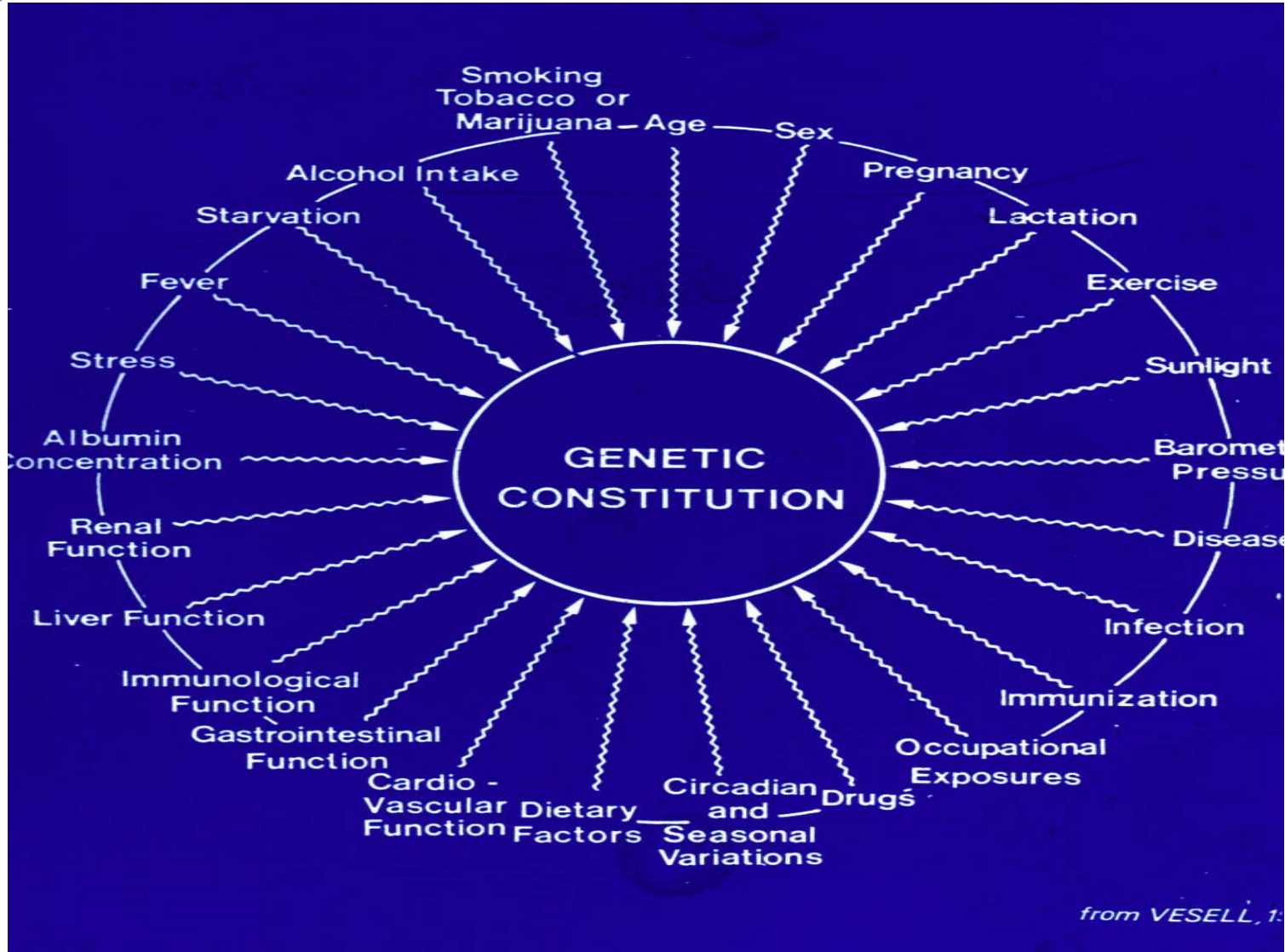


# **PHARMACOGENETIQUE: l'exemple des LAL**

**May FAKHOURY**

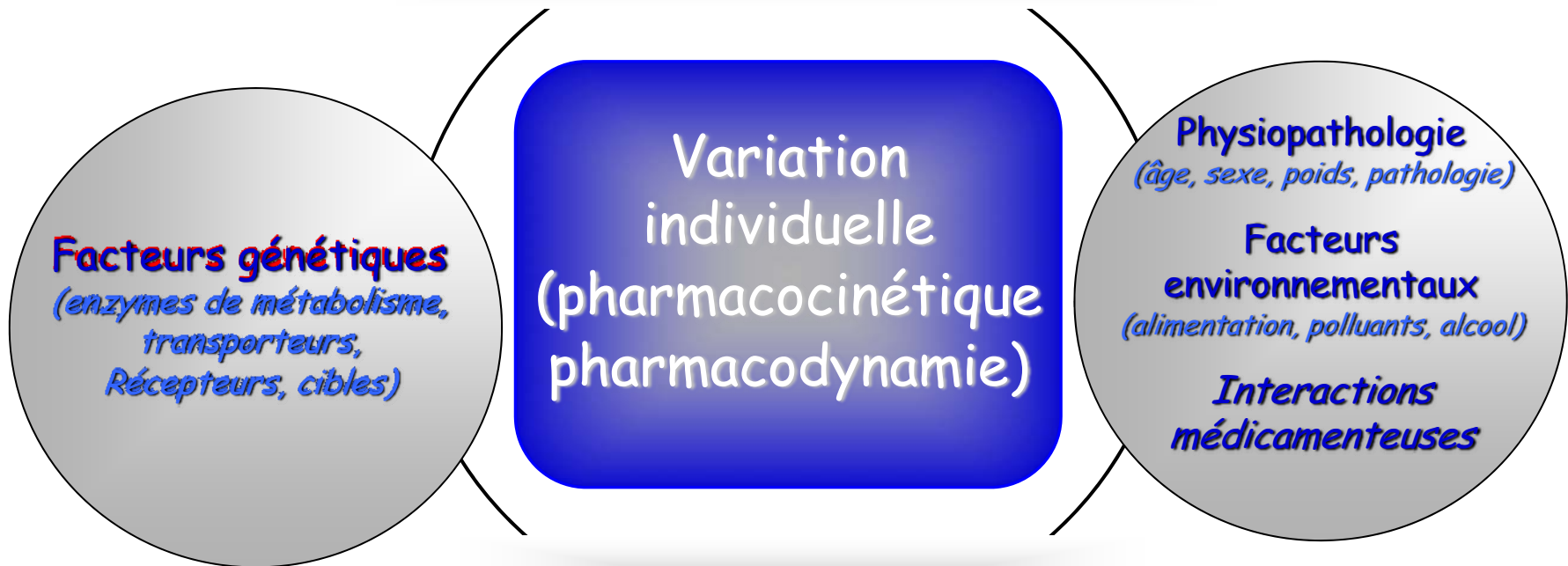
**Pharmacologie Pédiatrique et Pharmacogénétique  
Hôpital Robert Debré – Paris - France**

# Facteurs de variabilité des effets pharmacologiques des médicaments



# Variabilité inter et intra individuelle

médicament



réponse

**Efficacité** (80% des patients)

**Effets indésirables** (5-20% patients)



# Pharmacogénétique

---

- ❑ **La pharmacogénétique** est l'étude des variations individuelles d'origine génétique du devenir (Pharmacocinétique: PK) et des effets (Pharmacodynamie: PD) des médicaments dans l'organisme
- ❑ **Variations génétiques**
  - ❑ enzymes de métabolisme
  - ❑ protéines de transport
  - ❑ récepteurs des médicaments



# PG et susceptibilité

---

- Susceptibilité à certaines pathologies
  - liée à des différences de métabolisation ou de susceptibilité à différents polluants de l'environnement
    - activation des procarcinogènes
    - maladies neurodégénératives



## PG du métabolisme des médicaments

---

- ❑ **Variants alléliques** stables transmis selon le mode autosomique récessif (ou co-dominant)
- ❑ Altérant la synthèse protéique « normale »
- ❑ Responsables d'un phénotype « déficitaire - lent » atteignant au moins **1%** de la population
- ❑ Silencieux en l'absence de prise médicamenteuse



# Mécanismes moléculaires d'inactivation

---

- ❑ **Réarrangements géniques**
  - ❑ délétion complète, duplication génique
- ❑ **Mutations**
  - ❑ site de splicing, codon stop, changement d'acide aminé
- **absence** de la protéine
- présence d'une protéine **modifiée**
  - instabilité, non fonctionnalité...



# Les polymorphismes PG

---

- ❑ **Cibles des médicaments**
  - ❑ récepteur bêta-adrénergique et réponse aux bêta-agonistes dans l'asthme
  - ❑ enzyme de conversion et réponse aux IEC
  - ❑ récepteur à la 5-hydroxytryptamine et réponse aux neuroleptiques
- ❑ **Métabolisme et transport des médicaments**



# Métabolisme des médicaments (foie...)

## Phase I (fonctionnalisation)

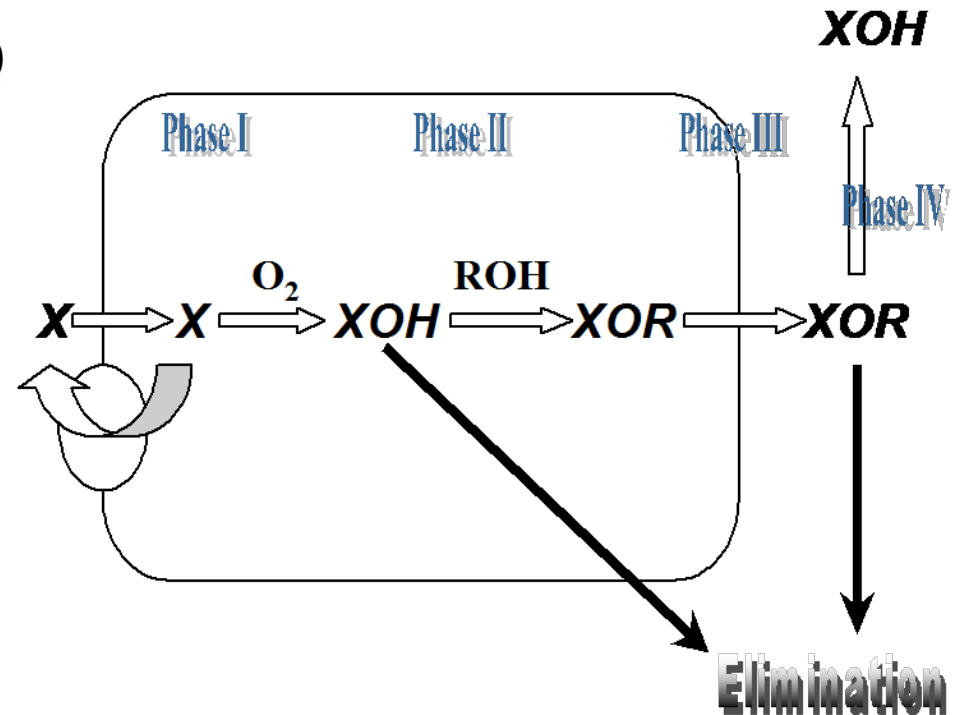
- CYP450: 1A, 2C, 2D, 3A
- ADH
- estérases
- époxyde hydrolase

## Phase II (conjugaison)

- UGTs
- NAT1 et NAT2
- GST
- TPMT

## Phase III (efflux)

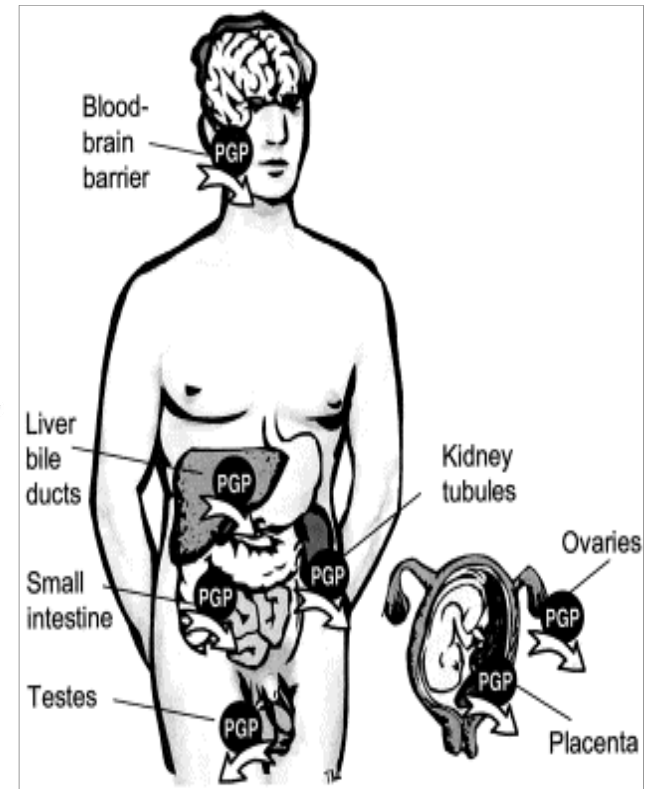
- MDR
- MRP



**CYP450:** cytochrome P450. **ADH:** alcool déshydrogénase. **UGTs:** uridine 5'-triphosphate glucuronosyltransférase. **NAT:** N-acetyltransférase. **GST:** glutathion S-transférase. **TPMT:** thiopurine méthyltransférase.

