

Université de Montréal

**Pharmacogénétique des immunomodulateurs
chez les receveurs de greffe rénale**

**par
Jean-Nicholas Roy**

Département de Microbiologie Immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (Msc.)
En Microbiologie et Immunologie

Décembre 2005
©Jean-Nicholas Roy 2005



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

ii

Ce mémoire intitulé :

**Pharmacogénétique des immunomodulateurs
chez les receveurs de greffe rénale**

**par
Jean-Nicholas Roy**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : D^r Marie-Josée Hébert

Directeur de recherche : D^r Michel Roger

Membre du Jury : D^r Claude Fortin

Mémoire accepté le :



RÉSUMÉ FRANÇAIS

Les receveurs de greffe rénale doivent s'assujettir à un régime immunosuppresseur très strict. Le tacrolimus est un immunosuppresseur de choix dans la prévention d'un rejet de l'organe transplanté. Malheureusement, celui-ci a un index thérapeutique très étroit et on retrouve une très grande variation interindividuelle au niveau de son métabolisme et de sa biodisponibilité. Le Tacrolimus est métabolisé par les enzymes du cytochrome P450(Cyp)3A et sa biodisponibilité est modulée par la pompe P-glycoprotéine (P-gp). La famille des gènes Cyp3A compte deux membres principaux : Cyp3A4 et Cyp3A5. Cyp3A4 est l'isoforme la plus exprimée mais on retrouve une plus grande variation interindividuelle au niveau de l'expression de Cyp3A5. Tout d'abord, nous avons donc analysé par séquençage direct la totalité des polymorphismes de Cyp3A5 chez 50 Zimbabwéens et 50 Caucasiens. Nous avons identifié 13 nouvelles mutations à faibles fréquences. Dans un deuxième temps, dans une cohorte de 44 patients receveurs de greffe rénale, nous avons génotypé 8 polymorphismes de Cyp3A4, 7 de Cyp3A5 et 5 de MDR-1 (gène de la P-gp). Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les polymorphismes de Cyp3A4 et la pharmacocinétique de tacrolimus une semaine post-opératoire. Les patients qui ne possédaient pas deux allèles Cyp3A5*3 avaient une concentration sur dose ajustée (C0/Dose) plus faible ($p < 0.001$) et le temps nécessaire pour atteindre la concentration cible (10-12ng/ml) ($p < 0.001$) était plus élevé. Les patients avec moins de trois copies des polymorphismes (T-129C, C3435T et G2677T) de MDR-1 avaient eux aussi un C0/Dose plus faible ($p < 0.006$), bien que cet effet était moins important que celui de Cyp3A5*3. Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les génotypes et les facteurs démographiques ou cliniques.

Mots clés : Tacrolimus, Cyp3A, MDR-1, transplantation rénale, pharmacocinétique,

Cyp3A5

RÉSUMÉ ANGLAIS

Renal graft recipients require an immunosuppressive regimen in order to prevent allograft rejection. Tacrolimus is a widely used immunosuppressant in transplantation which requires strict monitoring due to its narrow therapeutic index. Tacrolimus metabolism and bioavailability varies greatly inter-individually. Tacrolimus is metabolised by Cytochrome P450(Cyp)3A enzyme family and the P-glycoprotein pump (P-gp) modulates its bioavailability. The Cyp3A family counts two major isoforms Cyp3A4 and Cyp3A5. Cyp3A4 is the major isoform present in the metabolic sites however Cyp3A5 presents a greater inter-individual variation. Therefore we analysed the Cyp3A5 nucleotide sequence in 50 Zimbabweans and 50 Caucasians in order to identify all polymorphisms present. We identified 13 novel mutations, all at low frequencies. Secondly we recruited forty-four renal transplant patients and genotyped them for eight Cyp3A4 polymorphisms, seven Cyp3A5 polymorphisms and five MDR-1 polymorphisms. We found no correlation between Cyp3A4 polymorphisms and the pharmacokinetics of tacrolimus. Patients who were not carriers of two Cyp3A5*3 alleles were associated with a lower mean dose-adjusted tacrolimus blood concentration ($p < 0.001$) and required a longer time to achieve target concentrations (10-12ng/ml) ($p < 0.001$). Additionally patients who carried less than three copies of selected MDR-1 polymorphisms (T-129C, C3435T and G2677T) were associated with a lower mean dose-adjusted tacrolimus blood concentration ($p < 0.006$) although this effect was not as significant as Cyp3A5*3. We found no correlation between the clinical or demographic factors of our patients and the pharmacokinetics of tacrolimus.

Key Words: Tacrolimus, Cyp3A4, Cyp3A5, MDR-1, renal transplantation, pharmacokinetics

Avant-propos :

La pharmacogénétique en est encore à ses débuts. Quelques exemples, tels que les polymorphismes de Cyp2D6, ont été associés avec des profils pharmacocinétiques (métaboliseurs lents, intermédiaires, rapides et ultras) pour les inhibiteurs sélectifs. Cependant, bien des variables demeurent inconnues nous privant pour le moment d'applications scientifiques qui pourraient avoir un impact important sur la qualité de vie des patients. Le développement de nouvelles technologies a permis d'obtenir beaucoup de données sur le code génétique et l'expression de certains gènes possiblement impliqués dans le métabolisme et la modulation des profils pharmacocinétiques. De plus, les nouveaux progrès ont aussi permis l'élaboration et la mise au point de nouveaux médicaments. On se retrouve donc aujourd'hui devant un défi de taille : élucider le lien entre les informations recueillies parmi les profils génétiques individuels et les profils pharmacocinétiques des drogues. Cette étude a donc pour but de déterminer l'association entre les facteurs génétiques des gènes Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 et le profil pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients receveurs de greffe.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	III
RÉSUMÉ ANGLAIS	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
1. INTRODUCTION	1
<i>1.1 La Pharmacogénétique</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Les patients receveurs de greffe d'organes solides.....</i>	<i>2</i>
<i>1.3 L'immunosuppression clinique.....</i>	<i>4</i>
<i>1.3.1 Les régimes d'immunosuppression chez les receveurs de greffe</i>	<i>4</i>
<i>1.3.2 Découverte du tacrolimus</i>	<i>7</i>
<i>1.3.3 Mécanisme d'action du tacrolimus.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.4 Absorption et métabolisme du tacrolimus</i>	<i>9</i>
<i>1.3.5 Distribution.....</i>	<i>11</i>
<i>1.3.6 Métabolites et excrétion du tacrolimus.....</i>	<i>11</i>
<i>1.3.7 Importance clinique du dosage, de la concentration et du seuil cible</i>	<i>11</i>
<i>1.3.8 Interaction du tacrolimus et autres médicaments.....</i>	<i>13</i>
<i>1.4 Cyp3A.....</i>	<i>14</i>
<i>1.4.1 Les gènes de la famille CYP3A, historique</i>	<i>14</i>
<i>1.4.2 Cyp3A4 rôle et fonctions.....</i>	<i>15</i>

1.4.3	<i>Cyp3A5 rôles et fonctions</i>	16
1.4.4	<i>CYP3A7 rôles et fonctions</i>	17
1.4.5	<i>Polymorphismes et fréquences de Cyp3A4</i>	17
1.4.6	<i>Polymorphismes et fréquences de Cyp3A5</i>	22
1.4.7	<i>Site d'expression des gènes de la famille Cyp3A</i>	26
1.4.8	<i>Régulation de l'expression des gènes Cyp</i>	28
1.5	<i>MDR-1</i>	35
1.5.1	<i>Le gène MDR-1 humain, historique</i>	35
1.5.2	<i>La P-gp structure et fonctions</i>	36
1.5.3	<i>Structure du gène MDR-1</i>	39
1.5.4	<i>Polymorphismes et fréquences de MDR-1</i>	40
1.5.5	<i>Expression du gène MDR-1</i>	45
1.6	<i>Études précédentes sur la pharmacogénétique du tacrolimus</i>	50
2.	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	52
3.	ARTICLES	53
3.1	<i>Contribution des co-auteurs</i>	53
3.2	<i>Accord des co-auteurs</i>	54
3.3	<i>CYP3A5 genetic polymorphism in different ethnic populations</i>	66
3.4	<i>CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients</i>	80
4.	DISCUSSION	103
4.1	<i>Étude du polymorphisme de Cyp3A5 chez différentes ethnies</i>	103

4.2	<i>Étude de l'influence des polymorphismes de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 sur la pharmacocinétique du tacrolimus.....</i>	107
5.	CONCLUSION.....	111
6.	BIBLIOGRAPHIE	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Relation entre le groupe sanguin ABO du donneur et du receveur de greffe
Tableau II	Immunosuppresseurs utilisés chez les receveurs de greffe d'organes solides
Tableau III	Fréquences alléliques et effets des polymorphismes de Cyp3A4
Tableau IV	Fréquences alléliques et effets des polymorphismes de Cyp3A5
Tableau V	Inducteurs, inhibiteurs et substrats connus des gènes de la famille Cyp3A
Tableau VI	Liste des substrats de la P-gp
Tableau VII	Liste des mutations répertoriées au sein du gène humain MDR-1 et leur effet sur la protéine ou sa transcription.
Tableau VIII	Liste des inhibiteurs et inducteurs de la P-gp

Article 1:

Table 1:	Primer sequences annealing temperatures to amplify the promoter and coding regions of Cyp3A5 for sequencing
Table 2:	Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing of Cyp3A5
Table 3:	Cyp3A5 nucleotide sequence variation observed in Caucasiens Canadians and Zimbabweans
Table 4:	Cyp3A5 allelic frequencies (%) in different ethnic populations

Article 2:

Table 1 : Selected polymorphisms and their effects

Table 2: Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing or sequencing of Cyp3A4

Table 3: Demographic, clinical and pharmacokinetic characteristics according to Cyp3A5 (A6886G) and MDR-1 (T-129C,C3435T,G2677T) SNP's

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Molécule du tacrolimus	7
Figure 2: Liste des promoteurs de Cyp3A4, Cyp3A5 et Cyp3A7	32
Figure 3: Région non transcrite en 5' du gène MDR-1 et les promoteurs présents.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

abs	Absent
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATG	Anti-thymocyte globulin
ATP	Adénosine tri-phosphate
BMEC	Bone marrow epithelial cells
C	Carbone
C0	Concentration sérique au temps zéro
CAR	Constitutive androstane receptor
CRE	Calcium/AMPc response element
CREB	Calcium response element binding protein
Cyp	Cytochrome
Dr	Docteur
GRE	Glucocorticoïd response element
HLA	Human leucocytes antigen
HNF	Human nuclear factor
IL	Interleukine
INR	Initiation nuclear receptor
Ins	Insertion
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramme
MDR	Multi-drug-resistance
mg	Milligramme
MMF	Mycophenolate mofetil
N	Azote
Na	Sodium

NBD	Nuclear binding domain
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
ng	Nanogramme
NK	Natural killer cell
NTA	Nécrose tubulaire aigue
NTI	Narrow therapeutic index
O	Oxygène
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	P-glycoproteine
PTDM	Post-transplant diabetes mellitus
PXR	Pregnane X receptor
RG	Récepteurs glucocorticoïdes
RXR	Retinoic X receptor
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SV1	Splice variant 1
SV2	Splice variant 2
SV3	Splice variant 3
SXR	Steroid and xénobiotic receptor
TM	Trans-membranaire
TNF	T-cell nuclear factor
transporteurs ABC	ATP binding cassette transporters
ul	Microlitre
VIH	Virus immunodéficiencie acquise
WT1	Wilms tumor suppressor
XREM	Xenobiotic response element

1. INTRODUCTION

1.1 La Pharmacogénétique

Les études pharmacogénétiques ont pour but d'élucider la relation entre les polymorphismes génétiques des enzymes métaboliques, des transporteurs, des récepteurs et autres cibles liés aux différences interindividuelles de l'efficacité et du métabolisme des drogues. Avec l'augmentation du nombre d'individus qui prennent des médicaments de façon courante, il est primordial de pouvoir prédire les facteurs qui influenceront les dosages de ces drogues afin de maximiser l'efficacité de ces dernières et de minimiser leur toxicité. En effet, les variations interindividuelles de la réponse aux médicaments observées chez différents individus sont étonnantes. Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs dont : l'âge, le sexe, la santé générale du patient, son métabolisme, sa fonction rénale et surtout son bagage génétique (tant au niveau métabolique qu'immunologique). Avec la venue des techniques moléculaires et du clonage dans les années 1980, il a été possible d'identifier différents facteurs génétiques prédisposant ou affectant les patients de façon à moduler la biodisponibilité, le métabolisme, l'efficacité ou la toxicité de certains médicaments. Par exemple, il a été démontré que les individus homozygotes pour l'allèle non fonctionnel de Cyp2D6 sont résistants aux effets analgésiques des opiacés ^[1]. De plus, des mutations faux-sens dans le gène HERG ont été associées à des arythmies cardiaques (syndrome du QT allongé) chez certains patients qui prennent de la quinidine ^[2]. Cependant, il reste que la majorité des médicaments ne sont généralement pas affectés ou modulés par un seul système ou

gène. Le défi est donc de pouvoir comprendre les différentes interactions entre toutes les composantes génétiques et leurs effets sur la pharmacocinétique des médicaments.

1.2 Les patients receveurs de greffe d'organes solides

La transplantation est généralement un traitement de dernier recours. Les transplantations rénales sont recommandées à des patients en phase terminale d'insuffisance rénale, sauf en cas de contre indication. Par ailleurs, la transplantation offre une meilleure qualité de vie que la dialyse. En effet, les données recueillies par United Network for Organ Sharing (UNOS) ont démontré que malgré un risque de décès tôt post-transplantation, le taux de mortalité à un an post-transplantation était 59-67% plus faible que les patients dialysés en attente d'une transplantation ^[3]. Une deuxième étude a pu démontrer le même phénomène à long terme (période de huit ans)^[4]. Un traitement en dialyse pendant plusieurs années, la présence d'infections récurrentes, les pathologies cardiovasculaires, le VIH ou les complications gastro-intestinales augmentent le risque de mortalité post-transplantation, mais ne sont pas des contre-indications absolues à la transplantation ^[5]. Celles-ci consistent plutôt en : le cancer généralisé, les infections systémiques, l'alcoolisme, la toxicomanie et toute autre condition pathologique ayant une espérance de vie de moins de 2 ans. Évidemment, le groupe sanguin ABO doit être déterminé pour tous les candidats en attente d'une transplantation ainsi qu'un génotypage humains "leukocyte antigen" (HLA). Les groupes ABO doivent être compatibles ou identiques (Tableau I page 3). En ce qui concerne HLA, les greffes pour lesquelles l'appariement HLA-A, B et DR receveur-donneur est identique sont prioritaires et favorisées. Par la suite, les greffons disponibles sont offerts aux receveurs ayant le moins

d'HLA non concordants. Puisque la majorité des greffons disponibles pour la transplantation proviennent de donneurs cadavériques, il n'est pas toujours possible d'obtenir une concordance parfaite entre les HLA du donneur et du receveur. La priorité lors du choix de greffon est donc accordée pour la concordance HLA DR, suivie de HLA-B et finalement, HLA-A ^[6,7]. Une non-concordance des HLA peut provoquer une réaction immunitaire contre le greffon chez le receveur et possiblement engendrer un rejet aigu de ce dernier. Les immunosuppresseurs réduisent ainsi l'ampleur du rejet aigu et les effets secondaires non désirés.

Tableau I : Relation entre le groupe sanguin ABO du donneur et du receveur de greffe

Donneur	Receveur			
	A	B	AB	O
A	Identique	Incompatible	Compatible	Incompatible
B	Incompatible	Identique	Compatible	Incompatible
AB	Incompatible	Incompatible	Identique	Incompatible
O	Compatible	Compatible	Compatible	Identique

Comme mentionné, la transplantation rénale se fait surtout à partir de don d'organes cadavériques, mais peut aussi s'effectuer à partir de don d'organes d'un donneur vivant. Au Canada, entre 2000 et 2004, une moyenne de 1048 transplantations rénales par année ont été réalisées. Près de 25% des patients en attente d'une greffe rénale sont décédés en 2004, selon le "Canadian Organ Replacement Register". Les taux de survie un an et cinq ans post-greffe sont de 81-84% et 59-68 % respectivement pour les transplantations cadavériques ^[8]. Afin de prévenir tout rejet éventuel du greffon, les patients doivent recevoir une dose minimale d'immunosuppresseurs indéfiniment.

1.3 L'immunosuppression clinique

1.3.1 Les régimes d'immunosuppression chez les receveurs de greffe

Les premiers essais de transplantation remontent aussi loin que 1933, alors qu'on a tenté de faire une première transplantation cadavérique. Ce fut malheureusement un échec dû à la mauvaise compréhension du système immunitaire. L'acquisition de nouvelles connaissances en immunologie ont permis des essais d'immunosuppression. Les premières tentatives d'immunosuppression consistaient en une radiation complète du corps^[10]. Néanmoins, tous les patients receveurs de greffe sont décédés.

La première transplantation humaine fut réussie entre deux jumeaux identiques en 1954^[9,10]. Il s'agissait d'une transplantation rénale entre deux individus ayant le même bagage génétique immunitaire. En 1962, le premier immunosuppresseur, l'Azathioprine, fut introduit et permit le début des transplantations rénales dont les chances de succès étaient plus réalistes. Dans les années soixante, la vérification de la compatibilité tissulaire et l'appariement des HLA a débuté. Le point tournant de l'histoire de la transplantation a été l'apparition de la cyclosporine A en 1978. Découvert par le D^r Calne, cet immunosuppresseur est encore utilisé aujourd'hui. L'anticorps monoclonal OKT3, un deuxième immunosuppresseur, a fait son apparition en 1986. Dans les années quatre-vingt-dix, de nouveaux agents immunosuppresseurs sont apparus tels que : tacrolimus, néoral, mycophenolate mofetil (MMF), sirolimus, deoxyspergualin et plusieurs anticorps poly et monoclonaux. C'est le début de la transplantation à plus grande échelle dans les centres médicaux.

Aujourd'hui, deux méthodes principales sont explorées ou utilisées pour éviter le rejet du greffon. Il s'agit de rendre le greffon moins immunoréactif (tolérance) ou d'induire une immunosuppression. La tolérance demeure encore hypothétique bien qu'elle a été appliquée dans quelques modèles de souris. Celle-ci n'est toutefois pas au point et on ne peut l'appliquer à la pratique clinique d'aujourd'hui ^[11]. Un régime d'immunosuppresseurs est donc administré de façon quotidienne chez les transplantés. Il s'agit de l'administration concomitante d'un inhibiteur de la calcineurine (voir section 1.3.3), de corticostéroïdes et d'un antiprolifératif. La liste des différents immunosuppresseurs et de leurs effets secondaires majeurs est retrouvée dans le tableau II (page 6).

Les inhibiteurs de la calcineurine (cyclosporine, tacrolimus et sirolimus) sont aussi des immunosuppresseurs administrés à long terme afin de prévenir le rejet du greffon. Bien que certains individus semblent développer une tolérance pour le greffon, d'autres subissent un rejet aigu, parfois vingt ans post-transplantation. Il est donc nécessaire de maintenir la thérapie immunosuppressive à vie chez les transplantés ^[10].

Tableau II : Immunosuppresseurs utilisés chez les receveurs de greffe d'organes solides

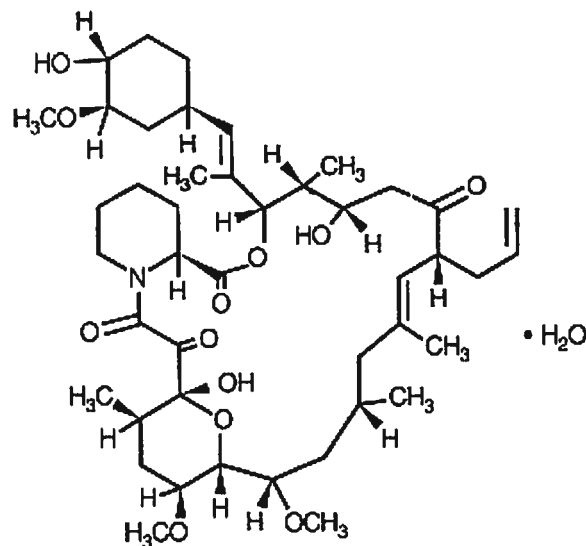
Médicaments	Mécanisme d'action	Effets secondaires majeurs
Cyclosporine (Sandimmune, Neoral)	Inhibe la transcription du gène IL-2; inhibe l'activation des lymphocytes T et leur prolifération	néphrotoxicité, hypertension, troubles neurologiques (tremblements, maux de tête, etc.), hyperplasie gingivale
Tacrolimus (Prograf, FK506)	Inhibe la transcription du gène IL-2; inhibe l'activation des lymphocytes T et leur prolifération	néphrotoxicité, hypertension, hyperglycémie, neurotoxicité
Rapamycine (Sirolimus)	Inhibe transcription du gène IL-2; inhibe l'activation des lymphocytes T et leur prolifération	néphrotoxicité, neurotoxicité
Azathioprine (Imuran)	Inhibe la synthèse et la récupération de purine, bloque la prolifération des lymphocytes	Leucopénie, anémie macrocytaire, hépatite cholestatique, pancréatite
Mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept)	Inhibe la biosynthèse des purines, la prolifération des lymphocytes	Diarrhée, anémie, anémie leucopénique
Corticostéroïdes	Bloque la transcription génique des cytokines et leur sécrétion des phagocytes mononucléaires; lyse possiblement des lymphocytes T	Hyperglycémie, hypertension, ostéoporose, cataractes, myopathie, dyslipidémie, variations d'humeur
ATG ou ALG (ATCAM)	Lyse des lymphocytes par opsonisation et phagocytose; module potentiellement la réponse immunitaire par d'autres mécanismes	Leucopénie, thrombocytopénie, réactions allergiques au sérum de cheval
OKT3 (Orthoclone OKT3)	Lyse des lymphocytes CD3 par opsonisation et phagocytose; module interaction des cellules T et des APC	Syndrome de relâchement des cytokines à la première dose, hypertension, œdème pulmonaire, azotémie transitoire, leucopénie, méningite aseptique

1.3.2 Découverte du tacrolimus

Un groupe japonais dirigé par T. Goto, T. Kino et H. Hatanaka a découvert le tacrolimus en 1987. Ce fut le premier immunosuppresseur de type macrolide. Il fut découvert dans la bactérie *Streptomyces tsukubaensis* lors de criblage bactérien. Le nom tacrolimus provient de : *Tsukuba macrolide immunosuppresseur*. Le nom scientifique du tacrolimus est :

[3S[3R*[E(1S*,3S*,4S*)],4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*,18S*,19S*,26aR*]],6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a -hexadeca-hydro-5, 19-dihydroxy-3- [2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl) -1-methylethenyl]-14, 16-diméthoxy-4,10,12, 18-tétraméthyl-8-(2-propényl)-15, 19-époxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4] oxazacyclotricosine-1,7,20, 21(4H,23H)-tétrone, monohydrate. Sa formule empirique est : $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ (Figure 1)

Figure 1 : Molécule du tacrolimus



tiré de: <http://fr.wikipedia.org/wiki/tacrolimus>

1.3.3 Mécanisme d'action du tacrolimus

Le macrolide tacrolimus (FK506, Prograf®, Fujisawa Japon) est un inhibiteur de la calcineurine. Il a le même mécanisme d'action que la cyclosporine, mais est dix à cent fois plus efficace. Après son entrée dans la cellule, le tacrolimus se lie aux immunophilines cytosoliques FKBP-12 et FKBP-52. Les immunophilines sont une famille de protéines hautement conservées qui participent aux repliements protéiques. Le complexe immunophiline-tacrolimus se forme et inhibe l'activité de la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase calcium/calmoduline dépendante exprimée dans tous les tissus humains. Elle clive le groupement phosphate de NFAT (nuclear factor of activated T-Cells) qui se lie au promoteur de interleukine-2 (IL-2). L'inhibition de la calcineurine interfère donc avec la translocation de plusieurs facteurs nucléiques (dont NFAT) impliqués dans la transcription des gènes des cytokines. Par conséquent, le complexe interrompt la voie d'activation des cellules T du système immunitaire calcium dépendant et l'expression d'IL-2.

Le tacrolimus bloque l'activation de la calcineurine et ainsi inhibe l'activation des gènes dont la transcription est médiée par l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) et les éléments CREB ("calcium response element binding protein"). La protéine CREB est exprimée de façon ubiquitaire en réponse à la présence élevée d'AMPc, de calcium et d'hormones de croissance. CREB se lie à son site de liaison CRE (calcium/cAMP response element) dans les promoteurs des gènes qu'il active. Mais le tacrolimus, de par son inhibition de la calcineurine, va également inhiber la transcription CREB/CRE dépendante^[12]. L'inhibition de la calcineurine interfère donc avec la production de IL-3, IL-5, IL-7^[11], interférons gamma, et TNF-alpha activés par CRE/CREB. Le tacrolimus inhibe

la production de IL-2 et IL-5 des cellules-T CD4+ et la prolifération des cellules-T stimulées par IL-2 et IL-7. De plus, le tacrolimus a la particularité d'inhiber la prolifération des cellules-T naïves ou activées ^[13]. Par ailleurs, il a été démontré que le tacrolimus contribue à la diminution de la production de IL-10 à l'intérieur du greffon ^[14] et qu'une augmentation de l'ARNm de IL-10 est associée de façon significative avec un rejet aigu^[14].

1.3.4 Absorption et métabolisme du tacrolimus

Le tacrolimus est un médicament hydrophile. Il est administré par voie orale sous forme solide mélangé à de l'hydroxypropyl methylcellulose. Cette formulation est très stable. Chez l'adulte moyen, 20-25% de la dose est absorbée ^[15] mais l'écart interindividuel d'absorption orale varie de 5-93% ^[16]. Plusieurs facteurs sont déjà associés à une biodisponibilité réduite tels que : le diabète ^[16], l'ethnie Afro-Américaine ^[17] ou les ethnies non-Caucasiennes ^[17], une alimentation riche en gras ou en hydrates de carbone ^[18] et les patients en attente de greffe rénale ^[17]. Chez la plupart des patients, une concentration maximale est observée entre trente (30) et soixante (60) minutes après l'ingestion du médicament ^[15]. Cependant, certains individus absorberont graduellement le tacrolimus pendant une période prolongée et présenteront un deuxième pic de forte concentration plasmatique ^[15]. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par la mauvaise dissolution du tacrolimus dans les solutions aqueuses et par les mouvements péristaltiques du système digestif. Ces écarts proviennent surtout des différences interindividuelles d'efficacité d'absorption et de métabolisme.

