

Université de Montréal

**Identification de déterminants pharmacogénétiques prédictifs des concentrations des médicaments à l'aide de grandes cohortes observationnelles**

Par

Maxime Meloche-Brouillette

Faculté de pharmacie

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophæ Doctor (Ph.D.)  
en sciences pharmaceutiques – option Pharmacogénomique

Le 29 avril 2022

© Maxime Meloche-Brouillette, 2022

Université de Montréal  
Études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :  
Identification de déterminants pharmacogénétiques prédictifs des concentrations des  
médicaments à l'aide de grandes cohortes observationnelles

présentée par  
Maxime Meloche-Brouillette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pre Marie Lordkipanidzé, présidente-rapporteuse

Pr. Simon de Denus, directeur de recherche

Pr. Grégoire Leclair, co-directeur de recherche

Dr. Jean-Sébastien Lebon, membre du jury

Pre Isabelle Laverdière, examinatrice externe

## Résumé

La pharmacogénomique (PGx) étudie le concept selon lequel les déterminants génétiques peuvent aider à prédire la réponse clinique d'un patient aux médicaments. Les concentrations plasmatiques de ces derniers sont essentielles pour déterminer l'exposition, les profils pharmacocinétiques (PK), les effets cliniques et éventuellement les doses des médicaments, dont la plupart sont métabolisés par des enzymes hépatiques, les cytochromes P450 (CYPs). Néanmoins, la plupart des découvertes en matière de PGx concernant la prédiction des profils de concentrations des médicaments ont généralement recours à des plans d'études PK traditionnels avec une approche fonctionnelle. Bien qu'utile, cette méthodologie comporte des limites pour les études PGx, notamment le nombre restreint de sujets inclus, qui réduit la puissance statistique des associations PGx et limite l'identification de nouveaux variants génétiques moins fréquents. À l'inverse, les grandes cohortes observationnelles sont largement utilisées pour identifier des marqueurs génétiques physiopathologiques. Cette thèse de doctorat visait donc à 1) synthétiser les données publiées concernant les effets cliniques des polymorphismes génétiques de l'enzyme CYP2D6 sur le traitement au métoprolol, un agent  $\beta$ -bloquant. Les concentrations plasmatiques de métoprolol ont montré à plusieurs reprises qu'elles étaient fortement influencées par la PGx du CYP2D6; 2) développer une nouvelle méthode bioanalytique capable de quantifier les concentrations chirales de métoprolol des patients dans un contexte clinique; 3) mener une étude clinique en utilisant une grande cohorte observationnelle, ou biobanque, comme preuve de concept pour recréer l'association précédemment établie entre les phénotypes inférés des génotypes du CYP2D6 et les concentrations plasmatiques de métoprolol. Ces projets sont présentés en tant que chapitres de thèse et sous forme de manuscrits publiés. Le premier projet consistait en une revue systématique qui a permis d'extraire toutes les études relatives à la PGx du métoprolol-CYP2D6. La synthèse qualitative a suggéré que les métaboliseurs lents du CYP2D6, dépourvus de capacité enzymatique, avaient des valeurs plus élevées concernant les réductions de la fréquence cardiaque et de tension artérielle, ainsi que la survenue d'épisodes bradycardiques relativement aux autres phénotypes. Une méta-analyse ultérieure a confirmé la significativité de ces associations. Le deuxième projet a combiné des techniques bioanalytiques telles que la dérivation, l'extraction en phase solide et la chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem. Une méthode permettant de surmonter les limites analytiques antérieures a été validée avec succès pour mesurer les concentrations plasmatiques de (*S*)-métoprolol, l'énantiomère pharmacologiquement actif, et de

son métabolite spécifique au CYP2D6. L'applicabilité d'une telle méthode a ensuite été démontrée grâce aux échantillons d'un groupe de patients issus de la Cohorte Hospitalière de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM). Puis, le troisième projet présente la réalisation de l'étude LEVEL-PGx (LEVERaging Large observational cohort studies to identify pharmacogenetic determinants of drug dosing : A proof-of-concept study in the Montreal Heart Institute Hospital Cohort). L'étude portait sur un échantillon de >1000 patients sélectionnés dans la cohorte hospitalière de l'ICM, incluant leur génotypage pour *CYP2D6* et la quantification du métoprolol racémique et de son métabolite spécifique au CYP2D6 dans des échantillons provenant de la Biobanque de l'ICM. Un seul échantillon unique et aléatoire par patient a été utilisé. Le recours à des modèles multivariés a validé le concept selon lequel de grandes cohortes transversales recueillant des échantillons biologiques pouvaient être utilisées afin d'identifier des associations PGx de concentrations de médicaments et ce, à des valeurs satisfaisant les seuils de significativité d'essais pangénomiques. D'autres analyses de cette cohorte ont indiqué que cette méthodologie parvenait à identifier des associations PGx qui influençaient la fréquence cardiaque au repos et la posologie du métoprolol à-travers les phénotypes du CYP2D6 et pour les déterminants génétiques uniques, même en présence de co-médications. Cependant, ces associations PGx avec les paramètres cliniques n'ont pas atteint une significativité applicable aux seuils pangénomiques. En résumé, par la reproduction d'une association PGx préalablement démontrée, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse suggère que l'identification et la découverte de nouveaux déterminants génétiques prédictifs des concentrations et des doses des médicaments pourrait s'effectuer par le biais de grandes cohortes observationnelles à l'échelle du génome. Ces approches permettraient de développer des modèles prédictifs plus précis de l'exposition et de la réponse aux médicaments, ce qui pourrait favoriser les découvertes PGx et, dans certains cas, éventuellement développer le potentiel translationnel d'une approche thérapeutique personnalisée selon le profil génétique des patients.

**Mots clés :** Pharmacogénomique; Bioanalyse; Concentrations de médicaments; Biobanques; Dose; Métoprolol;  $\beta$ -bloquants; Cytochrome P450 2D6; Génotype; Phénotype; Pharmacocinétique.

## Abstract

Pharmacogenomics (PGx) studies the concept that genetic determinants can help predict a patient's clinical response to therapies. Drug concentrations are an essential component to determining the exposure, pharmacokinetic (PK) profiles, clinical effects, and potentially drug doses, most of which are metabolized through the cytochrome P450 (CYPs) liver enzymes. Nevertheless, most PGx discoveries regarding the prediction of drug concentration profiles have generally resorted to traditional PK study designs with a functional approach. Though useful, this methodology contains limitations for gene-drug interaction studies, most notably the restricted number of subjects included, which reduces the statistical power for PGx associations and limits the identification of new, less frequent genetic variants. On the opposite, large observational cohorts have long been utilized for identifying genetic markers of disease. This doctoral thesis therefore aimed to 1) synthesize published data regarding the clinical effects of CYP2D6 genetic polymorphism on metoprolol therapy. A  $\beta$ -blocker, metoprolol plasma concentrations have shown repeatedly to be heavily influenced by the PGx of the CYP2D6 enzyme; 2) develop a new bioanalytical method able to quantify patients' chiral concentrations of metoprolol in a clinical setting; 3) conduct a clinical study using a large observational cohort, or biobank, as a proof of concept to recreate the previously established association between CYP2D6 genotype-inferred phenotypes and metoprolol plasma concentrations. Those projects are presented as thesis chapters in the form of published manuscripts. The first project was a systematic review that allowed us to find all studies pertaining to the PGx of metoprolol. The qualitative synthesis suggested that CYP2D6 poor metabolizers (PMs), without enzymatic capacity, had greater values regarding reductions in heart rate, blood pressures, and occurrences in bradycardia relative to non-PMs. A subsequent meta-analysis confirmed the significance of those associations. The second project combined bioanalytical techniques such as derivatization, solid phase extraction, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. A method overcoming previous analytical shortcomings was successfully validated to measure (*S*)-metoprolol plasma concentrations and its CYP2D6-specific metabolite. Its application was later demonstrated in a group of patients from the Montreal Heart Institute (MHI) Hospital Cohort. Then, the third project presents the conduct of the LEVEL-PGx study (LEVERaging Large observational cohort studies to identify pharmacogenetic determinants of drug dosing: A proof-of-concept study in the Montreal Heart Institute Hospital Cohort). The study implicated a sample of >1000 selected patients selected from the MHI Hospital Cohort, along

with the genotyping of *CYP2D6*, and the quantification of racemic metoprolol and its CYP2D6-specific metabolite in samples from the MHI Biobank. A single, random sample per patient was used. Multivariable modeling validated the concept that large observational cohorts collecting biospecimens could be utilized to identify PGx associations of drug concentrations with genome-wide significance. Further analyses in our cohort indicated that the tested PGx associations influenced resting heart rate and metoprolol daily drug dosage across CYP2D6 phenotypes and for single genetic determinants, regardless of interfering comedications. However, such PGx associations with clinical parameters could not achieve genome-wide significance. In summary, the body of work presented in this thesis suggested that, using a previously validated PGx association, the identification of novel genetic determinants predictive of drug concentrations and dosage could be discovered and identified at the genome-wide level with large observational cohorts. These approaches would help develop more accurate predictive models of drug exposure and response, which could favor PGx discoveries and the translational potential of a personalized approach to treatments according to a patient's genetic profile.

**Keywords:** Pharmacogenomics; Bioanalysis; Drug concentrations; Biobanks; Dosage; Metoprolol;  $\beta$ -blockers; Cytochrome P450 2D6; Genotype; Phenotype; Pharmacokinetics.

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Contributions des auteurs</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
1    La pharmacocinétique : concepts ADME .....	1
1.1    Absorption.....	2
1.2    Distribution .....	4
1.3    Métabolisme.....	5
1.3.1    Précisions sur les cytochromes P450 .....	5
1.4    Élimination.....	6
1.5    Pharmacocinétique clinique .....	7
2    Génétique et pharmacogénomique.....	8
2.1    Quelques généralités de génétique.....	8
2.2    Redéfinir le rôle du génome.....	13
2.3    La pharmacogénomique.....	14
2.3.1    Approches méthodologiques.....	15
2.3.1.1    Approche par gène candidat.....	17
2.3.1.2    Approche pangénomique .....	22
2.3.2    Ressources et consortiums pharmacogénomiques .....	27
2.4    Pharmacogénomique et métabolisme des médicaments : implications du CYP2D6 ...	29
2.4.1    Structure génétique, variations de séquence et nomenclature allélique.....	30
2.4.2    Phénotypage : des substrats marqueurs jusqu'aux génotypes .....	31
2.4.3    Pointage allélique et inférence phénotypique .....	34
2.4.4    Distribution populationnelle .....	36
2.4.5    Phénoconversion et facteurs influençant le métabolisme du CYP2D6 .....	37
2.4.6    Recommandations cliniques face à la pharmacogénomique du CYP2D6.....	38
2.5    Les biobanques comme outil de recherche biomédicale.....	40
2.5.1    Types et portée des biobanques .....	41
2.5.1.1    Biobanques populationnelles .....	41
2.5.1.2    Biobanques de cohorte.....	42

2.5.2	Biobanques, pharmacogénomique et métabolisme : le grand vide.....	44
3	Agents $\beta$ -bloqueurs .....	45
3.1	Généralités sur le système nerveux adrénergique.....	45
3.1.1	Principes physiologiques et signalisation sympathique.....	45
3.1.2	Récepteurs adrénergiques .....	46
3.1.2.1	Physiologie du récepteur $\beta_1$ -adrénergique .....	47
3.1.2.2	Mécanismes physiopathologiques : suractivation, désensibilisation et internalisation.....	48
3.1.2.3	Résumés des autres récepteurs adrénergiques .....	49
3.2	Classes pharmacologiques des $\beta$ -bloqueurs.....	50
3.2.1	Cardiosélectivité : de la première à la deuxième génération de $\beta$ -bloqueurs .....	51
3.2.2	Agents sympathomimétiques intrinsèques.....	51
3.2.3	Agents sympatholytiques.....	52
3.2.4	Effets hors-cibles, ou les $\beta$ -bloqueurs de troisième génération .....	52
3.3	Pharmacocinétique des $\beta$ -bloqueurs .....	53
3.4	Survol de l'usage des $\beta$ -bloqueurs en clinique .....	55
3.4.1	Défaillance cardiaque.....	55
3.4.2	Hypertension.....	56
3.4.3	Maladies coronariennes .....	57
3.4.4	Arythmies.....	57
3.4.5	Autres considérations de pharmacologie clinique .....	57
3.5	Sur la stéréochimie des $\beta$ -bloqueurs .....	58
4	Pharmacogénétique des $\beta$ -bloqueurs .....	61
4.1	Cibles polymorphiques connues .....	61
4.1.1	<i>ADRB1</i> .....	61
4.1.2	<i>ADRB2</i> .....	62
4.1.3	<i>ADRA2C</i> .....	63
4.1.4	<i>CYP2D6</i> .....	63
4.1.5	<i>GKR4</i> et <i>GRK5</i> .....	65
4.2	Études pangénomiques : nouvelles approches, nouveaux variants.....	66
5	Résumé de l'état des connaissances, hypothèses et objectifs .....	67