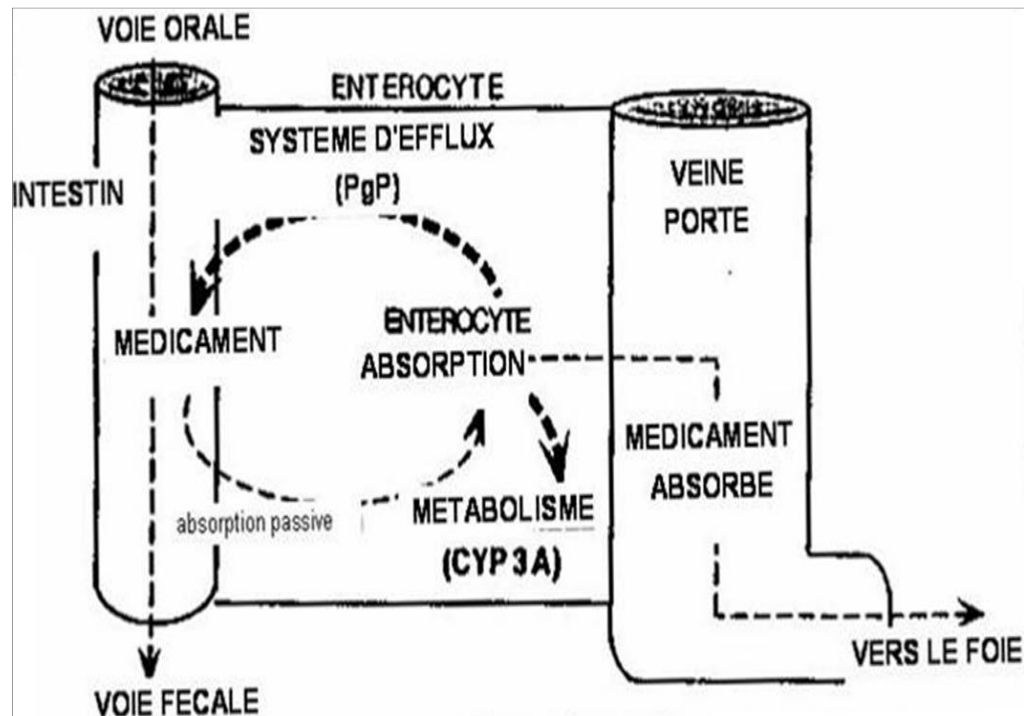
# Transport actif des médicaments

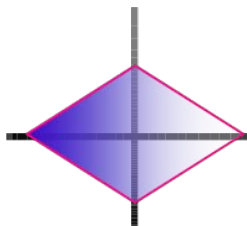
- ❑ famille des **ATP binding cassette**
  - ❑ MDR (P-glycoprotéine, P-gp) et MRP
    - *protéines transmembranaires*
    - **système d'efflux. Défense**
    - *intestin, foie, rein, placenta, tumeurs chimiorésistances*



# CYP3A/P-gp: barrière

- ❑ **CYP3A: métabolisme local**
  - ❑ inactivation
- ❑ **P-gp/MRP: rejet à l'extérieur des cellules**
  - ❑ ↓ de la biodisponibilité





## Substrats CYP3A/P-gp

Classe	Molécule	CYP3A	P-gp
<b>Corticoïdes</b>	dexaméthasone	S	S
<b>Immunosuppresseurs</b>	ciclosporine	S	S
	FK-506	S	S
<b>Anticancéreux</b>	étoposide	S	S
	vincristine	S	S
<b>Antifongiques</b>	kétoconazole	I	I
<b>Antiviraux</b>	nelfinavir	S	S
<b>Divers</b>	cisapride	S	?

S: substrat; I: inhibiteur



# Conséquences thérapeutiques

---

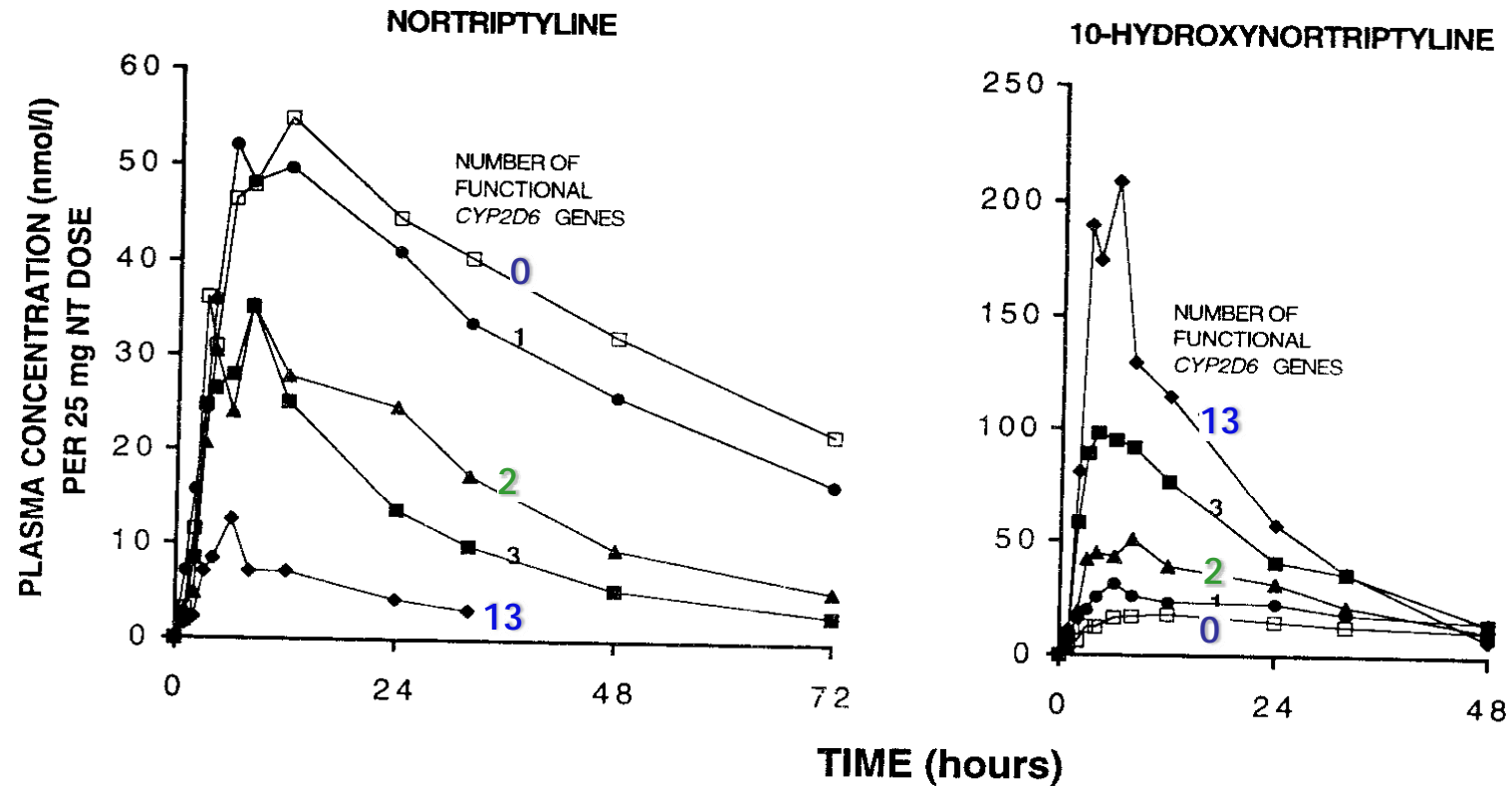
## ❑ Fonction du médicament

- ❑ médicament ou prodrogue (métabolite actif)
- ❑ importance de la voie déficitaire dans le métabolisme (% de métabolisme)
- ❑ possibilité de déviations du métabolisme par d'autres enzymes (métabolites formés actifs, toxiques...)
- ❑ index thérapeutique

## ❑ Fonction de l'individu

- ❑ métaboliseur **lent** (**groupe minoritaire et homogène**)
  - absence de métabolisme: surdosage, inefficacité, toxicité
- ❑ métaboliseur **rapide** (**groupe majoritaire et inhomogène**)
  - effet insuffisant, inefficacité du traitement
  - déséquilibre métabolique, interactions médicamenteuses
  - synthèse de métabolites réactifs (cancer, malformation...)

# CYP2D6 et nortriptyline (PG et PK)



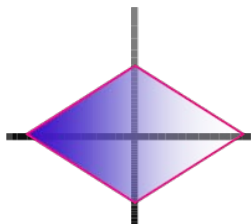
**Fig. 1.** Mean plasma concentrations of nortriptyline and 10-hydroxynortriptyline in different genotype groups after a single oral dose of nortriptyline. For subjects with 3 to 13 functional genes, plasma concentrations are adjusted to the 25 mg dose by means of division of the values by 2. The numerals close to the curves represent the number of functional *CYP2D6* genes in each genotype group.



## PG et effets indésirables

---

- ❑ **2%** des admissions pédiatriques sont dues aux EI
- ❑ **25%** des prescriptions impliquées dans les EI sont hors AMM (*Impicciatore 2001; Clarkson 2001*)
- ❑ **59%** des médicaments retrouvés dans les études sur les EI sont métabolisés par au moins une enzyme génétiquement déterminée vs 22% des médicaments sélectionnés au hasard (*Phillips 2001*)

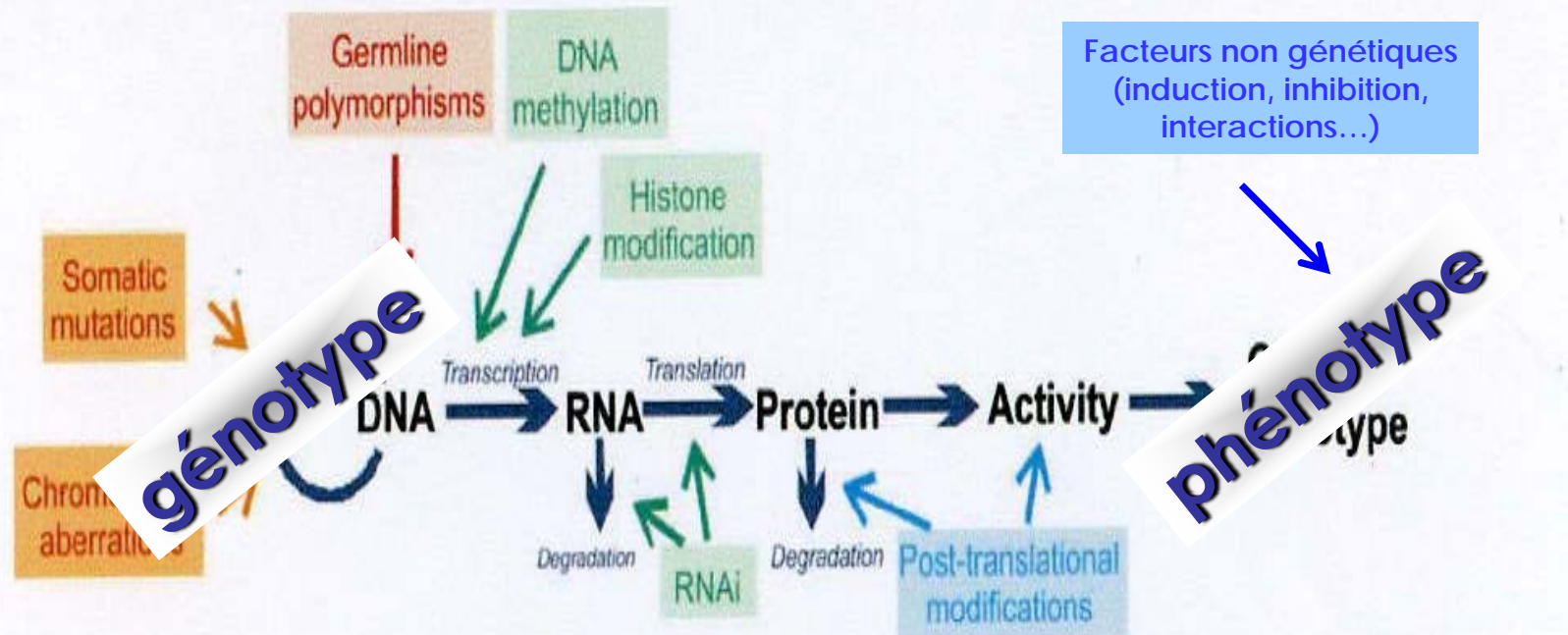


## Associations entre médicaments et EI

Enzyme	médicament	EI
CYP1A2	antipsychotiques	Dyskinésie
CYP2C9	Warfarine tolbutamide	Hémorragie Hypoglycémie
CYP2C19	Diazépam	Sédation prolongée
CYP2D6	Propafénone Perhexiline	Hépatotoxicité
Dihydropyridine deshydrogénase	5-fluoro-uracile	Myélotoxiciité
UDP glucuronosyl transférase 1A1	Irinitecan	Diarrhée Myélosuppression



