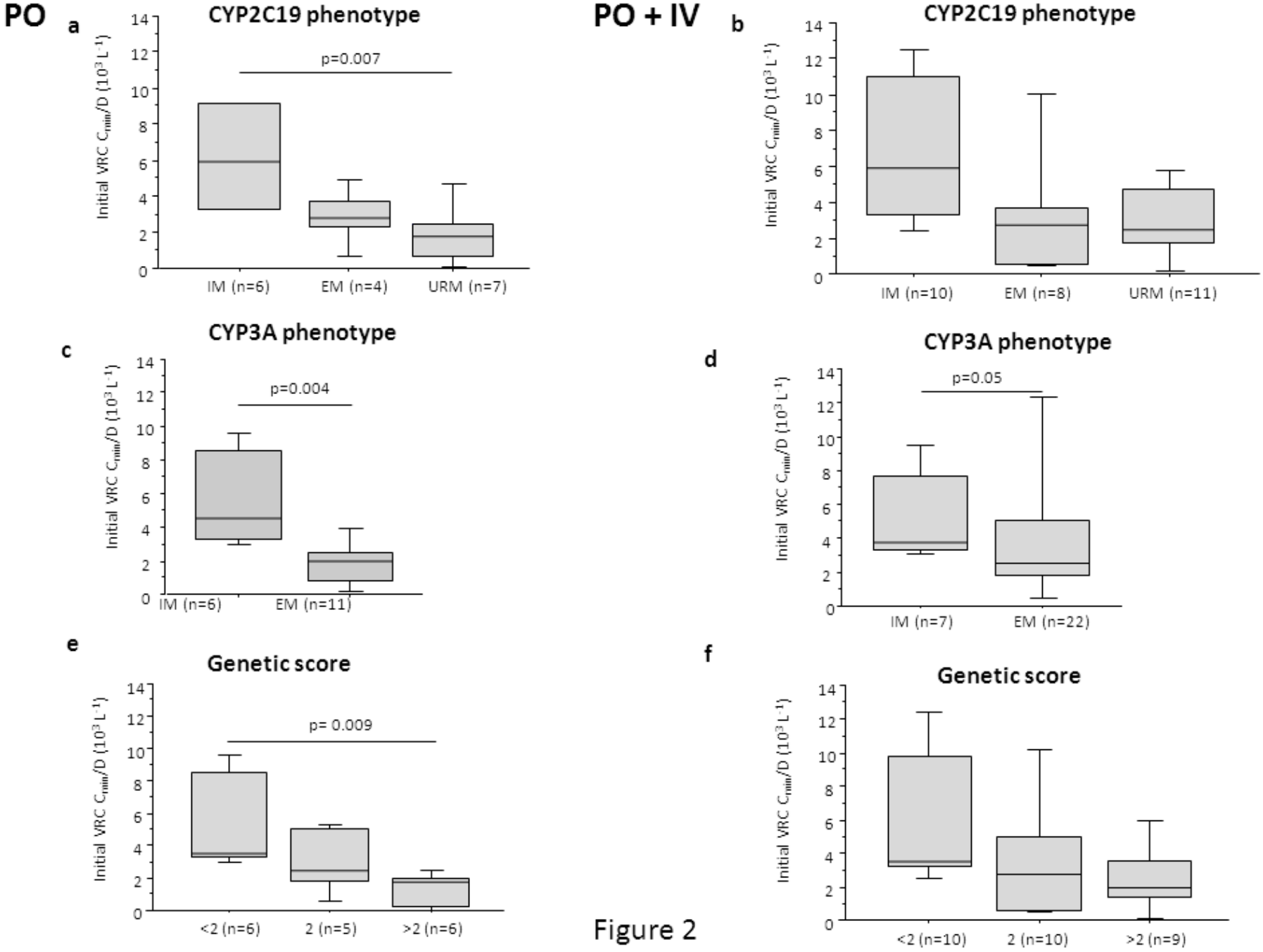

PO
a
CYP2C19 phenotype
p=0.007
Initial VRC C_{min}/D (10^3 L^{-1})
IM (n=6)
EM (n=4)
URM (n=7)
PO + IV
b
CYP2C19 phenotype
IM (n=10)
EM (n=8)
URM (n=11)
c
CYP3A phenotype
p=0.004
IM (n=6)
EM (n=11)
d
CYP3A phenotype
p=0.05
IM (n=7)
EM (n=22)
e
Genetic score
p= 0.009
<2 (n=6)
2 (n=5)
>2 (n=6)
f
Genetic score
<2 (n=10)
2 (n=10)
>2 (n=9)