Lors du premier passage, le tacrolimus est métabolisé dans l'intestin grêle et le foie par les cytochromes P450 (Cyp3A). Les quantités de Cyp3A présentes dans l'intestin grêle représentent 10-50% ^[19,20] des concentrations rénales. Le foie est donc le site principal du

métabolisme. La variation du métabolisme du tacrolimus dans l'intestin grêle contribue aux différences pharmacocinétiques retrouvées interindividuellement. De façon concomitante, un des principaux facteurs influençant l'absorption du tacrolimus est la P-gp (P-glycoprotein) codée par le gène MDR-1. La P-gp diminue la biodisponibilité du tacrolimus en pompant systématiquement du milieu intracellulaire vers la lumière intestinale le tacrolimus qui a été absorbé par les cellules de la muqueuse intestinale. Ce transport extracellulaire est important et on peut retrouver de très fortes variations interindividuelles. Dans une étude *in vitro*, une différence pouvant atteindre cinq fois l'expression basale de P-gp exprimée au niveau du duodénum a été observée [20]. De plus, la P-gp servirait aussi à limiter l'accès intracellulaire du tacrolimus afin de ne pas surcharger le milieu intracellulaire et de permettre une métabolisation efficace par les Cyp3A [21]. Finalement, des concentrations croissantes d'ARNm de MDR-1 sont trouvées tout au long de l'intestin grêle. On trouve de plus, pour l'expression de MDR-1 une variation interindividuelle qui varie entre 2 et 8 fois. Elle contribue donc aussi aux variations interindividuelles de l'absorption et de la métabolisation du tacrolimus [22].

Si le tacrolimus n'est pas métabolisé dans les cellules de la muqueuse intestinale, il diffuse alors dans le sang. Le tacrolimus est secondairement métabolisé par le foie. Les iso-enzymes de Cyp3A : Cyp3A4, Cyp3A5, sont les principales enzymes responsables du métabolisme hépatique. Cyp3A7 et Cyp3A43, les autres isoformes de Cyp3A, peuvent aussi métaboliser le tacrolimus. Ils ne sont cependant pas les principales enzymes métaboliques puisque Cyp3A7 est surtout exprimé chez le fœtus et Cyp3A43 ne semble représenter que 1% du Cyp3A total [23,24,25]. Les rôles et fonctions spécifiques des Cyp3A seront plus détaillés dans la section 1.4.1 à 1.4.4 .

1.3.5 Distribution

Le tacrolimus est distribué dans la plupart des tissus. Une étude *in vitro* a démontré que nous le retrouvons dans : le poumon, le rein, la rate, le foie, le cœur, le pancréas, le cerveau, les muscles et, bien entendu, dans le sang^[26]. La concentration totale sanguine est 15-35 fois supérieure à la concentration plasmatique. En fait, 99% du tacrolimus plasmatique est lié à des protéines plasmatiques (acide glycoprotéique-alpha-1, globulines et albumine) et il semble que seule la fraction libre de tacrolimus soit active. Ceci explique donc que la demi-vie du tacrolimus est d'environ 40 heures^[16].

1.3.6 Métabolites et excrétion du tacrolimus

Les métabolites du tacrolimus ont été isolés dans le plasma, dans la bile et dans l'urine. Ils sont avant tout générés dans les microsomes du foie^[27,28,29]. Jusqu'ici, 15 différents métabolites ont été répertoriés, issus principalement de l'hydroxylation ou de la déméthylation du tacrolimus par les Cyp3A. Le métabolite principal semble être le 13-O-demethyl-tacrolimus. On le retrouve principalement dans le sang et les microsomes du foie^[29] et il est dix fois moins actif que le tacrolimus^[30]. À l'exception du 31-O-dimethyl-tacrolimus qui est seulement 1.5 fois moins actif que le tacrolimus^[30], tous les autres métabolites du tacrolimus sont au moins 3 à 1000 fois moins actifs. Ainsi, seuls les deux premiers métabolites sont considérés comme encore actifs. L'élimination du tacrolimus se fait principalement par voie biliaire 98% et par voie urinaire 2.4%^[31].

1.3.7 Importance clinique du dosage, de la concentration et du seuil cible

Les dosages de concentration sérique (C0) sont pris de façon journalière les premières semaines suivant la transplantation, ensuite ils seront pris hebdomadairement

pendant le suivi à long terme du patient. La durée du suivi journalier dépend de l'organe greffé. Le protocole des soins varie en fonction du centre de transplantation. Afin de comparer différents patients et leur capacité métabolique, le C0/Dose est utilisé. Le C0/Dose correspond à : $C0 \text{ (ng/ul)} / \text{Dose ajusté au poids (mg/kg)}$ puisque pour une cohorte de patients d'un même centre de transplantation et de greffons de même nature, le C0 ciblé est identique (ex.rénaux 10-12ng/ul). Si le C0/Dose est élevé, le patient est alors un mauvais métaboliseur et a une grande quantité de tacrolimus libre (l'immunosuppression étant plus forte).

Le tacrolimus est considéré comme un médicament ayant un index thérapeutique très étroit (NTI). Le dosage doit être très précis chez le patient afin d'éviter, d'une part les effets secondaires toxiques causés par une dose trop grande et d'autre part une immunosuppression trop élevée qui augmenterait la susceptibilité des patients aux pathogènes. Par contre, si le dosage est trop faible, le patient risque de rejeter le greffon. Une concentration trop élevée est associée à de la néphrotoxicité ^[32,33,34] et de la neurotoxicité ^[35] et survient principalement lors de l'administration intraveineuse. Les symptômes neurologiques incluent l'insomnie, les tremblements, les maux de tête, la photophobie et les cauchemars. Les symptômes neurologiques les plus sévères sont les convulsions, l'aphasie expressive, le coma et le délire lors de très fortes concentrations du tacrolimus ^[36]. Le PTDM (diabète mellitus post-transplantation) a aussi été associé avec des C0/Dose élevés ^[37,38,33]. C'est un des effets secondaires les plus sérieux et qui est probablement exacerbé par l'administration concomitante de corticostéroïdes. L'incidence d'apparition de PTDM varie entre 8-20% dans la première année suivant la transplantation. Étant donné que les transplantés suivent un régime immunosuppresseur à vie, cet effet secondaire devient problématique. Néanmoins, dans certains cas, ce diabète est réversible

[39,38]. En outre, une concentration faible d'immunosuppresseur dans le patient a été associée avec un risque accru de rejet. Dans une étude prospective de Winker et al. [40] impliquant une analyse rétrospective de 16 000 échantillons sanguins provenant de 449 patients, une concentration sanguine faible fut associée avec le rejet de greffe du foie. D'autres études ont démontré le même phénomène chez les transplantés rénaux [41,33,40,34,42]. Le point central du problème concernant le dosage du tacrolimus est que nous ignorons encore comment prédire l'effet qu'une petite variation de la dose administrée aura sur le C0/Dose ou sur la biodisponibilité du tacrolimus [15] chez différents patients. Il a été démontré que les patients qui n'atteignent pas la concentration cible 2 jours après la transplantation ont un plus gros risque de rejet par rapport à ceux qui l'atteignent [42]. L'importance d'un dosage efficace du tacrolimus est donc capitale afin d'éviter les intoxications et/ou les rejets.

1.3.8 Interaction du tacrolimus et autres médicaments

Puisque le tacrolimus a un potentiel additif et synergétique pour la modification des fonctions rénales, un soin particulier doit être apporté lorsqu'il est administré de façon concomitante avec d'autres médicaments modulant la fonction rénale (aminoglycosides, amphotéricine B et cisplatine). L'administration concomitante de cyclosporine et du tacrolimus entraîne un effet additif/synergétique néphrotoxique. De plus, puisque le tacrolimus est métabolisé par les gènes Cyp3A, les substances qui peuvent inhiber et/ou activer les CYP3A peuvent influencer les concentrations sériques du tacrolimus (voir Tableau V page 33). Les médicaments des classes suivantes peuvent augmenter la concentration sérique du tacrolimus : les bloqueurs de canaux calciques, les antifongiques et les macrolides, alors que les anticonvulsants, la préparation de St-Johns Wort (*Hypericum perforatum*) et le

sirolimus peuvent diminuer la concentration sérique du tacrolimus. De plus, l'immunosuppression affecte l'efficacité des vaccins. L'utilisation de vaccins vivants atténués (rubéole, varicelle, rougeole, polio orale, fièvre jaune, Bacillus Calmette-Guerin ou BCG et typhus TY 21a) devrait être évitée.

1.4 Cyp3A

1.4.1 Les gènes de la famille CYP3A, historique

Les Cytochromes furent découverts en 1925 en tant que composés subissant une oxydation et une réduction rapide dans différents organismes vivants : (humains, plantes, insectes, etc). Ils constituent une famille de protéines qui sont apparentées par la présence d'un groupement prosthétique, ou hème, dont l'atome de fer passe de l'état ferrique (Fe III) à ferreux (Fe II) chaque fois qu'il accepte un électron. Les Cytochromes P-450 sont la famille des cytochromes principalement retrouvés dans le foie. Ils sont impliqués dans le métabolisme des composés endogènes (acides gras, stéroïdes, cholestérols et autres) et exogènes (médicaments, carcinogènes, polluants pesticides), dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, dans la cascade d'acide arachidonique, dans la synthèse des acides de la bile et dans les fonctions du système nerveux centrale (SNC). À ce jour, la famille des Cyp450 compte 59 gènes fonctionnels ^[43]. La sous-famille des cytochromes P4503A (Cyp3A) compte 3 gènes : Cyp3A4, Cyp3A5, Cyp3A7 ainsi qu'un pseudogène Cyp3A43. Ce dernier est exprimé dans le foie, mais la quantité totale de Cyp3A43 représente moins de 1% du Cyp3A total. Sa contribution aux activités métaboliques des Cyp3A est donc considérée comme négligeable ^[44]. Cyp3A7 est principalement exprimé chez le fœtus pour ensuite être remplacé chez l'adulte par Cyp3A4, l'isoforme principale du foie, et Cyp3A5 que l'on retrouve dans le foie et le petit intestin. Les gènes Cyp3A4 et Cyp3A5 sont

impliqués presque exclusivement dans la métabolisation et sont plus actifs dans l'élimination métabolique des médicaments que n'importe quel autre enzyme de la famille des cytochromes. Les Cyp3A catalysent les réactions de monooxygénation. La variation interindividuelle d'expression de Cyp3A peut varier jusqu'à quarante fois à travers les biopsies de tissus de foie et de l'intestin grêle ^[45]. L'expression des Cyp3A est modulable par des composés naturels et synthétiques tels les glucocorticoïdes. Cette variation d'expression combinée aux polymorphismes des gènes Cyp3A contribue à la variation interindividuelle de l'expression des Cyp3A.

1.4.2 Cyp3A4 rôle et fonctions

Cyp3A4 n'est pas retrouvé chez le fœtus, mais est exprimé dans le foie et l'intestin de l'adulte et l'enfant ^[46]. Cyp3A4 est une protéine membranaire le plus souvent retrouvée dans les microsomes ^[44,47]. Seule, Cyp3A4 est responsable de 40 à 60% du métabolisme des médicaments prescrits aujourd'hui ^[48]. Les Cyp3A4 catalysent les réactions d'oxydation C-N(carbone-azote), les déalkylations N-O (azote-oxygène) ainsi que les réductions et déshydrations nitriques. Récemment, la structure moléculaire de Cyp3A4 ainsi que son site actif ont été élucidés. Ce dernier est de taille et de topographie suffisantes pour un grand ligand ou de multiples ligands de plus petite taille ^[47]. Des expériences de mutagenèse dirigées contre des résidus impliqués dans la reconnaissance des ligands ont pu démontrer la présence de deux sites de liaison du ligand et d'un site de liaison effecteur ^[49]. Cyp3A4 a donc un large éventail de substrats, mais démontre quand même une régio et stéréosélectivité ^[49].

1.4.3 Cyp3A5 rôles et fonctions

Les rôles et fonctions spécifiques de Cyp3A5 versus ceux de Cyp3A4 et les autres Cyp3A restent encore nébuleux. La prépondérance de Cyp3A5 dans le foie et l'intestin n'est pas encore bien claire, quoique plusieurs études aient démontré que 30% des individus ont une forte concentration de Cyp3A5 hépatique ^[50]. Chez les individus qui expriment fortement Cyp3A5, il peut représenter jusqu'à 50% du Cyp3A4 total. Chez la majorité des individus, les Cyp3A4 sont prépondérants dans l'intestin et le foie tandis qu'à l'extérieur de ces deux organes, Cyp3A5 est prédominant (poumons, reins, œsophage, pancréas). Il est fort probable que Cyp3A5 contribue à la métabolisation des xénobiotiques dans l'intestin et le foie. Il y joue sensiblement le même rôle que Cyp3A4 puisque leur spectre de substrat est très semblable. Malheureusement, dû à ce fait et à l'expression colocalisée des Cyp3A, il est excessivement difficile de déterminer quels sont les rôles exacts de Cyp3A4 et Cyp3A5. Par conséquent, comme l'ont démontré Lin et coll, lorsqu'une protéine est inactivée ou moins exprimée, l'autre protéine compensera cette absence ^[51]. On a pu déterminer que même si les deux enzymes ont les mêmes substrats (exemple : nifedipine, testostérone, oestradiol, dehydropiandrosterone, cortisol), Cyp3A5 possède tout de même un spectre d'activité plus limité que Cyp3A4. Notamment, il métabolise difficilement : l'érythromycine, quinidine, 17-a-ethynyloestradiol, l'aflotoxine, la cyclosporine, et l'hydroxylation 6B de la progestérone et l'androstérone ^[52,53,54]. Une autre hypothèse avancée serait que Cyp3A5 jouerait possiblement un rôle physiologique. Par exemple, dans le rein, Cyp3A5 métaboliserait le 6-B-hydroxycortisol, un régulateur physiologique des transporteurs Na⁺^[55]. Ainsi, il pourrait participer au contrôle des réserves endogènes de facteurs paracrines ou endocrines. En outre, Cyp3A5 pourrait contribuer à la métabolisation variable des stéroïdes dans la prostate ou les poumons modulant ainsi les risques de

pathogénèse pour ces zones. Cyp3A5 joue donc un rôle métabolique de régulation des substances xénobiotiques et endobiotiques dans le corps, mais sa prépondérance et son implication exacte restent encore à déterminer.

1.4.4 CYP3A7 rôles et fonctions

Cyp3A7 est l'isoforme principale exprimée chez le fœtus et joue un rôle prépondérant dans la production des estrogènes pour le fœtus et la mère durant la grossesse. On retrouve une forte expression au niveau du placenta et de l'endomètre durant la grossesse et durant la phase sécrétoire du cycle menstruel [56]. L'allèle Cyp3A7*1C code pour une séquence du promoteur altérée dans le motif ER-6 et provoque une augmentation de l'expression des Cyp3A7 chez l'adulte. Ceci a été confirmé par plusieurs études portant sur l'ARNm de Cyp3A7 [24,50]. L'équipe de Burk [24] a aussi démontré que l'allèle 1B était associé à une augmentation de l'expression de Cyp3A7. Ils ont observé que les deux tiers des individus de leur étude qui exprimaient Cyp3A7 étaient également porteurs de l'allèle Cyp3A7*1B ou Cyp3A7*1C. La fréquence allélique de Cyp3A7*1C est d'environ 10% mais certaines études ont détecté une expression plus élevée (sept patients sur treize ou 54%) [54]. Sa contribution au métabolisme des xénobiotiques ne peut donc être négligée bien que son rôle et son importance exacte demeure encore inconnus.

1.4.5 Polymorphismes et fréquences de Cyp3A4

Les allèles Cyp3A4*1B,*1C,*1D et *1E furent les cinq premiers à être découverts. Ceux-ci sont identifiés grâce à la présence de polymorphismes dans la région du promoteur. Les allèles Cyp3A4*1B,*1C et *1D furent analysés par Kuehl et coll [50] dans une population caucasienne où ils étaient présents à moins de 2% et dans une population afro-

américaine où Cyp3A4*1C et *1D étaient absents mais Cyp3A4*1B était présent à 35%. Des études subséquentes à celles de Kuehl et coll ont démontré que le polymorphisme représentant l'allèle Cyp3A4*1B était le polymorphisme le plus fréquent au niveau du promoteur. Sa fréquence varie entre les divers groupes ethniques; il est présent entre 2 et 9.6% chez les Caucasiens ^[50,57,58,59], entre 9-11% chez les Hispaniques ^[58,60], entre 35-67% chez les Africains et les Afro-américains ^[50,57,58,61,62]. Toutefois, Cyp3A4*1B est absent chez les Asiatiques ^[57,63,58]. Les allèles Cyp3A4*1E et *1F furent découverts par Hamzeiy et coll. ^[62]. L'allèle Cyp3A4*1E ne fut retrouvé que chez un seul Caucasien dans une étude d'une cohorte de 101 patients, tandis que l'allèle Cyp3A4*1F fut observé chez 20% des Caucasiens et 18% des Iraniens. Le rôle de Cyp3A4*1E reste inconnu. Le polymorphisme Cyp3A4*1F n'est pas situé à proximité de ou dans un élément de transcription et a probablement peu ou pas d'effet sur l'expression de Cyp3A4^[62]. En 2004, le groupe de Fukushima-Uesaka et coll.^[64] a découvert trois autres allèles soient Cyp3A4*1K, *1L et *1M qui sont définis par un polymorphisme retrouvé dans le promoteur. Ces trois allèles ont été retrouvés à des fréquences de 0.1% dans leur cohorte composé de 416 sujets japonais. À ce jour, aucune étude ne peut expliquer les effets directs ou la possibilité d'un effet qu'un de ces allèles pourraient avoir sur la transcription de Cyp3A4.

Un total de 18 mutations ont été répertoriées dans les régions codantes de Cyp3A4 et permettent l'identification des 18 allèles (voir Tableau III page 21). Elles sont distribuées dans neuf des treize exons du gène. La plupart de celles-ci (identifiant 15 allèles) sont retrouvées dans les exons 5-6-7-11 et 12. La plupart des allèles sont présents à de faible pourcentage (<1%) et mentionnons qu'à ce jour aucune étude n'a démontré la présence d'homozygote de ces allèles ^[45].

Chez les Caucasiens, les allèles les plus fréquents sont Cyp3A4*2, *10 et *17 retrouvés respectivement à une fréquence de 2.7%^[61], 0.24-2%^[48,65] et 2.1%. Cyp3A4*17 a été associé à une baisse de l'activité de Cyp3A4 (métabolisme de testostérone)^[65].

Dans les autres populations ethniques, certains polymorphismes sont retrouvés à de plus forte fréquence. Ainsi, chez les Africains, l'allèle Cyp3A4*15A est présent à 2-4%^[48,66]. L'allèle Cyp3A4*18, associé avec le même phénotype que Cyp3A4*17 fut uniquement observé chez 10% d'une cohorte chinoise^[65]. Chez les Hispaniques et les Japonais, Cyp3A4*16 est retrouvé à 5%^[48]. De plus, les allèles Cyp3A4*3,*4 et *5 ont été associés à une baisse d'activité enzymatique *in vitro* (métabolisme de cortisol) mais ils ont été retrouvés uniquement dans une étude de cohorte asiatique (Chinoise)^[63] à des fréquences de 1-1.5%. Finalement, l'allèle Cyp3A4*6 code pour une protéine non fonctionnelle puisque ce polymorphisme entraîne la présence d'un codon stop. Cet allèle fut seulement retrouvé dans les populations asiatiques à une fréquence de 0.5%^[63].

De toutes ces mutations répertoriées à ce jour, aucun ne changera un des acides aminés situés dans le site de liaison du substrat. Étant donné que les polymorphismes connus sont faiblement retrouvés, il s'avère excessivement difficile de relier un polymorphisme précis à l'activité métabolique de Cyp3A. En effet, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'expression de Cyp3A4. D'ailleurs, l'utilisation d'un système d'expression hétérologue a permis l'association de deux allèles rarement observés (Cyp3A4*8 et Cyp3A4*13) avec une expression réduite ou absente de la protéine^[65]. De plus, plusieurs études ont tenté d'établir une association entre l'hydroxylation du midazolam

et les polymorphismes génétiques, néanmoins aucune étude n'a pu établir d'association concluante^[67,68,69].

À ce jour, quelques polymorphismes introniques ont été rapportés. La majorité de ceux-ci sont retrouvés à faible fréquence à l'exception des mutations déterminant les allèles Cyp3A4*1G et Cyp3A4*1Q. Ces derniers sont retrouvés tous deux à une fréquence de plus de 97% chez les Caucasiens et 76 % chez les Afro-Américains. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de ces polymorphismes, un effet quelconque^[48] et les variations de fréquence inter-ethnique.

Tableau III : Fréquence et effets des polymorphismes et allèles de Cyp3A4

Allèle	Position AF280107	Effet	Fréquence %			Activité In vivo	Référence
			Cauc	Afr	Asiat		
Cyp3A4*1	Sauvage	Aucun					Gonzales, [70]
Cyp3A4*1B	-392 A-G		2-96	35-67	0		Westlind et al [71]
Cyp3A4*1C	-444 T-G		1	0			Kuehl [50]
Cyp3A4*1D	-62 C-G		1	0			Kuehl [50]
Cyp3A4*1E	-369 T-A		<1				Hamzeiy et al [62]
Cyp3A4*1F	-747 C-G		20				Hamzeiy et al [62]
Cyp3A4*1G	20230 G-A						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1H	20230 G-A; 26206 C-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1J	6077 A-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1K	-655 A-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1L	-630 A-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1M	-156 C-A						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1N	14200 T-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1P	15727 G-A						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1Q	15809 T-C						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1R	16775 A-G						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1S	17815-17816 délétion AT						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*1T	26013 T-C						Fukushima et al [64]
Cyp3A4*2	15713 T-C	S22P	2.7	0	0		Sata et al [61]
Cyp3A4*3	1334 T-C ⁺	M445T	0.47-4			↓cortisol	Sata et al [61]
Cyp3A4*4	352 A-G	I118V			1.5	↓cortisol	Hseih et al [63]
Cyp3A4*5	653 C-G	P218R			0.98	↓cortisol	Hseih et al [63]
Cyp3A4*6	831 ins A	Stop 285			0.5		Hseih et al [63]
Cyp3A4*7	6004 G-A	G56D	1.41				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*8	13908 G-A	R130Q	0.33				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*9	14292 G-C	V170I	0.24				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*10	14304 G-C	D174H	0.24-2	2			Eiselt et al [65]
Cyp3A4*11	21867 C-T	T363M	0.34				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*12	21896 C-T	L373F	0.34				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*13	22026 C-T	P416L	0.34				Eiselt et al [65]
Cyp3A4*14	44 T-C	L15P					Lambda et al [48]

Allèle	Position		Fréquence %		Activité		Référence
	AF280107	Effet	Cauc	Afr	Asiat	In vivo	
Cyp3A4*15B	-392 A-G; 485 G-A -845INS: ATG GAGTGA	R162Q	<1		0		Hamzeiy et al [62]
Cyp3A4*16A	15603 C-G	T185S				Pas d'effet	Lambda et al [48]
Cyp3A4*16B	15603 C-G; 20230 G-A	T185S					Fukushima et al [64]
Cyp3A4*17	15615 T-C	F189S	2.1	0	0	↓	Dai et al [66]
Cyp3A4*18A	20070 T-C	L293P	0	0	10	↑	Dai et al [66]
Cyp3A4*18B	20070 T-C; 20230 G-A	L293P	0	0		↑	Fukushima et al [64]
Cyp3A4*19	23237 C-T; 20230 G-A	P467S			12		Dai et al [66]

1334 T-C⁺ : ces positions se rapportent à la séquence M18907

↓: diminution; ↑: Augmentation; Afr: Africains; Cauc: Caucasiens; Asiat: Asiatiques

1.4.6 Polymorphismes et fréquences de Cyp3A5

Les études de Kuehl et coll. ont décelé les premiers polymorphismes du promoteur de Cyp3A5, Cyp3A5*1B (G-86A) et *1C (C-74T). Chez les Caucasiens. Kuehl et coll ont observé une fréquence de 3% [45] pour Cyp3A5 * 1B et *1C, tandis que Hustert et coll ont observé une fréquence de 0.5% et 4.3% respectivement [72] pour ces mêmes allèles. Ces deux mutations n'ont pas été observées chez d'autres ethnies (Asiatiques, Africains et Afro-Américains). Aucun effet n'a été relié à ces mutations [50,72,45].

Dans la région codante, il y a 8 polymorphismes qui définissent 7 allèles. Tout d'abord, Cyp3A5*2 (A14665G) est retrouvé à très faible fréquence chez les Caucasiens [50,72,45] soit de 1 à 5% et n'est pas retrouvé chez les Africains ou les Afro-Américains [73]. Ce

dernier code pour un changement d'acide aminé T398N qui modifierait potentiellement la structure protéique. Ensuite, Cyp3A5*4 (A14665G) code pour une substitution d'acide aminé: Q200R. Ce polymorphisme a été découvert chez deux patients d'une cohorte de 110 chinois, par le groupe de Chou et coll ^[74]. Dans la même cohorte, deux individus étaient porteurs de Cyp3A5*5 (T12952C) qui code pour un défaut d'épissage. Aucune autre étude n'a retrouvé ce polymorphisme à travers d'autres ethnies ^[48,73]. Cyp3A5*6 (A14690G) entraîne un défaut d'épissage qui donne lieu à l'omission de l'exon 7 dans l'ARNm. Pour l'instant, deux hypothèses sont avancées : premièrement, l'ARNm n'est pas traduit ou deuxièmement, une protéine dont l'activité est sévèrement réduite est produite. Ce polymorphisme est présent uniquement chez les Africains (22%) ^[73] et chez les Afro-Américains 1.5%^[50,72,45,75,45,50,76]. Cyp3A5*7 code pour une mutation faux-sens qui donne naissance à un codon stop. Cet allèle est retrouvé seulement chez 10% des Africains et Afro-Américains ^[50,72,73,74]. Finalement, les allèles Cyp3A5*8, *9 et *10 ont tous trois été associés à une hydroxylation diminuée de la testostérone, donc potentiellement une activité réduite de la protéine ^[77]. Les trois allèles sont définis par des mutations qui causent des substitutions d'acides aminés : Cyp3A5*8 (T3699C;R28C), Cyp3A5*9 (G19386A;A337T) et Cyp3A5*10 (T29753C; F446S). Cyp3A5*10 porte aussi une mutation intronique A6986G (commun aux allèles 3 et qui engendre un épissage alternatif) et une mutation dans la région non transcrite 5' du gène présent (31611). Cependant, l'effet de la substitution F446S semble plus important que l'effet d'épissage pour l'activité de Cyp3A5 ^[77]. Cyp3A5*8 est retrouvé seulement chez 4% des Africains, Cyp3A5*9 est présent seulement chez 2% des Asiatiques et Cyp3A5*10 chez seulement 2% des Caucasiens ^[77,45,75]. Dernièrement, sur le site de nomenclature des allèles du Cytochrome P450 ^[78], Cyp3A5*11 a été défini par la présence des polymorphismes A3775G et A6986G. Le polymorphisme A6986G définit l'épissage

alternatif commun aux allèles 3 et la mutation A3775G engendre une substitution d'acide aminé Y53C. Il n'y a pas eu encore de publication sur l'origine et la découverte de cet allèle et sa fréquence.