# Génotype et Phénotype



Relation entre les variations génétiques, les variations de l'ARN et de l'expression des protéines, la biologie et l'effet clinique (Brockmoller 2008)



# Génotypage

---

- Recherche de mutations, délétion, duplication...
  - prise de sang (facile d'accès) pour extraction d'ADN
  - techniques de biologie moléculaires de + en + sophistiquées (rapides, précises...)
    - discrimination allélique (TaqMan), séquençage, puce ADN...
  - simple si les modifications génotypiques sont connues
  
- **Inconvénients**
  - ne renseigne pas sur les conséquences fonctionnelles
  - corrélation approximative avec le phénotype



# Phénotype

---

- Tester une voie métabolique in vivo
  - administration d'une substance de référence (*facile à obtenir et spécifique du polymorphisme d'intérêt*)
  - dosage de la molécule mère et de son métabolite
  - calcul du rapport ➔ **indice de métabolisation**
  - résultat valable pour tous les médicaments métabolisés par cette voie
- **Inconvénients**
  - présente un (*faible*) risque car administration d'une molécule exogène (*utilisation de faibles doses*)
  - résultat influençable par une variabilité d'origine non génétique
    - altération métabolique
    - interaction médicamenteuse

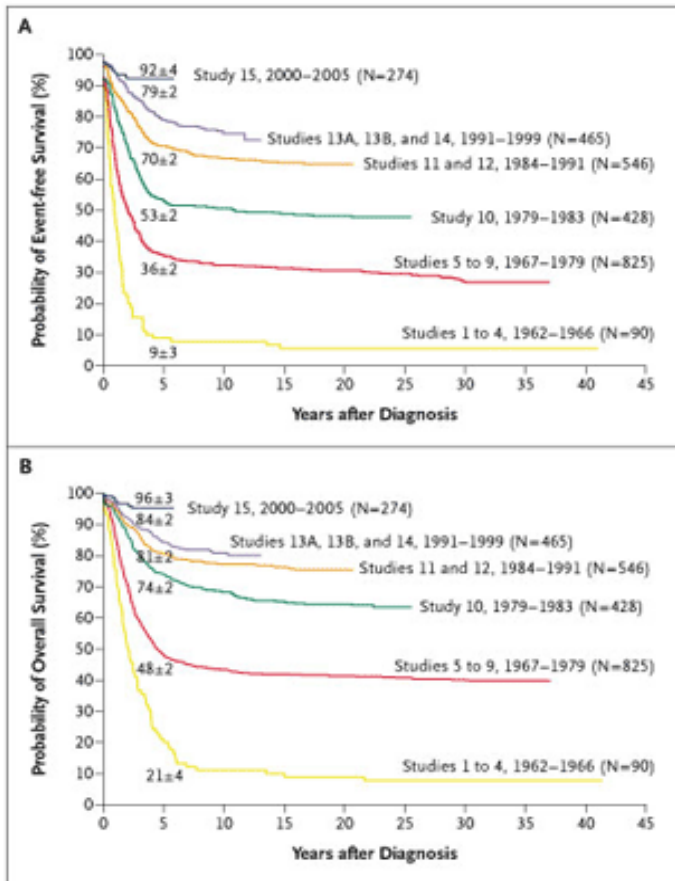


# Leucémies Aigues Lymphoblastiques

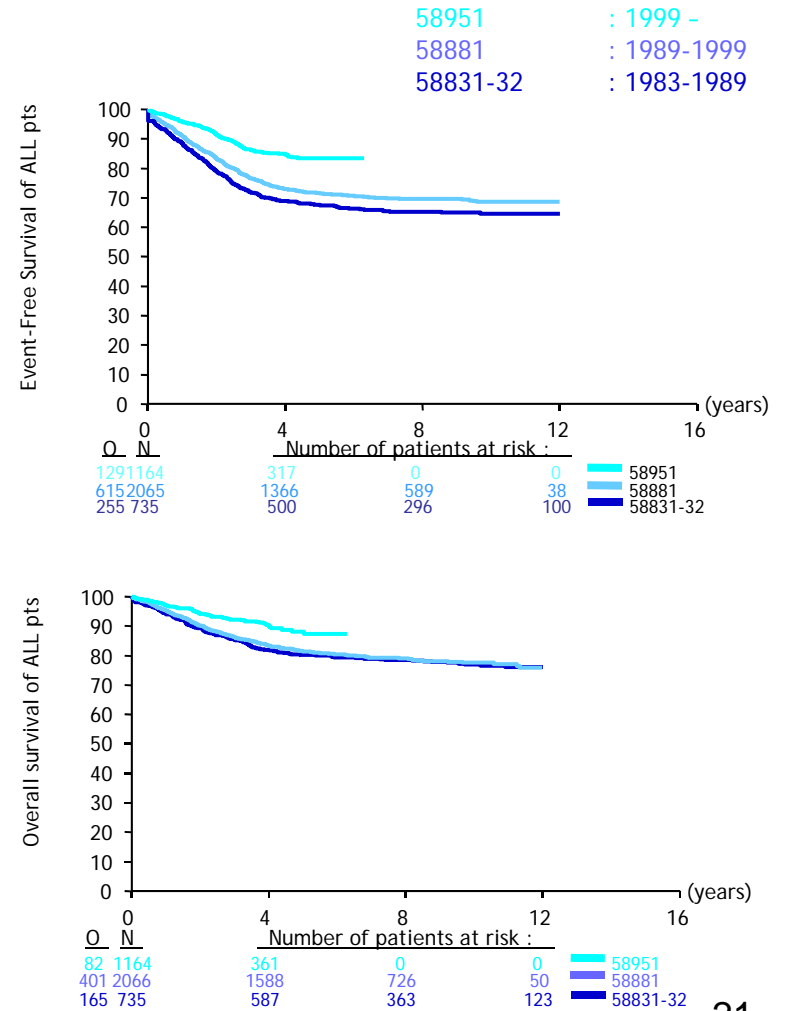
- ❑ **LAL:** pathologies tumorales les + fréquentes de l'enfant
  - ❑ 30% des cancers en pédiatrie
  - ❑ prolifération clonale de précurseurs de lignées lymphoïdes, morphologiquement anormaux et blocage de maturation
- ❑ **Pronostic:**
  - ❑ âge (meilleur pronostic est entre 4 et 10 ans)
  - ❑ syndrome tumoral
  - ❑ critères immunologiques (CD10 )
  - ❑ critères génétiques: t(9;22), t(4;11), hyperploïdie, hypoploïdie