Figure 2

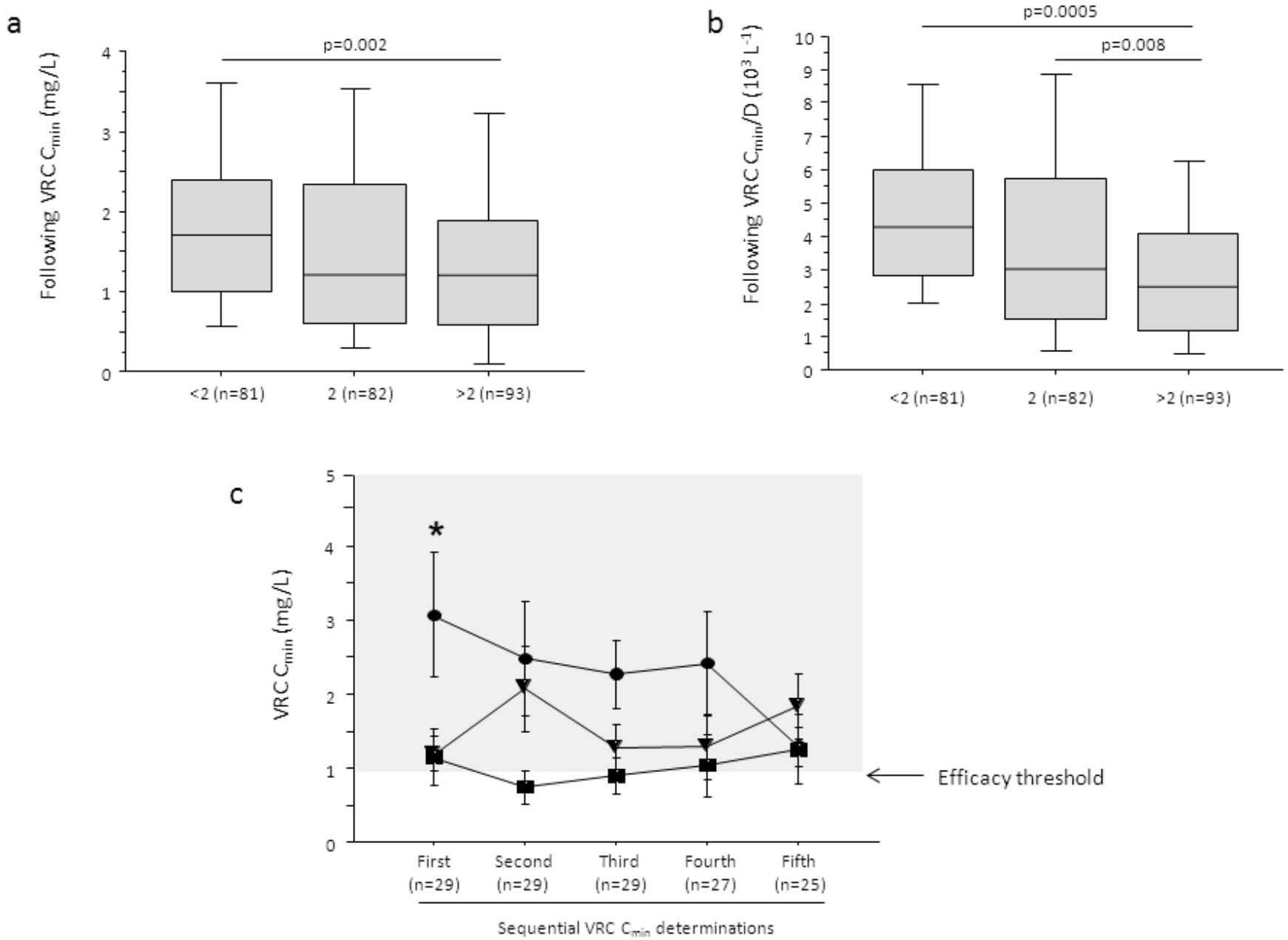

a
Following VRC C_{min} (mg/L)
p=0.002
<2 (n=81)
2 (n=82)
>2 (n=93)
b
Following VRC C_{min}/D (10^3 L^{-1})
p=0.0005
p=0.008
<2 (n=81)
2 (n=82)
>2 (n=93)
c
VRC C_{min} (mg/L)
*
Efficacy threshold
First (n=29)
Second (n=29)