**Chapitre 2 : Connaissances actuelles de l'impact du polymorphisme génétique du cytochrome P450 2D6 sur la réponse clinique au métoprolol – Synthèse, revue systématique et méta-analyse .....** **69**

1	Introduction.....	69
2	Manuscrit n° 1 (publié dans <i>Br J Clin Pharmacol.</i> 2020;86(6):1015-33).....	71
3	Discussion.....	108



<b>Chapitre 3 : Bioanalyse chirale et quantification simultanée du métoprolol et de son métabolite spécifique au CYP2D6 .....</b>	<b>112</b>
1 Introduction.....	112
2 Manuscrit n° 2 (publié dans <i>J Pharm Biomed Anal.</i> 2021;204:114263).....	116
3 Discussion.....	140
<b>Chapitre 4 : Identification de déterminants pharmacogénétiques par mesures des concentrations plasmatiques de métoprolol à l'aide d'une biobanque .....</b>	<b>144</b>
1 Introduction.....	144
2 Manuscrit n° 3 (publié dans <i>Clin Transl Sci.</i> 2022; 15: 1063-1073).....	148
3 Discussion.....	172
<b>Chapitre 5 : Discussion générale .....</b>	<b>177</b>
1 Résumé des volets abordés dans cette thèse .....	177
2 Résultats principaux des avancées scientifiques présentées .....	178
3 Avancées des connaissances, retombées potentielles et perspectives d'avenir .....	179
3.1 Sur l'utilisation des biobanques en recherche pharmacogénomique .....	179
3.2 Métabolisme des médicaments et progrès des méthodologies pharmacogénomiques	180
3.3 Pharmacocinétique et pharmacodynamie : vers de nouvelles conceptions d'essais pharmacogénomiques ?.....	183
3.4 Bénéficiaire de la détection des variants rares.....	184
3.5 À propos des scores de risques polygéniques.....	185
3.6 Résoudre les enjeux contemporains des biobanques pour augmenter le potentiel translationnel de la pharmacogénomique.....	186
<b>Conclusion .....</b>	<b>191</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>192</b>
<b>Annexe 1 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 1 .....</b>	<b>i</b>
<b>Annexe 2 – Analyses supplémentaires, Manuscrit n° 1 .....</b>	<b>viii</b>
<b>Annexe 3 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 2 .....</b>	<b>xxv</b>
<b>Annexe 4 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 3 .....</b>	<b>xxvii</b>
<b>Annexe 5 – Article supplémentaire .....</b>	<b>xxxv</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1	Termes clés en génétique. <sup>29,30,36,37</sup> .....	10
Tableau 2	Avantages et limites des approches méthodologiques générales en pharmacogénomique. <sup>70,71,75-77</sup> .....	16
Tableau 3	Classification phénotypique du CYP2D6 selon les pointages génotypiques. <sup>182</sup> .....	35
Tableau 4	Propriétés pharmacologiques de $\beta$ -bloqueurs communs. <sup>263,266-270</sup> .....	50
Tableau 5	Propriétés pharmacocinétiques de $\beta$ -bloqueurs communs. <sup>263,266,267,289,290</sup> .....	54

## Liste des figures

Figure 1	Du métabolisme à l'effet pharmacologique d'une drogue .....	2
Figure 2	Exemples de prodrogue inefficace et de molécule active toxique influencée par la pharmacogénomique d'enzymes métaboliques .....	20
Figure 3	Diagramme de Venn et aperçu des implications pharmacogénomiques de diverses cibles métaboliques dans différentes aires thérapeutiques majeures .....	30
Figure 4	Processus d'attribution phénotypique pour le CYP2D6.....	36
Figure 5	Comparaisons des coûts médians par participants (gauche) et de la durée médiane des études (droite) des essais pharmacogénomiques traditionnels financés et ceux initiés à partir d'une biobanque.....	43
Figure 6	Signalisation cardiomyocytaire $\beta_1$ -adrénergique .....	47
Figure 7	Désensibilisation et internalisation des récepteurs adrénérgiques suivant une suractivation prolongée par agonistes. ....	49
Figure 8	Structures arylaminoéthanol (gauche) et aryloxyaminopropanol (droite). ....	59
Figure 9	Métoprolol et $\alpha$ -hydroxymétoprolol .....	112
Figure 10	Schématisation des manipulations requises pour le développement de la méthode bioanalytique présentée.....	115
Figure 11	Enjeux généraux liés aux biobanques avec données (pharmaco)génomiques. ....	187

## Liste des abréviations

<b>Abréviation/Terme</b>	<b>Définition</b>
1KGP	1000 Genomes Project
AC	Adénylyl cyclase
ADRA2C	Récepteur pré-jonctionnel $\alpha_{2C}$ -adrénergique (adrenoceptor alpha 2C)
ADRB1	Récepteur $\beta_1$ -adrénergique (adrenoceptor beta 1)
ADRB	Récepteur $\beta_2$ -adrénergique (adrenoceptor beta 1)
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AUC	Area under the concentration-time curve (aussi appelé exposition)
ASI	Activité sympathomimétique intrinsèque
BEST	$\beta$ -Blocker Evaluation of Survival Trial
CDS	Clinical decision support
Cl/F	Clairance totale (aussi appelée clairance orale), divisée par la biodisponibilité (F) du médicament
C <sub>max</sub>	Concentrations plasmatiques maximales
CPIC	Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium
CPNDS	Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety
CNS	Système nerveux central
CYP	Cytochrome P450
DPWG	Dutch Pharmacogenetics Working Group
eMERGE	electronic Medical Records and Genomics
FC	Fréquence cardiaque
FDA	Food and Drug Administration
IGNITE	Implementing GeNomics In pracTicE
GPCR	Récepteur couple a une protéine G (G-protein coupled receptor)
GRK4/5	Kinase associée au récepteur couplé à une protéine G (G-protein coupled receptor kinase 4/5)
GWAS	Genome-wide association study
HER2	Récepteur au facteur de croissance épidermique (Human epidermal growth factor receptor 2)
HGP	Human Genome Project
HLA	Human leukocyte antigen
ICM	Institut de Cardiologie de Montréal
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MERIT-HF	Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive Heart Failure
NO	Nitric oxide

<b>Abréviation/Terme</b>	<b>Définition</b>
<i>OR10P1</i>	Olfactory receptor 10P1
PCR	Polymerase chain reaction
PEAR	Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses
PGRN	Pharmacogenomics Global Research Network
PGx	Pharmacogénomique
PharmGKB	Pharmacogenomics Knowledge Base
PharmVar	Pharmacogene Variation Consortium
PK	Pharmacocinétique
PKA	Protéine kinase A
PD	Pharmacodynamie (employé interchangeablement avec Pharmacodynamique)
PRiME	Process, robustness, improvements, matrix effects, ease of use
RNPGx	Réseau francophone de Pharmacogénétique
<i>SNX9</i>	Sorting nexin-9
SPE	Solid phase extraction
SRP	Score de risque polygénique
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie d'élimination
TAD	Tension artérielle diastolique
TAS	Tension artérielle systolique
VD	Volume de distribution
VKORC1	Sous-unité 1 du complexe époxyde réductase de la vitamine K (Vitamin K epOxide Reductase Complex subunit 1)

*À mon père,  
qui n'aura pu contempler à temps  
les fruits de ces périls.*

*« Le doute n'est pas une condition agréable,  
mais la certitude est absurde. »*

– Voltaire

*« The essence of the independent mind lies not in what it thinks,  
but in how it thinks. »*

– Christopher Hitchens, auteur

*« Progress in science depends on new techniques, new discoveries, and new ideas,  
probably in that order. »*

– Sydney Brenner, biologiste et lauréat du prix Nobel de Médecine

## Remerciements

Cette thèse est le résultat d'années d'efforts, de patience, de persévérance, ainsi que de croissance personnelle et professionnelle. Je ne serais pas parvenu à compléter cette thèse si ce n'était de l'aide des personnes que j'aurai côtoyées dans le cadre de mon parcours doctoral. Nommer tous ceux et celles qui ont contribué à mon succès est impossible, mais plusieurs mentions sont de mise.

D'abord, il est essentiel de remercier mon directeur de recherche, Simon de Denus, pour son encadrement, sa confiance et sa disponibilité. Suivi immédiatement est mon co-directeur, Grégoire Leclair, pour tout le support et les solutions fournies. Leurs conseils auront approfondi ma pensée critique et éclairé la réalisation de mes projets de recherche. Leur ouverture, leur patience et leur optimisme à-travers nos conversations auront rendu ces quatre années agréables.

Je remercie Pre Marie Lordkipanidzé, Dr. Jean-Sébastien Lebon et Pre Isabelle Laverdière d'avoir acceptés volontairement de participer à mon jury de thèse.

Un grand merci à Pre Marie-Pierre Dubé et le groupe du centre de Pharmacogénomique pour toute l'aide fournie durant l'accomplissement de cette thèse, sans oublier tous les autres membres du personnel de recherche de l'Institut de Cardiologie.

Je tiens à remercier Dre Christine Henri pour sa participation à mon comité de parrainage et pour ses recommandations pertinentes.

Je remercie Martin, Mihaela et Isabelle de la Plateforme de Biopharmacie pour tous les bons moments passés au laboratoire en leur complicité. Si je n'ai rien cassé, c'est grâce à eux !

À eux s'ajoutent évidemment tous mes collègues de la faculté sans qui ces études graduées seraient incomplètes. J'aurai certainement développé de sincères amitiés durant ces années. Je leur suis reconnaissant pour la légèreté qu'ils ont ajouté à mon parcours et avec qui j'aurai ressenti beaucoup moins d'incertitude.

Ces dernières lignes soulignent le soutien inconditionnel exprimé par mes amis et ma famille sans jamais ne l'avoir demandé. J'en aurai eu besoin sans jamais ne vous l'avoir avoué.

## Contributions des auteurs

### Chapitre 2

**Meloche M**, Khazaka M, Kassem I, Barhdadi A, Dubé MP, de Denus S. CYP2D6 polymorphism and its impact on the clinical response to metoprolol: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2020;86(6):1015-33.

Je suis l'auteur principal de cet article. Ainsi, dans le cadre de ces travaux, j'aurai conçu la stratégie de recherche itérative des bases de données biomédicales, défini les mots-clés liés à l'inclusion et l'exclusion des études, identifié et extrait les données qualitatives pour la revue systématique et les données quantitatives servant aux méta-analyses, participé à la rédaction du code informatique pour effectuer les méta-analyses, analysé et interprété les données et les méta-analyses générées, rédiger l'entièreté de la première version et réviser le manuscrit, en plus de l'avoir soumis aux journaux scientifiques ciblés.

Michael Khazaka était le second réviseur et a contribué à la validation de la sélection des articles, de même qu'à la révision des données qualitatives et quantitatives extraites. Imad Kassem a généré le code informatique nécessaire à la visualisation des méta-analyses illustrées dans le manuscrit. Amina Barhdadi a contribué à la conception statistique des méta-analyses. Marie-Pierre Dubé a participé à la conceptualisation des méta-analyses. Simon de Denus a été impliqué dans la conception de l'étude et sa supervision. Tous les co-auteurs de ce manuscrit l'auront révisé et auront approuvé sa version finale.

- Lors de sa publication, ce projet s'est mérité le Choix de l'Éditeur (*Editor's Pick*) de la part de la revue savante l'ayant fait paraître.

(2020), Issue highlights. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2020;86(6):1009-10.



### Chapitre 3

**Meloche M**, Jutras M, St-Jean I, de Denus S, Leclair G. Isocyanate derivatization coupled with phospholipid removal microelution-solid phase extraction for the simultaneous quantification of (*S*)-metoprolol and (*S*)- $\alpha$ -hydroxymetoprolol in human plasma with LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;204:114263.