Le gène Cyp3A5 porte aussi des polymorphismes non codants. Le polymorphisme intronique le plus important est sans doute le polymorphisme A6986G. Il code pour un épissage alternatif de Cyp3A5 et est commun à tous les allèles Cyp3A5*3 (3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,3H,3I,3J). Les allèles 3B, 3D 3F et 3J ont une mutation additionnelle qui code pour un changement de la protéine. Cyp3A5* 3B (3709-10ins GH30Y), Cyp3A5* 3D (A27050G; L82R), Cyp3A5* 3F (T31551C; I488T) et Cyp3A5* 3J (A29782G; I456V) codent chacun pour une substitution d'acide aminé en plus d'un défaut d'épissage. Cyp3A5* 3 est présent chez tout les ethnies; 50% chez les Africains ^[45,73], 70-95% chez les Caucasiens ^[50,45,79] et à 60-76% chez les Asiatiques ^[75]. Cet épissage à la particularité de produire un ARNm principal qui contient 131pb de l'intron 3, le variant d'épissage 1 (SV1). La particularité de Cyp3A5* 3 est que les allèles 3A, 3B et 3C possèdent également des mutations dans les introns 4 et 5 et peuvent produire deux variants d'épissage non fonctionnels SV2 et SV3 ainsi qu'une protéine sauvage fonctionnelle et ce malgré la présence du polymorphisme de A6986G ^[80,50]. Kuehl et coll. ont démontré que chez les individus homozygotes pour Cyp3A5*3 des ARNm sauvages, ainsi que des ARNm mutants SV1^[50] étaient présents. Le groupe de Lambda a vérifié et quantifié la présence des différents variants d'épissage. Ils ont pu déterminer que les individus porteurs de Cyp3A5*3/*1 expriment quatre fois plus d'ARNm sauvage que ceux portant Cyp3A5*3/*3. De plus, le variant d'épissage SV1 est dix fois moins présent que le variant ARNm sauvage chez ces mêmes individus. L'interaction de l'ARN-prémessager et le complexe d'épissage ^[80,50] serait déterminant de la production d'ARNm (mutant ou sauvage). Cyp3A5* 3 est donc

très polymorphique et varie fortement entre les ethnies. Il existe également plusieurs autres mutations ponctuelles qui ont été isolées dans diverses études. Elles ont cependant toutes été retrouvées à des fréquences de 1-2%, en général dans une seule ethnie, et surtout aucun effet potentiel ne leur est attribué.

Tableau IV : Fréquences et effets des polymorphismes et allèles de Cyp3A5

Allèle	Position	Effet	Fréquences %			Activité In vivo	Réf
			Cauc	Afr	Asiat		
Cyp3A5*1A	sauvage						
Cyp3A5*1B	-86 G-A		3	abs	abs		[50]
Cyp3A5*1C	-74 C-T		3	abs	abs		[50]
Cyp3A5*1D	31611 C-T		nd	nd	nd		[72]
Cyp3A5*2	27289 C-A	T398N	1-5	abs	abs		[74]
Cyp3A5*3	6986 A-G	défaut épissage	70-95	50	60-76	baisse sévère	[50,45,79,75, 73]
Cyp3A5*4	14665 A-G	Q200R	abs	abs	1		[74]
Cyp3A5*5	12952 T-C	défaut épissage	1	abs	abs		[74]
Cyp3A5*6	14690 G-A	défaut épissage	abs	22	abs	aucun ou baisse	[73,45,75,50, 76]
Cyp3A5*7	27131-32 ins T	changement cadre de lecture	abs	10	abs		[72]
Cyp3A5*8	3699 C-T	R28C	abs	4	abs	baisse	[77]
Cyp3A5*9	19386 G-A	A337T	abs	abs	2	baisse	[77]
Cyp3A5*10	986 A-G 29753 T-C 31611 C-T	défaut épissage F446S	2	abs	abs	baisse	[77]
Cyp3A5*11	3775 A-G; 6986A-G	Y53 C, défaut épissage	nd	nd	nd		

Cauc: Caucasiens; Afr: Africains; Asiat: Asiatiques; Ref: Références

1.4.7 Site d'expression des gènes de la famille Cyp3A

Foie

Le principal site d'expression des Cyp3A est le foie. Chez l'adulte, la distribution de l'expression des Cyp3A dans le foie est sélective aux zones métaboliques de ce dernier. On retrouve une plus forte concentration des Cyp3A dans les hépatocytes périveineux de la région péricentrale et aucune expression dans les hépatocytes périportaux^[81,82]. Cyp3A4 représente la majorité du Cyp3A exprimé dans le foie tandis que l'expression et la contribution de Cyp3A5 varie interindividuellement^[72].

Systeme gastro-intestinal

Le groupe de Watkins et al^[83] a détecté l'expression des Cyp3A dans les cellules épithéliales du système gastro-intestinal en 1987. On retrouve une plus forte activité enzymatique et expression au niveau des entérocytes du *villus tip* de la muqueuse de l'intestin grêle^[84] bien que les Cyp3A soient exprimés tout au long de l'intestin grêle, du colon et du rectum. En outre, dans le pancréas, une détection immunohistochimique a permis d'observer la présence de Cyp3A dans l'*épithelium ductulaire* plus faiblement exprimée par rapport au petit intestin^[84,85]. On a également retrouvé par immunohistochimie la présence de Cyp3A dans les cellules mucoales de l'œsophage, les cellules pariétales de l'estomac et dans les cellules cryptiques^[85]. Ainsi, une forte proportion des xénobiotiques sont métabolisés avant même d'avoir atteint le foie. D'autre part, Cyp3A4 est l'isoforme le plus exprimé dans l'intestin grêle, mais il n'est pas détecté dans l'œsophage et très peu dans l'estomac où on retrouve une expression prédominante de

Cyp3A5 ^[86]. Finalement, chez 10% de la population adulte porteuse de Cyp3A7*1C, on retrouve une expression de Cyp3A7 dans l'intestin.

Rein

L'expression de Cyp3A dans les reins est prédominante au niveau des cellules épithéliales du tubule proximal du cortex et est plus faible, voire nulle, au niveau de tubule distal ^[84,87,88]. Plusieurs expériences de détection effectuées au niveau des glomérules se sont avérées négatives ^[84,87,86]. Au niveau de la médulla, on retrouve une plus forte expression dans les cellules épithéliales du tube collecteur. L'ARNm de Cyp3A5 fut détecté dans les microsomes de toutes les 27 biopsies rénales analysées par Haehner ^[89]. Mentionnons que lors de cette étude, Haehner et coll ont retrouvé un sous-groupe qui démontrait une expression de Cyp3A5 10 fois plus élevée que celle observée chez les autres individus. Cette hausse d'expression était associée à une élévation de l'hydroxylation du midazolam. Ceci semble donc indiquer, en accord avec d'autres groupes, ^[90,72] que Cyp3A5 pourrait jouer un rôle prépondérant dans le métabolisme rénal.

Poumons

L'expression des Cyp3A dans les poumons a été premièrement localisée par immunohistochimie dans les glandes séromucosales et les épithéliums bronchiaux ^[91], et les pneumocytes ^[92]. En 1997, le groupe d'Antilla a utilisé des anticorps spécifiques contre Cyp3A4 et Cyp3A5, et ils ont ainsi pu démontrer l'expression de Cyp3A4 au niveau de l'épithélium pulmonaire et des macrophages alvéolaires. Cyp3A5 fut quant à lui, détecté dans les cellules ciliées et mucosales des parois bronchiales, dans les glandes bronchiales, dans les épithéliums bronchiaux colonnaires et cuboïdes, dans les épithéliums alvéolaires de type I et II, dans les épithéliums vasculaires et capillaires et finalement, dans les

macrophages alvéolaires. Les détections ne furent pas positives pour tous les individus et dans tous les tissus, ce qui suggère une expression polymorphique de Cyp3A5 dans les poumons.

Cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

L'intérêt d'étudier l'expression des Cyp3A dans le sang provient du fait que les échantillons sanguins sont facilement accessibles et pourraient être potentiellement indicateur de l'expression globale de Cyp3A. Les expériences de détection de l'expression de Cyp3A à partir de lymphocytes ou d'éosinophiles par les méthodes d'immunohistochimie ou PCR en temps réel se sont avérées positives pour certains groupes de recherche et négatives pour d'autres [90,88,93,94,95]. Ainsi, l'expression de Cyp3A dans les PBMC n'est pas un bon indicateur de l'activité hépatique, rénale ou pulmonaire de Cyp3A. Il semble donc que l'expression de Cyp3A dans le sang soit de niveau basal, et que le rôle des Cyp3A sanguins demeure inconnu.

1.4.8 Régulation de l'expression des gènes Cyp

L'expression des Cyp3A est surtout modulée par trois récepteurs : le récepteur glucocorticoïde (RG), le récepteur pregnane X (PXR) et le récepteur constitutif à l'androstérone (CAR). Premièrement, le RG contient un site de liaison à l'ADN et deux domaines de liaison "zinc-finger". Le site de liaison du ligand de 30 acides aminés est retrouvé au niveau C-terminal du récepteur. Cette partie est aussi impliquée dans la translocation nucléaire, la transactivation des gènes cibles et la dimérisation du récepteur [96,97]. Les "Zinc fingers" interagissent avec les séquences des GRE (glucocorticoïde response element) GTACnnnTGTTCT qui sont retrouvés au niveau des promoteurs des

Cyp3A. Le mécanisme exact de l'activation de Cyp3A par les RG demeure encore inconnu. Une étude récente effectuée à partir de souris porteur d'un gène RG non fonctionnel (mutation localisée) n'a démontré aucune différence d'induction de l'expression des Cyp3A en présence ou absence de glucocorticoïdes par rapport à celle observée chez des souris sauvages ^[98]. Une autre équipe, quant à elle, a rapporté l'induction de Cyp3A par des antagonistes aux glucocorticoïdes ^[99]. Finalement, Gibson a réussi à induire l'expression d'un gène rapporteur avec le promoteur de Cyp3A4 en présence de stéroïdes de manière dose dépendante ^[44]. L'hypothèse qui est présentement retenue propose que les RG contribuent à l'activation des gènes Cyp3A4, Cyp3A5 et Cyp3A7 non pas par la voie classique des récepteurs, mais par un mécanisme indirect. Il semble aussi que les voies de signalisation PXR, RG et CAR ne soient pas indépendantes et plutôt interreliées.

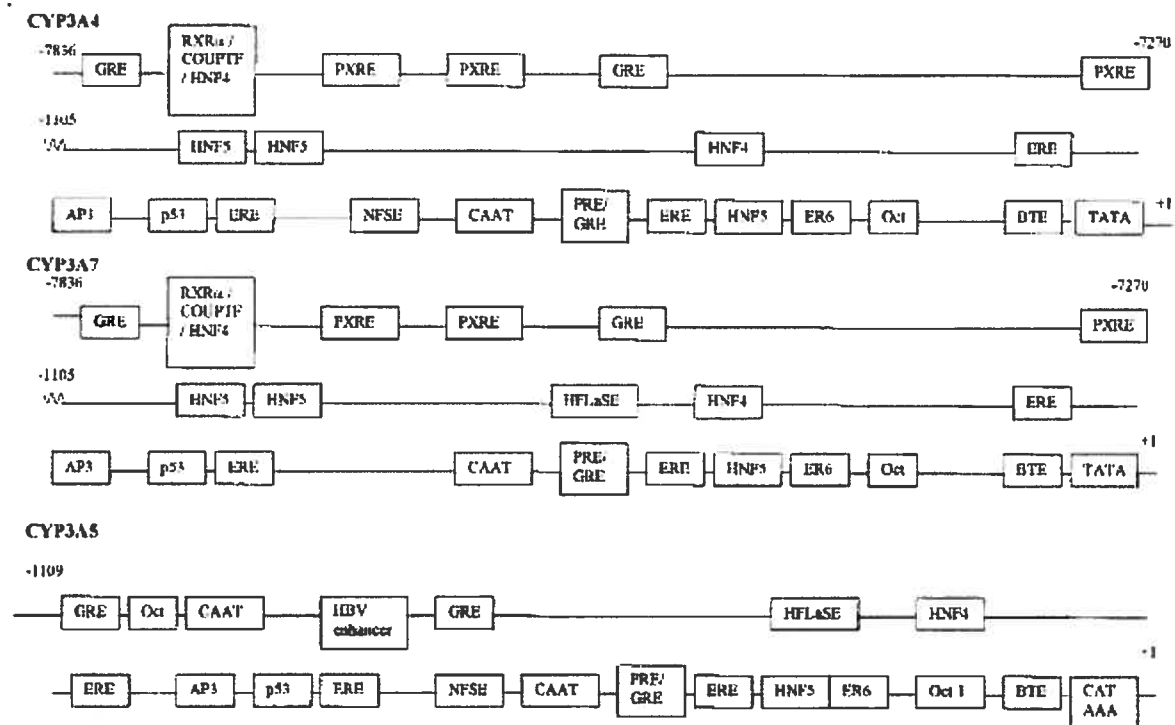
Le récepteur PXR est un récepteur nucléaire. Son domaine C-terminal contient le site de liaison inductif par ses ligands ainsi que le site de liaison à l'ADN. Le site de liaison du ligand a été étudié par cristallographie à une résolution de 2.5 et 2.75 Angstrom ^[100]. Le site est légèrement plus gros que les sites de liaison des récepteurs de la même famille et est de caractère lipophile prononcé. Ceci est en accord avec la taille et les caractéristiques des divers substrats de Cyp3A4 et Cyp3A5 ^[100]. PXR se lie aux sites de liaison activateurs des promoteurs suivants : PXR-RE, ER₆, DR₃ et DR₄ retrouvés chez Cyp3A4, Cyp3A5 et Cyp3A7 ^[101,102,103]. La dimérisation de PXR/RXR (retinoic X receptor) ^[104] permet aussi l'entrée de la cellule dans le noyau et sa liaison au site d'activation DR₃. RXR serait donc un facteur limitant de l'induction des Cyp3A étant donné sa distribution restreinte à dans différents tissus. Il est intéressant de noter que le promoteur de MDR-1 contient aussi des sites de liaison DR₄ ^[100]. Les récepteurs PXR pourraient répondre aux interrogations qui se posent toujours au sujet de la modulation de l'expression RG dépendante. Les ligands de

PXR sont des xénobiotiques et des endobiotiques. Certains d'entre eux sont également inducteurs de PXR. PXR coordonne l'activation ou l'inhibition des gènes impliqués dans le métabolisme et l'élimination de xénobiotiques tels que Cyp3A, Cyp2B6, Cyp2C8, Cyp2c9, MDR-1, BSEP et MRP2. Lorsque dans une souris transgénique le facteur de transcription de HNF-4alpha est absent, cela supprime toute expression PXR dépendante au niveau du foie ^[105]. HNF4-a est donc un facteur de transcription qui active le récepteur PXR. PXR est principalement exprimé dans le foie, le petit intestin et le colon comme les Cyp3A. Il lie avec une faible affinité une grande variété de substrats des Cyp3A tels que la rifampicin, le phénobarbitol, le nifedipine, le clotrimazol, les stéroïdes, les estrogènes etc.

Les récepteurs CAR, quant à eux sont des récepteurs orphelins et ont été initialement identifiés comme étant impliqués dans l'expression de l'alcool déshydrogénase, et du récepteur d'acide rétinoïc B2^[106]. On retrouve les CAR principalement au niveau du foie et de l'intestin ^[107]. CAR induit l'expression du phénobarbitol dépendante de l'UDP-glucuronosyltransférase et l'expression de Cyp2B6, Cyp2C9 et Cyp3A par le site d'activation DR₄ (RGGTCAggaaAGTNCA). La dimérisation de CAR avec RXR permet la liaison au site d'activation ER6 du promoteur de Cyp3A. *In vitro*, des expériences ont démontré qu'il y avait une augmentation de treize fois le niveau d'expression basale de Cyp3A4 lorsqu'il était induit par CAR-RXR^[108,107,109,110]. Le récepteur CAR a la particularité de pouvoir transactiver le gène Cyp3A4 sur deux sites d'activation du promoteur, l'un situé dans la région proximale et l'autre dans la région distale. On suppose même qu'il y a une synergie entre les deux sites d'activation ^[111]. La translocation de CAR au noyau se fait grâce à la région C-terminale du récepteur qui est riche en leucine. CAR peut donc réguler aussi l'expression des Cyp3A par sa localisation intracellulaire. En

l'absence de ligand, il est séquestré dans le cytoplasme ce qui inhibe la transcription des Cyp3A. La présence d'inducteurs de CAR tels les phénobarbituriques permet la translocation du récepteur de par son domaine leucine-riche ^[112]. La convergence de CAR/PXR sur les mêmes sites d'activation est signe qu'il doit y avoir communication entre les deux voies d'induction. La nature exacte de cette communication reste par contre encore à déterminer. Finalement, le site de régulation XREM (xenobiotic response element) retrouvé sur Cyp3A4 et Cyp3A5 se lie également au dimère PXR/CAR puisqu'il contient une séquence DR4. Ce récepteur serait possiblement l'élément principal de la régulation des CAR et PXR face aux xénobiotiques et expliquerait possiblement pourquoi on ignore encore quel serait le ligand naturel de CAR^[107]. Les promoteurs des gènes Cyp3A ont chacun leur propre structure, mais ont tout de même beaucoup de motifs communs (voir Figure 2) comme les éléments PXRE, GRE, HNF4. Ceci indique qu'il y a bel et bien synergie, ou "cross-talk", dans la régulation des Cyp3A, mais la nature de celle-ci reste encore à déterminer. Beaucoup d'éléments connus (inhibiteurs ou inducteurs) peuvent influencer les récepteurs RG, PXR, RXR et CAR et l'expression des Cyp3A (Tableau V page 33).

Figure 2 : Liste des promoteurs de Cyp3A4, Cyp3A5 et Cyp3A7



tiré de [44]

Tableau V : Inducteurs, inhibiteurs et substrats connus des gènes de la famille Cyp3A

	Substrats connus		
Nom	<p>Inhibiteurs Canaux Sodium:</p> <p>amlodipine diltiazem felodipine lercanidipine nifedipine nisoldipine nitrendipine vérapamil</p> <p>Inhibiteurs Reductase HMG CoA:</p> <p>atorvastatin cerivastatin lovastatin simvastatin</p> <p>Stéroïde 6beta-OH:</p> <p>estradiol hydrocortisone progestérone testostérone</p> <p>Autres:</p> <p>alfentanyl aripiprazole buspirone cafergot caféine cilostazol</p>	<p>dapsone dextromethorphan docetaxel dompéridone eplerenone fentanyl finastéride gleevec haloperidol irinotecan LAAM lidocaïne méthadone nateglinide odanestron pimozide propranolol quinine salmétérol sildenafil tamoxifen taxol terfenadine trazodone vincristine zaleplon zolpidem cocaïne codéine- N-déméthylation</p>	<p>Macrolides:</p> <p>clarithromycin érythromycin (pas 3A5) télichromycin</p> <p>Anti-arrhythmiques:</p> <p>quinidine=>3-OH (pas 3A5)</p> <p>Benzodiazépines:</p> <p>alprazolam diazépam=>3OH midazolam triazolam</p> <p>Immunomodulateurs:</p> <p>cyclosporine tacrolimus (FK506) sirolimus</p> <p>Antirétroviraux VIH</p> <p>indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir</p> <p>Prokinétique:</p> <p>cisapride</p> <p>Antihistaminiques:</p> <p>astemizole chlorpheniramine terfenidine</p>

	Inhibiteurs	Inducteurs
Nom	delaviridine indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir amiodarone aprepitant azithromycin chloramphénicol cimetidine ciprofloxacin clarithromycin diethyl- dithiocarbamate diltiazem érythromycine fluconazole fluvoxamine gestodène Jus de pamplemousse itraconazole kétoconazole mifepristone nefazodone norfloxacin norfluoxétine mibefradil vérapamil	efavirenz nevirapine barbituriques carbamazépine glucocorticoides modafinil phénobarbital phénytoïne rifampin troglitazone pioglitazone rifabutin

Tiré de : (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>)

1.5 MDR-1

1.5.1 Le gène MDR-1 humain, historique

Le phénomène de résistance multiple aux antibiotiques ou aux médicaments anti-cancéreux a été mis en évidence vers le début des années 1970 ^[113]. L'explication de ce phénomène a été un important sujet de recherche pendant près de trente ans jusqu'à la découverte de la pompe P-gp (P-glycoprotéine) codé par le gène MDR-1. La P-gp fait partie de la famille des transporteurs ABC (transporteur liant l'Adénosine Tri-phosphate ATP), elle rejette systématiquement les xénobiotiques intracellulaires vers le milieu extracellulaire et contribue donc à la résistance, à la biodisponibilité et au métabolisme de ces substrats xénobiotiques.

En 1970, le groupe de Biedler et Rhein a décrit une lignée cellulaires provenant de hamsters chinois qui était résistante à plusieurs composés anti-cancéreux. Un autre groupe a pu démontrer le même phénomène avec des cellules de souris ^[114]. On examina donc la structure de ces cellules. En 1973, le groupe de Dano^[115] a pu expliquer que le phénomène de résistance était relié à une faible accumulation intracellulaire des médicaments. Par la suite, une phospho-glycoprotéine de 170 kiloDalton (KDa) fut reliée à ce phénomène. Suite à la caractérisation de cette glycoprotéine, on a démontré que la P-gp codait pour une pompe ATP dépendante qui rejette systématiquement les xénobiotiques vers le milieu extracellulaire.

Avec l'essor du boom de la génétique humaine, la recherche de la séquence codante pour de la P-gp fut lancée. En 1986, Shen et al. ^[116] ont observé la présence d'une

expression élevée du gène MDR(multi-drug resistance) conjointement avec le phénomène de résistance chez des cellules cancéreuses KB. Simultanément, le groupe de Roninson ^[117] a démontré chez la souris cette même corrélation, mais cette fois-ci avec deux gènes: MDR-1 et MDR-2. De plus, ils ont démontré une expression simultanée des deux gènes. Par la suite, le groupe de Fojo ^[118] localisa ce gene sur le chromosome 7, dont le locus exact (7q21.1.) fut déterminé par la suite.

Finalement, en 1986, Ueda et al. ^[119] confirment que la séquence du gène MDR-1 code bel et bien pour la P-gp chez l'humain. Ils déterminent une corrélation entre les niveaux d'expression de MDR-1 et les quantités de P-gp et démontrent que les ADNc codant pour la P-gp s'hybrident avec l'ADNc de MDR-1. Finalement, plusieurs groupes parviennent aussi à séquencer le gène MDR chez l'humain ^[120,121] et chez la souris ^[122].

1.5.2 La P-gp; structure et fonction

La P-gp fait partie de la superfamille des transporteurs ABC. Les transporteurs ABC sont composés de deux moitiés homologues séparées par une région flexible. Chaque moitié contient six domaines trans-membranaires (TM) et un domaine de liaison nucléotidique (NBD) ou domaine de liaison de l'ATP. La P-gp a exactement la même structure qu'un transporteur ABC. La région flexible pour la P-gp est composée de soixante acides aminés phosphorylables. Il a été démontré que la délétion de la région flexible de la P-gp donne une protéine non-fonctionnelle, mais qui est exprimée à la surface des cellules à des niveaux similaires à la protéine non modifiée. Cependant, si cette région est remplacée par une autre séquence flexible d'acides aminés, on retrouve alors une partie des propriétés fonctionnelles de la P-gp ^[123]. Ces données ont permis de déterminer que l'interaction entre les deux moitiés de la P-gp est essentielle pour le bon fonctionnement de son mécanisme.

Les expériences sur les propriétés biochimiques de la P-gp ont démontré que le transport du substrat et l'hydrolyse de l'ATP étaient obligatoirement liés. Les deux sites de liaison d'ATP sont nécessaires pour le transport ^[124] et le transport d'une molécule de substrat nécessite deux molécules d'ATP ^[125,126]. Le premier modèle du cycle catalytique de l'hydrolyse de l'ATP et du mécanisme de la P-gp a été proposé par Senior et al. ^[127,128,129]. Essentiellement, le modèle supposait qu'il y aurait une hydrolyse alternative de l'ATP par les sites de liaison d'ATP. L'ATP se liait à un des sites de liaison, mais ne pouvait être hydrolysée avant que le deuxième site soit occupé. Leur conclusion était basée sur le fait que des mutations ponctuelles ou modifications chimiques sur un des sites inhibaient l'activité des deux sites d'hydrolyse. Cependant, ce modèle était incomplet au niveau du lien entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport de substrat.

Le modèle courant a été établi par Sauna et al. ^[130]. Tout d'abord, il y a liaison du substrat et d'une molécule d'ATP, puisqu'aucune dépense énergétique requise pour cette étape ^[131]. De plus lors de cette étape on retrouve aucune interférence entre la liaison de l'ATP ou des substrats ^[130] à la P-gp. Ensuite, il y a hydrolyse de l'ATP, ce qui entraîne un changement de conformation de la P-gp et réduit l'affinité du substrat et de l'ADP pour la P-gp. Ceci induit un relâchement spontané de l'ADP et du substrat extracellulaire. Le relâchement de l'ADP entraîne un autre changement conformationnel qui rétablit l'affinité du deuxième site de liaison de l'ATP. Cependant l'affinité pour le substrat demeure encore diminuée. Finalement, il y a liaison d'un ATP et hydrolyse de ce dernier. Ceci permet le retour de la protéine P-gp à son état initial et le rétablissement de l'affinité optimale de la P-gp pour ses substrats.

L'interaction directe entre la P-gp et ses substrats est encore un peu nébuleuse à ce jour. Le seul point en commun des substrats est qu'ils sont hydrophobes et possèdent une masse moléculaire variant entre 300 et 2000 Da^[132]. Les composés anioniques ne sont pas transportés par les P-gp. L'éventail des substrats de la P-gp est grand et comprend: des agents anti-cancéreux, les médicaments immunosuppresseurs, les anti-rétroviraux, les stéroïdes, les anti-histaminiques etc...^[133,134,135] (Tableau VI page 39). Deux hypothèses ont été avancées au sujet des sites de liaison de la P-gp : premièrement les substrats sont liés dans la bicouche lipidique puisque ceux-ci diffusent dans la cellule, ou deuxièmement qu'ils se fixent intracellulairement. L'utilisation d'analogues photosensibles a permis de déterminer avec plus de précision les régions de liaison des substrats. Ainsi, la P-gp n'a pas de site de liaison des substrats mais plutôt un grand nombre de TM qui jouent un rôle dans la liaison des substrats. De plus, les régions cruciales de liaison des TM varient en fonction des substrats. Ainsi, les différents substrats se lient à différents sites dans les TM et ces sites se chevauchent. À l'aide d'expériences de mutagenèse dirigée, on a pu déterminer plus spécifiquement les sites de liaison^[136]. Les mutations qui modifiaient la spécificité de la liaison des substrats étaient principalement regroupées dans les domaines TM 5, 6, 11 et 12, bien que quelques mutations ponctuelles présentent à l'extérieur de ces TM pouvaient avoir le même impact. De plus, les protéines mutantes qui ne possédaient pas de site de liaison nucléotidique pouvaient tout de même lier les substrats^[137,130,136]. Ceci nous confirme donc que la liaison des substrats se fait au niveau des domaines TM et que l'hydrolyse de l'ATP et/ou sa liaison n'est pas nécessaire pour la liaison du substrat. Il est à noter aussi que la P-gp peut lier d'autres molécules que ses substrats tels que des inhibiteurs et des inducteurs. Le spectre de molécules pouvant moduler l'activité de la P-gp est donc assez large (Tableau VI et XIII page 39 et 47).