Third (n=29)
Fourth (n=27)
Fifth (n=25)
Sequential VRC C_{min} determinations

Figure 3

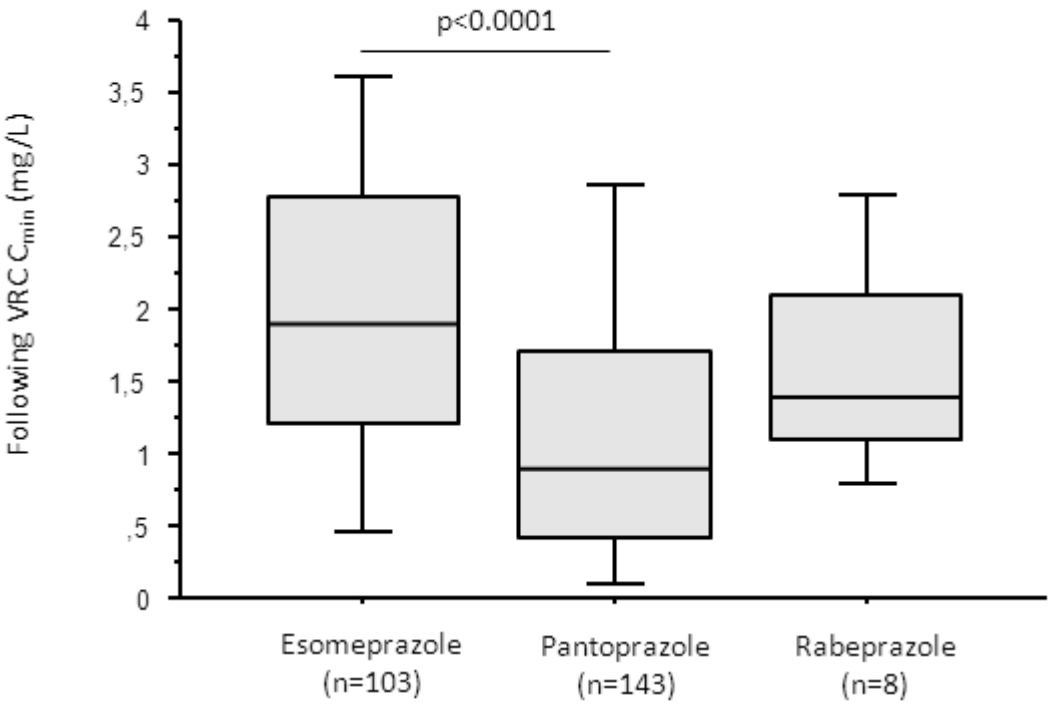

p<0.0001
Following VRC C_{min} (mg/L)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
,5
0
Esomeprazole
(n=103)
Pantoprazole
(n=143)
Rabeprazole
(n=8)