En tant qu’auteur principal de ce manuscrit, mes travaux ont inclus la conceptualisation de la méthodologie bioanalytique, le développement et la validation de la méthode finale, l’analyse des échantillons de patients, la réconciliation, le traitement et l’analyse des données générées, la rédaction complète de la première version du manuscrit, la conception des analyses statistiques reliées à la validation de la méthode, la création des figures, ainsi que la révision du manuscrit et la soumission de sa version finale aux journaux scientifiques d’intérêt.

Martin Jutras a participé à la conceptualisation et au développement de la méthode bioanalytique. Isabelle St-Jean a également contribué à l’article grâce à de nombreuses suggestions de méthode. Simon de Denus a géré et supervisé le projet, tout en permettant son financement et celui associé aux ressources matérielles. Grégoire Leclair a été impliqué dans la conceptualisation et la gestion du projet, en plus de l’allocation des ressources matérielles et l’analyse des données. Finalement, tous les co-auteurs ont participé à la révision du manuscrit avant sa soumission.

## Chapitre 4

**Meloche M**, Leclair G, Jutras M, Oussaïd E, Gaulin MJ, Mongrain I, Busseuil D, Tardif JC, Dubé MP, de Denus S. Leveraging large observational studies to discover genetic determinants of drug concentrations: A proof-of-concept study. *Clinical and Translational Science*. 2022; 15: 1063-1073.

Étant premier auteur de cet article, ma participation a constitué en les activités suivantes : rédaction du protocole de recherche pour approbation scientifique et éthique, rédaction partielle du manuscrit, développement et validation de la méthode bioanalytique ayant servi au traitement des échantillons de patients, révision et analyse des données et résultats, correction du manuscrit et soumission de sa version finale aux journaux scientifiques visés.

Grégoire Leclair a contribué à la conceptualisation de la portion bioanalytique de l'étude et à sa supervision. Martin Jutras a également participé à la conceptualisation et au développement de la méthode bioanalytique. Marie-Josée Gaulin a effectué le génotypage des patients inclus dans l'étude, alors que Ian Mongrain aura supervisé les activités de génotypage. Étant directeur de la Biobanque de l'Institut de Cardiologie de Montréal, David Busseuil a contribué au recrutement et à la gestion des données des patients dans le cadre de ce projet. Jean-Claude Tardif a quant à lui été impliqué dans le financement du projet tout en mettant sur pied le programme de la Biobanque auparavant. Puis, suivant l'acquisition des données bioanalytiques, génotypiques et cliniques reliées aux patients, Marie-Pierre Dubé a supervisé les analyses statistiques de l'étude. Simon de Denus a été impliqué dans la conceptualisation de l'étude dans son ensemble, en plus d'avoir participé à la rédaction du protocole de recherche et à la première version du manuscrit, à la conception des analyses statistiques et leur interprétation, à la gestion des données génotypiques, de même qu'au financement du projet de recherche. Encore une fois, tous les co-auteurs ont contribué à la révision du manuscrit final.

- Le prix de la meilleure publication scientifique 2021-2022 publiée dans l'axe Pharmacométrie et Pharmacothérapie de la Faculté de Pharmacie a été remis à cette publication.

## Annexe 5

**Meloche M**, Kwon HJ, Letarte N, Bussières JF, Vadnais B, Hurlimann T, Lavoie A, Beauchesne MF, de Denus S. Opinion, experience and educational preferences concerning pharmacogenomics: an exploratory study of Quebec pharmacists. *Pharmacogenomics*. 2020;21:235-45.

Je figure sur cet article supplémentaire à titre de premier auteur. Ainsi, mes activités ont été les suivantes : Élaboration et rédaction partielle du protocole de recherche pour approbation scientifique et éthique, création du questionnaire en ligne, analyses descriptives des données, analyses statistiques reliées aux réponses du questionnaire, interprétation des données générées, création des figures de l'article, et la rédaction partielle et la révision du manuscrit.

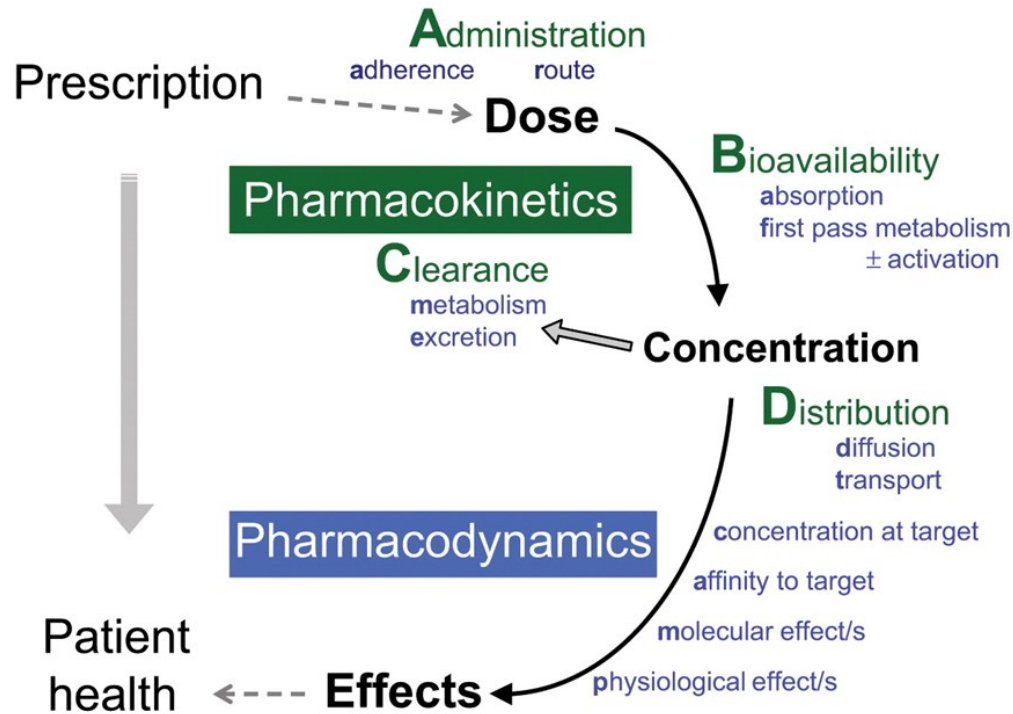
Hyuk Jin Kwon a partiellement rédigé le manuscrit et sa première version, contribuant également à l'analyse des données et leur interprétation, ainsi qu'à la création des figures. Nathalie Letarte, Jean-François Bussières, Barbara Vadnais, Thierry Hurlimann, Annie Lavoie et Marie-France Beauchesne ont contribué au développement du questionnaire. Simon de Denus a conçu l'idée du projet de recherche, contribué au développement du questionnaire et à la rédaction protocole de recherche, supervisé mes travaux et ceux de HJ Kwon, en plus de participer à l'interprétation des données. Plusieurs révisions ont été effectuées de la part de tous les co-auteurs du manuscrit.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1 La pharmacocinétique : concepts ADME

La réponse à un médicament dépend de son devenir dans l'organisme. Pour qu'un médicament, ou toute molécule pharmacologiquement active, puisse exercer son effet thérapeutique, il doit d'abord franchir une ou plusieurs barrières physiologiques avant d'être absorbé. En fonction de ses propriétés physico-chimiques et de son affinité pour certaines cibles, protéines ou transporteurs, le médicament peut ensuite se distribuer dans les tissus et atteindre son site d'action grâce à la circulation sanguine, entre autres. Selon sa voie d'administration, il sera métabolisé à partir de différents procédés enzymatiques qui ont principalement lieu au niveau hépatique. Suivant ces étapes, si le médicament n'est pas complètement métabolisé, il pourra finalement être éliminé par voies rénale ou intestinale, en tenant compte qu'une réabsorption puisse survenir.<sup>1</sup> Ainsi, la pharmacocinétique (PK) représente les mécanismes physiologiques qui définissent les paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) d'une drogue (**Figure 1**).<sup>2,3</sup> Chaque molécule dispose d'un profil PK qui lui est propre. Complémentaire à ce concept, la pharmacodynamie (PD) comprend l'ensemble des mécanismes d'actions lui conférant son action pharmacologique au sein de l'organisme, ainsi que les effets cellulaires et physiologiques qui y sont associés.<sup>4</sup>

Les concepts ADME s'appliquent autant pour les petites molécules que pour les produits biologiques (*i.e.* anticorps monoclonaux, protéines, peptides, etc.), quoique leurs profils se distinguent considérablement.<sup>5</sup> En accord avec la portée des sujets couverts dans cette thèse, la présente section adressera la PK réservée aux petites molécules.



**Figure 1 Du métabolisme à l'effet pharmacologique d'une drogue.**  
 Les paramètres ADME et les profils pharmacocinétiques peuvent être déterminants pour les profils pharmacodynamiques.

Reproduction autorisée : Doogue MP, Polasek TM. *The ABCD of clinical pharmacokinetics*. Ther Adv Drug Saf. 2013;4(1):5-7. Copyright © 2012 Doogue et al.

## 1.1 Absorption

Un médicament doit rejoindre la circulation systémique, ou le compartiment central de l'organisme, afin d'être considéré comme absorbé.<sup>2</sup> Sa voie d'administration influence grandement sa capacité à atteindre la circulation systémique. À cet effet, la biodisponibilité se définit comme la fraction de la dose rejoignant la circulation systémique relativement à celle administrée. Certaines voies permettent l'administration totale d'une dose en provoquant un bris de barrière physiologique, telle une injection intraveineuse. D'autres voies d'administration sont permises également d'obtenir une biodisponibilité élevée et rapide sans qu'il n'y ait bris invasif de barrière physiologique, comme l'administration par voies pulmonaire ou sublinguale.<sup>2</sup> Cela dit, parmi toutes les routes possibles, la voie orale demeure la plus utilisée en raison de la facilité d'administration.<sup>2</sup> Ce faisant, l'absorption du médicament devient médiée par le tractus gastro-

intestinal. Or, plusieurs paramètres sont à considérer afin d'évaluer la biodisponibilité orale d'un composé, à commencer par sa libération. En effet, un médicament doit inévitablement être libéré sous forme dissoute pour être absorbé par l'organisme.<sup>1</sup> Ses propriétés physico-chimiques comme sa lipophilicité, sa solubilité couplée au degré d'ionisation, ainsi que sa vitesse de dissolution selon le volume disponible de liquides au site de libération sont quelques-uns des paramètres à considérer lors de l'administration d'un médicament, du moins par voie orale.<sup>6</sup> Conjointement à la solubilité, la perméabilité membranaire du principe actif est une propriété biopharmaceutique critique pour l'absorption, les deux permettant d'anticiper la fraction dissoute d'une dose du médicament.<sup>6</sup> Certaines caractéristiques physiologiques additionnelles, comme le pH gastrique, influencent quant à elles l'intégrité du composé dans le tractus gastro-intestinal, tandis que la vidange gastrique, la circulation sanguine intestinale ou la surface disponible au site de libération déterminent aussi le degré d'absorption.<sup>2,6,7</sup>

Toujours selon les propriétés physico-chimiques d'une molécule, différents mécanismes de transport existent afin qu'elle puisse franchir la paroi intestinale ou d'autres membranes physiologiques.<sup>8</sup> Parmi eux, le transport passif est lorsqu'un composé traverse directement la membrane cellulaire phospholipidique selon son gradient électrochimique. Plus le gradient est élevé, plus la diffusion est grande de façon proportionnelle. Ce phénomène de diffusion simple s'applique toutefois exclusivement aux molécules de tailles restreintes et possédant un haut degré de lipophilicité. Les molécules plus volumineuses ou polaires empruntent majoritairement des transporteurs membranaires afin de médier leur passage à-travers les entérocytes, autant du côté apical que basolatéral.<sup>9</sup> Ces transporteurs, également présents à la surface des hépatocytes, peuvent médier les transports d'influx ou d'efflux, faisant entrer ou sortir des substrats d'une cellule.