Tableau VI : Liste des substrats de la P-gp

Agents	Anti-	Bloqueurs des canaux calciques et métabolites	Antibiotiques
Cancereux			erythromycine
actinomycin D		Diltiazem	levofloxacin
Étoposide		Nicardipine	sparfloxacin
Docetaxel		Verapamil	Antagonistes B-adrénorécepteurs
Doxorubicin		N-Dealkylverapamil	bunitrolol
Daunorubicin		N-Dealkylnorverapamil	celoprolol
Irinotecan		Médicaments Cardiaques	tanilol
Mytomycin C		B-acetyldigoxin	Anti-histaminiques
Mitoxantrone		a-methyldigoxin	fexofenadine
Paclitaxel		digitoxin	terfenadine
Teniposide		quinidine	cimetidine
Topotecan		Inhibiteurs de la protéase (VIH)	ranitidine
vinblastine		amprenavir	Autres
Vincristine		indinavir	debrisoquine
Vindesine		nelfinavir	losartan
Stéroïdes		Saquinavir	morphine
Aldostédrol		ritonavir	phentoine
Dexaméthasone		Immunosupresseurs	rifampin
Estradiol		Cyclosporine	rhodamine123
Hydrocortisone		Tacrolimus	trixton x-100
Hypolipédiant		Rapamycin	Haloantrine
Artorvastin			Amitriptylline
Lovastin			Domperidon
			Odansetron

tiré de ^[138]

1.5.3 Structure du gène MDR-1

Le gène MDR-1, comme mentionné précédemment, code pour la protéine P-gp. Chez l'humain, il y a deux gènes MDR : MDR-1 et MDR-2, tandis que chez le rat on retrouve trois copies du gène, soit : MDR-1, MDR-2 et MDR-3. Le gène est constitué d'une séquence d'une longueur de 209 634 paires de bases et comporte 29 exons (numérotés de -1 à 28) dont la taille varie de 49 à 587pb^[139]. Les jonctions exons-introns suivent les règles d'épissage conventionnelles. Les exons -1 et 1 représentent deux promoteurs distincts (P2 et

P1 respectivement) qui peuvent donner lieu à 2 ARNm différents ^[118]. La protéine est codée par les exons 2 à 28. Il y a 14 exons qui codent pour la moitié homologue gauche de la protéine alors que 13 codent pour la moitié homologue droite. Chaque TM est encodé par un exon différent. Dans la moitié gauche, les TM sont codées par les exons 4 à 10 tandis que ce sont les exons 17 à 24 qui codent pour ceux de la moitié droite de la P-gp. Les sites de liaison d'ATP sont codés par les exons 11 à 14 et la partie N-terminale de la protéine est codée par les exons 2 et 3. Finalement, la région flexible est codée par les exons 15 et 16. Il est également à noter qu'une des particularités du gène MDR-1 est la taille de ses introns. En effet, ceux-ci peuvent avoir une longueur qui peut dépasser 20 000 paires de base. Étant donné la longueur que peuvent atteindre les introns, seules leurs extrémités ont été analysées lors du séquençage des exons pour déterminer les polymorphismes présents au niveau du gène^[139,118]

1.5.4 Polymorphismes et fréquences de MDR-1

Le groupe de Hoffmeyer et al. ^[140] a complété la première étude des polymorphismes de MDR. Le groupe a identifié 15 polymorphismes dont 12 ne modifiaient pas la séquence protéique. Le groupe a aussi identifié trois substitutions nucléotidiques qui entraînaient un changement d'acide aminé (A61G, T307C et G1199A). Parmi les 12 mutations ne modifiant pas la protéine, la mutation C3435T de l'exon 26 est associée avec une diminution de l'expression de la P-gp. En effet, chez les sujets homozygotes pour cette mutation, on observe une expression réduite de la P-gp dans les cellules mononucléaires du sang périphérique ^[113] et dans l'intestin ^[140]. De plus, de nombreuses études pharmacogénétiques ont démontré un lien entre les concentrations systémiques des médicaments (ex. digoxine) et la présence homozygote de cette mutation ^[140,113,141].

On retrouve dans la région promotrice deux polymorphismes (C-145G et T12C) ainsi que trois autres polymorphismes qui sont impliqués dans l'initiation de la transcription : exon 1 T-129C (aussi appelé T-8C à partir de l'exon 2) ^[142], exon 2 C-4T ^[141] et G-1A ^[140]. Une faible expression de la P-gp a été associée de façon significative dans des placentas japonais avec le polymorphisme T-129C chez des individus homozygotes pour la mutation ^[143].

Un total de vingt-huit mutations ont été identifiées à ce jour pour MDR-1. ^[143] La mutation G2677T/A dans l'exon 21 qui code pour une substitution Ala-Ser ou Ala-Thr est associé avec une baisse d'expression ^[143]. Quatre autres polymorphismes codant pour une substitution d'acides aminés ont été identifiés, soit: A548G^[141], C1474T^[141], T3421A^[141] et A2956G^[143]. Aucune conséquence clinique ou rôle n'a pu être établie avec ces polymorphismes et l'expression de la Pgp. Pour ce qui est de MDR-1, il n'y a pas de nomenclature allélique d'usage. Le groupe de Kim et al. ^[141] a proposé une première nomenclature qui n'est cependant pas utilisée.

Certaines associations de polymorphismes ont été rapportées chez différentes populations. Par exemple, dans une population américaine et une européenne, on a retrouvé une coségrégation des polymorphismes C3435T et G2677T dans 62% des cas ^[141]. Cette coségrégation a aussi été retrouvée dans 93.8% et 73.3% des cas dans une cohorte japonaise ^[143] et italienne ^[144]. Ces informations pourraient élucider les mécanismes nécessaires afin d'identifier la relation entre les associations de polymorphismes et l'expression de la P-gp.

En ce qui concerne les polymorphismes de MDR-1, la majorité ont été étudiés uniquement chez deux ethnies : les Caucasiens et les Asiatiques où des fréquences

similaires ont été observés ^[141,143]. On notera cependant que pour les polymorphismes C3435T, G2677T et A61G étudiés dans des populations africaines, une fréquence plus faible (10-26 %, 10%, et 0%) a été observée^[141] au niveau de cette population comparée aux deux autres.. Cette variation de fréquence doit probablement répondre des facteurs environnementaux que subissent chaque ethnie et qui jouent un rôle important sur l'expression de MDR-1. Les fréquences des différents polymorphismes sont présentes dans le Tableau VII (page 43). Notre laboratoire a récemment étudié les fréquences des polymorphismes de MDR-1 dans une population africaine indigène (shona du Zimbabwe). Cette étude fut la première à identifier les fréquences des polymorphismes de MDR-1 dans une population homogène africaine ^[145]. Les résultats obtenus sont également inclus dans le Tableau VII (page 43). Ainsi , il a été observé de façon significative que les Africains sont beaucoup moins porteurs des polymorphismes C3435T (53% vs 9%) et G2677T (42.1% vs 0%) que ne le sont les Caucasiens. Comme ces polymorphismes sont associés avec une baisse de l'expression de MDR, on peut probablement conclure que les Africains auront besoin de plus fortes doses pour les substrats de la P-gp en comparaison à celles administrées chez les Caucasiens pour que le substrat ait le même impact.

Tableau VII : Liste des mutations répertoriées au sein du gène humain MDR-1 et leur effet sur la protéine ou sa transcription.

Exon	Mutation	Effet	Références	Fréquence allélique %	Populations (nombre d'individus)	
5'	A-41aG	Non-codant	Tanabe et al. 2001	9,4%	Japonais (96)	
1	T12C	Promoteur	Hoffmeyer et al. 2000	5,88%	Caucasien (170)	
				2,5%	Placenta jap. (200)	
	C-145G	Promoteur	Tanabe et al. 2001	1%	Japonais (96)	
				6%	Placenta jap. (200)	
				8,3%	Japonais (96)	
T-129C (T8C)	Initiation transcription	Tanabe et al. 2001	15%	Africains (100)		
			2,15%	Caucasien (186)		
2	C-4T	Initiation transcription	Kim et al. 2001	0%	Caucasien (74)	
				4,3%	Africain Amér. (46)	
	G-1A	Initiation transcription	Hoffmeyer et al. 2000	5,59%	Caucasien (376)	
				Kim et al. 2001	4,1%	Caucasien (74)
				0%	Africain Amér. (46)	
	A61G	Asn-Asp	Hoffmeyer et al. 2000	9,31%	Caucasien (376)	
				Kim et al. 2001	9,5%	Caucasien (74)
				0%	Africain Amér. (46)	
				Ifergan et al 2002	0%	Africains (100)
5	G-25T	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	16,47%	Caucasien (170)	
				0,59%	Caucasien (170)	
	G-35C	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	7%	Africains (100)	
				0,59%	Caucasien (170)	
T307C	Phe-Leu	Hoffmeyer et al. 2000	0,59%	Caucasien (170)		
6	C+139T *	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	40,59%	Caucasien (170)	
	C+145T	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	1,18%	Caucasien (170)	
7	A548G	Asn-Ser	Kim et al., 2001	1,4%	Caucasien (74)	
				0%	Africain Amér. (46)	
11	G1199A	Ser-Asn	Hoffmeyer et al. 2000	6,47%	Caucasien (170)	
				Kim et al. 2001	5,4%	Caucasien (74)
				0%	Africain Amér. (46)	
				Ifergan et al. 2002	2%	Africains (100)
12	C1236T *	Wobble	Hoffmeyer et al. 2000	37,77%	Caucasien (376)	
				Kim et al. 2001	41,9%	Caucasien (74)
				6,5%	Africain Amér. (46)	
				Tanabe et al. 2001	34,5%	Placenta jap. (200)
	35,4%	Japonais (96)				
C+44T	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	5,85%	Caucasien (376)		
13	C1474T	Arg-Cys	Kim et al. 2001	1,4%	Caucasien (74)	
				0%	Africain Amér. (46)	

Exon	Mutation	Effet	Références	Fréquence allélique %	Populations (nombre d'individus)	
17	T-76A	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	45,29%	Caucasien (170)	
	A+137G	Intron	Hoffmeyer et al. 2000	0,59%	Caucasien (170)	
21	C2650T	Wobble	Kim et al. 2001	2,7%	Caucasien (74)	
				0%	Africain Amér. (46)	
	G2677T	Ala-Ser	Kim et al. 2001	45,9%	Caucasien (74)	
				10,9%	Africain Amér. (46)	
				Tanabe et al. 2001	39% de T	Placenta jap. (200)
					41,7% de T	Japonais (96)
	G2677A	Ala-Thr	Tanabe et al. 2001	18% de A	Placenta jap. (200)	
				21,8% de A	Japonais (96)	
					7%	Africains (100)
				Ifergan et al. 2002	0,5%	Placenta jap. (200)
24	A2956G	Met-Val	Tanabe et al. 2001	0%	Japonais (96)	
				0,27%	Caucasien (376)	
26	C3396T	Wobble	Hoffmeyer et al. 2000	0%	Caucasien (74)	
	T3421A	Ser-Thr	Kim et al. 2001	4,3%	Africain Amér. (46)	
				48,14%	Caucasien (376)	
	C3435T	Wobble	Hoffmeyer et al. 2000	55,4%	Caucasien (74)	
				Kim et al. 2001	26,1%	Africain Amér. (46)
					10%	Ghanéins (344)
				Schaeffeler et al. 2001	50%	Caucasien (1074)
					22%	Africain Amér. (82)
					43%	Japonais (100)
					42%	Placenta jap. (200)
Tanabe et al. 2001				49%	Japonais (96)	
	0,5%	Placenta jap. (200)				
Ifergan et al. 2002	9%	Africains (100)				
28	G4030C	Non-codant	Tanabe et al. 2001	0%	Japonais (96)	
				30,5%	Placenta jap. (200)	
	A4036G	Non-codant	Tanabe et al. 2001	25%	Japonais (96)	

Les positions des polymorphismes correspondent à la séquence de ADNc de MDR-1 (GeneBank AC M14758). / Les polymorphismes avec un plus(+) ou un moins (-) correspondent à la position du polymorphisme dans l'intron à partir de la fin (+) ou le début (-) de l'exon. / *Ces deux mutations sont liées ensemble.

Modifié à partir de ^[145]

1.5.5 Expression du gène MDR-1

Le principal site d'expression de MDR-1 est le système gastro-intestinal. La P-gp est exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon. La P-gp est aussi sécrétée au niveau de la lumière de l'intestin. L'expression intestinale de la P-gp serait liée à l'expression de Cyp3A4. ^[146]

La P-gp est également exprimée dans le foie au niveau de la membrane des tubes caniculaires. Cela permet l'extrusion des xénobiotiques du milieu intracellulaire hépatique vers la lumière caniculaire ^[147]. La protéine participe à l'élimination de plusieurs drogues et de leurs métabolites par la voie hépatobiliaire, mais cette élimination peut être modifiée par la présence d'inducteurs ou d'inhibiteurs de la P-gp.

De plus, la P-gp est également exprimée sur la membrane apicale du tubule proximal du rein et parfois au niveau de la boucle de Henle du néphron. Les substrats non filtrés doivent traverser la membrane basolatérale soit par diffusion soit par transport actif pour ensuite interagir avec la P-gp. La P-gp peut donc augmenter le transport des drogues du sang vers l'urine, mais aussi limiter la réabsorption des substrats filtrés par les glomérules. Des études ont voulu examiner le rôle de la P-gp dans le rein. Pour ce faire, ils ont utilisé la digoxine comme substrat et ont pu démontrer que la co-administration de quinidine, un inhibiteur de la P-gp, augmentait la concentration sérique de digoxine de 2 à 3 fois ^[148,149].

Au niveau du système nerveux central (SNC), plus spécifiquement au niveau de la barrière hémato-encéphalique, les cellules endothéliales recouvrant les capillaires cérébraux

représentent une barrière physiologique limitant l'accès de plusieurs xénobiotiques au SNC. Des études immunohistochimiques ont démontré la présence de P-gp sur les cellules épithéliales de ces microvaisseaux (BMEC)^[150] et surtout au niveau de la membrane luminale des BMEC ce qui permettrait de réduire l'accès de xénobiotiques aux SNC.

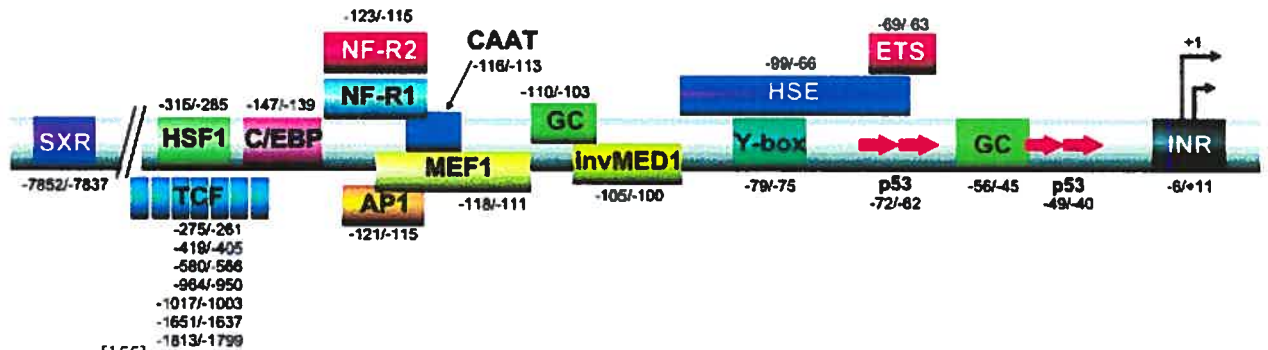
En outre, on a aussi démontré la présence de P-gp à travers les leucocytes sanguins des cellules souches pluripotentes. L'expression de la P-gp dans les leucocytes est hétérogène avec une variabilité substantielle entre les sous-types cellulaires. On a retrouvé une expression plus forte de la P-gp au niveau des cellules tueuses naturelles (NK), des cellules T CD4+, des cellules T CD8+ et des cellules souches de la moelle osseuse^[151]. La fonction exacte de la P-gp dans les cellules du sang n'est toujours pas connue, bien que l'on suppose que la P-gp joue un rôle de transporteur dans les réactions cytotoxiques et dans la sécrétion des cytokines et de protection contre les xénobiotiques.

Finalement, la présence de la P-gp a été démontrée au niveau du placenta et de l'endomètre de femmes enceintes. On suppose que le rôle de la P-gp dans ces sites serait relié à la sécrétion physiologique des stéroïdes et à la protection du fœtus contre des xénobiotiques et des tératogènes^[152,153,154].

Tableau VIII : Liste des inhibiteurs et inducteurs de la P-gp

Inhibiteurs	Inducteurs
Amiodarone	Amiodarone
Astemizole	Bromocriptine
Atorvastatin	Chlorambucine
Bepridil	Cisplatine
Chlorpromazine	Clotrimazole
Clarithromycine	Colchicine
Cortisol	Cyclosporine
Cyclosporine	Daunorubicine
Diltiazem	Dexamethasone
Dipyridamole	Diltiazem
Disulfiram	Doxorubicine
Erythromycine	Erythromycine
Felodipine	Etoposide
Itraconazole	Fluorouracil
Ketoconazole	Hydroxyurée
Midazolam	Insuline
Nicardipine	Méthotrexate
Nitrendipine	Midazolam
Progesterone	Mitoxantrone
Quinidine	Morphine
Quinine	Nicardipine
Reserpine	Nifédipine
Ritonavir	Phénobarbital
Sirolimus (rapamycin)	Phnothiazine
Tamoxifen	Phénytoïne
Terfenadine	Probenecid
Tetrabenazine	Reserpine
Valinomycine	Rifampin
Vérapamil	Sirolimus (rapamycin)
Vinblastine	St. John's wort
Biricodar (VX-710)	Tacrolimus
LY335979	Tamoxifen
GF120918	Verapamil
OC144-093	Vinblastine
R101933	Vincristine
Valspodar (PSC 833)	Yohimbine
XR9051	

Figure 3 : Région non transcrite en 5' du gène MDR-1 et les promoteurs présents.



tiré de [155]

Les flèches représentent les deux sites d'initiation de transcription.

La régulation de l'activité transcriptionnelle de MDR-1 dépend de plusieurs protéines trans-activantes qui se lient en cis à des éléments. Le gène diffère de son homologue murin du fait qu'on n'y retrouve pas de boîte TATA dans le promoteur, mais plutôt un élément d'initiation (INR). L'INR serait nécessaire pour diriger la transcription basale de MDR-1^[156,157]. De plus, le promoteur de MDR-1 contient plusieurs éléments qui influencent sa transcription. Premièrement, une boîte GC riche située entre les bases -56 à -45 représentant le site de liaison de Sp1. Sp1 est facteur de transcription nucléaire de 105Kda qui est exprimé de façon ubiquitaire^[158]. Il peut jouer plusieurs rôles distincts^[159] et peut être activé par une phosphorylation kinase dépendante^[160]. On a pu aussi démontrer que WT1 (wilm's tumor suppressor) se lie aussi à la région GC riche de même que ERG1 et que ils agissent comme antagonistes à la régulation de MDR-1^[161]. Deuxièmement, on retrouve dans le promoteur une boîte CCAAT inversée, ou boîte Y, qui est présente de -79 à 75 pb. La boîte Y a été impliquée dans l'activation de MDR par des rayons UV et est le site de liaison potentiel de NF-Y, un activateur de la P-gp dans les cellules tumorales^[162,163]. Il semble, par contre, que la régulation au niveau de la boîte Y soit plus compliquée. En effet, sa proximité avec la région GC riche suggère une coopération entre les deux éléments. Ceci a été renforcé par des études qui ont pu démontrer qu'il y avait des

interactions entre Sp1 et NF-Y^[164]. Troisièmement, le promoteur contient aussi des sites de liaison pour la protéine de p53. Celle-ci jouerait un rôle inhibiteur de l'expression de MDR-1 lorsque présente sous sa forme sauvage, mais serait activatrice sous forme mutante ^[165]. Cependant, cette affirmation est controversée puisque des études ont montré des cas où p53 sauvage serait aussi un activateur ^[165]. Il semble donc que le rôle exact de p53 ne soit pas encore clair, mais que son implication et ses effets dépendraient des conditions et des interactions précédentes de p53. On pourrait imaginer que la modulation de l'expression de MDR-1 par p53 dépend de son interaction avec des facteurs tels que : Sp1, NF-Y, C/EBPbeta, AP-1, facteurs qui peuvent tous influencer indépendamment l'expression de MDR-1. Quatrièmement, on retrouve dans le promoteur un élément AP-1. Il a été proposé que les signaux médiés par AP-1 sont impliqués dans la régulation de MDR-1, mais à ce jour, aucune preuve de l'interaction directe de AP-1 ou d'un complexe AP-1 de régulation de MDR-1 n'a été trouvée. Plusieurs informations suggèrent qu'il pourrait y avoir implication de *c-fos* et *c-jun* et que ceux-ci interagiraient avec l'élément AP-1^[166]. Cinquièmement, l'élément C/EBP situé entre les positions -47 et -139 est impliqué dans l'expression basale et tissulaire spécifique de plusieurs gènes et de MDR-1. C/EBP est rapidement induit en réponse aux lipopolysaccharides, aux cytokines d'inflammation (Il-2 Il-6 et TNF) et à l'acide rétinoïque ^[167]. Sixièmement, l'élément de réponse aux protéines de stress active l'expression de MDR-1 ^[168]. Septièmement, l'élément TCF est activé par des inducteurs de tumeurs ^[169]. Finalement, l'élément le plus important pour la régulation de MDR dans le contexte pharmacocinétique est le SXR, ou récepteur des xénobiotiques et stéroïdes, situé de la base -7582 à -7837. Cette région est liée par le récepteur hétérodimère PXR/RXR, ce qui active la transcription de MDR-1 en réponse à la présence d'inducteurs tels que nifedipine, RU486, dexaméthasone et le rifampin ^[170]. Le

motif DR4 du SXR se lierait aussi à PXR et CAR ^[171], ce qui activerait également l'expression de MDR-1. En outre, CAR et PXR ont la capacité d'activer les gènes de la famille des Cyp3A et Cyp2C. Ceci démontre donc un mécanisme d'interaction entre les différents systèmes métaboliques. Dernièrement, un nouvel élément de 23 paires de bases (-123 à -100pb) a été identifié. Celui-ci pourrait lier AP-1, NFkB/p65 et *c-fos* ^[14,15,51]. Tous ces différents modes de régulation du gène MDR-1 suggèrent un patron de régulation complexe s'étendant au-dessus des simples mécanismes déjà connus. De plus, les nouveaux sites de liaison du promoteur de MDR-1 suggèrent que les facteurs de transcription doivent interagir entre eux et que cela régule MDR-1 par des interactions compétitives ou coopératives. Ainsi, notre compréhension des mécanismes de régulation est plus qu'incomplète.

1.6 Études précédentes sur la pharmacogénétique du tacrolimus

Les premières études sur la pharmacogénétique du tacrolimus remontent en 2002, lorsque Macphe et collaborateurs ont établi une corrélation significative entre le polymorphisme A-44 G du pseudogène Cyp3AP1, l'activité hépatique de Cyp3A5 et les concentrations plasmatiques du tacrolimus chez des patients receveurs de greffe rénale ^[185]. Ils ont également démontré que ce polymorphisme de Cyp3AP1 était associé avec un laps de temps prolongé afin d'atteindre les doses cibles de tacrolimus chez ces mêmes patients ^[173]. Entre temps, Kuehl et collaborateurs ^[50] ont démontré que le pseudogène Cyp3AP1 est en déséquilibre de liaison avec Cyp3A5 et que c'est plutôt la présence de l'allèle Cyp3A5*1 (allèle sauvage) qui est liée avec un métabolisme plus efficace du tacrolimus alors que l'allèle mutant Cyp3A5*3 est responsable de la baisse d'activité de Cyp3A5. Les

études d'association entre l'allèle Cyp3A5*3 et le métabolisme du tacrolimus dans différentes populations de patients (greffes rénales, hépatiques ou pulmonaires) ont tous démontré, à l'exception d'une seule ^[182], une corrélation significative entre l'allèle Cyp3A5*3 et la concentration plasmatique du tacrolimus à 1 ou 3 mois post-tansplantation ^[174,175,176,177,178,64,173,172,179,180,181]. Toutefois, ces études ont testé spécifiquement l'allèle Cyp3A5* 3 et quelquefois l'allèle Cyp3A5*6, sans vérifier l'effet des autres allèles de Cyp3A5.

Il n'y a qu'une seule étude qui a pu démontrer une association significative entre les polymorphismes de Cyp3A4 et la métabolisation du tacrolimus. Hesselink et collaborateurs ^[174] ont établi une corrélation entre l'allèle Cyp3A4*1B et une faible concentration plasmatique du tacrolimus chez des patients receveurs de greffe rénale. En ce qui concerne MDR-1, les études sont plus controversées. Certaines études ont pu établir une corrélation significative entre les polymorphismes C3435T (exon 26 de MDR-1)^[185] et G2667T/A (exon 21) ^[186,187,188] et les dosages plasmatiques du tacrolimus chez les patients receveurs de greffe rénal alors que d'autres études n'ont pas retrouvé cette association ^[181,179,178,187].

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

D'une part, puisque Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 sont intimement liés à la biodisponibilité et au métabolisme du tacrolimus, nous supposons que certains polymorphismes génétiques liés à la structure, l'activité ou l'expression de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 seront prédictifs du métabolisme ainsi que la biodisponibilité du tacrolimus. Notre objectif est donc, dans un premier temps, de déterminer tous les polymorphismes des gènes Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 susceptibles de modifier l'activité, la structure et/ou l'expression de ces derniers. Non seulement notre laboratoire, mais aussi plusieurs autres études ont déjà examiné les polymorphismes de Cyp3A4 [58,66,65,189,68,64,59,62,63,190,69,61,191,57,71] et MDR-1 [145,192,124,193,139,194,141,142,121] afin de déterminer quels polymorphismes étaient susceptibles d'affecter la pharmacocinétique du tacrolimus. Pour Cyp3A5, nous allons explorer le gène dans une population indigène africaine et dans une cohorte caucasienne pour identifier tous les polymorphismes du gène susceptibles d'affecter la structure, l'activité ou l'expression de ce dernier.

D'autre part, le tacrolimus est un puissant immunosuppresseur administré aux receveurs de greffe. Le tacrolimus étant un médicament avec un index thérapeutique très strict, sa grande hétérogénéité du métabolisme et de la biodisponibilité est retrouvée chez les receveurs de greffe. Les délais engendrés pour atteindre le dosage cible augmentent les risques de rejet^[42]. Un dosage adéquat de tacrolimus est donc primordial afin d'éviter le rejet du greffon. Plusieurs études se sont penchées sur l'effet individuel de certains polymorphismes de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 (voir section I.6.) mais peu ont étudié

l'effet combiné des polymorphismes de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1. Notre second objectif est donc de compléter une étude qui déterminera l'association entre l'ensemble des polymorphismes de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 et le dosage sanguin du tacrolimus afin d'identifier des facteurs prédictifs de la pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients receveurs de greffe.