Figure 4

Supplemental Data

Table E1. Primers used for direct sequencing of cytochrome 2C19

Polymorphism	Orientation	Primer sequence 5’ to 3’
CYP2C19*2	F	CAATAAAAATTTCCCCATCAAGA
	R	CCTTGACCTGTTAAACATCCGTA
CYP2C19*3	F	ATTTAGCTTCACCCTGTGATCC
	R	AACAGGGCTTTGGAGTTTAGTG
CYP2C19*17	F	GCCCTTAGCACCAAATTCTC
	R	ATTTAACCCCCTAAAAAAACACG

CYP, cytochrome; F, forward; R, reverse

Table E2. Classification and repartition of patients according to cytochrome 2C19 genotype[1]

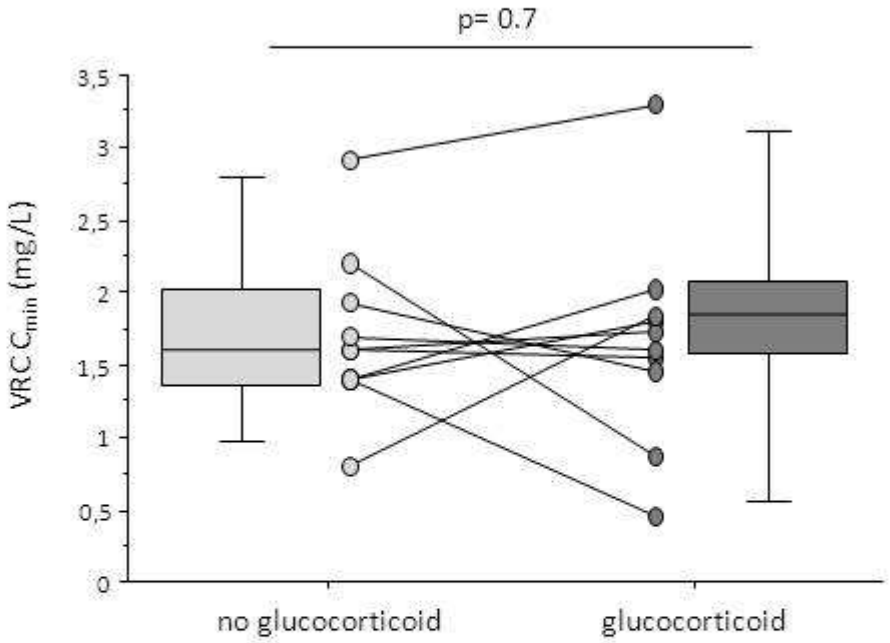
CYP2C19 genotype	CYP2C19 phenotype	Observed frequency, % (n)
*2/*2, *3/*3, *2/*3	Poor metabolizer	0 (0)
*2/*1, *3/*1, *2/*17, *3/*17	Intermediate metabolizer	28 (8)
*1/*1	Extensive metabolizer	34 (10)
*17/*17, *17/*1	Ultra-rapid metabolizer	38 (11)

1. Mega JL, Close SL, Wiviott SD et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med 2009; **360**: 354-62.

Table E3. Repartition of patients according to cytochrome 3A genotype

	Observed frequency, % (n)
CYP3A4 genotype	
*1/*1 (extensive metabolizer)	76 (22)
*22/*1 (intermediate metabolizer)	24 (7)
CYP3A5 genotype	
*3/*3 (nonexpresser)	97 (28)
*1/*3 (expresser)	3 (1)

Figure E1. Pairwise patient analysis of voriconazole trough concentrations with and without glucocorticoid



CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Elodie GAUTIER-VEYRET

TITRE : Variabilité des concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole chez le patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques : impact des facteurs génétiques et des comédications

RÉSUMÉ :

Le voriconazole (VRC) est un antifongique largement utilisé chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ses concentrations plasmatiques résiduelles (C_{min}) varient considérablement sans que les causes de cette variabilité ne soient clairement identifiées, exposant le patient à un risque accru d'échec thérapeutique ou de manifestations toxiques.