# Patients traités pour LAL: depuis 1960....

## St Jude Hospital

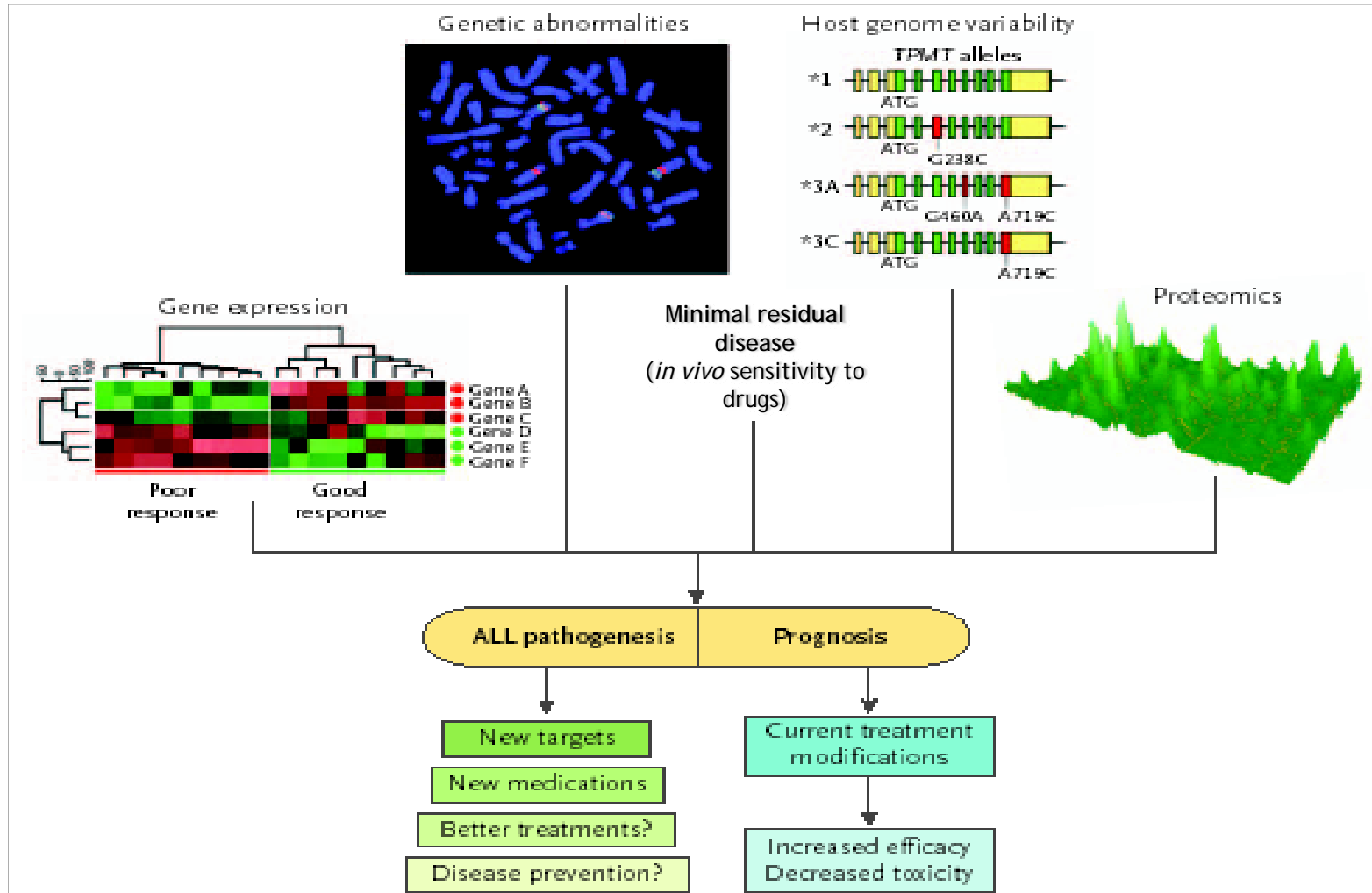


## EORTC CLG

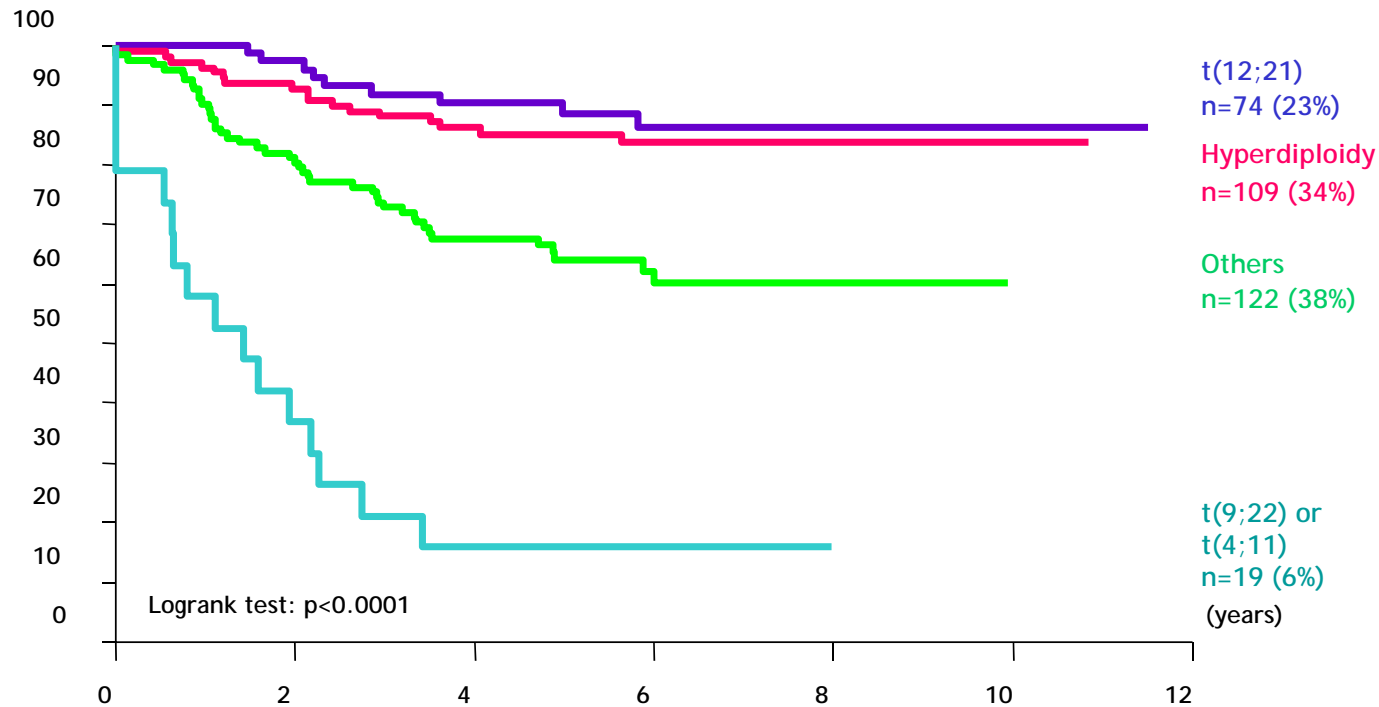


Survie: < 10% (1960) et 80% (2008)  
avec la polychimiothérapie

# Réponse au traitement multifactorielle

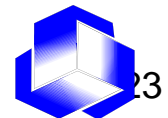


# Critères génétiques de la maladie

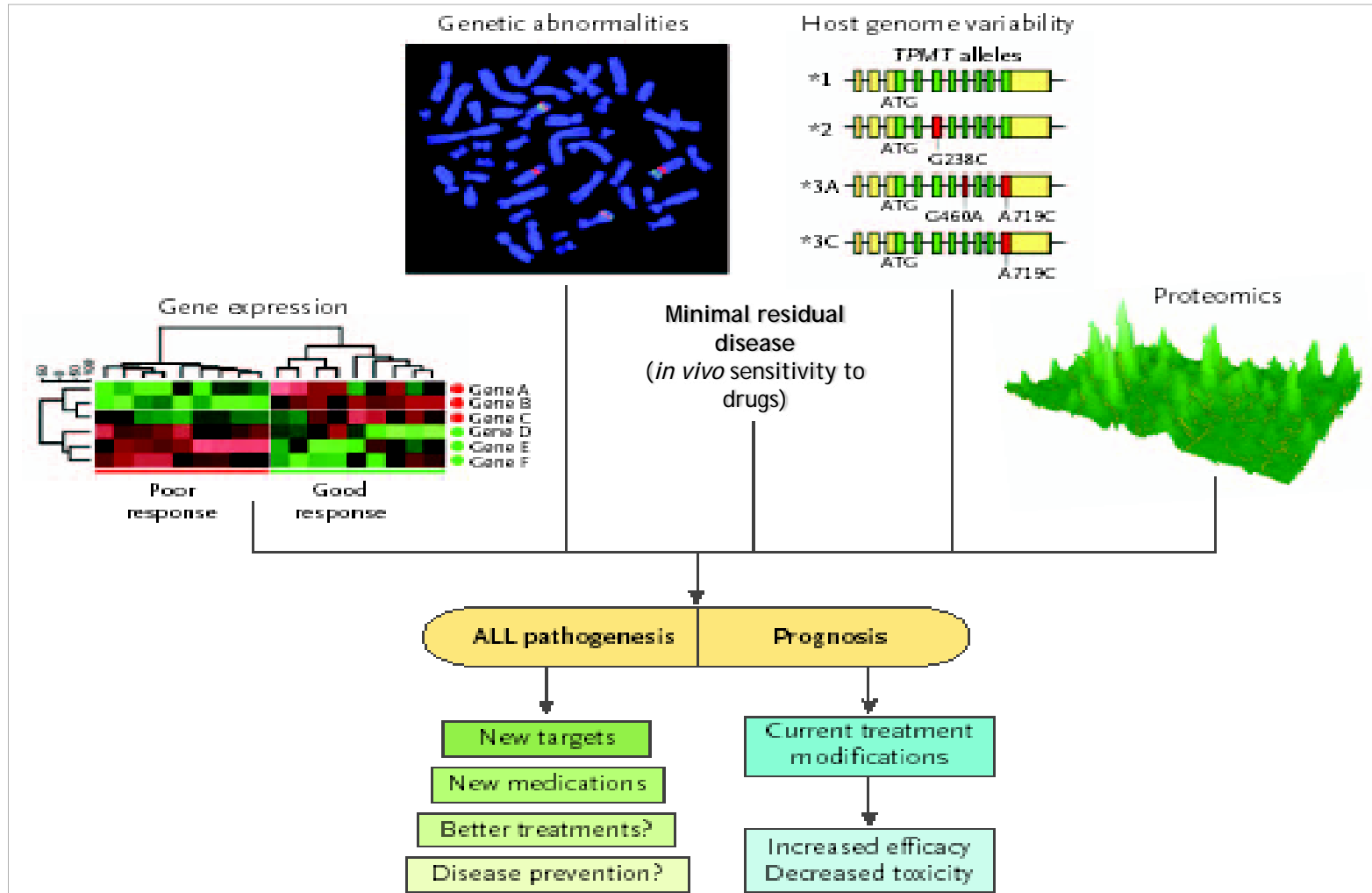


## Comparaison des différents sous-groupes

	t(12;21)	Hyper>50	Other	t(4;11) or t(9;22)
Age	4	3	4	6
WBC	11.5	6.4	19.7	124.6
EFS (6y)	86%	84%	62%	16%
survival (6y)	95%	90%	77%	31%



# Réponse au traitement multifactorielle

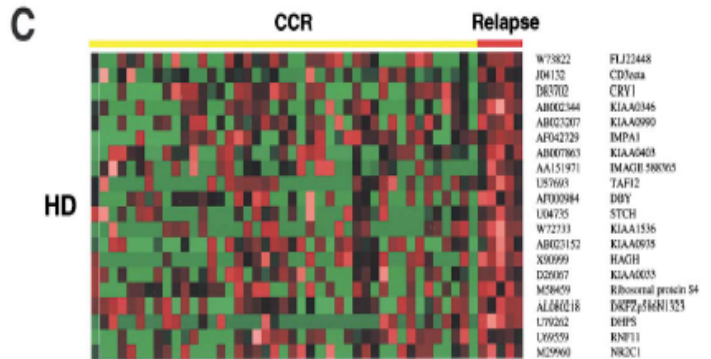
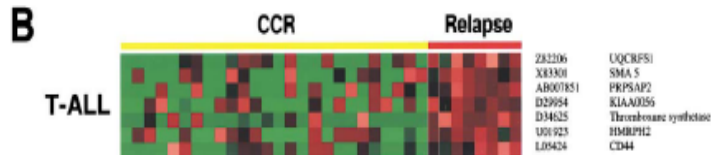




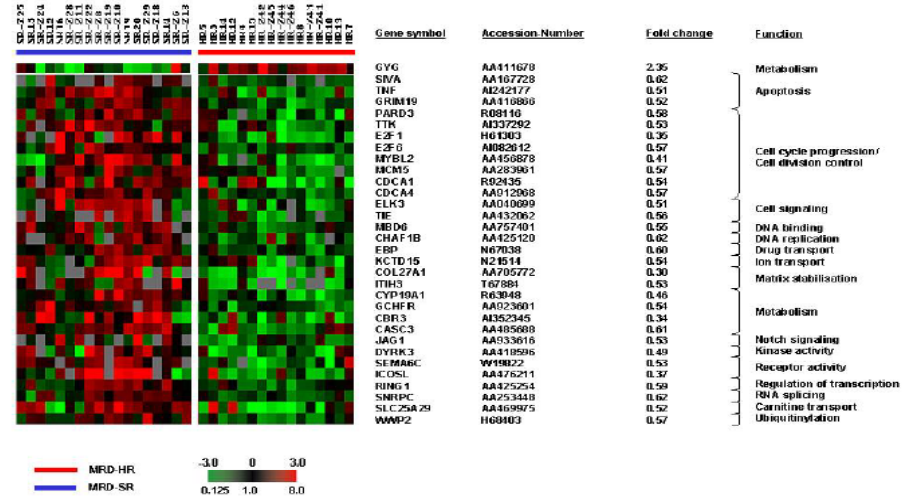
# Expression des gènes

## A Gene expression profiles as predictors of relapse

Genetic Subtype	Apparent Accuracy	Support Vector Machine $p =$ (Permutation Test)
T-ALL	97%	0.007
Hyperdiploid > 50	100%	0.018

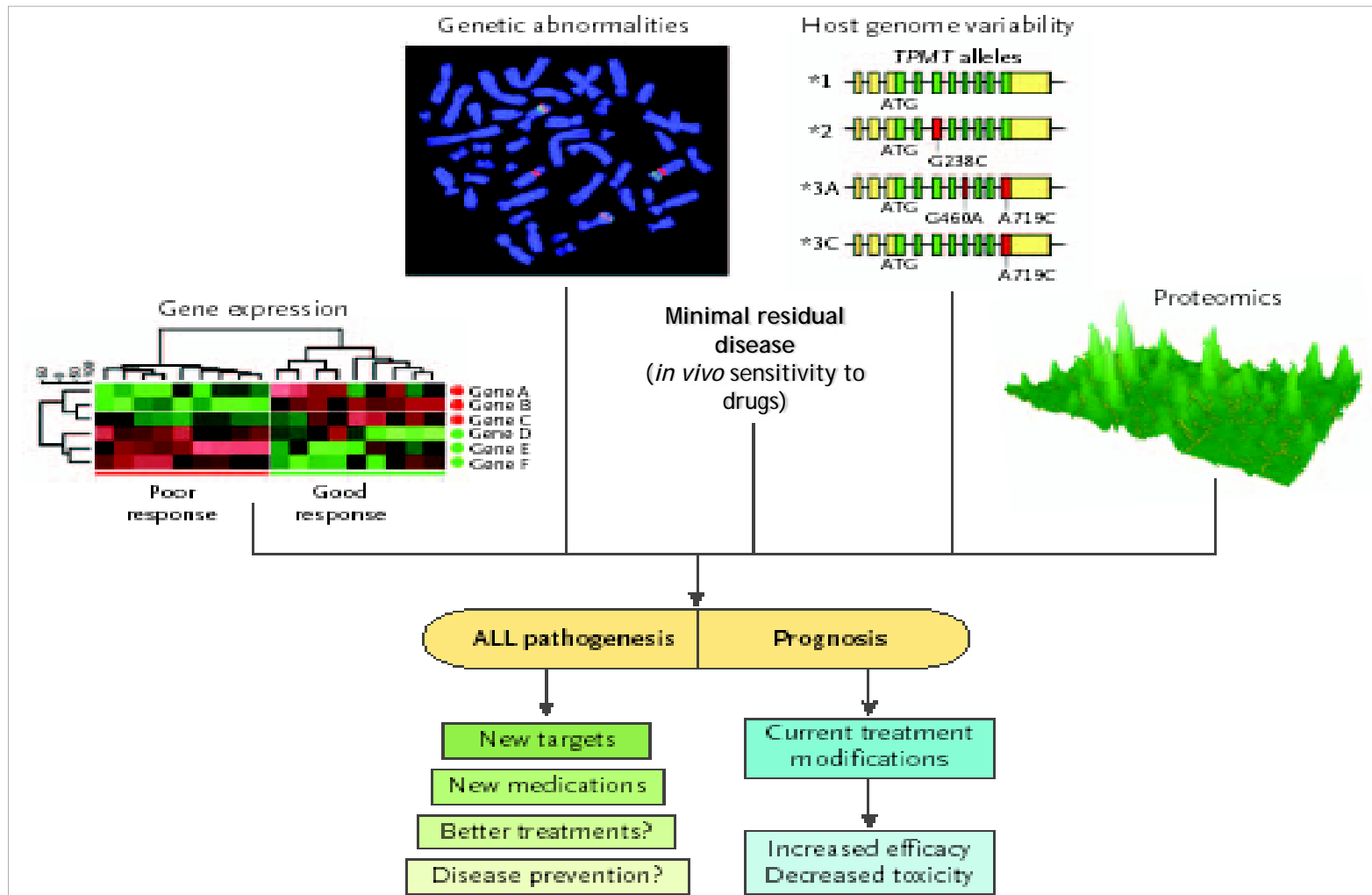


Les gènes à expression faible dans les cellules leucémiques résistantes sont associés avec le cycle cellulaire et l'apoptose