Un des aspects critiques de la biodisponibilité d'une molécule réside dans l'effet de « premier passage » hépatique.<sup>2,3</sup> Suivant l'absorption intestinale, les voies circulatoires mésentériques rejoignent la circulation portale hépatique. C'est au niveau du foie que sont présents en forte abondance des enzymes métaboliques effectuant des réactions de Phases I et II (voir **Section 1.3**). Une fois absorbés par les hépatocytes, certains composés sont métabolisés par ces enzymes avant que leurs formes actives ne rejoignent le compartiment central systémique. Ces enzymes peuvent également être présents dans les entérocytes et métaboliser des composés avant même qu'ils ne franchissent la paroi intestinale.<sup>8,10</sup> L'effet de premier passage et les réactions

enzymatiques survenant au foie constituent un obstacle majeur dans la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale.<sup>1</sup>

## 1.2 Distribution

Un médicament se distribue dans l'organisme lorsqu'il rejoint les tissus ou les organes cibles après qu'il soit entré dans la circulation systémique.<sup>2</sup> Comme l'absorption, l'étendue de la distribution d'un composé dépend en partie de ses propriétés physico-chimiques et des transporteurs membranaires exprimés par les tissus périphériques. En fonction du débit sanguin systémique et tissulaire, de même que la perméabilité membranaire d'un tissu, la vitesse à laquelle un médicament s'y accumule peut également varier. Selon leur degré d'affinité, de nombreux médicaments circulent en étant partiellement liés aux protéines plasmatiques, telles l'albumine et l' $\alpha_1$ -glycoprotéine, ce qui diminue la fraction libre de la molécule atteignant un compartiment cible.<sup>2</sup> Une fois qu'un organe spécifique est rejoint, seule la fraction libre peut franchir la paroi cellulaire et exercer son activité pharmacologique. Bien que la liaison aux protéines plasmatiques soit un processus souvent réversible, ce phénomène demeure pertinent pour des thérapies avec un index thérapeutique étroit, signifiant qu'une gamme restreinte de concentrations permet d'obtenir une efficacité clinique avant d'occasionner des effets indésirables.<sup>11</sup> La composition corporelle d'un individu peut aussi changer le degré de distribution d'une molécule. L'accumulation tissulaire d'une molécule liposoluble peut s'observer lorsqu'une masse adipeuse est plus importante.<sup>2</sup> Selon l'âge, la prise en considération de la composition corporelle peut s'avérer importante. En effet, certains traitements administrés aux populations pédiatriques peuvent nécessiter la prise en considération de la composition corporelle.<sup>12</sup> Comparativement aux adultes, la composition corporelle des enfants en bas âge affiche un pourcentage plus élevé en eau, atteignant jusqu'à 70% à la naissance pour ensuite diminuer à-travers le temps.<sup>13</sup> Ainsi, les drogues hydrosolubles se distribueront plus abondamment dans les tissus et pourront requérir des doses supérieures afin d'obtenir une exposition et des concentrations plasmatiques comparables à celles des adultes. Ajoutons à ce facteur l'expression des protéines plasmatiques généralement inférieur de ~10-15% chez les populations pédiatriques qui peut du même coup augmenter la fraction libre du médicament et favoriser sa distribution tissulaire, toujours selon ses propriétés physico-chimiques et son degré de liaison à celles-ci.<sup>12,13</sup>

### 1.3 Métabolisme

Un éventail considérable de composés et autres xénobiotiques absorbés sont biotransformés par l'organisme. Puisqu'ils contiennent une forte abondance d'enzymes métaboliques, ces procédés de biotransformation s'effectuent majoritairement dans les hépatocytes et sont responsables de l'effet de premier passage hépatique. Les réactions de Phases I, ou d'oxydoréduction, consistent à greffer ou modifier des groupements chimiques d'une molécule afin d'augmenter son caractère hydrosoluble.<sup>14</sup> Ces dernières peuvent aussi servir à activer des promédicaments et conférer leur propriétés pharmacologiques. Les réactions d'oxydoréduction de Phase I impliquent principalement des enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYPs) (voir **Section 1.3.1**). Les enzymes de Phase II médient quant à elles des réactions de conjugaison. La glucuronidation, la sulfatation, la méthylation et l'acétylation sont des exemples de réactions durant lesquelles des molécules précises seront conjuguées au médicament métabolisé pour augmenter son hydrosolubilité et son élimination. La **Section 2.3** fera état des variations de séquence génétiques codant pour les enzymes de Phases I et II pouvant entraîner des répercussions significatives sur les profils PK et PD des médicaments.<sup>15,16</sup>

#### 1.3.1 Précisions sur les cytochromes P450

La superfamille des CYPs se caractérise par des protéines contenant un groupement hème et requérant l'oxygène pour exercer leurs fonctions enzymatiques. Les réactions d'oxydoréduction sont rendues possibles grâce à l'intervention d'un complexe de co-enzymes permettant l'échange efficace d'électrons entre électrophiles et nucléophiles dans le cycle catalytique.<sup>14</sup> Près de 60 gènes codent pour des CYPs,<sup>17</sup> où leur plus forte expression se trouve au niveau hépatique, plus précisément dans les hépatocytes des régions périportale et de la veine centrale.<sup>18</sup> Environ 80% du métabolisme des médicaments serait attribuable aux CYPs.<sup>19</sup> Certains sont également impliqués dans le métabolisme et la synthèse de composés endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires et les acides gras, et pour lesquels une spécificité de substrat est observée. Ce phénomène est contraire aux CYPs qui ciblent et métabolisent principalement des xénobiotiques.<sup>17,18</sup> En effet, ces types de CYPs comportent un nombre important de substrats et de réactions enzymatiques en commun.<sup>14</sup> Les différences de spécificité de substrat entre les CYPs métaboliseurs de molécules endogènes et ceux métaboliseurs de xénobiotiques sembleraient s'expliquer par l'absence de pression évolutive chez ces derniers.<sup>17,18</sup> Ce faisant, malgré le nombre toujours croissant d'agents



thérapeutiques, seulement une douzaine de CYPs seraient responsables du métabolisme des médicaments.<sup>14</sup> On réfère ce groupe comme comportant des « isozymes », c'est-à-dire des enzymes codés par différents gènes mais exerçant les mêmes fonctions métaboliques.<sup>20</sup> Or, ce trait s'avère important pour CYPs métaboliseurs de xénobiotiques, car la multiplicité des voies métaboliques qu'une drogue emprunte peut causer des interactions médicamenteuses, modifiant ultimement ses profils PK et PD ou ceux d'autres molécules.<sup>14,21</sup>

La nomenclature des CYPs est hiérarchisée. L'acronyme CYP précède toute identification des protéines précises, suivi d'un chiffre, d'une lettre et d'un autre chiffre désignant respectivement la famille, la sous-famille et l'isoforme de l'enzyme.<sup>22</sup> Par exemple, le CYP2C19 désigne la deuxième famille, la sous-famille C et l'isoforme 19 des CYPs. Les sous-familles 1A, 2B, 2C, 2D et 3A sont celles qui métabolisent les xénobiotiques.<sup>7,14</sup> Cette classification reflète le degré d'homologie de séquence génétique parmi les CYPs : un isoforme compris dans une sous-famille donnée contient une homologie de séquence plus grande avec les autres membres de la sous-famille dont il fait partie. Cela signifie que plusieurs CYPs peuvent être obtenus par épissage alternatif (voir **Tableau 1** pour la définition). Contrairement aux isozymes, ces protéines sont des « allozymes », car ils présentent des séquences génétiques homologues issues d'un même gène mais affichent diverses propriétés métaboliques.<sup>23</sup> La même nomenclature s'applique aux familles d'enzymes de Phase II.<sup>15</sup>

## 1.4 Élimination

Les médicaments peuvent être excrétés par l'organisme sous forme inchangée ou suivant leur biotransformation. Deux voies principales d'élimination sont possibles, soit par les reins ou par excrétion biliaire.<sup>7,14</sup> L'élimination rénale s'effectue d'abord par filtration glomérulaire des composés polaires, hydrosolubles et en fraction libre. Près de 30% des médicaments seraient filtrés directement sous forme inchangée<sup>14</sup> et leur taille peut s'avérer décisive à leur filtration.<sup>24</sup> S'ensuit la sécrétion tubulaire proximale souvent médiée par des transporteurs membranaires de même classe que ceux pour l'absorption entérohépatique.<sup>8</sup> Un phénomène de réabsorption tubulaire distale peut survenir pour les composés qui demeurent suffisamment liposolubles et non-ionisés, ce qui dépend fortement du pH urinaire.<sup>7</sup> Les composés excessivement lipophiles seront toutefois excrétés au niveau du foie par le conduit biliaire vers la tractus gastrointestinal. Hormis leur

excrétion par les fèces, la réabsorption des métabolites demeure également possible par la paroi intestinale et ce, malgré la survenue de réactions enzymatiques de Phases I ou II.

## 1.5 Pharmacocinétique clinique

D'un point de vue clinique, les profils PK et PD des médicaments nécessitent une simplification afin d'être adéquatement mesurés et évalués. L'application des concepts ADME tend à être paramétrisée, ce qui permet de les interpréter clairement et de les relier les uns aux autres, de même qu'aux phénomènes physiologiques associés. L'analyse non-compartimentale constitue la méthode généralement préférée afin de générer des modèles représentatifs d'exposition de l'organisme au médicament et le comportement de ce dernier une fois en circulation.<sup>25</sup> Suivant la considération de paramètres tels la dose, les concentrations plasmatiques et le temps de prélèvement post-dosage, le calcul des paramètres ADME devient possible, puis l'établissement d'un profil PK. Bien que la compréhension des équations mathématiques derrière ces analyses dépasse largement la portée des travaux présentés, les paramètres décrits ci-bas illustrent les principes PK majeurs qui sont déterminés en pratique et qui seront pertinents pour les chapitres ultérieurs<sup>2,3,24,25</sup> :

- i. L'aire sous la courbe « concentration-temps » (*area under the concentration-time curve*, AUC), qui représente l'exposition à un médicament. L'AUC est exprimé selon les concentrations plasmatiques d'un médicament relativement à une période définie, par exemple sur 24 heures ( $AUC_{0 \rightarrow 24h}$ ) ou extrapolée à l'infini ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ );
- ii. La clairance (Cl), qui décrit la vitesse d'élimination d'une molécule ayant rejoint la circulation systémique. Afin de considérer l'effet de premier passage hépatique, la biodisponibilité du médicament est souvent comprise et désigne la clairance orale (Cl/F). Cette mesure permet généralement d'estimer les concentrations atteintes à l'état d'équilibre suivant des administrations répétées, donc la dose de maintenance d'une thérapie;
- iii. La concentration plasmatique maximale ( $C_{max}$ ), laquelle peut établir une limite à l'index thérapeutique avant le développement d'effets indésirables. Dans le cas où les profils PK sont représentatifs des effets PD,  $C_{max}$  permet d'estimer l'effet pharmacologique maximal attendu. Les paramètres comme la vitesse d'absorption d'une drogue, sa dose, son métabolisme et Cl/F établissent  $C_{max}$ . Le temps correspondant à l'obtention de cette valeur peut aussi être retenue ( $T_{max}$ );

- iv. Le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ), correspondant au temps requis à l'organisme pour qu'il puisse réduire de moitié les valeurs de concentrations plasmatiques,  $C_{max}$  ou autres. Généralement, 5 valeurs de  $t_{1/2}$  d'une drogue précise sont requis pour qu'elle soit dite métabolisée, puis 7 pour être éliminée.
- v. Le volume de distribution (VD), qui réfère au volume théorique requis d'un compartiment central afin d'obtenir des concentrations équivalentes à celles observées dans le plasma. En fonction de certains facteurs, comme la liaison aux protéines plasmatiques, la vitesse de distribution tissulaire ou la vitesse d'élimination d'un composé, la valeur de VD peut excéder largement celle du volume physiologique normal. Par exemple, plus la liaison aux protéines plasmatiques est importante, plus le VD sera grand afin de contenir toute la dose du médicament sous forme libre dans le plasma.

Dans le cadre d'essais PK traditionnels, ces valeurs sont mesurées suivant l'administration d'une dose normalisée chez des hommes habituellement sains, souvent sans qu'aucun autre traitement ne soit alloué. Des mesures répétées dans un environnement contrôlé sont nécessaires afin d'établir un profil PK représentatif et des valeurs précises de paramètres ADME.

Le devenir d'un médicament est plus complexe et les valeurs que ces paramètres prennent peuvent elles-mêmes fluctuer selon d'autres facteurs qui demeurent exclus des analyses PK. Le degré de saturation des transporteurs ou des canaux membranaires, la liaison aux protéines plasmatiques ou la distribution dans les tissus périphériques en sont des exemples. Encore une fois, seuls les éléments décrits seront les paramètres PK retenus au long de cette thèse.