Les objectifs de cette étude ont été de décrire les variations inter et intra-individuelles des C_{min} de VRC au cours du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) longitudinal et d'identifier les déterminants de cette variabilité en distinguant la C_{min} initiale de VRC, des C_{min} suivantes.

Les patients allogreffés de CSH ayant bénéficié d'au moins 3 dosages de VRC entre janvier 2011 et juin 2013 ont été sélectionnés. Les données cliniques, pharmacologiques, ainsi que les traitements associés ont été collectés de manière rétrospective. Le génotypage des cytochromes 2C19 et 3A a été réalisé sur des prélèvements pré-greffe et un score génétique combinant ces deux génotypes a été calculé pour chaque patient.

Les coefficients de variation inter- et intra-individuels des C_{min} de VRC étaient respectivement de 84 % et 68 %, résultant dans 42 % des cas à des C_{min} hors fenêtre thérapeutique. La dose de VRC (en mg/kg) était corrélée à la C_{min} uniquement pour la voie orale ($r=0,412$, $p<0,0001$). La voie d'administration et le score génétique combiné influençaient significativement la C_{min} initiale de VRC ajustée sur la dose (C_{min}/D). Pour la voie orale, la C_{min}/D initiale était supérieure lorsque le score génétique était <2 comparativement à un score génétique >2 ($p=0,009$). Les C_{min} suivantes de VRC restaient influencées par le score génétique ($p=0,004$), mais étaient également affectées par le type d'inhibiteur de la pompe à proton (IPP) associé : le pantoprazole étant associé à des C_{min} plus faibles que l'esomeprazole ($p<0,0001$).

Les C_{min} de VRC des patients allogreffés de CSH présentent donc une grande variabilité expliquée en partie par le score génétique combiné, la voie d'administration du VRC ou encore le type d'IPP associé. Ces données suggèrent l'intérêt du génotypage des cytochromes 2C19 et 3A4 pour l'individualisation *a priori* des doses de VRC mais soulignent également la nécessité du STP longitudinal pour adapter les doses suivantes afin de maintenir des C_{min} dans la fourchette thérapeutique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

A Grenoble, le 28/5/2014

LE DOYEN ET PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Professeur Christophe RIBUOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE 1

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; **347**: 408-15.

2. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1882-9.

3. Pascual A, Calandra T, Bolay S et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 201-11.

4. Dolton MJ, Ray JE, Chen SC et al. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4793-9.

5. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1162-76.

6. Hoenigl M, Duettmann W, Raggam RB et al. Potential factors for inadequate voriconazole plasma concentrations in intensive care unit patients and patients with hematological malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3262-7.

7. Racil Z, Winterova J, Kouba M et al. Monitoring trough voriconazole plasma concentrations in haematological patients: real life multicentre experience. *Mycoses* 2012; **55**: 483-92.

8. Trifilio S, Ortiz R, Pennick G et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 509-13.

9. Park WB, Kim NH, Kim KH et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 1080-7.

10. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 540-7.

11. Narita A, Muramatsu H, Sakaguchi H et al. Correlation of CYP2C19 phenotype with voriconazole plasma concentration in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; **35**: e219-23.

12. Hassan A, Burhenne J, Riedel KD et al. Modulators of very low voriconazole concentrations in routine therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 86-93.

13. Wang D, Guo Y, Wrighton SA et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 2011; **11**: 274-86.

14. Kuehl P, Zhang J, Lin Y et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383-91.

15. Boyd NK, Zoellner CL, Swancutt MA et al. Utilization of omeprazole to augment subtherapeutic voriconazole concentrations for treatment of Aspergillus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6001-2.

16. Mitsani D, Nguyen MH, Shields RK et al. Prospective, observational study of voriconazole therapeutic drug monitoring among lung transplant recipients receiving prophylaxis: factors impacting levels of and associations between serum troughs, efficacy, and toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2371-7.