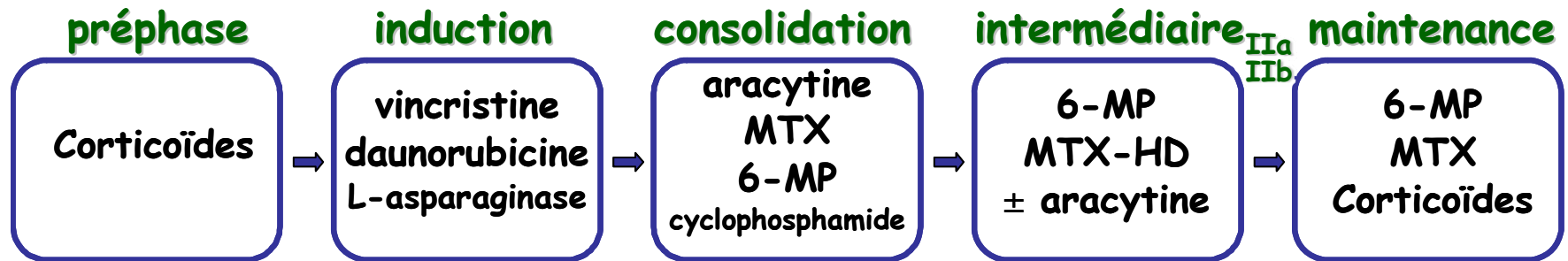
Genes whose expression is associated with molecular treatment response.

# Réponse au traitement multifactorielle



# Traitement des LAL

- Durée moyenne de 2 à 3 ans (protocole EORTC)



- Traitements des LAL peuvent être inefficaces ou responsables d'effets toxiques
  - molécules à index thérapeutique étroit
  - polymorphismes génétiques
    - **enzymes de métabolisme:** CYP450, thymidilate synthase (TS), thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), méthionine synthase (MS)
    - **transporteurs:** récepteur des folates réduits (RFC), P-gp

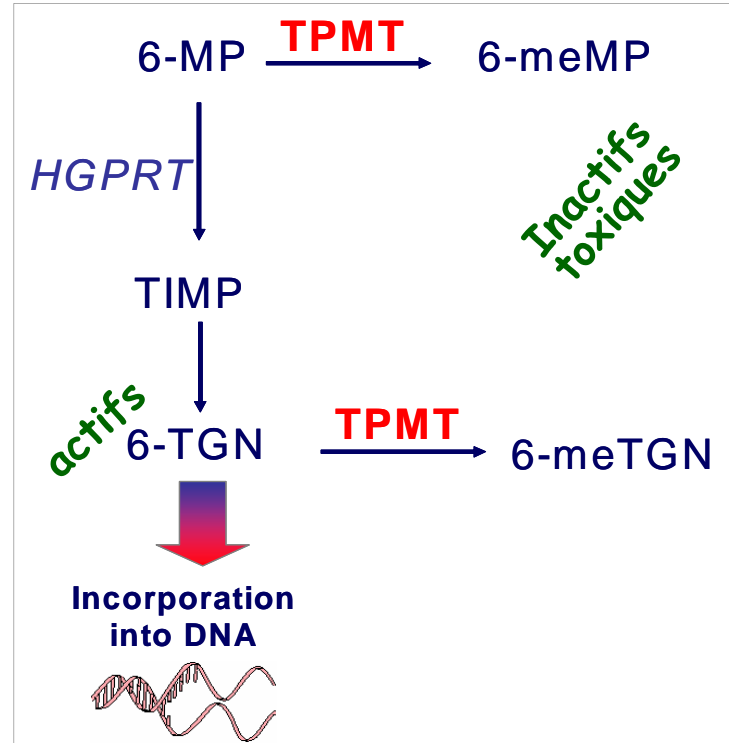
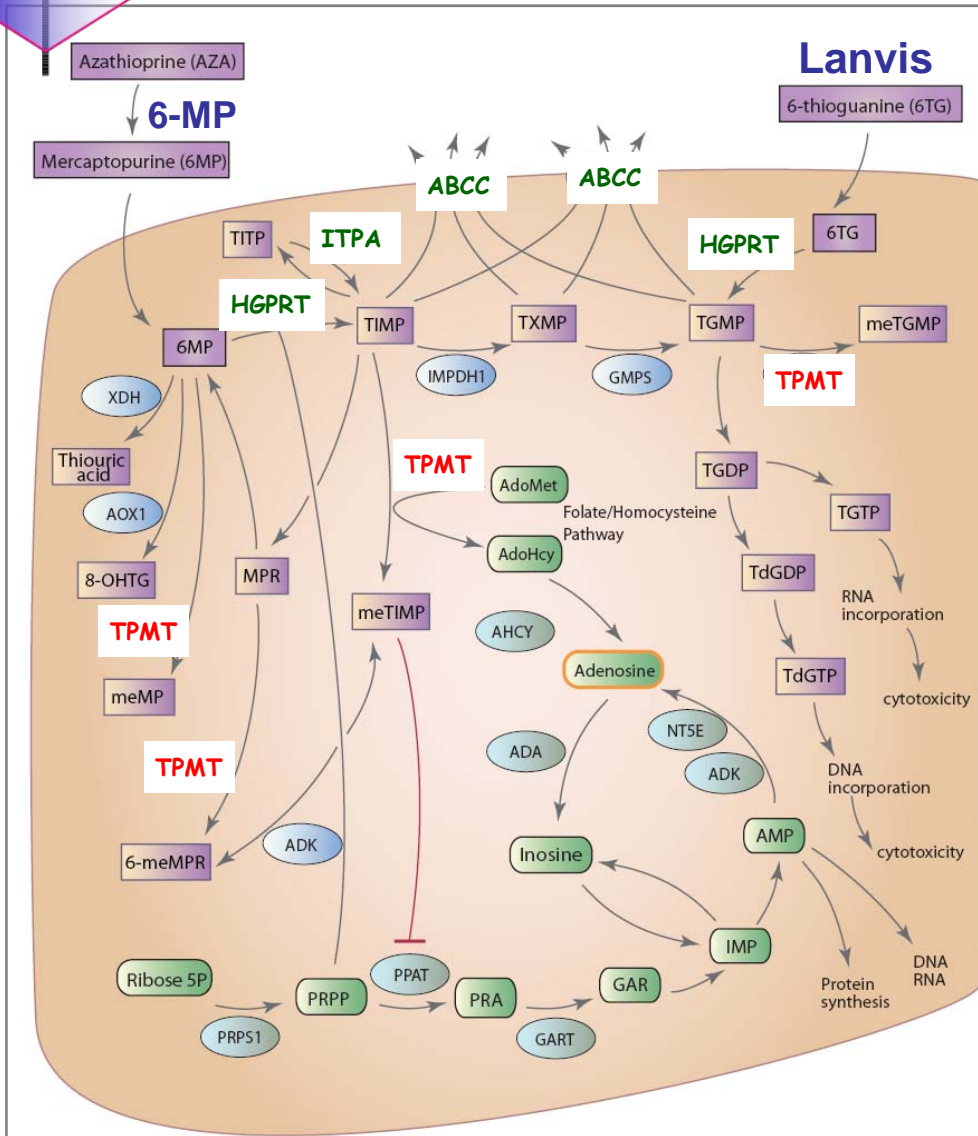




# PG et anticancéreux

<b>gène</b>	<b>fonction</b>	<b>mutations</b>	<b>impact en clinique</b>
<b>Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)</b>	métabolisme des folates	C677T A1298C	hyperhomocystéinémie (cardiovasc et neuro)
<b>Méthionine synthase (MS)</b>	reméthylation de la méthionine	A2756G	hyperhomocystéinémie
<b>Thymidilate synthase (TS)</b>	métabolisme des analogues des folates	2R / 3R	3R/3R: diminution taux plasmatiques des folates
<b>MDR1 / P-gp</b>	système d'efflux	C3435T C1236T G2677T/A	résistance des cellules cancéreuses
<b>CYP3A5</b>	50% des CYP3A hépatique, variabilité interindividuelle	CYP3A5*1 / CYP3A5*3	protéines tronquées et absence CYP3A5
<b>Transporteur des folates (RFC)</b>	transport des folates	G80A	résistance aux anti-folates
<b>Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT)</b>	métabolisme des thiopurines	G238C G460A A719G	accidents myélotoxiques (aplasies médullaires)

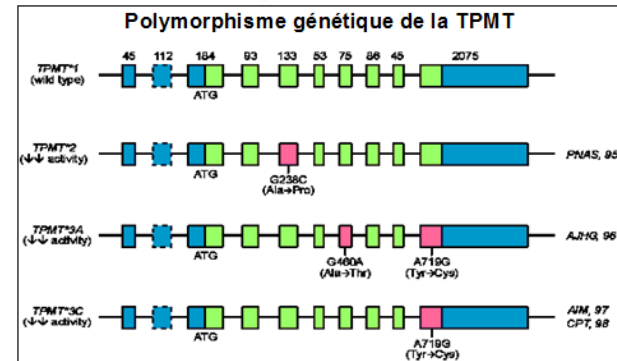
# 6-mercaptopurine (6-MP)



HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase. ITPA: inosine triphosphate pyrophosphohydrolase

# TPMT thiopurine S-méthyltransférase

- Enzyme cytosolique. Activité trimodale
- **Polymorphisme pharmacogénétique** (Caucasiens)
  - 89% HN
  - 11% HT
  - 1/300 HM: déficient
- **Principales mutations ponctuelles** (95% de la fréquence des allèles)
  - TPMT\*2 (G238C)
  - TPMT\*3B (G460A)
  - TPMT\*3C (A719G)
    - » TPMT\*3A (\*3B et \*3C)

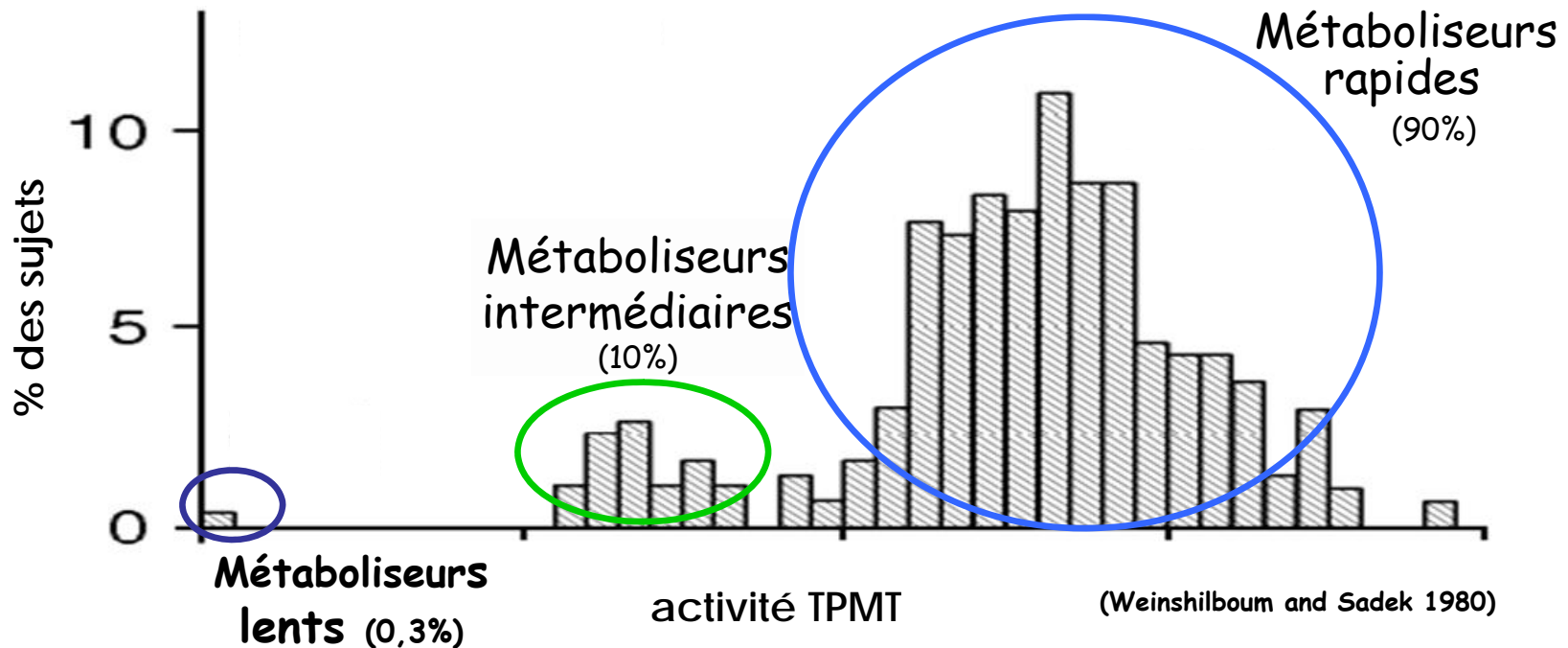


## La fréquence des variants TPMT

Caucasiens	6 %	*3A
Asiatiques du Sud-Ouest	1 %	*3A
Asiatiques de l'Est	2 %	*3C
Africains	6 %	*3C