## 2 Génétique et pharmacogénomique

### 2.1 Quelques généralités de génétique

Le **Tableau 1** contient une liste de termes utiles à la compréhension de cette deuxième section. Les avancées contemporaines majeures dans le domaine de la génétique peuvent être attribuées en grande partie à la complétion du Human Genome Project (HGP).<sup>26,27</sup> Grâce au séquençage du génome humain, ces travaux conducteurs ont permis de caractériser son étendue au tournant du millénaire, bien que des portions marginales manquantes soient constamment révisées dans le modèle référentiel.<sup>28</sup> À ce jour, on compte plus de 3,3 milliards de paires de nucléotides

distribués sur 22 paires de chromosomes homologues, aussi appelés « autosomes », et une paire de chromosomes sexuels.<sup>29,30</sup> Ensemble, ceux-ci comprennent au-delà de 20 000 gènes nucléaires et mitochondriaux codant entre 30 000 et 40 000 protéines et autres transcrits fonctionnels,<sup>27-29</sup> quoique ces nombres soient eux aussi fréquemment mis à jour.<sup>31</sup> La mise en place de répertoires publiques de ces données génétiques assure également une gestion continue et une meilleure annotation des régions codantes et non-codantes à l'aide d'outils bio-informatiques spécialisés.<sup>32,33</sup> Ainsi, ce serait seulement 1-3% du génome complet qui serait exonique et produirait des protéines, le reste étant représenté par des portions introniques et intergéniques.<sup>27,29,30</sup> À voir toute la diversité génétique interindividuelle, ces valeurs pourraient sembler d'autant plus restreintes lorsqu'on considère que le code génétique de chaque individu est similaire à  $\geq 99,6\%$ .<sup>27-30</sup>

Les efforts ayant suivi la complétion du HGP ont consisté à l'élaboration du projet HapMap, dont l'objectif visait à cartographier la variabilité d'haplotypes représentés dans le génome par l'entremise du séquençage de marqueurs génomiques cibles.<sup>34</sup> En 2007, on rapportait 3,1 millions de variants génétiques identifiés.<sup>34</sup> Grâce au principe de déséquilibre de liaison (**Tableau 1**), soit l'association non-indépendante d'allèles à proximité les unes aux autres dans le génome, HapMap aura permis d'associer des motifs haplotypiques et des gènes associés à plusieurs conditions physiopathologiques communes.<sup>35</sup>

**Tableau 1 Termes clés en génétique.**<sup>29,30,36,37</sup>

Terme	Définition
<b>Structures et concepts génétiques</b>	
ADN	Macromolécule ubiquitaire à toutes les cellules d'un organisme humain assurant à la fois le fonctionnement cellulaire et la transmission d'information génétique aux générations suivantes; sa structure hélicoïdale est composée de 2 brins complémentaires sens et antisens, lesquels sont composés de nucléotides A, C, G et T (voir définition ci-bas)
Allèle	Toutes formes alternatives d'un gène ou d'une séquence génétique dans le génome à un locus défini; un allèle est hérité de chaque parent
ARN/ARNm	Molécule transcrite à partir de l'ADN et traduite en protéines; sa structure est composée d'un simple brin de nucléotides A, C, G, et U, et est synthétisé à partir du brin antisens.
Codon	Combinaison de 3 nucléotides codant un acide aminé. À noter que lors de la traduction d'une séquence d'ARNm, la lecture d'un triplet indiquant un codon d'arrêt par les ribosomes n'encode pas un acide aminé et provoque la fin de la traduction
Épissage	Processus enzymatique par lequel les séquences introniques du transcrit primaire d'ARNm sont excisées et les séquences exoniques sont réunies de façon contiguë et conservées
Épissage alternatif	Usage de différents exons d'un même gène. Les transcrits d'ARN messenger se différencient pour former des protéines homologues aux fonctions pouvant varier
Exon	Segment codant d'ADN intégré à la séquence d'ARN messenger
Gène	Unité fondamentale à l'hérédité. Un gène est constitué d'une séquence de nucléotides encodant un produit fonctionnel ( <i>ex.</i> ARN messenger, protéine)
Génotype	Ensemble du matériel génétique hérité à un locus spécifique; un génotype d'une personne comprend normalement 2 allèles
Haplotype	Séries d'allèles liées et spécifiques à un seul chromosome; deux diplotypes sont présents dans un segment d'ADN et forment le diplotype
Hétérozygote	Un locus particulier présentant 2 allèles non-identiques (hétérozygotie)
Homozygote	Un locus particulier présentant 2 allèles identiques (homozygotie)
Intron	Segment d'ADN transcrit puis retiré de la séquence finale d'ARN messenger par épissage
Locus	Emplacement chromosomal d'un gène ou d'une séquence d'ADN identifiable
Nucléotide	Molécule organique fondamentale à la structure d'ADN composée d'une base azotée (purine A/G ou pyrimidine C/T/U), d'un sucre à 5 carbones (pentose) et d'un groupement phosphate
Pseudogène	Séquence non-codante d'ADN contenant une homologie de séquence importante à un gène fonctionnel proximal

A : Adénine; ADN : Acide désoxyribonucléique; ARN : Acide ribonucléique; C : Cytidine; G : Guanine; U : Uracile; T : Thymidine.

**Tableau 1 (Suite)**

<b>Variations génétiques</b>	
Faux-sens	Changement de séquence génétique entraînant la substitution d'un acide aminé par un autre
Insertion/Délétion (indel)	Addition ou suppression d'une séquence de nucléotides; les segments ajoutés ou retirés peuvent être de quelques nucléotides jusqu'à comprendre le gène complet
Inversion	Inversion d'une séquence définie de nucléotides; l'activité de la protéine est habituellement abolie
Non-sens	Changement de séquence génétique faisant apparaître un codon d'arrêt prématuré; la fonction du gène est habituellement abolie et l'ARNm résultant est dégradé
Sens/Synonyme	Changement de séquence génétique qui code pour le même acide aminé que la séquence normale, soit une séquence sauvage pour laquelle la distribution populationnelle s'avère dominante et qui procure une fonction normale à une protéine donnée, relativement à la présence d'un autre allèle; une mutation synonyme peut affecter les sites d'épissage et affecter le processus
Mutation	Variation génétique à un locus défini dont la fréquence allélique est exprimée chez <1% d'une population; une mutation peut être délétère ou bénéfique à l'homéostasie d'un organisme
Mutation d'épissage	Changement de séquence génétique affectant les sites d'épissage et menant à des transcrits d'ARN incorrects; une perte d'activité partielle ou totale de la protéine peut être observée
Polymorphisme	Variation génétique à un locus défini dont la fréquence allélique est exprimée chez >1% d'une population
SNP	Variation de séquence d'ADN impliquant un seul nucléotide; les SNPs sont le type de variation génétique le plus fréquent dans le génome
CNV	Variation individuelle du nombre de copies d'un gène ou d'une séquence génétique; des séquences de 1000 jusqu'à 3 millions de nucléotides peuvent être dupliquées ou supprimées

CNV : *copy number variant* (nombre de copies de variant); SNP : *single nucleotide polymorphism* (variant nucléotidique simple).

**Tableau 1 (Suite)**

<b>Concepts d'épidémiologie génétique</b>	
Déséquilibre de liaison	Ensemble d'allèles de <i>loci</i> spécifiques situés à proximité dans une séquence génétique et hérités plus fréquemment que de manière aléatoire
Dominance/ Récessivité	Phénomène décrivant la sensibilité d'un organisme à une perte partielle d'une fonction associée à l'expression d'un gène; un phénotype récessif est exprimé lorsque 2 allèles anormaux sont présents, alors qu'une pathologie développée avec un seul allèle anormal signifie un phénotype dominant
Fréquence allélique	Fréquence à laquelle un allèle est présent au sein d'une population
Équilibre Hardy-Weinberg	Mesure reliant la fréquence allélique à la distribution génotypique d'un locus dans une population en état de panmixie et présumée constante entre générations, pourvu qu'il n'y ait pas d'intervention évolutive, qu'une taille d'échantillon soit vaste et qu'une migration des populations soit absente; l'équilibre Hardy-Weinberg est maintenu quand la distribution de génotypes AA, Aa/aA et aa respecte l'équation $p^2 + 2pq + q^2$ , où $p$ représente la fréquence allélique de l'allèle A et $q$ celle de l'allèle a selon $p + q = 1$
Gène candidat	Gène susceptible ou reconnu pour influencer l'expression d'un phénotype physiopathologique ou un trait complexe en raison des propriétés biologiques de son produit
Héritabilité	Degré d'observation d'un phénotype attribuable à un changement de séquence génétique
Pénétrance	Probabilité qu'un phénotype soit exprimé chez une personne selon la présence d'un génotype ou d'une séquence génétique définie
Phénotype	Traits observables et/ou mesurables chez une personne résultant d'influences génétiques et/ou environnementales
<b>Concepts utiles de génétique médicale et de pharmacogénomique</b>	
Phénotype inféré	Phénotype attribué selon la présence d'allèles spécifiques à un locus défini
Utilité clinique	Degré selon lequel les résultats d'un test génétique peuvent orienter le traitement d'une personne et améliorer l'issue d'une condition
Validité analytique	Capacité d'un test à identifier un variant génétique particulier ou à exclure sa présence
Validité clinique	Habilité d'un test génétique à prédire l'apparition ou non d'une maladie selon un déterminant génétique identifié

Au fil des années suivantes, la quantité croissante d'information génétique est notoire, alors que le séquençage complet de plusieurs génomes mène à la découverte de davantage de séquences variables.<sup>34,38</sup> Cette trajectoire culminera à la mise en place du 1000 Genomes Project (1KGP), qui regroupe 2504 génomes provenant de 26 populations géographiques.<sup>39</sup> Le perfectionnement des méthodes de séquençage permettrait maintenant d'établir à plus de 88 millions le nombre de variants polymorphiques et structurels.<sup>39</sup> De façon similaire au HGP, l'information du 1KGP est partagée publiquement,<sup>40</sup> ce qui crée de nombreuses initiatives concertées visant l'intégration et la caractérisation des séquences génétiques par l'application de nouvelles méthodes bio-informatiques.<sup>41</sup> Ensemble, ces travaux ont à la fois démontré l'immense complexité du génome, en plus de fournir les outils de base nécessaires à cerner la relation entre la variabilité génétique inter-individuelle et leur implication dans certaines physiopathologies, autant celles aux causes monogéniques qu'aux traits génétiques complexes.

## **2.2 Redéfinir le rôle du génome**

Les données agrégées du HGP, du HapMap et du 1KGP ont permis de mettre à l'avant-plan le génome afin de déterminer les facteurs causals des maladies, puis ceux pouvant affecter la réponse aux médicaments. Rappelons que l'inclusion d'un volet génétique en contexte de soins n'émerge pas uniquement de ces initiatives. En effet, le principe de médecine personnalisée se veut être déjà connu et appliqué, où l'information génétique familiale, les facteurs environnementaux, de même que les origines ancestrales sont depuis longtemps utilisés afin d'établir un degré de prédisposition à des événements cliniques et stratifier ces risques chez des patients.<sup>42</sup> Donc, bien que d'autres co-variables comme l'origine ethnique ou l'historique familial soient pris en compte, l'information génétique obtenue par le séquençage du génome humain séquençage réitère sa pertinence face aux autres variables cliniques.<sup>43</sup> Les similarités de marqueurs génétiques partagés entre différentes populations géographiques, surtout quant au développement de physiopathologies ou à la réponse aux médicaments, justifieraient l'incorporation de ces données aux critères cliniques.<sup>34,35,44</sup>

Les contributions méthodologiques qui découlent plus directement des projets HGP, HapMap et 1KGP s'observent davantage dans l'approche « multi-omique » qui caractérise la recherche biomédicale contemporaine : génomique, épigénomique, métabolomique,



microbiomique, protéomique, transcriptomique; tous ces domaines tirent profit des avancées technologiques du séquençage génétique.<sup>45</sup> L'oncologie semble être l'aire thérapeutique qui devance largement les autres quant à l'application clinique de la médecine génomique,<sup>46</sup> quoique les percées faites dans ces disciplines bénéficient aussi au traitement des maladies cardiovasculaires,<sup>47</sup> entre autres. Il est valable de mentionner qu'il ne s'agit pas simplement de l'ADN germlinal, soit celui comportant des variants génétiques hérités depuis la naissance, qui soit étudié pour son potentiel d'application PGx. L'ADN somatique, qui lui comprend des variations génétiques pouvant survenir au niveau tissulaire suivant la conception et durant la vie.<sup>48</sup> Des avancées récentes dans l'étude du génome tumoral témoignent de profils différentiels d'expression génétique pouvant affecter le pronostic pour des types de cancers, en plus de les sensibiliser à certains traitements selon les déterminants génétiques observés dans les tumeurs, pour ensuite influencer la survie des patients.<sup>49,50</sup> De telles informations sont maintenant contenues dans bases de données afin de pouvoir identifier des signatures génétiques tumorales au potentiel PGx, notamment.<sup>51,52</sup> Puis, le génome du microbiote intestinal se veut lui aussi de plus en plus investigué comme étant un facteur pouvant expliquer un portion de la variabilité inter-individuelle de la réponse aux médicaments.<sup>53</sup>

La prochaine section traitera de la personnalisation de la pharmacothérapie à partir de l'information génomique de l'ADN germlinal d'une population.