17. Miyakis S, van Hal SJ, Ray J et al. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 927-33.

18. Neely M, Rushing T, Kovacs A et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 27-36.

19. Trifilio SM, Yarnold PR, Scheetz MH et al. Serial plasma voriconazole concentrations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1793-6.

20. Jourdil JF, Tonini J, Stanke-Labesque F. Simultaneous quantitation of azole antifungals, antibiotics, imatinib, and raltegravir in human plasma by two-dimensional high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; **919-920**: 1-9.

21. Mega JL, Close SL, Wiviott SD et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; **360**: 354-62.

22. Kollef M, Micek S, Hampton N et al. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1739-46.

23. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3640-5.

24. Kim SH, Lee DG, Kwon JC et al. Clinical Impact of Cytochrome P450 2C19 Genotype on the Treatment of Invasive Aspergillosis under Routine Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in a Korean Population. *Infect Chemother* 2013; **45**: 406-14.

25. Owusu Obeng A, Egelund EF, Alsultan A et al. CYP2C19 Polymorphisms and Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole: Are We Ready for Clinical Implementation of Pharmacogenomics? *Pharmacotherapy* 2014, sous presse.

26. Dolton MJ, Mikus G, Weiss J et al. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1633-41.

27. Li XQ, Andersson TB, Ahlström M et al. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 821-7.

28. Johnson HJ, Han K, Capitano B et al. Voriconazole pharmacokinetics in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 852-9.

29. Chu HY, Jain R, Xie H et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 105.



Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Elodie GAUTIER-VEYRET

Variabilité des concentrations plasmatiques résiduelles de voriconazole chez le patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques : impact des facteurs génétiques et des comédications

Résumé

Le voriconazole (VRC) est un antifongique largement utilisé chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ses concentrations plasmatiques résiduelles (C_{min}) varient considérablement, exposant le patient à un risque accru d'échec thérapeutique ou de toxicité. Les objectifs de ce travail ont été de décrire les variations inter et intra-individuelles des C_{min} de VRC au cours du suivi thérapeutique pharmacologie (STP) et d'identifier les déterminants de cette variabilité en distinguant les C_{min} initiale de VRC, des C_{min} suivantes.

Les C_{min} de VRC, ainsi que les données cliniques et médicaments associés des patients allogreffés de CSH ont été collectés de manière rétrospective. Le génotype pré-greffe des CYP2C19 et 3A a été déterminé et un score génétique combinant ces deux génotypes a été calculé.

Les coefficients de variation inter- et intra-individuel des C_{min} de VRC étaient respectivement de 84 % et 68 %. La dose de VRC était corrélée à la C_{min} uniquement pour la voie orale ($r=0,412$, $p<0,0001$). La voie d'administration et le score génétique influençaient significativement la C_{min} initiale de VRC ajustée sur la dose (C_{min}/D). Pour la voie orale, le ratio C_{min}/D initial était supérieur lorsque le score génétique était <2 comparativement au score génétique >2 ($p=0,009$). Les C_{min} suivantes de VRC restaient influencées par le score génétique ($p=0,004$), mais étaient également affectées par le type d'inhibiteur de la pompe à proton (IPP) ($p<0,0001$).

Les C_{min} de VRC des patients allogreffés de CSH présentent une grande variabilité expliquée en partie par le score génétique, la voie d'administration et le type d'IPP. Ces données suggèrent l'intérêt du génotypage des CYP2C19 et 3A4 pour l'individualisation *a priori* des doses de VRC, mais soulignent également la nécessité du STP longitudinal pour adapter les doses suivantes.

Mots-clés : voriconazole, concentration résiduelle, CYP2C19, CYP3A4

Jury : Pr Christophe RIBUOT, Président du jury
Pr Françoise STANKE-LABESQUE
Dr Anne THIEBAUT-BERTRAND
Dr Danièle MAUBON
Dr Xavier FONROSE

Date de soutenance : 23 juin 2014