3. ARTICLES

3.1 Contribution des co-auteurs

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études ayant mené aux articles qui suivent. Jean-Nicholas Roy a participé à l'élaboration du devis de l'étude et a effectué l'analyse génétique des spécimens. Julie Lajoie a effectué une partie de l'analyse génétique du projet Zvitambo. Lynn Zijenah a fait l'extraction de l'ADN sur les spécimens de la population africaine et est un des co-investigateurs du projet Zvitambo. Brian Ward est un co-investigateur du projet et a participé au recrutement des patients du projet Zvitambo. D^r Bernard Vinet est un co-investigateur qui a procédé à l'analyse pharmacologique du tacrolimus sur les spécimens cliniques. D^r Azemi Barama et D^r Charles Poirier sont des co-investigateurs qui ont recruté les patients receveurs de greffe. Le D^r Michel Roger est le chercheur principal du projet. Les articles ont été rédigés par Jean-Nicholas Roy et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

3.2 Accord des co-auteurs



ASPET

AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

Council

James E. Barrett
President
Adolor Corporation

Elaine Sanders-Bush
President-Elect
Vanderbilt University

Stephen G. Holtzman
Past President
Emory University

Patricia K. Sonsalla
Secretary/Treasurer
University of Medicine & Dentistry
of New Jersey

Lynn Wecker
Secretary/Treasurer-Elect
University of South Florida

James R. Halpert
Past Secretary/Treasurer
University of Texas Medical Branch

Bryan F. Cox
Councilor
Abbott Laboratories

Ronald N. Hines
Councilor
Medical College of Wisconsin

Donald E. McMillan
Councilor
University of Arkansas for Medical
Sciences

Brian M. Cox
Board of Publications Trustees
Uniformed Services University
of the Health Sciences

Jack Bergman
Programs Committee
Harvard Medical School - McLean
Hospital

Christine K. Carrico
Executive Officer

September 23, 2005

Jean-Nichols Roy
Immunogenetics
University of Montreal
1560 Sherbrooke East
Montreal, PQ H2L 4M1
Canada

Fax: 514-412-7512

Dear Mr. Roy:

This is to grant you permission to reproduce the following articles in your master's thesis entitled "Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale (Pharmacogenetics of immunomodulators in renal graft recipients)":

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn S. Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J. Ward, and Michel Roger, "CYP3A5 Genetic Polymorphisms in Different Ethnic Populations," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 33, pp. 884-887, 2005

On the first page of each copy of the article, please add the following:

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

In addition, the original copyright line published with the paper must be shown on the copies included with your thesis.

9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3995

Richard Dodenhoff
Journals Director

Phone: (301) 634-7060
Fax: (301) 634-7061

info@aspet.org
www.aspet.org

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J Ward et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A5 polymorphisms in different ethnic populations

Revue qui publie l'article et date de publication

Drug Metabolism and Disposition Vol 33, No 7, 884-887, 2005
accepted April 12th 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

JULIE LAJOIE
Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

21 septembre 2005
Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J Ward et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A5 polymorphisms in different ethnic populations

Revue qui publie l'article et date de publication

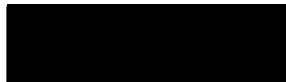
Drug Metabolism and Disposition Vol 33, No 7, 884-887, 2005
accepted April 12th 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

Lynn S.Zijenah (PhD)

Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

22 Sept. 05

Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J Ward et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A5 polymorphisms in different ethnic populations

Revue qui publie l'article et date de publication

Drug Metabolism and Disposition Vol 33, No 7, 884-887, 2005
accepted April 12th 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

CHARLES POIRIER

Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

05/9/21

Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J Ward et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A5 polymorphisms in different ethnic populations

Revue qui publie l'article et date de publication

Drug Metabolism and Disposition Vol 33, No 7, 884-887, 2005
accepted April 12th 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

<p>B. WARD</p> <p>Nom (caractère d'imprimerie)</p>	 <p>Signature</p>	<p>APR 22, 2005</p> <p>Date</p>
--	---	---------------------------------

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Jean-Nicholas Roy, Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Azemi Barama, Charles Poirier, Brian J Ward et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A5 polymorphisms in different ethnic populations

Revue qui publie l'article et date de publication

Drug Metabolism and Disposition Vol 33, No 7, 884-887, 2005
accepted April 12th 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

Michel Roger

Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

2 Février 2006

Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Roy Jean-Nicholas, Azemi Barama, Charles Poirier, Bernard Vinet et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on Tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients


Revue qui publie l'article et date de publication

Article Soumis à Pharmacogenetics

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

BARAMA
Nom (caractère d'imprimerie)


Signature

3/10/05
Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Roy Jean-Nicholas, Azemi Barama, Charles Poirier, Bernard Vinet et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on Tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients

Revue qui publie l'article et date de publication

Article Soumis à Pharmacogenetics

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

CHARLES POIRIER
Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

05/09/21
Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Roy Jean-Nicholas, Azemi Barama, Charles Poirier, Bernard Vinet et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on Tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients

Revue qui publie l'article et date de publication

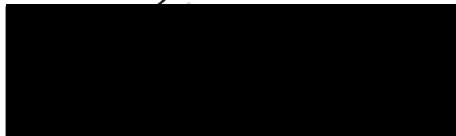
Article Soumis à Pharmacogenetics

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

B. VINET

Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

23 sept. 05

Date

Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du Programme

Roy Jean-Nicholas
2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'Article

Auteurs de l'article

Roy Jean-Nicholas, Azemi Barama, Charles Poirier, Bernard Vinet et Michel Roger

Titre de l'Article

CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on Tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients

Revue qui publie l'article et date de publication

Article Soumis

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Nicholas Roy inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Pharmacogénétique des immunomodulateurs chez les receveurs de greffe rénale

Michel Roger
Nom (caractère d'imprimerie)


Signature

1 février 2016
Date

3.3 CYP3A5 genetic polymorphism in different ethnic populations

Jean-Nicholas Roy^{a,b}, Julie Lajoie^{a,b}, Azemi Barama^c, Charles Poirier^d, Michel Roger^{a,b}

^aLaboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Montréal, Canada)

^bDépartement de microbiologie-immunologie, Université de Montréal

^cDépartement de chirurgie, Université de Montréal

^dDépartement de médecine, Université de Montréal

Sponsorship: This work was supported by a grant from the Réseau Sida et maladies infectieuses du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M. Roger is supported by career award from FRSQ.

Word count: Abstract: 140 , Text (excluding abstract): 1516

Address correspondence to: Michel Roger M.D, Ph.D

Département de microbiologie, Hôpital Notre-Dame du CHUM,
1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

Phone: (514) 890-8000 (2-5802), Fax: (514) 412-7512

E-mail address: [REDACTED]

Abstract

Cyp3A5 activity varies between any given ethnic population suggesting that genetic variation within Cyp3A5 gene may be the most important contributor to interindividual and interracial differences in Cyp3A-dependent drug clearance and response. We analyzed the full extent of Cyp3A5 polymorphism in a Caucasian and an indigenous African populations. Using DNA direct sequencing procedure, we detected the presence of 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Caucasian samples and 12 SNPs in the African samples. We identified 13 novel mutations occurring at low frequencies in these populations. Significant differences were observed in the distribution of Cyp3A5*3, Cyp3A5*6, and Cyp3A5*7 alleles among Caucasian and African populations. These differences may reflect evolutionary pressures generated by environmental factors in these geographically distinct regions. However, the genetic polymorphism of Cyp3A5 does not explain the interindividual differences in the metabolic activities and gene expression of Cyp3A5.

Introduction

Cytochromes P450-3A's are estimated to participate in the metabolism of 40-60% of all clinically administered drugs. Specifically, they catalyze the oxidative, peroxidative, and reductive metabolism of many endogenous substrates and xenobiotics [1]. The Cyp3A family is composed of four genes: Cyp3A4 the major isoform, Cyp3A43, Cyp3A5 and Cyp3A7. Cyp3A43 is expressed at very low levels in adult livers, accounting for only 0.1-0.2% of Cyp3A4 transcripts [2]. Cyp3A7 is primarily expressed in the fetal liver but is also present in some adult livers [3]. Therefore, the contribution of Cyp3A43 and Cyp3A7 to the metabolism of Cyp3A substrates in adults is regarded to be negligible. Cyp3A4 and

Cyp3A5 are primarily expressed in human liver and the mucosa of the intestine and account for the majority of the catalytic activity of this subfamily in adults [4,5]. Substantial interindividual differences in Cyp3A expression contribute to variation in oral bioavailability and systemic clearance of Cyp3A substrates. The Cyp3A5 contribution has been reported to vary from 6-99% of the total Cyp3A in different populations [4,5]. Cyp3A5 is reported in detectable amounts in only 10-30% of adult Caucasians and Asians [6], while 60% of African Americans express the protein [4]. These variations are due on one hand to inhibition and induction of Cyp3A expression through a wide array of environmental factors and drug-drug interactions; on the other hand, to genetic variations.

Therefore, Cyp3A5 may be the most important genetic contributor to interindividual and interracial differences in Cyp3A-dependent drug clearance and response. To date most studies on Cyp3A5 polymorphism have been conducted in populations from industrialized countries. Hence, the distribution of Cyp3A5 genetic variants in people living in developing countries may differ from those living in industrialized countries due to the selection pressure exerted on specific alleles by different environmental factors present in these geographic areas. Therefore, our objective was to analyze the full extent of Cyp3A5 polymorphism in a Caucasian and an indigenous African populations. To our knowledge, this is the first study to systematically examine the nucleotide sequence diversity of Cyp3A5 gene in a large sample of indigenous Africans.

Material and Methods

Our sample consisted of stored DNA extracts from 100 unrelated Zimbabweans of the Shona ethnic group and 77 unrelated Caucasians from Quebec (Canada). DNA was

extracted from whole peripheral blood by standard phenol-chloroform extraction procedure. The nucleotide sequence variants in the promoter region and the 13 exons of Cyp3A5 gene were determined by direct sequencing method using 50 randomly selected samples of each population. The primers for PCR amplification of the promoter region and exon specific fragments were designed from the wild-type Cyp3A5 sequence (GenBank accession number AC005020). The primers were design to cover the entire promoter region and exons, as well as sequences at the exon-intron boundaries that important for messenger RNA (mRNA) splicing. Details regarding primer sequences and annealing temperatures for amplifying Cyp3A5 DNA fragments for sequencing are illustrated in Table 1. Amplification reactions contained 200ng of DNA, 0.25mM of each dNTP (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), 1 X PCR buffer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 1.5mM MgCl₂ (Perkin-Elmer), 2.5 units of TAQ polymerase (Perkin-Elmer), and 15pmole of primers in a total volume of 30µl. PCR cycling conditions included 5 minutes initial denaturation step at 95°C followed by 40 cycles of: 50 seconds at 95°C, 50 seconds at an appropriate annealing temperature, 50 seconds at 72 °C and a final extension step at 72°C for 5 minutes. The nucleotide sequences of the PCR products were determined by direct sequencing using BigDye terminator cycle sequencing reactions (Perkin Elmer). The reaction products were run in an automated DNA sequencing ABI PRISM 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCR products were sequenced in both directions.

Specific polymorphisms that have the potential to modify enzymatic activity and protein structure were typed by amplified-restriction fragment length polymorphism (A-RFLP) in

all the study samples. Cyp3A5*1B and Cyp3A5*1C alleles were determined by direct DNA sequencing. The primer sequences, annealing temperatures and restriction-
endonuclease enzymes for the A-RFLP analyses are indicated in Table 2. Genomic DNA was amplified with the specific primers (Table 2) using the PCR conditions as described above. Amplified DNA products were then digested with the specific restriction enzymes according to the manufacturers' instructions (Table 2). The digestion products were subjected to 2.5% agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide. Allelic frequencies in our study populations were compared with published frequencies in other populations by Chi-squared test. Genotypic frequencies were compared with Hardy-Weinberg expectations using Chi-square analysis.

Results and Discussion

The DNA sequence analysis of the promoter and the entire coding regions of Cyp3A5 gene revealed the presence of 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Caucasian samples and 12 SNPs in the Zimbabwean samples (Table 3). In the current study, all sequences were compared with the wild type Cyp3A5 sequence (GenBank accession number AC005020), and the positions we report are in reference to this sequence. We identified five novel variants in the Caucasians samples. Two of these new mutations are located in the promoter region. The novel nucleotide substitutions at codons 309 (C→A), 323 (C→A), and 371 (A→G) are nonsynonymous mutations predicted to modify the amino acid composition of the protein. We detected eight new SNPs in the African samples. They are three novel mutations in introns 3 (C→T), 8 (C→T) and 12 (T→C) and three others, at codons 218 (A→G), 295 (C→T), and 349 (C→T), that are synonymous substitutions (silent mutations). The nucleotide variants at codons 238 (T→C) and 460

(C→T) are nonconservative mutations resulting in a Val→Ala substitution and in a stop codon leading to a non-functional truncated protein, respectively. However, all the novel mutations that have the potential to modify the function or amino acid composition of the protein occur at a very low frequency in these populations. Therefore, it seems improbable that they would play an important role as to the metabolic activities related to Cyp3A5 enzyme in these populations.

The distribution of Cyp3A5 alleles is illustrated in Table 4. The genotypic distribution of SNPs at each position is in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.5$) for both populations analysed in the present study. There is a significant difference in the Cyp3A5 allelic distribution between indigenous Africans and Caucasians particularly for Cyp3A5*3, Cyp3A5*6, and Cyp3A5*7 alleles. The frequency of Cyp3A5*3 allele in Caucasian Canadians (~93%) is higher than in Zimbabweans (77.6%) ($p < 0.001$). Inversely, Cyp3A5*6 and Cyp3A5*7 alleles are relatively frequent in Africans subjects (10-22%) but absent in Caucasians ($p < 0.001$). Cyp3A5*3 and Cyp3A5*6 alleles code for splicing defects [4,7] resulting both in modified mRNA that may generate defective Cyp3A5 enzymes. Cyp3A5*7 allele has a single base insertion at codon 346 that causes a frameshift resulting in a truncated, non-functional enzyme [7]. These findings would suggest that indigenous Africans would in proportion to Caucasians, be greater metabolizers since Cyp3A5*3 allele is less frequently observed in Africans. However the presence of Cyp3A5*6 and Cyp3A5*7 in the latter population may compensate for the relative low frequency of the Cyp3A5*3 allele in Africans and give them the same metabolic capabilities as with Caucasians. Finally SNP 31611 which is located in the 3'UTR region of the Cyp3A5 gene was detected in 60% of Africans while only in 8.6% of Caucasians ($p < 0.001$). To date there is no knowledge of the effects of SNP 31611 on Cyp3A5 enzyme.

It has been reported that there can be up to 2-3 fold enhancement of Cyp3A5 activity between any given ethnic population [3]. This in turn has led to the suggestion that the genetic variation in Cyp3A5 expression is a major determinant of Cyp3A-dependent drug metabolism in human [8]. Previously published data which has compared the metabolic capabilities of different patients to their genotype has yet to establish a solid correlation between the levels of Cyp3A5 expression and genetic markers although attempts have been made [2,4,5,9]. It has also been reported that individuals homozygous for Cyp3A5*3 can express both wild-type and variant (SV1) mRNA [2]. Interestingly, the polymorphisms that are the most frequent in all ethnic populations are the ones that code for splicing defects (Cyp3A5*3 and Cyp3A5*6) suggesting that the levels of Cyp3A5 activity and expression are not compelled by genetic factors. Ultimately it seems that the metabolic capacities of Cyp3A5 are intertwined into a complex procedure determined by both the genetic make-ups of an individual as well as external factors, such as xenobiotics, influencing gene expression [10].

In summary, we have conducted a thorough analysis of the nucleotide sequence of Cyp3A5 gene in Caucasians and in an indigenous Zimbabwean population. We have identified several novel and nonconservative mutations, albeit at low frequencies, with respect to predicted amino acid composition and function of the protein. The data from this study and others [4-8] demonstrate that the allelic distribution of Cyp3A5 gene differs widely in populations from industrialized and developing countries, presumably due to geographically-determined selection pressures. However, the genetic polymorphism of Cyp3A5 does not explain the interindividual differences in the metabolic activities and gene expression of Cyp3A5. Additional studies will have to be undertaken examining a large number of parameters including: genotype, mRNA expression, drug-drug interaction

as well as external factors in order to possibly understand the mechanisms regarding Cyp3A5's metabolic capabilities.

References

1. Vazquez, M. A. Southwestern Internal Medicine Conference. New advances in immunosuppression therapy for renal transplantation. *Am J Med Sci* 1997; **314**: 415-435.
2. Westlind, A., Malmebo, S., Johansson, I., Otter, C., Andersson, T.B. Ingelman-Sunberg, M., Oscarson, M. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the Cyp3A subfamily, Cyp3A43. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2001; **281**:1349-1355.
3. Schuetz, J.D., Beach, D.L., Guzelian, P.S. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A4 mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* 1994; **4**:11-20.
4. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., Watkins, P. B., Daly, A., Wrighton, S. A., Hall, S. D., Maurel, P., Relling, M., Brimer, C., Yasuda, K., Venkataramanan, R.,
5. Strom, S., Thummel, K., Boguski, M. S., and Schuetz, E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383-391.
6. Wrighton, S. A., Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P., Raucy, J. L., Molowa, D. T., and Vandenbranden, M. Studies on the expression and metabolic

capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990; **38**: 207-213.

7. Lee, S. J., Usmani, K. A., Chanas, B., Ghanayem, B., Xi, T., Hodgson, E., Mohrenweiser, H. W., and Goldstein, J. A. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 461-472.

8. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K., Nuessler, A. C., Neuhaus, P., Klattig, J., Eiselt, R., Koch, I., Zibat, A., Brockmoller, J., Halpert, J. R., Zanger, U. M., and Wojnowski, L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 773-779.

9. Chou, F.G., Tzeng, S.J., Huang, J.D. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Meta. Dispos.*, 2001; **29**:1205-1209

10. Jounaidi, Y., Hyrailles, V., Gervot, L., Maurel, P. Detection of a Cyp3A5 allelic variant : a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**:446-470.

Table 1: Primer sequences annealing temperatures for amplify the promoter and coding regions of Cyp3A5 for sequencing

Exon	Primer Name	Primer sequence	Annealing Temperature	Fragment size (bp)
Promoter ^a	Cyp3A5F	GAG GAT GGA TTT CAA TTA TTC TA	55 °C	387
	Cyp3A5R	GTC CAT CGC CAC TTT CCT TC		
Exon 2	5Ex2f	CTC ACC AGC CCT CTG ATC TAT AAA	64 °C	238
	5Ex2r	AAG GAG GGG CAT TTT TAC TGA TGG		
Exon 3	5Ex3f	CCC CAA TTA GAG GTA GGG TTT A	60 °C	175
	5Ex3r	GGT AAC CTC CTC ACA GTA GC		
Exon 4	5Ex4f	GGC TAG TGA AGT TTA ATC AGC T	56 °C	190
	5Ex4r	ATT TAA TCA GTG GAT CAA TC		
Exon 5	5Ex5f	TTG TGC AAC CAT GAA GAT CA	60 °C	238
	5Ex5r	CTT TCT ACC TGT CCC CAG AT		
Exon 6	5Ex6f	CCA TAT CCT TCT GGG ACT TGA GTC TG	64 °C	215
	5Ex6r	CAT GGC AGG CAG CTG GAA GGG		
Exon 7	5Ex7f	GCA TGT ATA GTG GAA GGA CG	60 °C	275
	5Ex7r	GAA TTA TAT GTC AAG AAA GCA G		
Exon 8	5Ex8f	GTA AAG TTT GCA TTT TCA AT	60 °C	256
	5Ex8r	CAT GCT CTA TCA TGT GTA TAA		
Exon 9	5Ex9f	GCC ATA GGG AGG TTG AGG GAG GGA A	64 °C	234
	5Ex9r	CCT CCC TCT TAG TGT CCC CGC CAG		
Exon 10	5Ex10f	CTA AGC TGT GAT GTT GTA CGT TG	64 °C	348
	5Ex10r	TCC TAC ATT ATG TCA GTG AAG GAA TC		
Exon 11	5Ex11f	CTT CAC GAA TAC TAT GAT CAT TTA CC	60 °C	422
	5Ex11r	GGC AGA ATA TGC TTG AAC CAG C		
Exon 12	5Ex12f	GGG TTG TTC TTA AGT AAG AAC CCC T	64 °C	374

Exon	Primer Name	Primer sequence	Annealing Temperature	Fragment size (bp)
	5Ex12r	GAT GGA TCC AAG TAG GTT CTT TGG CC		
Exon 13	5Ex13f	GAT ACA TGG TGT TAA GAG TCG T	60 °C	422
	5Ex13r	TCC TTT ATA CTA CAT AAT GCA CAA C		

^a [4]

Table 2: Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing of Cyp3A5

Allele/SNP	Primer Name	Primer sequence	Annealing temperature	Restriction enzyme	Digestion products
Cyp3A5*2	5Ex11f	CTT CAC GAA TAC TAT GAT CAT TTA CC	60 °C	Tsp5091 (NEB)	Wt: 310,90,22 Mt:187,123,90,22
	5Ex11r	GGC AGA ATA TGC TTG AAC CAG C			
Cyp3A5*3	3A5A3f	CAT GAC TTA GTA GAC AGA TGA	56 °C	Ssp I (NEB)	Wt: 148,125,20 Mt: 168,125
	3A5A3r	GGT CCA AAC AGG GAA GAA ATA			
Cyp3A5*5	3A5A5f	CCA TGA AGA TCA CCA CAA CT	56 °C	Nla III (NEB)	Wt: 218 Mt: 172,46
	3A5A5r	CCT GTC CCC AGA TTC ATT C			
Cyp3A5*6	5Ex7f	GCA TGT ATA GTG GAA GGA CG	60 °C	Dde I (NEB)	Wt: 103,60,87,25 Mt: 128,87,60
	5Ex7r	GAA TTA TAT GTC AAG AAA GCA G			
SNP 31611 (3'UTR)	C3A512f	ACC CTA AGT GGAGGA ATG AGT TAT TCT AAG T	60 °C	Sca 1 (NEB)	Wt: 209 Mt: 181,29
	5Ex13r	TCC TTT ATA CTA CAT AAT GCA CAA C			

Abbreviations, A-RFLP: amplified-restriction fragment length polymorphism; NEB: New England Biolabs; SNP: single nucleotide polymorphism; Wt: wild-type; Mt: mutant

Table 3 Cyp3A5 nucleotide sequence variations observed in Caucasian Canadians and Zimbabweans

Location	Allele	Nucleotide substitution	Genomic position	Observed in (frequency %)	Amino acid change	Ref	
Promoter	Cyp3A5*1C	C/T	15 839	Cau. (4.6)		[4,7]	
Promoter		G/A	15 588	Cau. (0.6)		New	
Promoter		G/A	15 660	Cau. (0.6)		New	
Intron 3	Cyp3A5*3	A/G	22 893	Afr. (77.6) Cau. (92.9)	Splicing defect	[4,7]	
Intron 3		C/T	23 114	Afr. (6.0)		New	
Exon 7	Codon 208	Cyp3A5*6	G/A	30 597	Afr. (22.0)	Splicing defect	[4,7]
Exon 7	Codon 218		A/G	30 627	Afr. (2.0)	None (Pro)	New
Exon 8	Codon 238		T/C	31 756	Afr. (1.0)	Val → Ala	New
Intron 8		C/T	32 867	Afr. (1.0)		New	
Exon 10	Codon 295		C/T	35 171	Afr. (1.0)	None (Leu)	New
Exon 10	Codon 309		C/A	35 210	Cau. (1.0)	Thr→ Asn	New
Exon 10	Codon 323		C/A	35 252	Cau. (1.0)	Thr→ Asn	New
Intron 10		A/G	42 957	Cau. (4.0)		[7]	
Exon 11	Codon 346	Cyp3A5*7	Ins T	43 039	Afr. (10.0)	Frameshift	[7]
Exon 11	Codon 349		C/T	43 050	Afr. (1.0)	None (Ala)	New
Exon 11	Codon 371		A/G	43 114	Cau. (1.0)	Ile→ Val	New
Exon 11	Codon 398	Cyp3A5*2	C/A	43 196	Cau. (0.7)	Thr→ Asn	[7]
Exon 12	Codon 460		C/T	45 701	Afr. (1.0)	Gln→ Stop	New
Intron 12		T/C	47 406	Afr. (3.0)		New	
3'UTR	SNP 31611	T/C	47 518	Afr. (60.0) Cau. (8.6)		[7]	

Variant nucleotides are in bold. Genomic positions are based on GenBank sequence AC005020 . Abbreviations, Afr: African (Zimbabwean); Cau: Caucasian Canadian

Table 4. Cyp3A5 allelic frequencies (%) in different ethnic populations

Allele	Caucasian Canadian (n=154)	Zimbabwean (n=200)	Caucasian European	African- American	Asian	Ref
Cyp3A5*1B	0.0	0.0	0.5-3.0	0.0	n.d	[4,7]
Cyp3A5*1C	4.6	0.0	3.0	7.0	0.0	[4,6,7]
Cyp3A5*2	0.7	0.0	2.0	0.0	n.d	[7]
Cyp3A5*3	92.9	77.6	70.0	27.0-50.0	75	[4,6,7]
Cyp3A5*5	0.0	0.0	n.d	n.d	0.9	[8]
Cyp3A5*6	0.0	22.0	0.0	13.0	0.0	[6]
Cyp3A5*7	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	[6,7]

Abbreviations, Afr. Am.: African Americans; Cau: Caucasians; n= number of alleles; n.d: not determined ;Ref: references

[4] Cau. n= 118; Afr. Am. n= 30; [6] Asians n= 48; Afri. Am. n= 15; Cau. n= 48; [7] Cau. n= 160; Afr. Am. n= 90 ; [8] Asians n=220; .

3.4 CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients

Jean Nicholas Roy^{a b}, Azemi Barama^c, Charles Poirier^d, Bernard Vinet^e and Michel Roger^{a b}

^aLaboratoire d'immunogénétique, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-
Hôpital Notre-Dame, ^bDépartement de microbiologie et immunologie, ^cDépartement de
chirurgie, ^dDépartement de médecine, and ^eDépartement de biochimie, Université de
Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Short title: Pharmacogenetics of tacrolimus

Source of funding: This work was supported in part by a grant from the Réseau Sida et
maladies infectieuses of Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). M. Roger is
supported by a career award from the FRSQ.

Conflicts of interest: none to declare

Word counts in the text: 2772

Address correspondence to:

Michel Roger M.D, Ph.D

Département de microbiologie, CHUM-Hôpital Notre-Dame

1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

Phone: (514) 890-8000 (25802), Fax: (514) 412-7512

E-mail address: [REDACTED]

Abstract

Objective: The immunosuppressive drug tacrolimus requires strict therapeutic monitoring due to its narrow therapeutic index and great inter-individual variability. Cytochrome P450 3A4 (Cyp3A4) and Cyp3A5 are the most important contributors to tacrolimus metabolism while the P-glycoprotein pump (MDR-1) modulates its bioavailability. The objective of our study is to investigate the association between *Cyp3A4*, *Cyp3A5*, and *MDR-1* polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in the early period after renal transplantation.

Methods: Forty-four renal transplant recipients were genotyped for 8 *Cyp3A4*, 7 *Cyp3A5*, and 5 *MDR-1* genetic variants affecting the proteins' expression and/or function. Dose-adjusted tacrolimus trough levels were determined during the first week after transplantation and correlated with corresponding genotype.