### **2.3 La pharmacogénomique**

Introduit par Motulsky<sup>54</sup> et Kalow,<sup>55</sup> l'expression « pharmacogénomique » (PGx) se résume à identifier des marqueurs génétiques associés à une ou plusieurs réponses pharmacologiques.<sup>56</sup> Cela implique, par exemple, la capacité à prédire la survenue excessive d'événements indésirables ou l'inefficacité de certaines thérapies chez des sous-groupes d'individus possédant des déterminants génétiques particuliers.<sup>57,58</sup> Bien entendu, cet effet est inversé lorsqu'il est question de promédicaments. Ces considérations pèsent lourd sur les réseaux modernes de soins et l'apport potentiel de la PGx clinique n'est pas à négliger. En effet, les réactions indésirables aux médicaments figureraient entre le quatrième et le sixième rang des causes de décès aux États-Unis,<sup>59</sup> une tendance qui se maintiendrait à-travers les années.<sup>57,60</sup> Sur le territoire canadien, entre 2005 et 2017, le *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug*

*Safety* (CPNDS) répertoriait 10 045 événements indésirables causés par des médicaments, près des trois quarts survenant chez une population pédiatrique.<sup>61</sup> Ajoutons le potentiel d'héritabilité qui serait important pour certaines médications,<sup>58,62,63</sup> il devient alors valable d'aborder le volet génétique en tant que déterminant potentiel majeur à l'issue d'une pharmacothérapie donnée. Ainsi, plusieurs efforts sont désormais entrepris afin d'appréhender la réponse aux traitements par le biais de concepts PGx.<sup>64,65</sup> Sa valeur ajoutée anticipée ne se limite pas seulement au milieu clinique, mais aussi en développement du médicament, où l'exploration d'associations PGx s'effectue en parallèle des essais cliniques à un rythme grandissant.<sup>66-69</sup> Les approches méthodologiques qui entourent la recherche PGx seront discutées dans les prochaines pages.

### 2.3.1 Approches méthodologiques

Le **Tableau 2** résume les avantages et les limites respectives des méthodes courantes en recherche PGx. On distingue deux approches méthodologiques générales afin d'examiner l'impact des variations génétiques sur la réponse médicamenteuse. La première, soit l'approche par gène candidat, tend à déterminer l'implication d'une ou de plusieurs variations de séquence dans un gène ciblé et dont le rôle de la protéine transcrite qui y est associée est *a priori* connu et caractérisé.<sup>66</sup> L'hypothèse initiale de telles études est que, en raison de leur relation mécanistique, les cibles étudiées pourraient directement influencer la réponse à un traitement donné. La seconde approche, de plus en plus répandue, consiste à explorer le génome en son ensemble de manière agnostique. Les retombées de ce type d'essai pangénomique (*genome-wide association studies*, GWAS) peuvent être enrichissantes, car elles permettent d'associer des conséquences cliniques observées de certains traitements à des séquences génétiques et des cibles PGx insoupçonnées.<sup>70-</sup>  
<sup>73</sup> Ainsi, l'investigation d'associations PGx se veut libre d'hypothèse, c'est-à-dire qu'elles ne se limitent pas aux gènes associés aux cibles connues du développement de la maladie, du métabolisme ou de la réponse à des thérapies précises.<sup>74</sup> Ces deux méthodes seront élaborées plus en détail ci-bas. Bien sûr, le recours à ces méthodologies est ubiquitaire à la pharmacologie fonctionnelle et aux sciences « -omiques ». Dans l'optique de cette thèse, les utilisations de chacune d'elles dans le cadre de la recherche PGx seront retenues, en gardant à l'esprit qu'elles restent similaires à d'autres domaines.

**Tableau 2 Avantages et limites des approches méthodologiques générales en pharmacogénomique.**<sup>70,71,75-77</sup>

Approche par gène candidat	Approche pangénomique (GWAS)
<p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Réplication et validation de modèles biologiques confirmés</li> <li>• Faibles coûts et ressources nécessaires</li> <li>• Possibilité d'étudier l'héritabilité génétique</li> <li>• Peut requérir seulement de petites cohortes (~100 participants) pour obtenir une association statistiquement significative</li> </ul>	<p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Découverte agnostique de nouvelles cibles hors des modèles mécanistiques connus (traits polygéniques)</li> <li>• Millions de variants étudiés; avantage du déséquilibre de liaison par imputations de variants non-indépendants sans que la détermination directe des allèles impliquées ne soit requise</li> <li>• Identification améliorée de variants rares (fréquence allélique ~1%)</li> <li>• Création de réseaux et consortiums facilitant le partage des données standardisées issues de plateformes de séquençage/génotypage</li> </ul>
<p><b>Limites</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plausibilité biologique prédéfinie des gènes impliqués – approche non-agnostique</li> <li>• Peu de gènes et de polymorphismes causals étudiés en même temps</li> <li>• Variants rares potentiellement absents à cause des cohortes restreintes</li> </ul>	<p><b>Limites</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grandes cohortes requises pour détecter des variants à effet plus modeste</li> <li>• Identification de variants pouvant ne pas avoir de lien causal avec les traits investigués, lié en partie au déséquilibre de liaison. Des variants transmis avec le déterminant d'intérêt sont identifiés, sans pour autant distinguer celui étant responsable du développement ou de la progression de la maladie</li> <li>• Tests multiples avec corrections statistiques; possibilité que des variants faux-positifs et/ou faux-négatifs créent des signaux statistiquement significatifs</li> <li>• Coûts relativement élevés, surtout en séquençage</li> <li>• Causalité non-définie; valeur clinique prédictive incertaine</li> <li>• Entreposage massif d'échantillons et infrastructures bio-informatiques complexes</li> <li>• Couverture génétique variable des plateformes de génotypage</li> </ul>

### 2.3.1.1 Approche par gène candidat

Tel que mentionné ci-haut, l'approche par gène candidat explore les impacts des variations génétiques d'une cible précise sur le métabolisme, les paramètres ADME, les profils PD ou la réponse clinique générale aux médicaments. Habituellement, il est établi que la cible en question, ainsi que son gène associé, sont connus pour avoir des ramifications mécanistiques démontrées au métabolisme ou à l'action pharmacologique d'un médicament, puis potentiellement envers d'autres substrats. Ces présuppositions et modèles fondent la rationnelle derrière leur investigation pour la présence d'effets PGx. Les cibles d'études par gène candidat incluent souvent les gènes impliqués dans les profils ADME des médicaments à l'étude ou les récepteurs visés et leur cascades de signalisation associées.<sup>57,78,79</sup> D'autres gènes candidats peuvent être étudiés en raison de leur implication dans le système immunitaire pouvant provoquer des réactions d'hypersensibilité à des drogues.<sup>57</sup> En fonction du nombre investigué, les variants génétiques d'une cible polymorphique pré-caractérisée sont initialement identifiés à l'aide de différentes techniques de biologie moléculaire.<sup>80</sup> Le génotypage *in vitro* avec réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) est couramment employé, soit par restriction ou par amplification de fragments polymorphiques,<sup>81</sup> par hybridation par fragments nucléotidiques sur puces,<sup>82</sup> ou par combinaison de ces méthodes avec la spectrométrie de masse par temps d'envol,<sup>83</sup> entre autres. D'autres techniques *in vivo* tendent à conjuguer les résultats génotypiques de participants, sains ou malades, aux concentrations plasmatiques ou aux profils PK de médicaments métabolisés par une voie enzymatique étudiée,<sup>84,85</sup> ou à une réponse pharmacologique différentielle.<sup>57,86</sup>

On retrouve de nombreux cas de déterminants génétiques utilisés comme biomarqueurs et pour lesquels des tests compagnons diagnostiques sont administrés afin d'identifier une mutation présente sur une cible pharmacologique, informant du même coup le personnel soignant de la thérapie efficace à sélectionner.<sup>46</sup> Un exemple courant de ce type d'application PGx est dans le traitements des cancers exprimant un récepteur homodimérique au facteur de croissance épidermique (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*, HER2). *HER2* ayant été initialement identifié en tant que proto-oncogène dans les années 1980,<sup>87,88</sup> et étant présent dans 15-20% des cancers du sein, sa surexpression et son amplification ont ensuite été directement associées à un pronostic défavorable en raison du caractère métastatique des tumeurs HER2<sup>+</sup>.<sup>89</sup> Depuis, des

thérapies précises ont été développées afin de cibler ce sous-groupe de tumeurs, comme le trastuzumab en immunothérapie. Pouvant être administré en combinaison avec d'autres chimiothérapies, son efficacité dépend avant tout d'un résultat positif de test compagnon diagnostique effectué au préalable.<sup>90,91</sup> Ces tests compagnons diagnostiques, comme l'HercepTest ayant recours à la détection de HER2 par immunohistochimie, sont désormais fréquemment effectués pour d'autres types de cancers afin de personnaliser les thérapies anticancéreuses selon cette composante génétique, tels les cancers gastriques et pulmonaires,<sup>90,92</sup> en plus de permettre le développement et l'évaluation d'autres traitements néoadjuvants.<sup>93</sup>

Cette approche PGx par test génétique pré-traitement est également pratiquée en cardiologie sans toutefois s'avérer être un test compagnon diagnostique, notamment dans le cadre de l'hypercholestérolémie familiale, une maladie autosomale dominante causée par la présence d'une mutation du gène *LDLR*, qui encode le récepteur aux LDL. Identifié comme étant un gène candidat directement causal de cette condition dans plusieurs cohortes,<sup>94</sup> le génotypage de *LDLR* est maintenant recommandé par les lignes directrices canadiennes afin d'établir de manière robuste un diagnostic d'hypercholestérolémie familiale. Suivant la détermination d'un profil mutant homozygote ou hétérozygote *LDLR* chez un patient, une certaine composante PGx peut être associée, car l'initiation d'une thérapie avec statines est conjuguée à d'autres agents adjuvants anti-hypercholestérolémiants prescrits selon les résultats du test génétique afin d'atteindre des valeurs cibles de bilan lipidique et de limiter la survenue d'événements cardiovasculaires.<sup>95</sup> Certaines variations génétiques peuvent directement causer la présence de physiopathologies. Néanmoins, le développement en parallèle de traitements fondés sur l'aspect PGx de ces cibles thérapeutiques montre les progrès de la médecine génomique en exploitant leurs ramifications à la pharmacothérapie moderne.

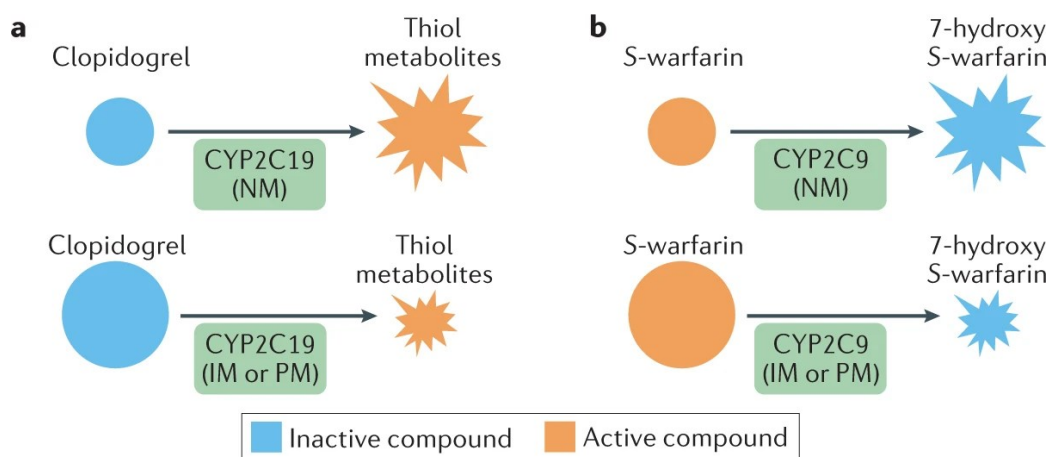
Les enzymes hépatiques de Phases I et II sont d'excellents modèles de gènes candidats qui, encore à ce jour, font l'objet d'investigations concernant leurs impacts PGx.<sup>78,86,96</sup> Ces recherches se justifient à la fois par leur implication centrale dans la bioactivation et le métabolisme des médicaments, mais également par l'abondance de variations génétiques comprises à-travers si peu de gènes.<sup>16,96,97</sup> Tel que soulevé en **Section 1.3.1**, l'absence de pression évolutive quant à l'exposition aux agents pharmacologiques expliquerait leur nombre élevé de variations de séquence,<sup>98</sup> incluant des cibles PGx portant des SNPs délétères à leur fonctionnement.