# Génotype et activité de la TPMT

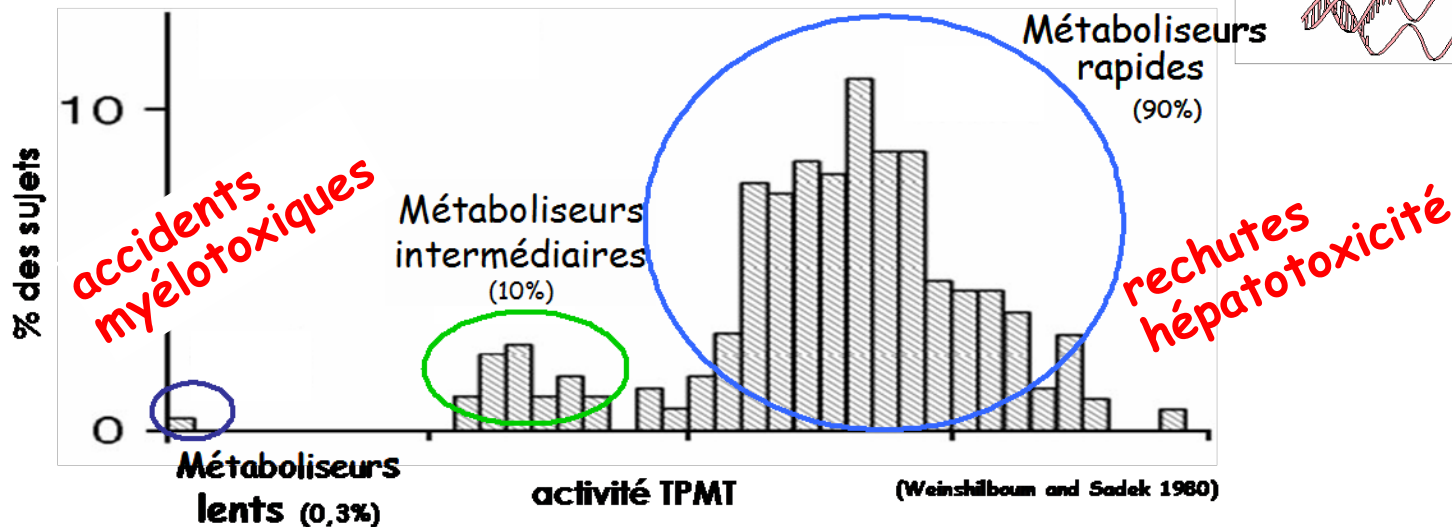
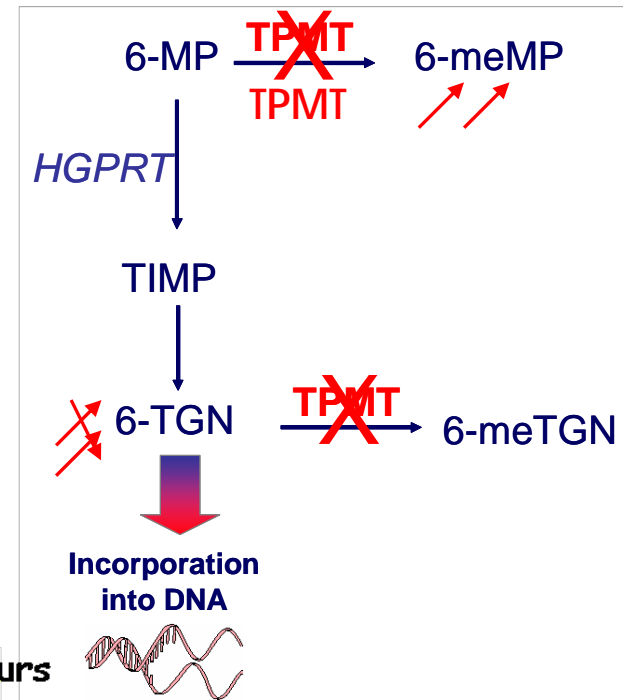
- Polymorphisme pharmacogénétique
  - *synthèse d'une protéine instable (Tai et al., 1995)*
- Variabilité interindividuelle de l'activité





# Implication en clinique

Lors d'administration de doses standards de 6-MP





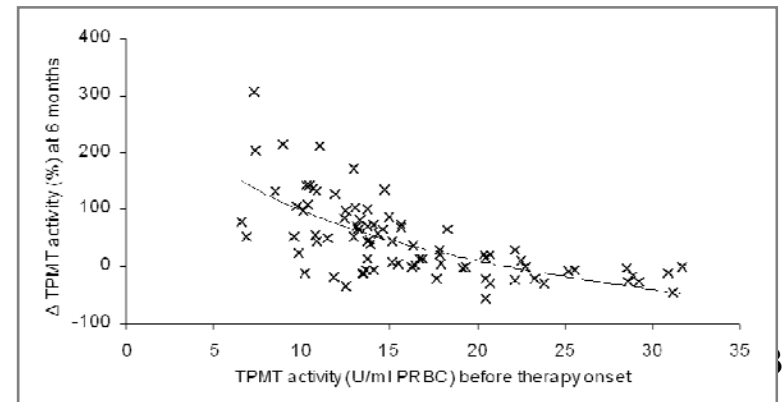
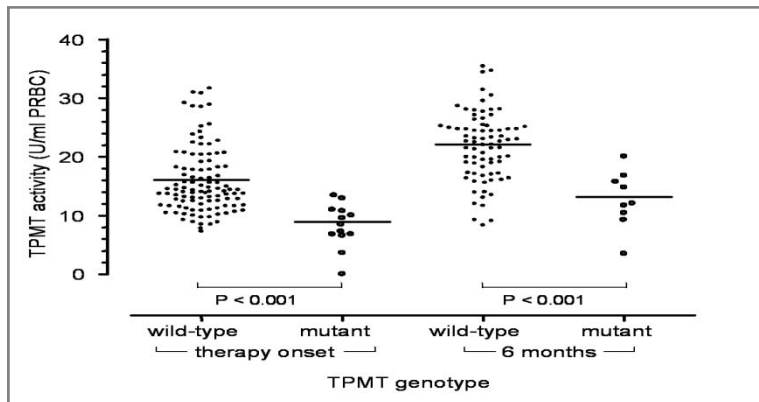
# Avant tout traitement par 6-MP

---

- Au diagnostic
  - **génotype TPMT**
    - » identifier les homozygotes mutés
    - » prévenir les toxicités sévères (aplasies médullaires graves)
  - séquençage pour les cas exceptionnels selon la clinique
- Exemple du patient \*3A/\*3A (génotypage au diag.)
  - adaptation posologique dès le début du protocole
    - » 50% de la dose de 6-MP (phase intermédiaire)
    - » phase IIb: lanvis 1/2 comprimé (20 mg/j)
    - » entretien: 30% de la dose de 6-MP (15 mg/m<sup>2</sup> au lieu de 50 mg/m<sup>2</sup>)
  - Arrivée à la fin du protocole sans EI majeur**

# Activité TPMT

- ❑ **Activité TPMT:** mesurée dans les érythrocytes
- ❑ **Contraintes techniques**
  - ❑ tube doit arriver rapidement au labo
  - ❑ technique complexe, longue et coûteuse
  - ❑ variabilité de la mesure selon les transfusions....
- ❑ **Variabilité de l'activité**
  - ❑ avant traitement: corrélation génotype/phénotype
  - ❑ en cours de traitement: corrélation presque inexistante (induction, inhibition...)



# En cours de traitement: métabolites??

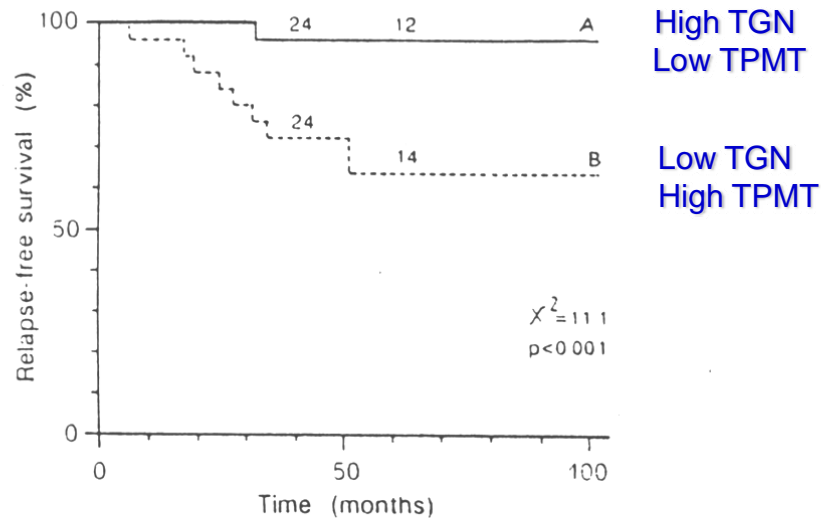
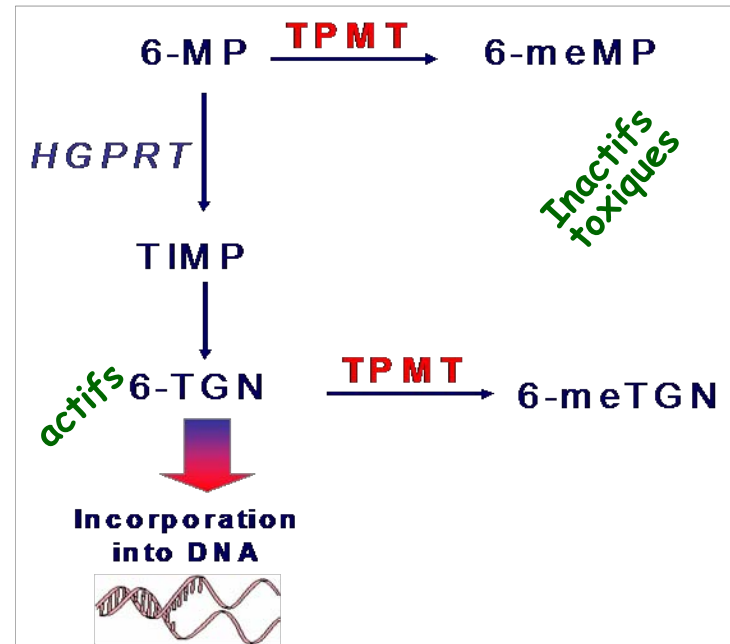


Fig 4—Actuarial relapse-free survival from the start of 6-MP therapy for 95 children remission when grouped according to whether above (A, n=48) or below (B, n=47) median 6-TGN concentration.