Results: We found no correlation between *Cyp3A4* polymorphism and tacrolimus pharmacokinetics. Patients who do not carry both *Cyp3A5**3 alleles achieved lower mean dose-adjusted tacrolimus blood concentrations ($p < 0.001$) and needed a longer time to reach the target concentration (10-12 ng/ml) ($p < 0.001$) compared to *Cyp3A5**3 homozygotes. Patients with less than 3 copies of *MDR-1* (T-129C, C3435T and G2677T) polymorphisms, associated with reduced expression of P-glycoprotein, had also lower dose-adjusted tacrolimus blood concentrations compared to patients harboring equal to or greater than 3 copies of *MDR-1* genetic variants ($p = 0.006$), although the effect was less prominent than *Cyp3A5*. There was no difference in the rate of biopsy-confirmed acute rejection among groups during the first 3 months after transplantation.

Conclusion: The complete absence of *Cyp3A5**3 allele and the accumulation of less than 3 copies of *MDR-1* (T-129C, C3435T and G2677T) polymorphisms are associated with

lower tacrolimus blood levels identifying these genotypes as markers for patients requiring higher tacrolimus doses.

Introduction

Tacrolimus is a member of the calcineurin inhibitor family which acts through the disruption of signalling in T lymphocytes [1]. It is widely used in solid organ transplantation to prevent allograft rejection. Tacrolimus is a critical dose-drug with a narrow therapeutic index. Moreover, its pharmacokinetic characteristics may vary greatly among individuals, and daily doses must be adjusted according to its whole blood trough concentrations. Achieving therapeutic trough levels is of paramount importance during the period immediately after transplantation. Therefore, the identification of parameters predictive of the optimal tacrolimus dosage would be a great clinical asset in the determination of adequate tacrolimus administration.

Tacrolimus is known to be a substrate of cytochrome P450 (Cyp) 3A4, Cyp3A5, and P-glycoprotein (P-gp), which are encoded by *Cyp3A4*, *Cyp3A5* and multidrug resistance-1 (*MDR-1*) genes, respectively. The difference in expression level and the bioactivity of these proteins may explain individual variations of tacrolimus pharmacokinetics. A number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described for *Cyp3A4* [2-7], *Cyp3A5* [7-12], and *MDR-1* [13-14]. Recent studies have assessed the effect of some of these gene polymorphisms on tacrolimus blood concentrations in renal transplant recipients. One study has identified an association between the *Cyp3A4*1B* allele and tacrolimus dose requirement, although this difference may have been due to ethnicity as a confounding factor since the difference was not apparent when only white patients were considered [15]. *Cyp3A5* harbors a SNP (A6989G) within intron 3, of which *A* and *G* nucleotides are

designated as *Cyp3A5*1* (wild type) and *Cyp3A5*3* alleles, respectively. The *Cyp3A5*1* allele expresses large amounts of Cyp3A5, while the *Cyp3A5*3* allele creates a cryptic splice site, resulting in a premature stop codon and the absence of functional Cyp3A5 [7]. Patients with the *Cyp3A5*1* allele have significantly lower tacrolimus dose-adjusted trough levels at 1 and 3 months post-transplantation compared to *Cyp3A5*3* homozygotes [15-20]. These findings suggest that *Cyp3A5*1* carriers (Cyp3A5 expressers) require a higher dose of tacrolimus than *Cyp3A5*3* homozygotes (Cyp3A5 nonexpressers) to reach target trough concentrations. The association between *MDR-1* polymorphism and tacrolimus blood concentrations has been investigated and the results are controversial. Some studies have reported a weak correlation between *MDR-1* C3435T and/or G2677T polymorphisms and high tacrolimus blood concentrations [21-23], whereas others have found no effect [12,17-19,24]. C3435T and G2677T mutations have been associated with decreased P-gp expression [13,14], indicating enhanced uptake of tacrolimus by the intestine in mutant carriers. However, the major limitation of these studies is that they restricted their analyses to very few specific gene polymorphisms in a given population. Since oral bioavailability of tacrolimus is thought to result from the actions of metabolizing CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and drug transporter MDR-1 protein, their relative contributions to tacrolimus pharmacokinetics need to be determined altogether in the same study population. Furthermore, additional polymorphisms affecting these proteins' expression and function have been identified [3-7,9,13] and justify their assessment in relation to tacrolimus bioavailability. We, therefore, investigated the effect of 8 *Cyp3A4*, 7 *Cyp3A5*, and 5 *MDR-1* protein-modifying alleles on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients.

Methods

Patients and pharmacokinetic analysis

We conducted a prospective and observational study on 44 renal transplant recipients followed at the CHUM-Hôpital Notre-Dame between October 2003 and December 2004. All our patients were treated with a combination of immunosuppressants consisting of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroids. Demographic characteristics (age, sex, race, and weight) of the patients were recorded at the time of transplantation. Patients were followed for up to 3 months post-transplantation for creatinine clearance and acute graft rejection. Acute graft rejection was confirmed by kidney biopsy according to Banff criteria [195]. Plasma creatinine concentrations were measured 3 times a week to quantify creatinine clearance ($\mu\text{l}/\text{min}$). Daily tacrolimus trough blood concentration (C_0) (ng/ml) and tacrolimus dosage (mg/kg) were noted for the first 7 days post-transplantation. Tacrolimus C_0 were measured 12 h post-dose by Emit 2000 immunoassay (DADE Behring Canada Inc.). Daily tacrolimus dosage was adjusted to obtain the target concentration of 10-12 ng/ml. The study was approved by the Research Ethics Committee of the CHUM, and written informed consent was obtained from all subjects.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood under a standard phenol-chloroform protocol. Specific *Cyp3A4*, *Cyp3A5*, and *MDR-1* polymorphisms with the potential to modify enzymatic activities and protein structures were typed in all study samples (Table 1). The *Cyp3A4*1B* promoter variant was analyzed by direct DNA sequencing while other *Cyp3A4* alleles were genotyped by amplified restriction fragment length polymorphism (A-RFLP) analysis using the specific primers and restriction enzymes listed in Table 2. Amplification reactions contained 200 ng of DNA, 0.25 mM of each

dNTP (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), 1 X PCR buffer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 1.5 mM MgCl₂ (Perkin-Elmer), 2.5 units of TAQ polymerase (Perkin-Elmer), and 15 pmole of primers, in a total volume of 30 µl. PCR cycling conditions included a 5-minute initial denaturation step at 95°C, followed by 40 cycles of: 50 seconds at 95°C, 50 seconds at an appropriate annealing temperature, 50 seconds at 72°C and a final extension step for 5 minutes at 72°C. The nucleotide sequences of the PCR products for the *Cyp3A4*1B* variant were determined by direct sequencing using BigDye terminator cycle sequencing reactions (Perkin-Elmer). The reaction products were run in an automated DNA sequencing ABI PRISM 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For the other *Cyp3A4* alleles, amplified DNA products were digested with specific restriction enzymes according to the manufacturers' instructions (Table 2). The digestion products were then subjected to 2.5% agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide. *Cyp3A5* and *MDR-1* genetic variants were genotyped according to A-PCR and DNA sequencing methods described previously [12,14,26].

Statistics

The data are expressed as mean \pm SD (standard deviation). Differences were considered significant for $p < 0.05$. The Chi-square test served to examine the difference in categorical data, and the Mann-Whitney U-test or T-test analyzed the difference in continuous values between groups. Genotypic frequencies were compared by Hardy-Weinberg expectations with the Chi-square test. The analysis was performed with SPSS statistical software.

Results

Our genotyping strategy investigated the presence of 8 *Cyp3A4* and 7 *Cyp3A5* possible protein-modifying alleles in 44 renal transplant recipients. We observed only 3 *Cyp3A4* and 4 *Cyp3A5* alleles in our study population. *Cyp3A4*1B* was found at a frequency of 5.7%, followed by *Cyp3A4*6* (2.3%) and *Cyp3A*18* (2.3%) alleles. The *Cyp3A5*1C*, *Cyp3A5*3* and *Cyp3A5*6* alleles and the 31611 SNP in *Cyp3A5* 3' UTR were detected at respective frequencies of 5.7%, 84.1%, 1.1%, and 4.5%. All 5 selected *MDR-1* polymorphisms occurred at the following frequencies: T-129C (9.1%), A61G (4.6%), G199A (4.6%), C3435T (55.7%) and G2677T (50.0%). The *Cyp3A4*, *Cyp3A5* and *MDR-1* allelic frequencies in our study population are similar to those reported in other populations [7,12,27-30] and the genotypic distribution of each genetic variant was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.5$).

Mean dose-adjusted tacrolimus trough blood concentrations (C_0 /dose weight-adjusted ratio) for the first 7 days post-transplantation were quantified for all patients. We found no correlation between clinical outcomes (creatinine clearance and acute graft rejection) during the first 3 months post-transplantation and the selected key *Cyp3A4*, *Cyp3A5* and *MDR-1* polymorphisms. None of the *Cyp3A4* alleles tested in this study population correlated with tacrolimus dose requirements and trough blood levels. However, the *Cyp3A5*3* genotype defined by the nucleotide change A→G at position 6986 (intron 3) correlated with tacrolimus pharmacokinetics. Homozygous wild-type (A/A) and heterozygous (A/G) genotypes were associated with significant decreases of mean dose-adjusted tacrolimus trough blood concentrations for the first 7 days post-transplantation ($p<0.001$), a longer time to achieve the target concentration (10-12 ng/ml) for more than 2 consecutive days following transplantation ($p<0.001$) and race ($p<0.001$) (Table 3). None of the single *MDR-1* SNPs tested correlated with tacrolimus pharmacokinetics, sex or race.

However, since T-129C, C3435T and G2677T variants can diminish MDR-1 expression ^[140,143], we determined the combined effect of these 3 polymorphisms. Renal transplant recipients with less than 3 copies of these SNPs had low mean dose-adjusted tacrolimus trough blood concentrations for the first 7 days ($p=0.006$) post-transplantation. These findings were corroborated by a second statistical analysis where significant variables (race, *Cyp3A5*3* genotype and accumulation of *MDR-1* SNPs) were dichotomized into high and low absorbers based on the median dose-adjusted tacrolimus trough blood value of 85.5 (range 9.5-363) ng/ml per mg/kg observed during the first 7 days post-transplantation (Table 4). Patients who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles achieved 12-fold lower dose-adjusted tacrolimus blood concentrations compared to *Cyp3A5*3* homozygotes. Patients with less than 3 copies of *MDR-1* SNPs, associated with reduced P-gp expression, had 4-fold lower dose-adjusted tacrolimus blood concentrations compared to patients harboring equal to or greater than 3 copies of *MDR-1* SNPs. However, no correlation was observed between the dichotomized dose-adjusted tacrolimus trough blood concentrations and race ($p<0.79$). Linear and logistic regression analyses, including race, *Cyp3A5*3* genotype and accumulation of *MDR-1* SNPs in the models, were performed, and both models only retained the *Cyp3A5*3* variable as significant.

Discussion

Our results showed that patients who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles achieved lower mean dose-adjusted tacrolimus blood concentrations during the first week post-transplantation compared to *Cyp3A5*3* homozygotes. This finding is in agreement with the fact that the *Cyp3A5*3* allele results in the loss of hepatic Cyp3A5 activity [7,10] and indicates that patients who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles require a higher daily

tacrolimus dose compared to *Cyp3A5*3* homozygotes. Moreover, despite daily therapeutic drug monitoring as a guide to dose adjustment, there was a significant delay in achieving target blood concentrations in those who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles. This is particularly important since a delay in achieving target blood concentrations of the calcineurin inhibitors after transplantation has been associated with an increased rate of acute graft rejection [31,32]. Although acute graft rejection was observed more frequently in renal transplant recipients who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles (33%) than in *Cyp3A5*3* homozygotes (23%) (Table 3), the difference was not statistically significant, presumably due to a lack of sufficient power. Ethnic factors have been shown to influence the dose requirement for tacrolimus. Black patients require higher doses to achieve target blood concentrations [33,34]. In the current study, 4 black patients were analyzed; none of them was homozygous for the *Cyp3A5*3* alleles, and they all had low tacrolimus blood concentrations during the first week post-transplantation. *Cyp3A5*3* homozygote genotype was significantly over-represented in white patients ($p < 0.001$) (Table 3), but no correlation was seen between whites and tacrolimus blood concentrations ($p = 0.79$) (Table 4). This indicates that the *Cyp3A5*3* polymorphism cannot be replaced by ethnicity to predict tacrolimus dose requirement, even though they are tightly linked.

One of the potential weaknesses of using the tacrolimus pre-dose blood concentration mean over the first week post-transplantation is that, for most samples, no steady state concentrations were reached. However, this strategy allowed us to avoid the potential confounding effects of other drugs which could have modulated tacrolimus pharmacokinetics, and reflects the application of therapeutic drug monitoring in clinical practice where the goal is to achieve target blood concentrations during this early period. Nevertheless, our study on tacrolimus pharmacokinetics during the first week post-

transplantation is in agreement with previous investigations showing that the *Cyp3A5*3* genotype is associated with tacrolimus dose requirements at 1 or 3 months post-transplantation [15-20]. However, most of these previous studies tested specifically for the effect of the *Cyp3A5*3* allele and did not look at other *Cyp3A5* alleles. Unfortunately, they assumed that patients who lacked the *Cyp3A5*3* allele were wild-type (*Cyp3A5*1*). This designation is misleading and erroneous because patients who do not carry the *Cyp3A5*3* allele are not necessarily wild-type (*Cyp3A5*1*) and can harbor other *Cyp3A5* alleles. They concluded that wild-type (*Cyp3A5*1*) patients required a higher daily dose of tacrolimus compared to *Cyp3A5*3* homozygotes, suggesting that these genotypes could predict the tacrolimus dose requirement. Furthermore, our results revealed that *CYP3A5*3* homozygotes are not all poor metabolizers, and some of these patients had low tacrolimus blood levels (Table 4). The *Cyp3A5* allelic nomenclature is not exclusive, and that 2 alleles may be present on the same chromosome, as was reported by Lee's group [35]. In the current study, all relatively frequent *Cyp3A5* polymorphisms that have the potential to affect *Cyp3A5* activity were genotyped. In accordance with Lee's study, we found that *Cyp3A5*3* homozygotes can carry other *Cyp3A5* alleles as well. One *Cyp3A5*3* homozygote also carried the *Cyp3A5*6* allele and, as expected, achieved high tacrolimus blood trough levels, since both alleles resulted in the absence of *Cyp3A5* [7]. Five *Cyp3A5*3* homozygotes also carried the *Cyp3A5*1C* allele, and 3 of these patients had low tacrolimus blood levels, even though they were homozygotes for the *Cyp3A5*3* alleles. Therefore, the presence of other *Cyp3A5* alleles in *Cyp3A5*3* homozygotes could potentially affect tacrolimus blood concentrations, indicating that the *Cyp3A5*3/*3* genotype is not a good marker to predict tacrolimus pharmacokinetics. Our results showed that the absence of at least one *Cyp3A5*3* allele is the best clinical marker in white patients

for predicting tacrolimus dose requirement and not the wild-type (*Cyp3A5*1*) or *Cyp3A5*3/*3* genotypes.

It is also possible that *Cyp3A4* expression might compensate for the lack of *Cyp3A5* expression in patients who are *Cyp3A5*3* homozygotes. We found no correlation between *Cyp3A4* polymorphism and tacrolimus pharmacokinetics. However, *Cyp3A4* genetic variants that affect the protein's structure or activity were not frequent in our cohort. Therefore, the fact that we found no correlation between these polymorphisms and tacrolimus blood concentrations does not necessarily indicate that they are of negligible importance, but rather that we could not measure their effect due to the small sample size.

Although *MDR-1* polymorphisms were observed relatively frequently in the study population, none of the single *MDR-1* SNPs tested correlated with tacrolimus pharmacokinetics. However, since T-129C, C3435T and G2677T variants can diminish *MDR-1* expression [13,14], we determined the combined effect of these 3 polymorphisms. We were able to define a limit where the accumulation of less than 3 copies of these SNPs in 1 patient was linked to lower mean dose-adjusted tacrolimus trough blood concentrations during the first week post-transplantation. Patients with this genotype would have more active P-gp pumps and would therefore extrude intracellular tacrolimus more efficiently than individuals with equal to or greater than 3 copies of *MDR-1* SNPs. The relatively enhanced extracellular pumping would thus require higher tacrolimus doses to reach target concentrations. Since P-gp and *Cyp3A* are jointly present in the gut and believed to be major contributors to the oral bioavailability of tacrolimus [36,37], we hypothesized that P-gp expression could potentially compensate for the lack of *Cyp3A5* expression in patients who are *Cyp3A5*3* homozygotes. We looked at the distribution of *MDR-1* SNPs in all

*Cyp3A5*3* homozygotes and found that 10/14 (71%) *Cyp3A5*3* homozygotes who had low tacrolimus blood levels carried less than 3 copies of *MDR-1* SNPs, whereas 9/21 (43%) *Cyp3A5*3* homozygotes carrying less than 3 copies of *MDR-1* SNPs had high tacrolimus blood concentrations (data not shown). Although the difference is not statistically significant ($p < 0.1$), it suggests that P-gp expression could possibly compensate for the lack of *Cyp3A5* expression in some patients who are *Cyp3A5*3* homozygotes and carry less than 3 copies of *MDR-1* SNPs. However, other factors, such as the presence of other *Cyp3A5* alleles, must influence tacrolimus pharmacokinetics in *Cyp3A5*3* homozygotes.

The accumulation of *MDR-1* SNPs was not retained by multivariate analyses, indicating that the effect of *MDR-1* polymorphism on tacrolimus blood concentration is not as strong as *Cyp3A5*3* polymorphisms. This observation and the necessity of looking at the combined effect of *MDR-1* polymorphisms could explain the discrepancy between previous studies on the association between single SNPs and tacrolimus blood concentrations [15,17-19,21,22,24]. *MDR-1* is located upstream of *Cyp3A4* and *Cyp3A5* on the complementary strand; the ties between the regulation of these 3 genes and linkage disequilibrium are still unknown but could probably be the missing link in understanding tacrolimus metabolism. We, therefore, postulate that although the *Cyp3A5*3* genotype is a good predictive factor, it is not an absolute indicator of tacrolimus metabolism since downstream events, such as expression, can modulate the process. Evaluation of *Cyp3A4*, *Cyp3A5* and *MDR-1* mRNA levels might be a better predictor of tacrolimus metabolism in transplant recipients.

In conclusion, we have analyzed all relatively frequent *Cyp3A4*, *Cyp3A5*, and *MDR-1* genetic variants that have the potential to affect the proteins' expression and/or function and demonstrated that the *Cyp3A5*3* genotype and the accumulation of *MDR-1* (T-129C, C3435T and G2677T) polymorphisms are associated with tacrolimus blood concentrations in renal transplant recipients. Patients who do not carry both *Cyp3A5*3* alleles achieved significantly lower mean dose-adjusted tacrolimus blood concentrations during the first week post-transplantation compared to *Cyp3A5*3* homozygotes. Patients with less than 3 copies of *MDR-1* SNPs, associated with reduced expression of P-gp, had also lower dose-adjusted tacrolimus blood concentrations compared to patients harboring equal to or greater than 3 copies of *MDR-1* SNPs, although the effect was less prominent than *Cyp3A5*.

Acknowledgements

We thank Jo-Ann Fugere from the CHUM Renal Transplant Unit for providing the clinical data, and Ovid Da Silva from the Research Support Office of the CHUM Research Centre for editorial assistance.

References

1. Canadas, O., Guerrero, R., Garcia-Canero, R., Orellana, G., Menendez, M., and Casals, C. Characterization of liposomal tacrolimus in lung surfactant-like phospholipids and evaluation of its immunosuppressive activity. *Biochemistry* 2004; 43:9926-9938
2. Westlind, A., Lofberg, L., Tindberg, N., Andersson, T. B., and Ingelman-Sundberg, M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic

polymorphism in the 5'-upstream regulatory region.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 1999; 259:201-205

3. Sata, F., Sapone, A., Elizondo, G., Stocker, P., Miller, V. P., Zheng, W. et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2000; 67:48-56
4. Hsieh, K. P., Lin, Y. Y., Cheng, C. L., Lai, M. L., Lin, M. S., Siest, J. P. et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29:268-273
5. Eiselt, R., Domanski, T. L., Zibat, A., Mueller, R., Presecan-Siedel, E., Hustert, E. et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11:447-458
6. Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W. et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; 299:825-831
7. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J. et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat.Genet.* 2001; 27:383-391
8. Jounaidi, Y., Hyrailles, V., Gervot, L., and Maurel, P. Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996; 221:466-470
9. Chou, F. C., Tzeng, S. J., and Huang, J. D. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29:1205-1209

10. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K. et al.
The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11:773-779
11. Lee, S. J., Usmani, K. A., Chanas, B., Ghanayem, B., Xi, T., Hodgson, E. et al.
Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* 2003; 13:461-472
12. Roy, J. N., Lajoie, J., Zijenah, L. S., Barama, A., Poirier, C., Ward, B. J. et al.
CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab. Dispos.* 2005; 33:884-887
13. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A. et al.
Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97:3473-3478
14. Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y. et al.
Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; 297:1137-1143
15. Hesselink, D. A., van Schaik, R. H., van der Heiden, I.P., van der Werf, M., Gregoor, P. J., Lindemans, J. et al.
Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2003; 74:245-254
16. Thervet, E., Anglicheau, D., King, B., Schlageter, M. H., Cassinat, B., Beaune, P. et al.
Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and

concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76:1233-1235

17. Haufroid, V., Mourad, M., Van, K.V., Wawrzyniak, J., De Meyer, M., Eddour, D. C. et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14:147-154

18. Tsuchiya, N., Satoh, S., Tada, H., Li, Z., Ohyama, C., Sato, K. et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78:1182-1187

19. Tada, H., Tsuchiya, N., Satoh, S., Kagaya, H., Li, Z., Sato, K. et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant.Proc.* 2005; 37:1730-1732

20. Macphee, I. A., Fredericks, S., Mohamed, M., Moreton, M., Carter, N. D., Johnston, A. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; 79:499-502

21. Macphee, I. A., Fredericks, S., Tai, T., Syrris, P., Carter, N. D., Johnston, A. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002; 74:1486-1489

22. Zheng, H., Webber, S., Zeevi, A., Schuetz, E., Zhang, J., Bowman, P. et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am.J.Transplant.* 2003; 3:477-483
23. Anglicheau, D., Verstuyft, C., Laurent-Puig, P., Becquemont, L., Schlageter, M. H., Cassinat, B. et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003; 14:1889-1896
24. Macphee, I. A., Fredericks, S., Tai, T., Syrris, P., Carter, N. D., Johnston, A. et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am.J.Transplant.* 2004; 4:914-919
25. Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T. et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology *Kidney Int* 1999; 55:713-723
26. Woodahl, E. L., Yang, Z., Bui, T., Shen, D. D., and Ho, R. J. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004; 310:1199-1207
27. Lamba, J. K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G., and Thummel, K. E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2002; 54:1271-1294
28. von Ahsen, N., Richter, M., Grupp, C., Ringe, B., Oellerich, M., and Armstrong, V. W. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter

- polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin.Chem.* 2001; 47:1048-1052
29. Ameyaw, M. M., Regateiro, F., Li, T., Liu, X., Tariq, M., Mobarek, A. et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217-221
30. Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M. et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:169-174
31. Undre, N. A., van Hooff, J., Christiaans, M., Vanrenterghem, Y., Donck, J., Heeman, U. et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant.Proc.* 1999; 31:296-298
32. Clase, C. M., Mahalati, K., Kiberd, B. A., Lawen, J. G., West, K. A., Fraser, A. D. et al. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am.J.Transplant.* 2002; 2:789-795
33. Andrews, P. A., Sen, M., and Chang, R. W. Racial variation in dosage requirements of tacrolimus. *Lancet* 1996; 348:1446
34. Mancinelli, L. M., Frassetto, L., Floren, L. C., Dressler, D., Carrier, S., Bekersky, I. et al. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: a comparison across ethnic groups. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:24-31

35. Lee, S. J., Bell, D. A., Coulter, S. J., Ghanayem, B., and Goldstein, J. A. Recombinant CYP3A4*17 is defective in metabolizing the hypertensive drug nifedipine, and the CYP3A4*17 allele may occur on the same chromosome as CYP3A5*3, representing a new putative defective CYP3A haplotype. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2005; 313:302-309
36. Masuda, S., Uemoto, S., Hashida, T., Inomata, Y., Tanaka, K., and Inui, K. Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in a living-donor small bowel recipient. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 68:98-103
37. Zhang, Y. and Benet, L. Z. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40:159-168

Table 1: Selected polymorphisms and their effects

Allele/SNP	Nucleotide position	Amino acid effect	Reference
Cyp3A4*1B	-392A>G	Promoter	[2]
Cyp3A4*2	15713T>C	Ser→ Pro	[3]
Cyp3A4*4	352A>G*	Ile→ Val	[4]
Cyp3A4*5	653C>G*	Pro→ Arg	[4]
Cyp3A4*6	831insA*	Frameshift	[4]
Cyp3A4*12	21896C>T	Leu→ Phe	[5]
Cyp3A4*17	15615T>C	Phe→ Ser	[6]
Cyp3A4*18	20070T>C	Leu→ Pro	[6]
Cyp3A5*1B	-86G>A	Promoter	[7]
Cyp3A5*1C	-74C>T	Promoter	[7]
Cyp3A5*2	27289C>A	Thr→ Asn	[8]
Cyp3A5*3	6986A>G	Splicing defect	[10]
Cyp3A5*5	12952T>C	Splicing defect	[9]
Cyp3A5*6	14690G>A	Splicing defect	[7]
SNP 31611	31611C>T	3' UTR	[7]
MDR-1 T-129	T-129C	Promoter	[14]
MDR-1 A61G	A61G	Asn→ Asp	[13]
MDR-1 G1199A	G199A	Asn→ Ser	[13]
MDR-1 C3435T	C3435T	Wobble	[13]
MDR-1 G2677T/A	G2677T/A	Ala→ Ser/Thr	[14]

Cyp3A4 nucleotide positions refer to the start codon of *Cyp3A4* in sequence accession number AF280107, *Cyp3A4** positions refer to cDNA sequence accession number M18907, *Cyp3A5* positions refer to the start codon of *Cyp3A5* in sequence accession number NG_000004.