L'exposition aux xénobiotiques, un phénomène historiquement récent, n'aurait pas permis une sélection naturelle favorable aux porteurs de variants à faible impact et la disparition de ceux avec une activité métabolique fortement réprimée. En fait, des analyses du 1KGP suggèrent que près de 40% de la variabilité fonctionnelle des enzymes hépatiques et des transporteurs impliqués dans les profils PK des médicaments seraient tributaires à des variations de séquences génétiques rares possédant une fréquence allélique <1%.<sup>99</sup> Ultimement, cela confère l'opportunité d'évaluer plusieurs polymorphismes de gènes spécifiques pouvant montrer des variations de paramètres ADME et de profils PK d'un médicament, et potentiellement de profils PD et de réponse clinique.<sup>97,100</sup>

L'investigation des polymorphismes génétiques des enzymes métaboliques et des transporteurs met en lumière les impacts PGx sur les profils PK et les répercussions immédiates que ces derniers peuvent avoir sur les effets PD et la réponse aux traitements.<sup>19</sup> Effectivement, certains effets PGx peuvent être directement associés aux variations de profils PK, faisant varier les concentrations plasmatiques, la capacité métabolique, la distribution tissulaire ou la clairance d'une drogue. Ultimement, la variabilité d'un médicament à l'effet exposition-dépendant pourra causer des effets PD-PGx.<sup>101</sup> Les deux rationnelles propres à la PGx sont habituellement investiguées, soit d'identifier des non-répondeurs ne bénéficiant pas d'un traitement ou des hyper-répondeurs pour qui le risque d'événements indésirables est cliniquement plus important.<sup>19,57</sup> À titre de repère, certaines associations PK- et PD-PGx visant l'optimisation du bénéfice thérapeutique ont franchi des étapes importantes en vue de leur application clinique. L'association du clopidogrel-*CYP2C19*<sup>102</sup> permettant de mieux diriger le traitement antiplaquettaire lors d'interventions coronariennes percutanées<sup>103,104</sup> en est un exemple. De l'autre côté, des cas PGx notoires permettraient de réduire le risque d'événements indésirables, tel le risque de saignements lors de l'anticoagulation avec warfarine-*CYP2C9* par ajustements de doses (**Figure 2**).<sup>105,106</sup>

D'autres découvertes PK-PGx provenant d'enzymes et de transporteurs sont répertoriées et auront éventuellement eu un impact dans la prise en charge par les prescripteurs.<sup>19,107</sup> Ces cas découlent de variations de profils PK influençant les effets PD et dont l'ajout de l'information PGx, soit par un changement de traitement ou de dose, semble prodiguer un bénéfice clinique et pourrait un jour être implanté de façon routinière en cardiologie, notamment.<sup>44</sup> Rappelons que le raffinement des techniques bioanalytiques, tel que par chromatographie liquide couplée à la

spectrométrie de masse (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) offre maintenant la possibilité de quantifier les concentrations plasmatiques de médicaments pour des cohortes entières de patients.<sup>108</sup> Ces opportunités peuvent se conjuguer au génotypage PGx en médecine personnalisée, dans la mesure où les niveaux de concentrations de médicaments et leur métabolisme soient prédictifs de la réponse thérapeutique.<sup>108,109</sup>



**Figure 2 Exemples de prodrogue inefficace et de molécule active toxique influencée par la pharmacogénomique d’enzymes métaboliques.**

En présence de polymorphismes génétiques qui inactivent CYP2C19, le clopidogrel ne peut exercer son activité pharmacologique. Des polymorphismes génétiques inactivant du CYP2C9 causeront une activité supra-thérapeutique de la (S)-warfarine. IM : *intermediate metabolizer*; NM : *normal metabolizer*; PM : *poor metabolizer*.

Reproduction autorisée : Springer Nature Customer Service Centre GmbH : Springer Nature. Nature Reviews Cardiology. *Pharmacogenetics to guide cardiovascular drug therapy*. Julio D. Duarte et al. © Copyright 2021.

Les études PK-PGx peuvent être intégrées aux essais cliniques de phases I et II en développement du médicament.<sup>110</sup> Le Industry Pharmacogenomics Working Group, qui rassemble 25 entreprises pharmaceutiques, fait état de la prise en compte grandissante des gènes polymorphiques ADME dans l’initiation des essais cliniques afin d’inclure la variabilité inter-individuelle occasionnée par la PGx.<sup>68</sup> Ces considérations s’insèrent dans des essais de type « *first in human* », de dosage, d’interactions médicamenteuses ou de populations spéciales.<sup>68</sup> Il devient alors possible d’évaluer directement l’impact des polymorphismes génétiques d’une voie métabolique d’intérêt qu’une drogue emprunte durant son développement, puis de formuler une

association PGx qui pourrait influencer ses avenues commerciales.<sup>67</sup> À voir les enjeux liés aux impacts PK-PGx de gènes candidats, le processus de développement du médicament s'efforce graduellement à réduire la conception de nouvelles molécules empruntant des voies métaboliques exclusives et hautement polymorphiques, comme les CYPs, ou sinon à intégrer la variabilité inter-individuelle lors d'essais cliniques.<sup>67,68</sup>

Les exemples décrits plus haut ont fait allusion à des médicaments pour lesquels les variations de profils PK sont à l'origine des différences de profils PD et de la réponse clinique qui en découlent. En revanche, la présence de variants génétiques sur les cibles pharmacologiques de certaines drogues signifient également que les profils PK des médicaments peuvent demeurer inchangés et que l'effet PGx puisse tout de même mener à une différence d'efficacité dans une population.<sup>79,101</sup> Il convient d'inclure les exemples discutés plus haut du trastuzumab étant administré seulement lors de la présence de tumeurs HER2<sup>+</sup> détecté par test compagnon diagnostique, ou les traitements adjuvants aux statines selon l'expression de *LDLR* qui font eux aussi partie des cas classiques d'applications cliniques de PD-PGx. L'efficacité de ces traitements est plutôt indépendante des caractéristiques ADME et se détermine davantage selon l'expression ou non du récepteur membranaire ciblé, lequel est directement codé par un gène candidat. La warfarine sert aussi à illustrer proprement ce principe. Ayant été évoquée plus haut en relation à l'enzyme CYP2C9, cette association nécessite également la prise en considération de la cible de la warfarine pour optimiser son potentiel PGx clinique, à savoir une sous-unité du complexe époxyde réductase de la vitamine K (*Vitamin K epOxide Reductase Complex subunit 1*, VKORC1), l'enzyme responsable de sa bioactivation. Un polymorphisme génétique situé dans la région promotrice (-1639G>A) affectant son niveau d'expression, et non pas son activité, réduirait les concentrations plasmatiques requises afin que les patients porteurs puissent atteindre l'index thérapeutique et des valeurs cibles de coagulation, selon la mesure de ratio international normalisé.<sup>111</sup> À l'opposé, d'autres variants aux fréquences alléliques plus faibles situés dans la région codante de VKORC1 modifieraient la structure tridimensionnelle de la protéine, de sorte à ce que l'interaction avec la warfarine soit diminuée, celle-ci ne pouvant exercer son effet pharmacologique sur sa cible.<sup>112</sup> Des analyses de sous-groupe en essai randomisé contrôlé démontraient que les porteurs de SNPs à la fois sur *CYP2C9* et *VKORC1* étaient hautement plus sensibles au traitement à la warfarine, ceux-ci étant significativement plus à risque de souffrir de saignements et requérant des doses fortement diminuées.<sup>113</sup> Ces observations seraient inversées



chez les porteurs des variants modifiant la structure de *VKORC1*, où les doses requises seraient beaucoup plus élevées et laisseraient témoigner d'une résistance au traitement.<sup>112</sup>

Depuis, plusieurs algorithmes PGx ont été proposés pour personnaliser la pharmacothérapie à la warfarine en incluant *CYP2C9* et *VKORC1*, puis d'autres facteurs comme la co-médication, le poids et l'âge, entre autres.<sup>114</sup> Selon d'autres résultats d'essais randomisés,<sup>105</sup> le génotypage de ces deux cibles serait maintenant recommandé par quelques sociétés cliniques.<sup>115</sup> Somme toute, le cas de la warfarine-*VKORC1* sert à démontrer l'importance clinique des associations PD-PGx liées à l'abondance ou à l'altération d'une cible pharmacologique, dont l'effet se veut dose-dépendant plutôt que d'être initialement exposition-dépendant, puisque les profils PK restent inchangés par rapport aux non-porteurs. Néanmoins, l'optimisation d'un tel traitement comprend nécessairement des composantes PK- et PD-PGx.

### 2.3.1.2 Approche pangénomique

Grâce aux plateformes de séquençage et de génotypage pouvant désormais identifier des millions de polymorphismes cibles, puis d'en imputer des millions additionnels par déséquilibre de liaison, l'approche agnostique est maintenant l'une des avenues les plus employées en recherche génomique. Depuis l'introduction des premiers GWAS il y a plus de quinze ans,<sup>116</sup> l'investigation agnostique du génome humain a permis d'identifier au-delà de 50 000 associations génétiques physiopathologiques statistiquement significatives, menant ainsi à la découverte de mécanismes biologiques, de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques, même pour des traits polygéniques comme le diabète et les maladies coronariennes, entre autres.<sup>76,117</sup> Les tailles d'échantillon considérablement plus grandes que celles des essais par gène candidat entendent à identifier des variants génétiques aux tailles d'effet plus modestes ou sans nécessité d'une composante d'héritabilité, lesquels se distingueraient difficilement avec des cohortes plus restreintes.<sup>76,118</sup>

Les succès passés de l'approche pangénomique en médecine génomique et en PGx sont abondants, surtout au niveau de la réponse clinique et de l'efficacité de certains agents. Ayant précédemment fait allusion à ce point, la découverte de cibles PGx à diverses phases de développement du médicament est source d'exemples notoires d'associations PGx reliées à une cible moléculaire.<sup>66</sup> Un exemple de gène PD serait celui de la présence de mutations à gain de fonction dans le gène *PCSK9* en situation d'hypercholestérolémie familiale<sup>119</sup> similaire à *LDLR*.