# TPMT et traitement par 6-MP

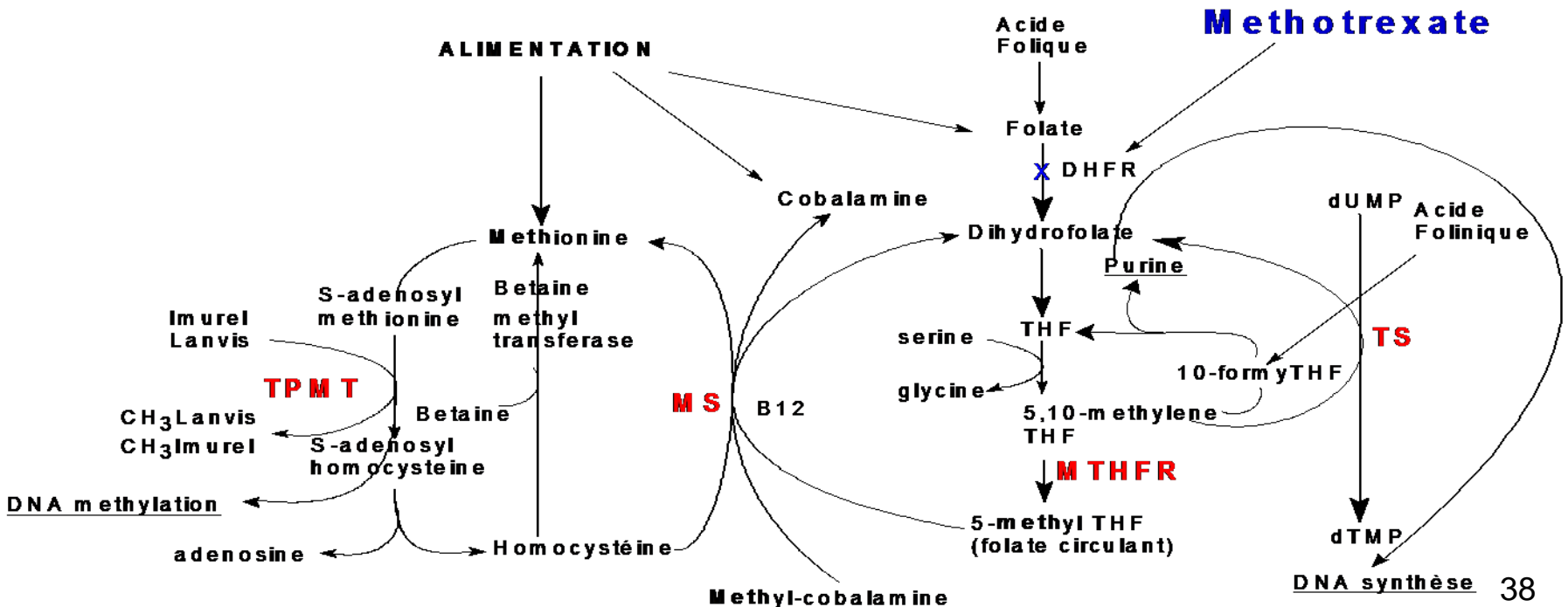
---

- ❑ **Prise en charge des malades**
  - ❑ au diagnostic
    - ***génotype TPMT**: identifier les HM*  
*(prévenir les toxicités sévères)*
  - ❑ en cours du traitement (phase de maintenance)
    - *variabilité de l'activité de la TPMT très grande*
    - *adaptation de la posologie de la 6-MP sur la mesure des concentrations des **6-TGN et des dérivés méthylés***

# Le Methotrexate (MTX)

## Le méthotrexate (MTX)

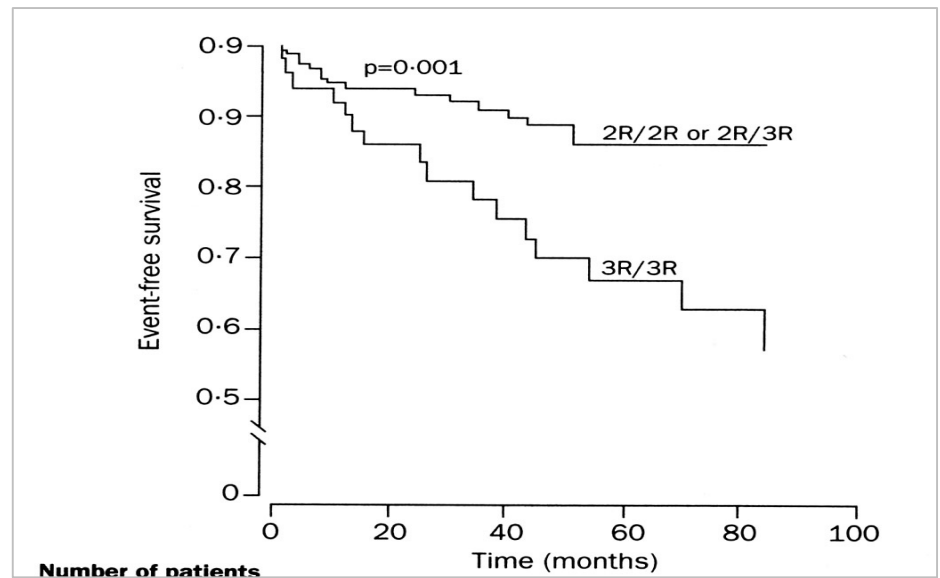
- anticancéreux interférant dans cycle des folates
- Médicament clé du traitement des LAL
- large variabilité interindividuelle et risque de toxicité
  - surveillance des concentrations plasmatiques



## □ La thymidylate synthase (TS)

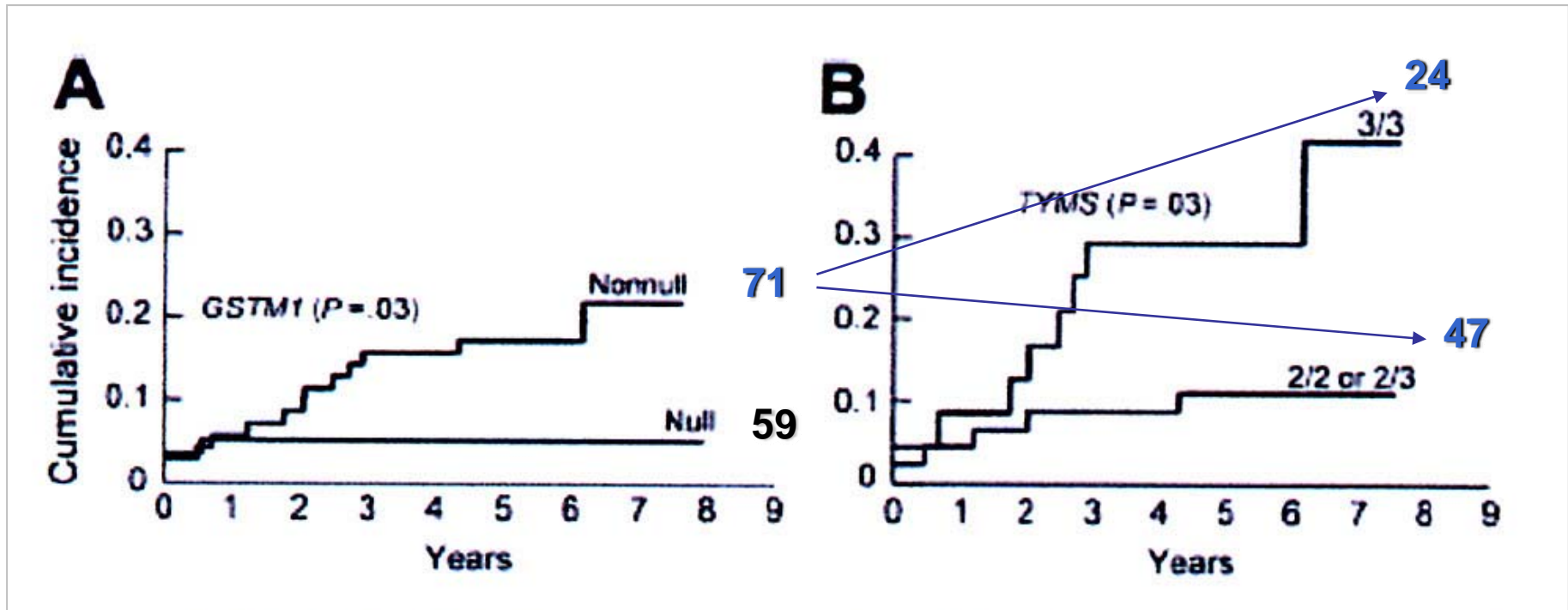
- Enzyme nécessaire pour les cellules proliférantes
- Cible importante pour une variété d'agents chimiothérapeutiques (MTX, 5-FU...)
- Polymorphisme de longueur dans le gène
  - «triple repeat» augmentant l'activité TS

Impact du génotype sur la survie sans événements chez 205 enfants traités par MTX (*Krajnovic 2002*)



# PG et MTX: GST et TS

- Courbe de l'incidence cumulée du risque de rechute hématoologique pour les patients LAL selon leur génotype



**GSTM1**

**GSTM1 and TS**





# PG et MTX: les transporteurs

---

## □ MDR1 (P-gp)

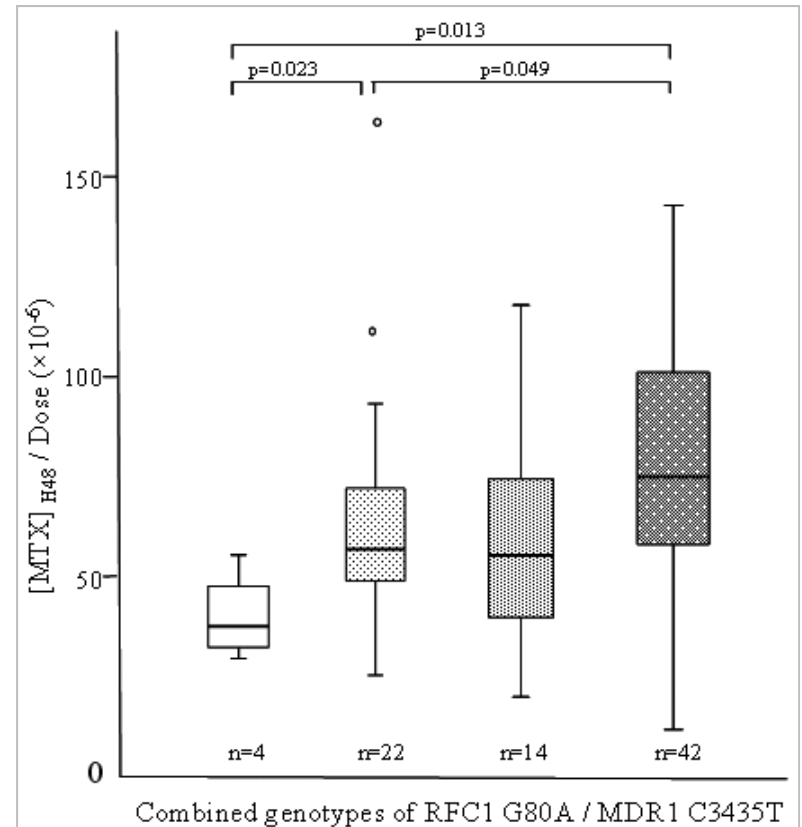
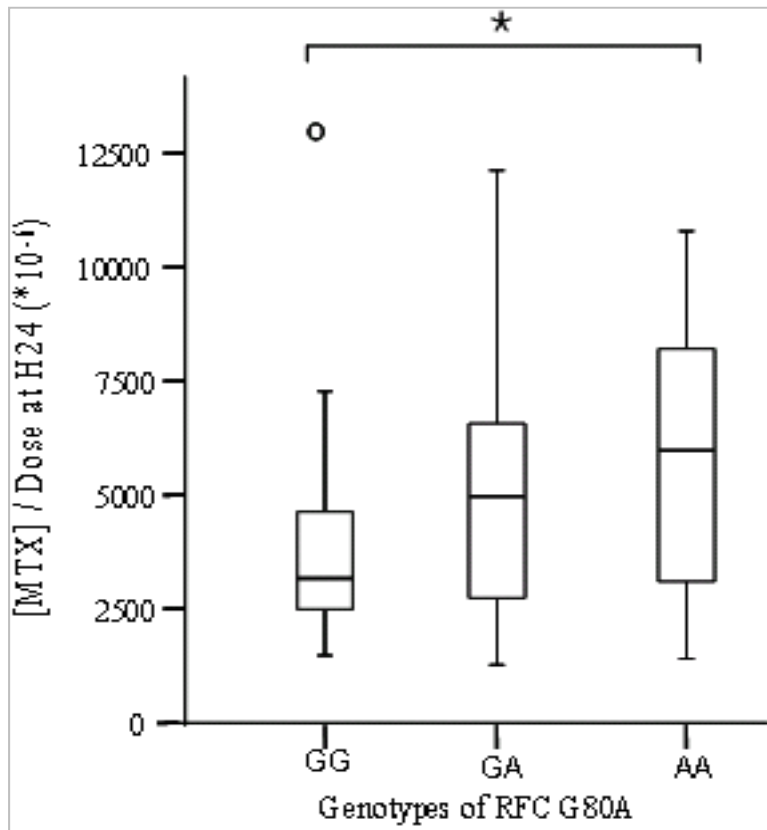
- Système d'efflux (*intestin, foie, rein, placenta, tumeurs chimio-résistantes*)
- Polymorphisme pharmacogénétique: 2636C>T, 2677G>T/A, 3435C>T
- Fréquence des haplotypes chez les Caucasiens:
  - CGC (HN des 3 SNPs) : 30%
  - TTT (HM des 3 SNPs) : 40%