Abbreviation: SNP, single nucleotide polymorphism

Table 2: Primer sequences, annealing temperatures, restriction-endonuclease enzymes and digestion products for A-RFLP typing or sequencing of *Cyp3A4* polymorphisms

Allele	Primer name	Primer sequence	T	Enzyme	Digestion products
Cyp3A4*1B	PRO3A4F	gca cac tcc agg cat agg taa a	63 ⁰ C		
	Cyp3A4R	agg ttt cca tgg cca agt ct			
Cyp3A4*2	CYP2AF	cta gca cat cat ttg gag tga aca t	54 ⁰ C	Dde I	Wt: 110,32
	CYP2AR	tta aag gaa ata gta gtc cac ata ctt act		(NEB)	Mt: 142
Cyp3A4*4	CYP4F	gga gac ctc cac aac tga tgt agg aca	58 ⁰ C	NLAIII	Wt: 84,31
	CYP4R	tct tcc att ctt cat cct cag cta tag aca		(NEB)	Mt: 115
Cyp3A4*5	CYP5F	cag cat gga tgt ttc gtt ctt tc	50 ⁰ C	Hinf I	Wt: 179,44
	CYP5R	gtg gat gaa tta cat ggt ga		(NEB)	Mt: 106,73,44
Cyp3A4*6	C3A4A6F	gag cca tat tct cag aag gga gat caa g	60 ⁰ C	Hinf I	Wt: 137,129,24
	C3A4A6R	caa aca tgt cct gta gat taa		(NEB)	Mt: 153,137
Cyp3A4*12	C3A4A12F	atc caa atc tgt ttc gtt ctt tc	60 ⁰ C	BsmAI	Wt: 235,106
	C3A4A12R	cca cat gac tgt cct gta gat taa		(NEB)	Mt: 341
Cyp3A4*17	C3A4A17F	cca cat gac tgt cct gta gat taa	60 ⁰ C	Hpy188	Wt: 457,198,100
	C3A4A17R	gtg atc tag tag atc tga aag tgt gtg gct		8III (NEB)	Mt:281,198,176,100
Cyp3A4*18	C3A4A18F	ctt ttc cct tag gga ttt gag ggc tt	60 ⁰ C	BpmI	Wt: 137,130
	C3A4A18R	cct tat tgg gta aaa ctg cat caa ttt cct cc		(NEB)	Mt: 267

Abbreviations: A-RFLP, amplified-restriction fragment length polymorphism; NEB, New England Biolabs;

Wt: wild-type; Mt: mutant

Table 3: Demographic, clinical and pharmacokinetic characteristics according to *Cyp3A5* (A6986G) and *MDR-1* (T-129C, C3435T, G2677T) SNPs

		<i>Cyp3A5</i> A6986G genotypes ^a		P-value ^b	Number of <i>MDR-1</i> SNPs		P-value
		A/A or A/G	G-G		< 3	≥ 3	
Average age, years (SD)		38.7 (13.4)	50.1 (15.1)	0.25	44.6 (16.7)	52.6 (11.5)	0.12
Log tacrolimus C ₀ /Dose 7 days ^c (SD)		1.51 (0.28)	1.92 (0.3)	<0.001	1.73 (0.33)	2.01 (0.28)	0.006
Log time to achieve target dose ^d , days (SD)		1.08 (0.31)	0.58 (0.28)	<0.001	0.66 (0.35)	0.7 (0.35)	0.97
Average creatinine clearance 90 days ^e (SD)		0.69 (0.24)	0.71 (0.2)	0.73	0.7 (0.19)	0.72 (0.22)	0.25
Sex	Women	5	19	0.95	17	10	0.16
	Male	4	16		7	10	
Race	White	3	35	<0.001	22	16	0.23
	Other ^f	6	0		5	1	
Acute graft rejection (positive)		3	8	0.52	6	5	0.59

^a *Cyp3A5* A6986G SNP defines the *Cyp3A5**3 allele

^b P-value as determined by the Mann-Whitney test for age and creatinine clearance; Student's T-test for Log time to achieve the target dose and Log C₀/Dose 7 days; Chi-square test for sex and acute graft rejection; and Fisher's test for race.

^c Log C₀/Dose 7 days = average of Log C₀/Dose (ng/ml)/(mg/kg) first 7 days post-transplantation

^d Log time to achieve target dose (10-12 ng/ml) in days

^e Creatinine clearance (μl/min) at 90 days post-transplantation

^f Black, 4 individuals; Asian, 2 individuals

Abbreviations: SD, standard deviation; SNP, single nucleotide polymorphism

Table 4: Statistical analysis using variables dichotomized into high and low tacrolimus absorbers based on the median C_0/Dose 7 days post-transplantation

Variables	C_0/Dose first 7 days ^a		Unadjusted OR (95% CI) ^b P-value ^c
	High C_0/Dose	Low C_0/Dose	
Race			
White	21	17	0.16 (0.02-1.52)
Other ^d	1	5	P=0.79
<i>Cyp3A5</i> A6986G genotype			
A/A or A/G	1	8	12.0 (1.34-106.8)
G/G	21	14	P=0.009
Accumulation of <i>MDR-1</i> (T-129C, C3435T, G2677T) SNPs			
< 3 SNPs	10	17	4.08 (1.10-15.02)
≥ 3 SNPs	12	5	P=0.03

^a High C_0/Dose 7 days: $C_0/\text{Dose} \geq 85.5$ ng/ml per mg/kg (n=22); Low C_0/Dose 7 days: $C_0/\text{Dose} < 85.5$ ng/ml per mg/kg (n=22)

^b Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) calculated with the exact method

^c P-value was calculated by the Chi-square test

^d Black, 4 individuals; Asian, 2 individuals

Abbreviation: SNP, single nucleotide polymorphism

4. DISCUSSION

4.1 Étude du polymorphisme de Cyp3A5 chez différentes ethnies

Nous avons séquencé le promoteur complet ainsi que toutes les régions codantes de Cyp3A5 dans notre cohorte caucasienne et zimbabwéenne. Ceci nous a permis d'identifier 10 polymorphismes dans la cohorte caucasienne et 12 dans la cohorte zimbabwéenne (Tableau 3 - article 1 page 79) dont 13 étaient nouveaux. À l'intérieur du promoteur, deux nouvelles mutations ont été identifiées chez les Caucasiens et aucune chez les Africains. Ces mutations sont toutefois retrouvées à une très faible fréquence (0.6%). En raison de leur faible fréquence, ces mutations ponctuelles ne sont pas responsables de l'hétérogénéité de la métabolisation effectuée par Cyp3A5. Dans la cohorte caucasienne, trois autres nouveaux polymorphismes ont été identifiés et codent tous pour une substitution d'acide aminé (codon 309: Thr-Asn; codon: 323: Thr-Asn et codon 371: Ile Val). Pour les codons 309 et 323, il s'agit d'une substitution entre deux acides aminés neutres polaires (Asn-Thr). Cependant, au niveau de la chaîne latérale, il y a perte du groupement méthyle neutre sans possibilité de liaison pour un groupement amine neutre plus réactif. Le groupement carboxyl est substitué pour un groupement alcool qui a semblablement les mêmes propriétés. Le changement d'acide aminé n'entraînera donc probablement pas de changement de structure ou de fonction majeure. Pour la substitution au codon 371, il s'agit d'une substitution d'un acide aminé neutre non-polaire (Ile) pour un autre acide aminé neutre non-polaire (Val). La substitution au niveau de la chaîne terminale entraîne seulement la perte d'un groupe méthyle, qui est un groupement peu réactif. Il semble donc que cette mutation n'entraînera pas de changement majeur à la conformation ou à l'activité

de la protéine Cyp3A5. De plus, la faible fréquence de ces mutations ponctuelles (1%) indique que ces mutations n'auront pas un très grand effet sur les différences interindividuelles du métabolisme de Cyp3A5.

Dans la population zimbabwéenne, aucun nouveau polymorphisme n'a été retrouvé dans le promoteur. Nous avons identifié trois SNP introniques dont l'effet est inconnu, ainsi que trois mutations silencieuses. Pour la majorité, les nouvelles mutations de la population zimbabwéenne se retrouvent à une fréquence de 1%. La mutation dans l'intron 3 (C-23114T) a une fréquence de 6%. Il est possible que la proximité de cette mutation dans l'intron 3 à la mutation qui définit les allèles 3 de Cyp3A5 (A6989G)^[80] et explique sa forte fréquence. La mutation T47406C, localisée dans l'intron 12, est retrouvée à une fréquence de 3% dans la population zimbabwéenne. Finalement, deux nouvelles substitutions entraînant un changement d'acide aminé ont été observées. La première, située au codon 238, code pour une substitution, d'un acide aminé neutre non-polaire (Val) pour un autre acide aminé neutre non-polaire (Ala). La différence au niveau de la chaîne latérale des acides aminés est l'addition d'un groupe méthyle peu réactif. Ainsi, nous supposons que cette mutation n'entraînera pas de modification majeure à Cyp3A5. La deuxième substitution (codon 400) retrouvée dans la population zimbabwéenne pourrait entraîner un changement majeur puisqu'elle code pour la présence d'un codon stop prématuré localisé dans le dernier exon. La substitution entraînera donc une protéine tronquée qui sera possiblement non fonctionnelle, dont l'activité ou la translocation sera modifiée. Toutefois, ces deux mutations ont une fréquence si faible (1%) que leur impact risque d'être minime sur les variations observées au niveau de la capacité métabolique de Cyp3A5 entre la population africaine et la population caucasienne.

La distribution allélique de Cyp3A5 que nous avons observé est indiquée dans le Tableau IV de l'article 1. (page 79). La distribution allélique des polymorphismes suit l'équilibre de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$). On remarque une différence significative pour ce qui est de la distribution allélique de Cyp3A5*3, Cyp3A5*6 et Cyp3A5*7 entre les Caucasiens et les Africains. Chez les Caucasiens, l'allèle Cyp3A5*3 est retrouvé à une fréquence de 93% comparée à 77% chez les Zimbabwéens ($p < 0.001$). Pour les allèles Cyp3A5*6 et Cyp3A5*7, on retrouve respectivement une fréquence de 10% et 22% chez les Africains tandis que chez les Caucasiens ces allèles n'ont pas été observés ($p < 0.001$). Les allèles Cyp3A5*3 et Cyp3A5*6 entraînent tous deux un défaut d'épissage^[50,72] qui engendre des enzymes Cyp3A5 défectueuses. Cyp3A5*7 quant à lui code pour une insertion d'un nucléotide au codon 346 ce qui engendre un changement du cadre de lecture et mène à la présence d'un codon stop prématuré. Cyp3A5*7 produit donc une enzyme tronquée non fonctionnelle^[72]. Ces résultats indiquent la possibilité que les Africains indigènes puissent être de meilleurs métaboliseurs que les Caucasiens puisque l'allèle Cyp3A5*3 est observé moins fréquemment dans cette population. Cependant, la présence de Cyp3A5*6 et *7 dans la population africaine pourrait compenser pour la faible fréquence de Cyp3A5*3. Ceci expliquerait ainsi pourquoi certains Africains ont une capacité métabolique similaire aux Caucasiens tandis que d'autres semblent être de meilleurs métaboliseurs. Finalement, le polymorphisme, situé en position 31611 dans la région 3' non-transcrit de Cyp3A5, fut détecté dans 60% des échantillons africains analysés et dans seulement 8.6 % des échantillons caucasiens ($p < 0.001$). Les effets possibles de ce polymorphisme demeurent encore inconnus.

Il a déjà été rapporté que l'activité de Cyp3A5 varie grandement entre les différentes ethnies et interindividuellement^[54]. On a alors proposé que les différences

génomiques pourraient expliquer les différences observées en ce qui a trait aux variations métaboliques des médicaments ^[74]. Malheureusement, les études sur le sujet n'ont pas permis de trouver de telles associations. Au contraire, elles ont plutôt indiqué qu'il y avait certains polymorphismes qui pouvaient être de bons indicateurs des différences observées entre les populations, sans être des indicateurs absolus ^[53]. Les polymorphismes ne sont pas les seuls facteurs influençant le métabolisme des drogues relié à Cyp3A5. Les différents facteurs environnementaux et génétiques qui influencent l'expression de Cyp3A5 sont aussi d'importants facteurs et modulables. Westlind et coll. ^[100] ont d'ailleurs démontré que les individus homozygotes pour l'allèle Cyp3A5*3 peuvent exprimer une protéine mutante (SV1) et également une protéine sauvage. De plus, les plus fréquents les polymorphismes engendrent un épissage ce qui suggère que ces facteurs génétiques prédisposent un individu à une modulation post-transcriptionnelle de l'expression et de l'activité de Cyp3A5. Ceci pourrait être la base de la variation interindividuelle des capacités métaboliques de Cyp3A5. Ultimement, il semble que les capacités métaboliques de Cyp3A5 soient reliées à une procédure complexe impliquant le bagage génétique d'un individu, ainsi qu'à des facteurs externes comme l'administration des xénobiotiques qui influencent l'expression de la protéine. Nous pouvons ainsi conclure que tous les polymorphismes génétiques majeurs de Cyp3A5 susceptibles d'affecter son activité ou sa structure ont été identifiés et qu'il reste à associer ces derniers avec leurs différents phénotypes, de même que la modulation de leur expression.

4.2 Étude de l'influence des polymorphismes de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 sur la pharmacocinétique du tacrolimus

Nous avons étudié huit polymorphismes de Cyp3A4 et sept de Cyp3A5 qui étaient susceptibles de moduler la métabolisation du tacrolimus parce qu'ils changeaient la structure ou l'expression de la protéine produite. Comme plusieurs études antérieures [68,59,174,190,196], nous n'avons pas établi de corrélation significative entre les différents polymorphismes de Cyp3A4 et la concentration plasmatique du tacrolimus chez les receveurs de greffe rénale. Une seule étude a identifié une association significative entre l'allèle Cyp3A4*1B et la métabolisation du tacrolimus. Cependant cette différence était probablement due à l'ethnie, un facteur confondant, puisque les résultats n'étaient pas reproductibles lorsque l'on analysait seulement les patients de race blanche [174]. Ces études laissent présager que les polymorphismes de Cyp3A4 ne sont pas déterminants de son activité bien qu'il soit un des cytochromes les plus exprimés [197]. De part les faibles fréquences des différents polymorphismes de Cyp3A4 retrouvé dans notre population et le petit échantillonnage de patients analysés, il est aussi probable que notre étude ne soit pas assez puissante pour bien mesurer l'impact du polymorphisme de Cyp3A4.

En ce qui concerne Cyp3A5, nous avons trouvé une corrélation significative entre les patients qui ne sont pas porteurs de deux copies de l'allèle Cyp3A5*3 (homozygotes mutants) et le C0/Dose à 7 jours post-transplantation, ainsi qu'avec le temps pour atteindre la concentration plasmatique cible du tacrolimus. Plus spécifiquement l'absence d'une copie de l'allèle Cyp3A5*3 (hétérozygote mutant ou homozygote pour l'allèle sauvage) est associée à de plus fortes doses de tacrolimus et un délai plus long pour atteindre les concentrations cibles. La présence de l'allèle Cyp3A5*3 engendre un épissage alternatif de

l'ARNm de Cyp3A5 qui en réduit son activité^[50]. Chez les patients hétérozygotes mutants ou homozygotes pour l'allèle sauvage, l'enzyme Cyp3A5 serait plus actif et métaboliserait plus efficacement le tacrolimus que celui retrouvé chez les homozygotes mutants. Ainsi, les patients hétérozygotes mutants ou homozygotes pour l'allèle sauvage sont de meilleurs métaboliseurs et doivent recevoir une dose plus élevée de tacrolimus afin d'atteindre la concentration cible de tacrolimus le plus rapidement possible. L'identification de ce groupe de patients est très important car il est primordial d'atteindre le seuil cible de tacrolimus aussi rapidement que possible afin de diminuer le risque de rejet du greffon^[42,198]. Dans notre étude, la fréquence de rejet aigu du greffon était plus élevée dans le groupe de patients hétérozygotes mutants ou homozygotes pour l'allèle sauvage (33%) que celle observée chez les homozygotes mutants (23%). Toutefois, la différence n'était pas significative, probablement dû au faible taux de rejet aigu observé dans notre cohorte.

Nos résultats confirment les précédentes études qui ont trouvé une corrélation entre Cyp3A5 et la concentration plasmatique du tacrolimus 1 mois et 3 mois post-transplantation^[173,175,199,172,174,181,178,179]. Toutefois, ces études ont seulement analysé la présence ou l'absence de l'allèle Cyp3A5*3 et parfois de Cyp3A5*6. Macphee^[172] en a conclu que l'allèle Cyp3A5*1 était associé avec un faible C₀/dose parce qu'il a assumé que les patients qui ne portaient pas l'allèle Cyp3A5*3 étaient de génotype sauvage (Cyp3A5*1). Récemment, le groupe de Lee^[190] a démontré qu'ils pouvaient avoir plus d'un allèle présent sur le même brin d'ADN. Nous avons observé que certains patients homozygotes pour de l'allèle mutant (Cyp3A5*3) portaient également l'allèle Cyp3A5*1C ou Cyp3A5*6. De ces patients, plusieurs étaient de bons métaboliseurs malgré le fait qu'ils soient homozygotes pour l'allèle mutant. Il semble que la présence d'autres allèles de

Cyp3A5 chez les homozygotes mutants pourrait influencer la pharmacocinétique du tacrolimus. Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène provient d'une étude récente^[80] qui a démontré que l'allèle Cyp3A5*3 induit non seulement la production d'ARNm mutant SV1 et SV2, mais aussi des ARNm fonctionnel; ce qui pourrait améliorer l'activité de l'enzyme. Enfin, il semble que Cyp3A5 et Cyp3A4 aient la même affinité pour le tacrolimus, mais que Cyp3A5 métaboliserait le substrat beaucoup plus efficacement et rapidement que Cyp3A4^[65]. Par exemple, un premier patient qui exprime une grande quantité de Cyp3A4 et un deuxième qui exprime une petite quantité de Cyp3A5 fonctionnel et a une grande affinité pour le tacrolimus pourraient tous deux avoir le même profil pharmacocinétique.

D'autre part, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la pharmacocinétique du tacrolimus et l'ethnie des patients. La majorité des Caucasiens sont porteurs de l'allèle Cyp3A5*3 (93%) tandis que la fréquence de Cyp3A5*3 est plus faible chez les non Caucasiens (77% pour les Africains, 75% pour les Asiatiques ($p < 0.001$)). En conséquence, nous pouvons conclure que l'ethnie n'est pas un indicateur de la pharmacocinétique du tacrolimus chez les patients. Un test de dépistage génétique est donc nécessaire et ne peut être remplacé par l'ethnicité.

Bien que les fréquences des polymorphismes de MDR-1 observées dans notre étude soient élevées, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la concentration plasmatique du tacrolimus et les polymorphismes individuels de MDR-1. Nous nous sommes donc interrogés sur l'effet combiné des polymorphismes T-129C, G2677T et C3435T qui diminuent tous l'activité ou l'expression de la P-gp. Nous avons pu établir une corrélation entre une faible concentration plasmatique de tacrolimus à 7 jours post-tranplantation et

l'accumulation de moins de trois copies des mutations T-129C, G2677T et C3435T de MDR-1. Les patients porteurs de moins de trois copies de ces mutations ont une pompe P-gp plus active et ainsi éliminent le tacrolimus plus efficacement que les patients ayant 3 copies ou plus de ces mutations. Ils ont donc besoin d'une dose plus élevée de tacrolimus pour atteindre le seuil cible.

Puisque la P-gp et Cyp3A sont tous deux présents dans l'intestin et sont responsables de la biodisponibilité orale du tacrolimus^[37,36], nous avons fait l'hypothèse que l'expression de P-gp pourrait compenser pour le manque de Cyp3A5 fonctionnel chez les patients homozygotes pour l'allèle mutant (Cyp3A5*3). Nous avons examiné la distribution des polymorphismes de MDR-1 (T-129C, C3435T et G2677T) chez les patients homozygotes pour l'allèle Cyp3A5*3. Nous avons trouvé que 10/14 (71%) des patients homozygotes pour l'allèle Cyp3A5*3 et porteurs de moins de trois copies des polymorphismes sélectionnés pour MDR-1 avaient une faible concentration plasmatique de tacrolimus tandis que 9/21 (43%) de ses patients avaient un concentration plasmatique élevée de tacrolimus. Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative ($p < 0.1$), ceci semble suggérer que l'expression de la P-gp puisse compenser pour une diminution d'expression de Cyp3A5 chez certains patients homozygotes pour l'allèle Cyp3A5*3 et porteurs de moins de trois copies de MDR-1. Dans une étude future, il serait donc intéressant d'évaluer la corrélation entre les niveaux d'expression d'ARNm de MDR-1, de Cyp3A4 et de Cyp3A5 et la biodisponibilité orale du tacrolimus, car cette mesure pourrait potentiellement être un meilleur indicateur prédictif du métabolisme du tacrolimus chez les receveurs d'organes solides.

5. CONCLUSION

Premièrement, nous avons analysé deux ethnies afin de vérifier que les séquences nucléotidiques de Cyp3A5 étaient complètement élucidées. Nous avons identifié plusieurs nouvelles mutations, à faibles fréquences, dont certaines avaient la possibilité de modifier la séquence d'acides aminés de la protéine et potentiellement modifier la structure et fonction de celle-ci. Ainsi, avec les informations obtenues dans cette étude et celles des études précédentes ^[50,48,45,72,77,74,63], nous avons pu déterminer que les fréquences alléliques varient entre les différentes ethnies en raison des différentes pressions sélectives géographiques. Ceci nous a donc permis de mieux identifier les facteurs génétiques susceptibles de moduler le métabolisme de Cyp3A5.

Deuxièmement, nous avons analysé tous les variants de Cyp3A4, Cyp3A5 et MDR-1 susceptibles de moduler les paramètres pharmacocinétiques du métabolisme du tacrolimus chez les receveurs de greffe rénale. Nous avons ainsi démontré que les patients hétérozygotes mutants (Cyp3A5*3) ou homozygotes pour l'allèle sauvage (Cyp3A5*1) présentaient une concentration plasmatique plus faible de tacrolimus durant la première semaine post-transplantation et que ces derniers avaient besoin de plus de temps pour atteindre les concentrations cibles. De plus, les patients porteurs de moins de trois copies des polymorphismes de MDR-1 (T-129C, C3435T et G2677T) associés à une baisse d'expression, avaient eux aussi une concentration plasmatique de tacrolimus plus faible que ceux porteurs de 3 copies ou plus des polymorphismes de MDR-1 sélectionnés. Finalement, l'effet de Cyp3A5*3 semble donc être plus prédominant que celui de MDR-1.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Desmeules, J., Gascon, M. P., Dayer, P., and Magistris, M. Impact of environmental and genetic factors on codeine analgesia *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1991; **41**:23-26
2. Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W. et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia *Cell* 1999; **97**:175-187
3. Edwards, E. B., Bennett, L. E., and Cecka, J. M. Effect of HLA matching on the relative risk of mortality for kidney recipients: a comparison of the mortality risk after transplant to the mortality risk of remaining on the waiting list *Transplantation* 1997; **64**:1274-1277
4. Schnuelle, P., Lorenz, D., Trede, M., and Van Der Woude, F. J. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up *J.Am.Soc.Nephrol.* 1998; **9**:2135-2141
5. Expert group on Renal Transplantation. Section I : Evaluation , selection and preparation of the potential transplant recipient *Nephrology Dialysis Transplantation* 2000; **15**[Suppl. 7]:3-38
6. Thorogood, J., Persijn, G. G., Schreuder, G. M., D'Amaro, J., Zantvoort, F. A., van Houwelingen, J. C. et al. The effect of HLA matching on kidney graft survival in separate posttransplantation intervals *Transplantation* 1990; **50**:146-150
7. Bradley, B. A., Gilks, W., Gore, S. M., Klouda, P. T., and Selwood, N. H. Beneficial HLA matching in centers using cyclosporine A *Clin.Transpl.* 1986; **93-98**
8. Norman DJ and Suki WN. Expected Clinical Outcomes/risk factors 1998; **245-249**
9. Merril JP, Murray JE, and Harrison JH. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 1956; **160**:277-282
10. Sayegh, M. H. and Carpenter, C. B. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises *N.Engl.J.Med.* 2004; **351**:2761-2766

11. Sayegh, M. H., Perico, N., and Remuzzi, G. Transplantation tolerance. A complex scenario awaiting clinical applicability *Contrib.Nephrol.* 2005; **146**:95-104
12. Siemann, G., Blume, R., Grapentin, D., Oetjen, E., Schwaninger, M., and Knepel, W. Inhibition of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-mediated transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 depends on the promoter context *Mol.Pharmacol.* 1999; **55**:1094-1100
13. Roelen, D. L., van Bree, F. P., Schanz, U., van Rood, J. J., and Claas, F. H. Differential inhibition of primed alloreactive CTLs in vitro by clinically used concentrations of cyclosporine and FK506 *Transplantation* 1993; **56**:190-195
14. Fujimura, T., Yang, X. F., Soriano, R., Ogawa, T., Kobayashi, M., and Jiang, H. Cellular surface molecular and cytokine gene expression in rat heart allografts under optimal doses of cyclosporine and FK 506 *Transplant.Proc.* 1998; **30**:1023-1026
15. Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V. et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus *Clin.Pharmacokinet.* 1995; **29**:404-430
16. Staatz, C. E. and Tett, S. E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation *Clin.Pharmacokinet.* 2004; **43**:623-653
17. Fitzsimmons, W. E., Bekersky, I., Dressler, D., Raye, K., Hodosh, E., and Mekki, Q. Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics *Transplant.Proc.* 1998; **30**:1359-1364
18. Bekersky, I., Dressler, D., and Mekki, Q. A. Effect of low- and high-fat meals on tacrolimus absorption following 5 mg single oral doses to healthy human subjects *J.Clin.Pharmacol.* 2001; **41**:176-182
19. Paine, M. F., Khalighi, M., Fisher, J. M., Shen, D. D., Kunze, K. L., Marsh, C. L. et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997; **283**:1552-1562
20. Lampen, A., Christians, U., Guengerich, F. P., Watkins, P. B., Kolars, J. C., Bader, A. et al. Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability *Drug Metab Dispos.* 1995; **23**:1315-1324

21. Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A., and Wacher, V. J. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery *J.Control Release* 1999; **62**:25-31
22. Kuypers, D. R. and Vanrenterghem, Y. Time to reach tacrolimus maximum blood concentration, mean residence time, and acute renal allograft rejection: an open-label, prospective, pharmacokinetic study in adult recipients *Clin.Ther.* 2004; **26**:1834-1844
23. Williams, J. A., Ring, B. J., Cantrell, V. E., Jones, D. R., Eckstein, J., Ruterbories, K. et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 *Drug Metab Dispos.* 2002; **30**:883-891
24. Burk, O., Tegude, H., Koch, I., Hustert, E., Wolbold, R., Glaeser, H. et al. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine *J.Biol.Chem.* 2002; **277**:24280-24288
25. Gellner, K., Eiselt, R., Hustert, E., Arnold, H., Koch, I., Haberl, M. et al. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene *Pharmacogenetics* 2001; **11**:111-121
26. Venkataramanan, R., Jain, A., Warty, V. S., Abu-Elmagd, K., Alessiani, M., Lever, J. et al. Pharmacokinetics of FK 506 in transplant patients *Transplant.Proc.* 1991; **23**:2736-2740
27. Christians, U., Braun, F., Kosian, N., Schmidt, M., Schiebel, H. M., Ernst, L. et al. High performance liquid chromatography/mass spectrometry of FK 506 and its metabolites in blood, bile, and urine of liver grafted patients *Transplant.Proc.* 1991; **23**:2741-2744
28. Christians, U., Braun, F., Schmidt, M., Kosian, N., Schiebel, H. M., Ernst, L. et al. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients *Clin.Chem.* 1992; **38**:2025-2032
29. Iwasaki, K., Shiraga, T., Matsuda, H., Nagase, K., Tokuma, Y., Hata, T. et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506 *Drug Metab Dispos.* 1995; **23**:28-34
30. Iwasaki, K., Shiraga, T., Nagase, K., Tozuka, Z., Noda, K., Sakuma, S. et al. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506,

a potent immunosuppressive macrolide lactone *Drug Metab Dispos.* 1993; **21**:971-977

31. Moller, A., Iwasaki, K., Kawamura, A., Teramura, Y., Shiraga, T., Hata, T. et al. The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects *Drug Metab Dispos.* 1999; **27**:633-636
32. Przepiorka, D., Nash, R. A., Wingard, J. R., Zhu, J., Maher, R. M., Fitzsimmons, W. E. et al. Relationship of tacrolimus whole blood levels to efficacy and safety outcomes after unrelated donor marrow transplantation *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1999; **5**:94-97
33. Takahara, S., Kokado, Y., Kameoka, H., Takano, Y., Jiang, H., Moutabarrik, A. et al. Monitoring of FK 506 blood levels in kidney transplant recipients *Transplant. Proc.* 1994; **26**:2106-2108
34. Kershner, R. P. and Fitzsimmons, W. E. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation *Transplantation* 1996; **62**:920-926
35. Eidelman, B. H., Abu-Elmagd, K., Wilson, J., Fung, J. J., Alessiani, M., Jain, A. et al. Neurologic complications of FK 506 *Transplant. Proc.* 1991; **23**:3175-3178
36. Mor E, Yussim A, and Chodoff L. New immunosuppressive agents for maintenance therapy in organ transplantation: focus on adverse events *Bio Drugs* 1997; **16**:242-257
37. Jindal, R. M., Sidner, R. A., and Milgrom, M. L. Post-transplant diabetes mellitus. The role of immunosuppression *Drug Saf* 1997; **16**:242-257
38. Pirsch, J. D., Miller, J., Deierhoi, M. H., Vincenti, F., and Filo, R. S. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group *Transplantation* 1997; **63**:977-983
39. Mayer, A. D., Dmitrewski, J., Squifflet, J. P., Besse, T., Grabensee, B., Klein, B. et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group *Transplantation* 1997; **64**:436-443

40. Winkler, M., Wonigeit, K., Undre, N., Ringe, B., Oldhafer, K., Christians, U. et al. Comparison of plasma vs whole blood as matrix for FK 506 drug level monitoring *Transplant.Proc.* 1995; **27**:822-825
41. Kuypers, D. R. J., Claes, K., Evenepoel, P., Maes, B., and Vanrenterghem, Y. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2004; **75**:434-447
42. Undre, N. A., van Hooff, J., Christiaans, M., Vanrenterghem, Y., Donck, J., Heeman, U. et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection *Transplant.Proc.* 1999; **31**:296-298
43. Nelson, D. R. Cytochrome P450 and the individuality of species *Arch.Biochem.Biophys.* 1999; **369**:1-10
44. Gibson, G. G., Plant, N. J., Swales, K. E., Ayrton, A., and El Sankary, W. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man *Xenobiotica* 2002; **32**:165-206
45. Lamba, J. K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G., and Thummel, K. E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2002; **54**:1271-1294
46. Greuet, J., Pichard, L., Bonfils, C., Domergue, J., and Maurel, P. The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996; **225**:689-694
47. Scott, E. E. and Halpert, J. R. Structures of cytochrome P450 3A4 *Trends Biochem.Sci.* 2005; **30**:5-7
48. Lamba, J. K., Lin, Y. S., Thummel, K., Daly, A., Watkins, P. B., Strom, S. et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations *Pharmacogenetics* 2002; **12**:121-132
49. Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak, V. D., and Jhoti, H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin *Nature* 2003; **424**:464-468

50. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J. et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression *Nat.Genet.* 2001; **27**:383-391
51. Lin, Y. S., Dowling, A. L., Quigley, S. D., Farin, F. M., Zhang, J., Lamba, J. et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism *Mol.Pharmacol.* 2002; **62**:162-172
52. Aoyama, T., Yamano, S., Waxman, D. J., Lapenson, D. P., Meyer, U. A., Fischer, V. et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine *J.Biol.Chem.* 1989; **264**:10388-10395
53. Wrighton, S. A., Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P., Raucy, J. L. et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450 IIIA5 (HLp3) *Mol.Pharmacol.* 1990; **38**:207-213
54. Schuetz, J. D., Beach, D. L., and Guzelian, P. S. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver *Pharmacogenetics* 1994; **4**:11-20
55. Grogan, W. M., Phillips, V. M., Schuetz, E. G., Guzelian, P. S., and Watlington, C. O. Corticosterone 6 beta-hydroxylase in A6 epithelia: a steroid-inducible cytochrome P-450 *Am.J.Physiol* 1990; **258**:C480-C488
56. Schuetz, E. G., Schuetz, J. D., Strom, S. C., Thompson, M. T., Fisher, R. A., Molowa, D. T. et al. Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes *Hepatology* 1993; **18**:1254-1262
57. Walker, A. H., Jaffe, J. M., Gunasegaram, S., Cummings, S. A., Huang, C. S., Chern, H. D. et al. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. Mutations in brief no. 191. Online *Hum.Mutat.* 1998; **12**:289-
58. Ball, S. E., Scatina, J., Kao, J., Ferron, G. M., Fruncillo, R., Mayer, P. et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4 *Clin.Pharmacol.Ther.* 1999; **66**:288-294

59. Garcia-Martin, E., Martinez, C., Pizarro, R. M., Garcia-Gamito, F. J., Gullsten, H., Raunio, H. et al. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity *Clin.Pharmacol.Ther.* 2002; **71**:196-204
60. Paris, P. L., Kupelian, P. A., Hall, J. M., Williams, T. L., Levin, H., Klein, E. A. et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 1999; **8**:901-905
61. Sata, F., Sapone, A., Elizondo, G., Stocker, P., Miller, V. P., Zheng, W. et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity *Clin.Pharmacol.Ther.* 2000; **67**:48-56
62. Hamzeiy, H., Vahdati-Mashhadian, N., Edwards, H. J., and Goldfarb, P. S. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP *Mutat.Res.* 2002; **500**:103-110
63. Hsieh, K. P., Lin, Y. Y., Cheng, C. L., Lai, M. L., Lin, M. S., Siest, J. P. et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese *Drug Metab Dispos.* 2001; **29**:268-273
64. Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Watanabe, H., Shiseki, K., Saeki, M., Nakamura, T. et al. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population *Hum.Mutat.* 2004; **23**:100-
65. Eiselt, R., Domanski, T. L., Zibat, A., Mueller, R., Presecan-Siedel, E., Hustert, E. et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants *Pharmacogenetics* 2001; **11**:447-458
66. Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W. et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; **299**:825-831
67. Eap, C. B., Buclin, T., Hustert, E., Bleiber, G., Golay, K. P., Aubert, A. C. et al. Pharmacokinetics of midazolam in CY *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2004; **60**:231-236
68. Floyd, M. D., Gervasini, G., Masica, A. L., Mayo, G., George, A. L., Jr., Bhat, K. et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women *Pharmacogenetics* 2003; **13**:595-606

69. Ozdemir, V., Kalowa, W., Tang, B. K., Paterson, A. D., Walker, S. E., Endrenyi, L. et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method *Pharmacogenetics* 2000; **10**:373-388
70. Gonzalez, F. J., Schmid, B. J., Umeno, M., McBride, O. W., Hardwick, J. P., Meyer, U. A. et al. Human P450PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase *DNA* 1988; **7**:79-86
71. Westlind, A., Lofberg, L., Tindberg, N., Andersson, T. B., and Ingelman-Sundberg, M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999; **259**:201-205
72. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K. et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism *Pharmacogenetics* 2001; **11**:773-779
73. Roy, J. N., Lajoie, J., Zijenah, L. S., Barama, A., Poirier, C., Ward, B. J. et al. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations *Drug Metab Dispos.* 2005;
74. Chou, F. C., Tzeng, S. J., and Huang, J. D. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese *Drug Metab Dispos.* 2001; **29**:1205-1209
75. Balram, C., Zhou, Q., Cheung, Y. B., and Lee, E. J. CYP3A5*3 and *6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2003; **59**:123-126
76. Saeki, M., Saito, Y., Nakamura, T., Murayama, N., Kim, S. R., Ozawa, S. et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of CYP3A5 in a Japanese population *Hum.Mutat.* 2003; **21**:653-
77. Lee, S. J., Usmani, K. A., Chanas, B., Ghanayem, B., Xi, T., Hodgson, E. et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups *Pharmacogenetics* 2003; **13**:461-472
78. Michel Eichelbaum, eymour Garte, Joyce A Goldstein, Frank J Gonzalez, Fred F Kadlubar, Tetsuya Kamatakiet al. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee *Website* 2005;

79. van Schaik, R. H., van, d. H., I, van den Anker, J. N., and Lindemans, J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians *Clin.Chem.* 2002; **48**:1668-1671
80. Rogan, P. K., Svojanovsky, S., and Leeder, J. S. Information theory-based analysis of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 splicing mutations *Pharmacogenetics* 2003; **13**:207-218
81. Ratanasavanh, D., Beaune, P., Morel, F., Flinois, J. P., Guengerich, F. P., and Guillouzo, A. Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age *Hepatology* 1991; **13**:1142-1151
82. McKinnon, R. A., Burgess, W. M., Hall, P. M., Roberts-Thomson, S. J., Gonzalez, F. J., and McManus, M. E. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues *Gut* 1995; **36**:259-267
83. Watkins, P. B., Wrighton, S. A., Schuetz, E. G., Molowa, D. T., and Guzelian, P. S. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man *J.Clin.Invest* 1987; **80**:1029-1036
84. Murray, G. I., Barnes, T. S., Sewell, H. F., Ewen, S. W., Melvin, W. T., and Burke, M. D. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450 *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1988; **25**:465-475
85. Lown, K. S., Kolars, J. C., Thummel, K. E., Barnett, J. L., Kunze, K. L., Wrighton, S. A. et al. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test *Drug Metab Dispos.* 1994; **22**:947-955
86. Lechevrel, M., Casson, A. G., Wolf, C. R., Hardie, L. J., Flinterman, M. B., Montesano, R. et al. Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa *Carcinogenesis* 1999; **20**:243-248
87. Yokose, T., Doy, M., Taniguchi, T., Shimada, T., Kakiki, M., Horie, T. et al. Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues *Virchows Arch.* 1999; **434**:401-411
88. Murray, G. I., McFadyen, M. C., Mitchell, R. T., Cheung, Y. L., Kerr, A. C., and Melvin, W. T. Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer *Br.J.Cancer* 1999; **79**:1836-1842

89. Haehner, B. D., Gorski, J. C., Vandenbranden, M., Wrighton, S. A., Janardan, S. K., Watkins, P. B. et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans *Mol.Pharmacol.* 1996; **50**:52-59
90. Koch, I., Weil, R., Wolbold, R., Brockmoller, J., Hustert, E., Burk, O. et al. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA *Drug Metab Dispos.* 2002; **30**:1108-1114
91. Kivisto, K. T., Bookjans, G., Fromm, M. F., Griese, E. U., Munzel, P., and Kroemer, H. K. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1996; **42**:387-389
92. Kivisto, K. T., Griese, E. U., Fritz, P., Linder, A., Hakkola, J., Raunio, H. et al. Expression of cytochrome P 450 3A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of normal tissue and lung tumours *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1996; **353**:207-212
93. Hukkanen, J., Hakkola, J., Anttila, S., Piipari, R., Karjalainen, A., Pelkonen, O. et al. Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes *Mol.Carcinog.* 1997; **20**:224-230
94. Janardan, S. K., Lown, K. S., Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., and Watkins, P. B. Selective expression of CYP3A5 and not CYP3A4 in human blood *Pharmacogenetics* 1996; **6**:379-385
95. Nakamoto, T., Hase, I., Imaoka, S., Hiroi, T., Oda, Y., Asada, A. et al. Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin *Pharmacogenetics* 2000; **10**:571-575
96. Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily *Science* 1988; **240**:889-895
97. Beato, M. Gene regulation by steroid hormones *Cell* 1989; **56**:335-344
98. Schuetz, E. G., Schmid, W., Schutz, G., Brimer, C., Yasuda, K., Kamataki, T. et al. The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver *Drug Metab Dispos.* 2000; **28**:268-278

99. Wright, M. C., Wang, X. J., Pimenta, M., Ribeiro, V., Paine, A. J., and Lechner, M. C. Glucocorticoid receptor-independent transcriptional induction of cytochrome P450 3A1 by metyrapone and its potentiation by glucocorticoid *Mol.Pharmacol.* 1996; **50**:856-863
100. Westlind, A., Malmebo, S., Johansson, I., Otter, C., Andersson, T. B., Ingelman-Sundberg, M. et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43 *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001; **281**:1349-1355
101. Barwick, J. L., Quattrochi, L. C., Mills, A. S., Potenza, C., Tukey, R. H., and Guzelian, P. S. Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes *Mol.Pharmacol.* 1996; **50**:10-16
102. Pascussi, J. M., Jounaidi, Y., Drocourt, L., Domergue, J., Balabaud, C., Maurel, P. et al. Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999; **260**:377-381
103. Honkakoski, P. and Negishi, M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors *Biochem.J.* 2000; **347**:321-337
104. Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T., and Kliewer, S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions *J.Clin.Invest* 1998; **102**:1016-1023
105. Goodwin, B., Redinbo, M. R., and Kliewer, S. A. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2002; **42**:1-23
106. Baes, M., Gulick, T., Choi, H. S., Martinoli, M. G., Simha, D., and Moore, D. D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements *Mol.Cell Biol.* 1994; **14**:1544-1552
107. Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B. et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands *J.Biol.Chem.* 2000; **275**:15122-15127
108. Sueyoshi, T., Yokomori, N., Korach, K. S., and Negishi, M. Developmental action of estrogen receptor-alpha feminizes the growth hormone-Stat5b pathway and

expression of Cyp2a4 and Cyp2d9 genes in mouse liver *Mol.Pharmacol.* 1999; **56**:473-477

109. Tzamelis, I., Pissios, P., Schuetz, E. G., and Moore, D. D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR *Mol.Cell Biol.* 2000; **20**:2951-2958
110. Xie, W., Barwick, J. L., Simon, C. M., Pierce, A. M., Safe, S., Blumberg, B. et al. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR *Genes Dev.* 2000; **14**:3014-3023
111. Goodwin, B., Hodgson, E., D'Costa, D. J., Robertson, G. R., and Liddle, C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor *Mol.Pharmacol.* 2002; **62**:359-365
112. Zelko, I., Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Moore, R., and Negishi, M. The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver *Mol.Cell Biol.* 2001; **21**:2838-2846
113. Fellay, J., Marzolini, C., Meaden, E. R., Back, D. J., Buclin, T., Chave, J. P. et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study *Lancet* 2002; **359**:30-36
114. Kessel, D. and Bosmann, H. B. On the characteristics of actinomycin D resistance in L5178Y cells *Cancer Res.* 1970; **30**:2695-2701
115. Dano, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells *Biochim.Biophys.Acta* 1973; **323**:466-483
116. Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I. et al. Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification *Science* 1986; **232**:643-645
117. Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A. et al. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1986; **83**:4538-4542
118. Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., and Pastan, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; **84**:265-269

119. Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V. et al. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein *Biochem.Biophys.Res Commun.* 1986; **141**:956-962
120. Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells *Cell* 1986; **47**:381-389
121. Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C. J., Roninson, I. B., Gottesman, M. M., and Pastan, I. The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation *J Biol Chem.* 1987; **262**:505-508
122. Gros, P., Ben Neriah, Y. B., Croop, J. M., and Housman, D. E. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance *Nature* 1986; **323**:728-731
123. Hrycyna, C. A., Airan, L. E., Germann, U. A., Ambudkar, S. V., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport *Biochemistry* 1998; **37**:13660-13673
124. Azzaria, M., Schurr, E., and Gros, P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance *Mol.Cell Biol.* 1989; **9**:5289-5297
125. Ambudkar, S. V., Cardarelli, C. O., Pashinsky, I., and Stein, W. D. Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein *J.Biol.Chem.* 1997; **272**:21160-21166
126. Shapiro, A. B. and Ling, V. Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein *Eur.J.Biochem.* 1998; **254**:189-193
127. Senior, A. E. Catalytic mechanism of P-glycoprotein *Acta Physiol Scand.Suppl* 1998; **643**:213-218
128. Senior, A. E. and Gadsby, D. C. ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR *Semin.Cancer Biol.* 1997; **8**:143-150
129. Senior, A. E., al Shawi, M. K., and Urbatsch, I. L. The catalytic cycle of P-glycoprotein *FEBS Lett.* 1995; **377**:285-289
130. Sauna, Z. E. and Ambudkar, S. V. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes *J.Biol.Chem.* 2001; **276**:11653-11661

131. Liu, R. and Sharom, F. J. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains *Biochemistry* 1996; **35**:11865-11873
132. Ford, J. M. and Hait, W. N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer *Pharmacol.Rev.* 1990; **42**:155-199
133. Gottesman, M. M., Pastan, I., and Ambudkar, S. V. P-glycoprotein and multidrug resistance *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1996; **6**:610-617
134. Huisman, M. T., Smit, J. W., and Schinkel, A. H. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors *AIDS* 2000; **14**:237-242
135. Zhang, Y. and Benet, L. Z. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein *Clin Pharmacokinet.* 2001; **40**:159-168
136. Jones, P. M. and George, A. M. A new structural model for P-glycoprotein *J Membr.Biol* 1998; **166**:133-147
137. Loo, T. W. and Clarke, D. M. Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers *J Biol Chem.* 2001; **276**:36877-36880
138. Sakaeda, T., Nakamura, T., and Okumura, K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs *Pharmacogenomics.* 2003; **4**:397-410
139. Chen, C. J., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins *J.Biol.Chem.* 1990; **265**:506-514
140. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., Johne, A. et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**:3473-3478
141. Kim, R. B., Leake, B. F., Choo, E. F., Dresser, G. K., Kubba, S. V., Schwarz, U. I. et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans *Clin.Pharmacol.Ther.* 2001; **70**:189-199
142. Rund, D., Azar, I., and Shperling, O. A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease *Adv.Exp.Med.Biol.* 1999; **457**:71-75

143. Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y. et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; **297**:1137-1143
144. Tang, K., Ngoi, S. M., Gwee, P. C., Chua, J. M., Lee, E. J., Chong, S. S. et al. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations *Pharmacogenetics* 2002; **12**:437-450
145. Ifergan, I. Étude du Polymorphisme du gène humain MDR-1 en relation avec l'infection au virus de l'immunodéficience humaine 2002;
146. Kivisto, K. T., Niemi, M., and Fromm, M. F. Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein *Fundam.Clin Pharmacol* 2004; **18**:621-626
147. Muller, M. and Jansen, P. L. Molecular aspects of hepatobiliary transport *Am.J.Physiol* 1997; **272**:G1285-G1303
148. Bigger, J. T., Jr. The quinidine-digoxin interaction *Mod.Concepts Cardiovasc.Dis.* 1982; **51**:73-78
149. Su, S. F. and Huang, J. D. Inhibition of the intestinal digoxin absorption and exsorption by quinidine *Drug Metab Dispos.* 1996; **24**:142-147
150. Beaulieu, E., Demeule, M., Ghitescu, L., and Beliveau, R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain *Biochem.J.* 1997; **326** (Pt 2):539-544
151. Drach, D., Zhao, S., Drach, J., Mahadevia, R., Gattringer, C., Huber, H. et al. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype *Blood* 1992; **80**:2729-2734
152. Lankas, G. R., Wise, L. D., Cartwright, M. E., Pippert, T., and Umbenhauer, D. R. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice *Reprod.Toxicol.* 1998; **12**:457-463
153. Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H. et al. Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein *Eur.J Pharmacol* 2000; **408**:1-10
154. Smit, J. W., Huisman, M. T., van Tellingen, O., Wiltshire, H. R., and Schinkel, A. H. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure *J Clin Invest* 1999; **104**:1441-1447

155. Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E., Rigal, D., and Baggetto, L. G. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views *Biochem.Pharmacol* 2002; **64**:943-948
156. van Groenigen, M., Valentijn, L. J., and Baas, F. Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter *Biochim.Biophys.Acta* 1993; **1172**:138-146
157. Smale, S. T. and Baltimore, D. The "initiator" as a transcription control element *Cell* 1989; **57**:103-113
158. Cornwell, M. M. and Smith, D. E. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity *J.Biol.Chem.* 1993; **268**:19505-19511
159. Bouwman, P. and Philipsen, S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors *Mol.Cell Endocrinol.* 2002; **195**:27-38
160. Chu, S. and Ferro, T. J. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation *Gene* 2005; **348**:1-11
161. McCoy C, McGee SB, and Cornell MM. The wilms tumor supressor WT1 inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate activation of the multidrug-resistance-1 promoter *Cell Growth Differentiation* 1999;377-386
162. Sundseth, R., MacDonald, G., Ting, J., and King, A. C. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter *Mol.Pharmacol.* 1997; **51**:963-971
163. Jin, S. and Scotto, K. W. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y *Mol.Cell Biol.* 1998; **18**:4377-4384
164. Roder, K., Wolf, S. S., Larkin, K. J., and Schweizer, M. Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1 *Gene* 1999; **234**:61-69
165. Nguyen, K. T., Liu, B., Ueda, K., Gottesman, M. M., Pastan, I., and Chin, K. V. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants *Oncol.Res.* 1994; **6**:71-77
166. Daschner, P. J., Ciolino, H. P., Plouzek, C. A., and Yeh, G. C. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells *Breast Cancer Res.Treat.* 1999; **53**:229-240

167. Combates, N. J., Rzepka, R. W., Chen, Y. N., and Cohen, D. NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter *J.Biol.Chem.* 1994; **269**:29715-29719
168. Chin, K. V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., and Gottesman, M. M. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells *J.Biol.Chem.* 1990; **265**:221-226
169. Yamada, T., Takaoka, A. S., Naishiro, Y., Hayashi, R., Maruyama, K., Maesawa, C. et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis *Cancer Res.* 2000; **60**:4761-4766
170. Geick, A., Eichelbaum, M., and Burk, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin *J.Biol.Chem.* 2001; **276**:14581-14587
171. Burk, O., Arnold, K. A., Geick, A., Tegude, H., and Eichelbaum, M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression *Biol.Chem.* 2005; **386**:503-513
172. Macphee, I. A., Fredericks, S., Mohamed, M., Moreton, M., Carter, N. D., Johnston, A. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians *Transplantation* 2005; **79**:499-502
173. Macphee, I. A., Fredericks, S., Tai, T., Syrris, P., Carter, N. D., Johnston, A. et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation *Am.J.Transplant.* 2004; **4**:914-919
174. Hesselink, D. A., van Schaik, R. H., van, d. H., I, van der, W. M., Gregoor, P. J., Lindemans, J. et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus *Clin.Pharmacol.Ther.* 2003; **74**:245-254
175. Zheng, H., Zeevi, A., Schuetz, E., Lamba, J., McCurry, K., Griffith, B. P. et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism *J.Clin.Pharmacol.* 2004; **44**:135-140
176. Goto, M., Masuda, S., Kiuchi, T., Ogura, Y., Oike, F., Okuda, M. et al. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation *Pharmacogenetics* 2004; **14**:471-478

177. Kamdem, L. K., Streit, F., Zanger, U. M., Brockmoller, J., Oellerich, M., Armstrong, V. W. et al. Contribution of CYP3A5 to the in Vitro Hepatic Clearance of Tacrolimus *Clin.Chem.* 2005;
178. Tsuchiya, N., Satoh, S., Tada, H., Li, Z., Ohyama, C., Sato, K. et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients *Transplantation* 2004; **78**:1182-1187
179. Tada, H., Tsuchiya, N., Satoh, S., Kagaya, H., Li, Z., Sato, K. et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients *Transplant.Proc.* 2005; **37**:1730-1732
180. Zhao, Y., Song, M., Guan, D., Bi, S., Meng, J., Li, Q. et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus *Transplant.Proc.* 2005; **37**:178-181
181. Haufroid, V., Mourad, M., Van, K., V, Wawrzyniak, J., De Meyer, M., Eddour, D. C. et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients *Pharmacogenetics* 2004; **14**:147-154
182. Mai, I., Perloff, E. S., Bauer, S., Goldammer, M., John, A., Filler, G. et al. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2004; **58**:548-553
183. Iscan, M., Klaavuniemi, T., Coban, T., Kapucuoglu, N., Pelkonen, O., and Raunio, H. The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue *Breast Cancer Res.Treat.* 2001; **70**:47-54
184. Hitzl, M., Drescher, S., van der, K. H., Schaffeler, E., Fischer, J., Schwab, M. et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells *Pharmacogenetics* 2001; **11**:293-298
185. Macphee, I. A., Fredericks, S., Tai, T., Syrris, P., Carter, N. D., Johnston, A. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement *Transplantation* 2002; **74**:1486-1489
186. Yamauchi, A., Ieiri, I., Kataoka, Y., Tanabe, M., Nishizaki, T., Oishi, R. et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene *Transplantation* 2002; **74**:571-572

187. Anglicheau, D., Verstuyft, C., Laurent-Puig, P., Becquemont, L., Schlageter, M. H., Cassinat, B. et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003; **14**:1889-1896
188. Zheng, H., Schuetz, E., Zeevi, A., Zhang, J., McCurry, K., Webber, S. et al. Sequential analysis of tacrolimus dosing in adult lung transplant patients with ABCB1 haplotypes *J.Clin.Pharmacol.* 2005; **45**:404-410
189. Engman, H. A., Lennernas, H., Taipalensuu, J., Otter, C., Leidvik, B., and Artursson, P. CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies *J.Pharm.Sci.* 2001; **90**:1736-1751
190. Lee, S. J., Bell, D. A., Coulter, S. J., Ghanayem, B., and Goldstein, J. A. Recombinant CYP3A4*17 is defective in metabolizing the hypertensive drug nifedipine, and the CYP3A4*17 allele may occur on the same chromosome as CYP3A5*3, representing a new putative defective CYP3A haplotype *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2005; **313**:302-309
191. van Schaik, R. H., de Wildt, S. N., van Iperen, N. M., Uitterlinden, A. G., van den Anker, J. N., and Lindemans, J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians *Clin.Chem.* 2000; **46**:1834-1836
192. Ifergan, I., Bernard, N. F., Bruneau, J., Alary, M., Tsoukas, C. M., and Roger, M. Allele frequency of three functionally active polymorphisms of the MDR-1 gene in high-risk HIV-negative and HIV-positive Caucasians *AIDS* 2002; **16**:2340-2342
193. Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M. et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects *Clin Pharmacol Ther.* 2001; **69**:169-174
194. Gerloff, T., Schaefer, M., Johne, A., Oselin, K., Meisel, C., Cascorbi, I. et al. MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males *Br J Clin Pharmacol* 2002; **54**:610-616
195. Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T. et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology *Kidney Int* 1999; **55**:713-723
196. von Ahsen, N., Richter, M., Grupp, C., Ringe, B., Oellerich, M., and Armstrong, V. W. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough

concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients
Clin.Chem. 2001; **47**:1048-1052

197. Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P., and Vilarem, M. J. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors *Biochim.Biophys.Acta* 2003; **1619**:243-253
198. Clase, C. M., Mahalati, K., Kiberd, B. A., Lawen, J. G., West, K. A., Fraser, A. D. et al. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling *Am.J.Transplant.* 2002; **2**:789-795
199. Thervet, E., Anglicheau, D., King, B., Schlageter, M. H., Cassinat, B., Beaune, P. et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients *Transplantation* 2003; **76**:1233-1235
200. Zheng, H., Webber, S., Zeevi, A., Schuetz, E., Zhang, J., Bowman, P. et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms *Am.J.Transplant.* 2003; **3**:477-483