## □ RFC1 (*reduced folate carrier*)

- Transport du MTX à l'intérieur des cellules (globules blancs)
- Polymorphisme G80A (His27Arg) menant à une protéine non fonctionnelle
- Fréquence 47% chez les Caucasiens

# PG et MTX: MDR1 et RFC1

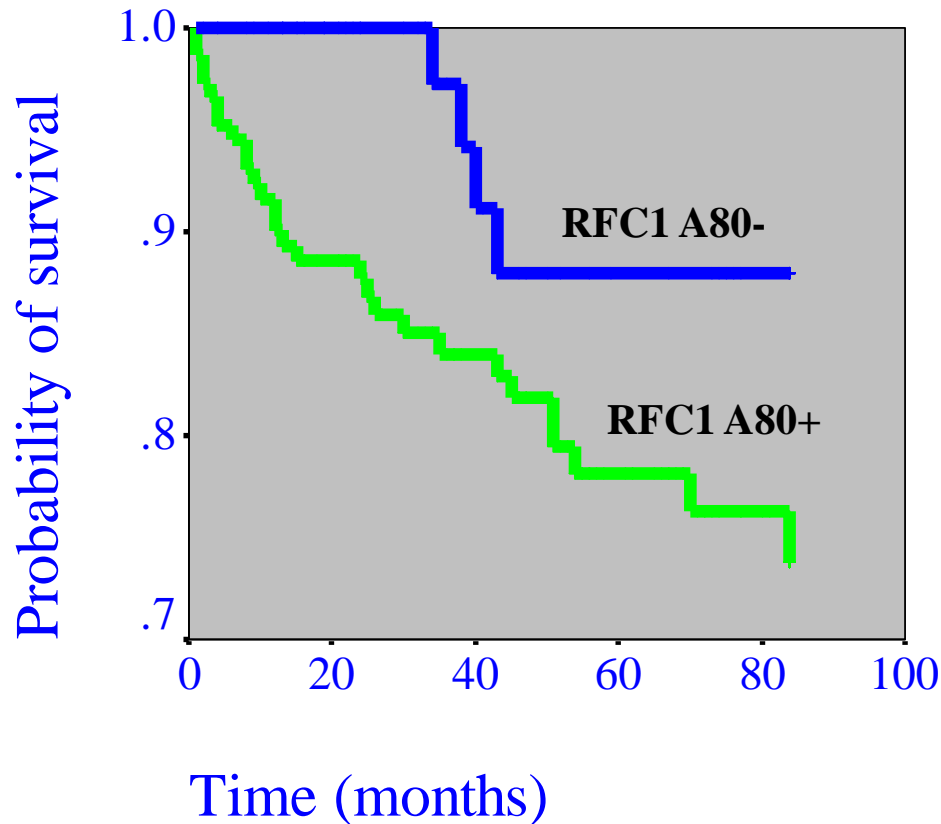
- Impact de la PG de RFC, MDR1 sur les concentrations plasmatiques du MTX



86 enfants LAL

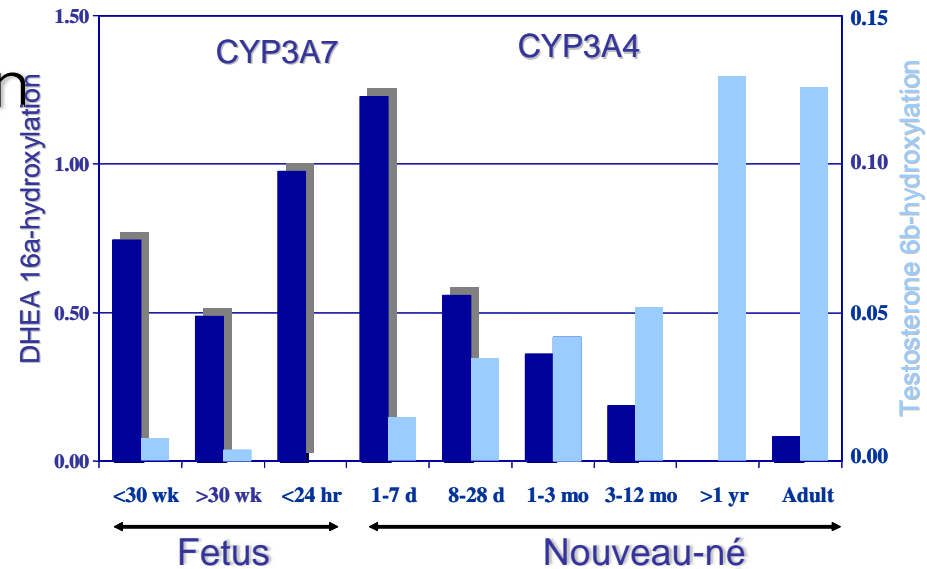
# PG et MTX: RFC1

- Impact de la PG de RFC1 G80A sur l'évolution des LAL



# PG en pédiatrie vs adultes

- Impact de la maturation
  - pathologies spécifiques
  - PK (ADME)
  - PD des médicaments

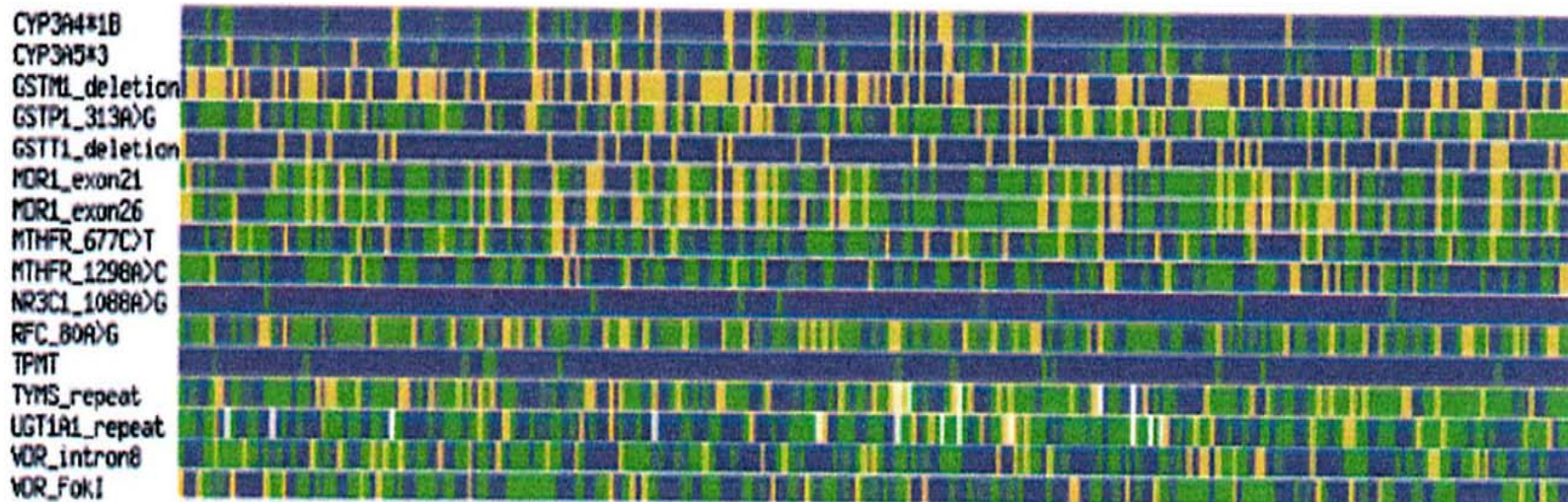


Lacroix et al. Eur J Biochem 247:625, 1997

- Objectifs des études chez les enfants
  - sélectionner les doses optimales par groupes d'âge, de population basées sur l'information génétique prédictive de la PK et/ou activité

# Etat actuel en clinique

- A l'exception de la TPMT, aucun test pharmacogénétique n'est utilisé en routine
- La recherche PG est difficile (surtout en pédiatrie)
  - populations étudiées petites
  - information PG limitée (faible nombre de SNPs étudiés)
  - gènes étudiés indépendamment



*Rocha et al., Neoplasia, 2005*

Graphique visuel du génotype pour les enzymes de métabolisme et de transport impliqués dans les LAL (246 patients/colonnes)

Homozygotes WT: **bleu**; Homozygotes mutés: **jaune**; Hétérozygotes: **vert**



## Recherche vs clinique

---

- ❑ **Recherche:** association entre SNPs et clinique (efficacité et toxicité): résultats des statistiques
    - ❑ ne prédit pas la clinique
  - ❑ **Clinique:** les cas sont complexes
    - ❑ pathologie, traitements (interactions médicamenteuses), alimentation
    - ❑ interactions des SNPs de différents gènes
- Il est impératif de réaliser des études prospectives pour évaluer si un polymorphisme génétique améliore le pronostic

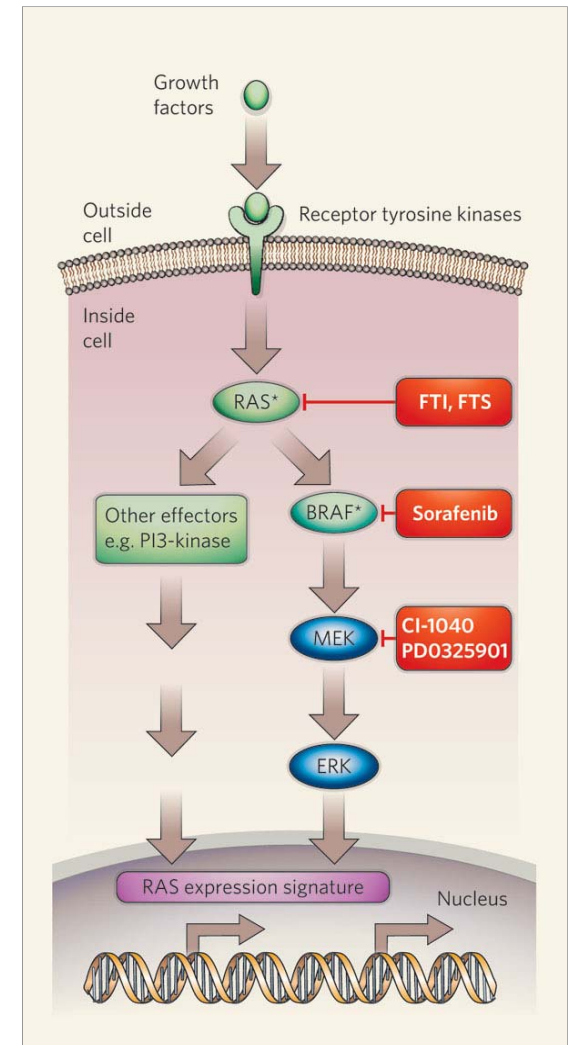
# Et à l'avenir ?

Les nouvelles molécules anti-cancéreuses sont développées de façon à cibler des cellules spécifiques et des signatures génétiques des tumeurs??

**Table 3. Selected Recently Developed Antileukemic Agents Being Tested in Clinical Trials.**

Agent	Mechanism of Action	Subtype of Leukemia Targeted
Imatinib mesylate	ABL kinase inhibition	BCR-ABL+
BMS-354825	ABL-SRC kinase inhibition	BCR-ABL+
AMN107	ABL kinase inhibition	BCR-ABL+
PKC412 MLN518 CEP701	FMS-like tyrosine kinase 3 inhibition	MLL-rearranged, hyperdiploid
Tipifarnib	Farnesyltransferase inhibition	All
MK0752	Gamma secretase inhibition (interference with NOTCH signaling)	T-cell
Decitabine	DNA demethylation	All
SAHA Valproic acid MS-275	Histone deacetylase inhibition	All
Bortezomib	Inhibition of ubiquitin proteasome pathway	All
Clofarabine	Deoxyadenosine analogue	All
Nelarabine	Deoxyguanosine analogue	T-cell
Rituximab	Anti-CD20 chimeric murine-human monoclonal antibody	CD20+
Gemtuzumab ozogamicin	Anti-CD33 monoclonal antibody conjugated with calicheamicin	CD33+
Alemtuzumab	Anti-CD52 humanized monoclonal antibody	CD52+
Epratuzumab	Anti-CD22 humanized monoclonal antibody	CD22+

Pui & Evans, NEJM 2006



Downward, Nature 20047



## Et à l'avenir ?

---

- Au cours de l'évaluation des médicaments (efficacité et toxicité)
  - étudier la cartographie des polymorphismes (SNPs)
  - rechercher des déséquilibres de liaisons
- En clinique
  - mise à disposition du médecin de tests de dépistage du polymorphisme génétique, réalisables en routine, permettant de prédire la réponse ou de cerner le risque d'accident médicamenteux
  - pour le traitement d'un patient
    - caractériser le profil PG individuel (DNA arrays)
    - adapter le traitement (molécule et posologie)