En confirmant son implication mécanistique dans l'hypercholestérolémie et sa causalité dans l'augmentation de risques d'événements cardiovasculaires par des études pangénomiques de liaison, l'élaboration d'anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 et la mise en place d'essais randomisés subséquents ont permis la commercialisation de médicaments destinés à ce sous-groupe.<sup>95,120</sup>

Il est également valable de mentionner des études GWAS ayant exclusivement pour objectif d'identifier directement des effets médicamenteux associés à des variants génétiques. Par exemple, l'identification d'un polymorphisme à perte de fonction du gène *NUDT15* a été associée à une toxicité hématopoïétique avec les thiopurines.<sup>121</sup> Ces percées ont permis d'étendre la PGx des thiopurines auparavant restreinte à TPMT, soit l'enzyme principalement responsable du métabolisme des nucléotides cytotoxiques.<sup>57</sup> Le génotypage de l'enzyme *NUDT15* est maintenant recommandé afin d'évaluer la capacité métabolique face aux thiopurines et d'éviter la survenue d'événements indésirables lors du traitement anticancéreux.<sup>122</sup>

Tel qu'énoncé précédemment, la réponse immunologique se veut une caractéristique importante de la PGx de certains traitements.<sup>57</sup> Contrairement à la présence de variants causant des effets suprathérapeutiques ou une inefficacité pour diverses thérapies, d'autres polymorphismes génétiques peuvent induire une hypersensibilité indépendante de la dose ou des concentrations plasmatiques. On compte plusieurs variants d'hypersensibilité aux médicaments ayant été identifiés, soit au sein de petites cohortes ou au niveau populationnel. Notamment, ces associations sont découvertes au niveau des gènes codant les antigènes de leucocytes humains (*human leukocyte antigen*; HLA) : abacavir-*HLA-B\*57:01*, allopurinol-*HLA-B\*58:01*, carbamazépine-*HLA-A\*31:01*;<sup>71,123</sup> dans certains cas, le génotypage préventif des gènes de la famille HLA se veut suffisamment efficace pour qu'il soit recommandé avant l'administration du médicament auquel un risque d'hypersensibilité peut être perçu.<sup>124-126</sup> Les essais pangénomiques PGx se veulent de plus en plus répandus dans l'identification de variants causant une hypersensibilité ou autre réaction indésirable à certaines thérapies.<sup>57,70</sup>

Par l'entremise des comparaisons agnostiques en devis cas-contrôles, on estime qu'une plus grande proportion de variabilité des profils PK ou PD puisse être expliquée par l'identification de variants PGx.<sup>70,80,110,127,128</sup> Selon le catalogue des GWAS répertoriés dans le National Human

Genome Research Institute comportant un volet PGx, ce ne sont que 2% des variants et 6% des gènes identifiés durant ces essais qui avaient faits l'objet d'investigations par gène candidat auparavant.<sup>78</sup> Ces données rappellent à quel point la recherche PGx bénéficie des approches agnostiques relativement à la portée restreinte des modèles mécanistiques et aux hypothèses de variants *a priori* causals de gène candidat. Les investigations par GWAS mentionnées ci-haut ayant mené à la découverte et/ou à la validation de déterminants génétiques sur la PGx de *TPMT/NUDT15*-thiopurines,<sup>121,129,130</sup> ou encore l'identification de variants polymorphiques des complexes *HLA* à plusieurs médicaments<sup>128</sup> sont des exemples qui témoignent de leurs bénéfices à identifier des déterminants génétiques prédictifs de la toxicité de certaines thérapies. À l'inverse, elles peuvent parallèlement confirmer l'implication de cibles polymorphiques dans le métabolisme et la réponse de médicaments spécifiques et rejeter la présence d'autres associations, comme dans le cas de l'association PGx avec warfarine-*CYP2C9/CYP4F2/VKORC1*.<sup>131</sup> Cela n'implique pas pour autant que le potentiel prédictif de ces cibles soit absolu.<sup>117</sup> Pour la warfarine, des essais pangénomiques avec réplication ne parviennent qu'à expliquer respectivement 50% de la variabilité de réponse.<sup>107</sup> Dans le cas du clopidogrel, même si les seules associations PGx significatives par GWAS s'avèrent être au niveau de *CYP2C19* pour l'agrégation plaquettaire, ce n'est que 12% de la variabilité de réponse qui serait expliquée.<sup>107</sup> La prise en compte des paramètres cliniques reste essentielle à la médecine personnalisée,<sup>42</sup> tout en devant considérer la génomique au-delà des gènes candidats à variants multiples.<sup>107</sup> Néanmoins, les paramètres cliniques évalués qui peuvent être influencés par une association PGx sont nombreux et pourraient comporter des implications concrètes en pratique, comme la dose, le profil d'innocuité ou la réponse selon des critères de jugement précis.<sup>57,64,71</sup> Considérant que seulement 39% des 200 médicaments les plus prescrits ont été inclus dans des GWAS ayant une portée PGx,<sup>78</sup> les futures initiatives PK- ou PD-PGx seront fortement appelées à se rediriger vers les applications pangénomiques.<sup>80</sup>

S'il est vrai que l'engouement pour les GWAS en PGx s'accroît en raison de leur capacité à identifier de nouvelles cibles, cette effervescence ne se fait pas sans contraintes. Certes, des limites sont partagées et inhérentes à tous les domaines d'applications des GWAS, que ce soit afin d'identifier des associations génétiques de traits physiopathologiques ou PGx. Parmi ces derniers peut-on mentionner le déploiement technique et technologique dispendieux, quoique coûteux,<sup>76</sup> des analyses pangénomiques, et les limites de couverture des techniques de

génotypage.<sup>76,117,132</sup> Pour l'analyse, des corrections statistiques multiples sont également requises afin d'augmenter la puissance des associations,<sup>67,76,77,133</sup> sans que le potentiel prédictif des variants détectés face au développement des maladies ou envers une réponse aux médicaments en soit nécessairement plus fiable, tel que démontré plus haut.<sup>117</sup> En plus, les tailles d'échantillons doivent être exponentiellement plus grandes en comparaison aux essais par gène candidat pour détecter des associations aux tailles d'effet modestes parmi tous les variants investigués.<sup>67,76,133</sup> Ce dernier point représente l'une des contraintes majeures des GWAS qui semble perdurer depuis leur dissémination en recherche PGx. En effet, les travaux de McInnes *et al.* établissaient que la taille médiane des GWAS destinés aux associations PGx ne comportait qu'un peu plus que 1000 patients, une donnée qui se maintiendrait elle aussi au fil des années.<sup>70</sup> Cette figure se contraste fortement à la population médiane des GWAS visant l'identification de déterminants génétiques de traits physiopathologiques, qui elle atteint des valeurs >10 fois celles des GWAS PGx.<sup>70,98</sup> Le contexte des GWAS PGx prend souvent la forme de sous-études prospectives ou rétrospectives d'essais randomisés contrôlés aux tailles d'échantillons insuffisantes et peu généralisables,<sup>133,134</sup> ou sinon de cohortes observationnelles pour lesquelles la puissance statistique est également réduite.<sup>78,128</sup> Ce dilemme est évident, car les associations PGx requièrent non seulement la présence d'une maladie nécessitant une intervention pharmacologique, mais aussi que suffisamment de patients atteints de la condition reçoivent la thérapie à l'étude, ce qui impose des contraintes supplémentaires à la sélection du phénotype d'intérêt. Des mesures de base en période pré-traitement et suivant son initiation peuvent également être requises pour identifier des génotypes faisant varier la réponse à ces thérapies, ce qui restreint d'autant plus le nombre de patients éligibles.<sup>72,128</sup> On explique alors plus facilement que plusieurs GWAS PGx n'aient pas identifiés d'associations ni répliqués des résultats antérieurs face à la réponse clinique aux médicaments ou à l'innocuité proférée par certains marqueurs PGx, faute de cohortes assez grandes ou d'événements suffisamment fréquents.<sup>71,128</sup>

Les limites abordées ci-haut, lesquelles ont accompagné l'expansion de la recherche et des applications cliniques PGx, obligent les groupes de recherche à développer de nouvelles ressources afin de contourner ces défauts méthodologiques. Pour surmonter les défis d'échantillonnage et de puissance statistique, des consortiums inter-institutionnels de recherche ont été mis en place afin de former des bases de données pangénomiques. En regroupant les données de multiples GWAS PGx, certains consortiums orientés vers l'étude de thérapies précises, comme l'irinotécan, la

metformine ou le tamoxifène, ont été en mesure d'identifier toujours plus d'associations PGx liées à leur efficacité ou à leur innocuité.<sup>70,128,133</sup> Notamment, on reconnaît parmi eux les travaux du groupe SEARCH (Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine), connus pour l'identification de la combinaison statines-*SLCO1B1* et l'induction de myopathies.<sup>135</sup> Outre l'investigation de thérapies spécifiques, d'autres consortiums pangénomiques PGx sont utilisées dans plusieurs sphères thérapeutiques. En partenariat avec l'institut japonais de recherche RIKEN, le réseau international du Pharmacogenomics Global Research Network (PGRN) procure >56 000 échantillons génotypés issus de plusieurs sources.<sup>136</sup> Incluant des groupes de recherches établis dans plus de 40 pays, un nombre considérable de publications scientifiques de GWAS PGx en oncologie, en cardiologie, en maladies pulmonaires et en neuropsychiatrie ont été rapportées grâce aux données du PGRN-RIKEN.<sup>128,136</sup> La réplication des résultats ou les méta-analyses de GWAS PGx deviennent par la suite envisageables. Notons que l'angle des travaux effectués grâce à ces bases de données mise davantage sur l'identification de variants PGx influençant la réponse clinique ou la toxicité des médicaments, sans toutefois se pencher de manière égale sur les associations PK-PGx précédemment définies. Peu d'exemples PK-PGx existent à l'aide de GWAS<sup>57</sup> et celles-ci se restreignent à de petites cohortes ne disposant pas toujours d'échantillons plasmatiques, avec lesquelles la quantification des concentrations de médicaments se voudrait un atout majeur servant à valider ces associations. En effet, il s'agit d'une caractéristique majeure de la médecine personnalisée,<sup>72,137</sup> puisqu'elle peut médier l'exposition aux thérapies.

La remédiation à l'échantillonnage insuffisant des GWAS PGx expose une problématique de diversité des origines populationnelles au sein des cohortes. L'inclusion prédominante de participants d'origine européennes empêcherait de capter la diversité PGx présentes dans d'autres populations et tendrait à freiner la généralisabilité des résultats établis dans les GWAS et leurs prédictions PGx.<sup>70,107</sup> Bien que ces enjeux outrepassent le but de cette thèse, il reste valable de mentionner l'élaboration d'initiatives populationnelles et le changement de paradigme qui s'effectuent actuellement face à ces biais.<sup>67,138</sup>

### 2.3.2 Ressources et consortiums pharmacogénomiques

Depuis les études initiales de médecine personnalisée, le volume d'informations et d'annotations PGx pour les médicaments n'a fait qu'augmenter, que ce soit en nombre ou en importance clinique. De 2000 à 2020, 178 monographies (26%) de produits approuvés par la FDA rapportaient un biomarqueur PGx.<sup>139</sup> Au moment d'écrire ces lignes, la FDA tient une liste d'environ 400 biomarqueurs PGx indiqués à-travers les monographies de 275 médicaments prescrits dans diverses aires thérapeutiques.<sup>110,139-141</sup> En général, ceux-ci sont identifiés en tant que cibles immuno-oncologiques et constituent des marqueurs génomiques nécessitant ou non des tests compagnons diagnostiques. Il n'en demeure pas moins que 138 marqueurs PK-PGx distribués sur 13 gènes ADME cibles, tels des enzymes ou des transporteurs, font l'objet de classifications.<sup>140</sup> Des contre-indications et des avertissements sont parfois émis, alors que des dizaines de marqueurs pour lesquels le génotypage est recommandé pour des populations spécifiques auraient le potentiel d'altérer les posologies de médicaments, même jusqu'à en requérir des changements de thérapies.<sup>140,141</sup> Les agences régulatrices européennes affichent elles aussi des provisions semblables avec des annotations PGx aux monographies.<sup>142</sup>

Outre l'information PGx fournie par les autorités réglementaires, il existe également des plateformes numériques libres d'accès ayant pour mission de réviser l'évidence et la littérature scientifique derrière chaque association. Comme il en a été question plus haut, le PGRN cherche à catalyser la recherche en médecine de précision et à supporter sa transition vers la pratique clinique. En accord avec ces buts, c'est lors de la formation du PGRN en l'an 2000 que le groupe a simultanément établi le Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB) afin de regrouper initialement les données génotypiques et phénotypiques pertinentes à la PGx.<sup>143</sup> Par la révision systématique d'articles scientifiques, l'annotation codifiée de variants et l'assignation d'un niveau d'évidence quantitatif pour chaque association identifiée, cette plateforme effectue un processus étayé de curation afin d'émettre des annotations cliniques. Les monographies de produits et les lignes directrices émises par d'autres consortiums PGx se voyant elles aussi révisées comme chacun des variant inclus, cette ressource publique gratuite regroupe et harmonise l'information PGx qu'on retrouve à tous les paliers et ce, à l'échelle internationale.<sup>144,145</sup> On s'efforce en plus à y distinguer des variants de haute importance, formuler des cascades métaboliques et de signalisation et à fournir une interprétation aux données révisées.

Financé par l'agence américaine des National Institutes of Health, le PGRN promeut le potentiel translationnel et l'application clinique concrète de la PGx en émettant des recommandations pratiques. Par l'entremise d'un cadre rigoureux, le groupe du Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC) concentre ses efforts à souligner les données probantes entourant des associations PGx d'intérêt.<sup>143,146,147</sup> Des lignes directrices à l'endroit des prescripteurs sont ensuite émises concernant des ajustements posologiques ou des changements de thérapies lorsque certains patients présentent un génotype ou un phénotype à risque.<sup>146,147</sup> Semblable à cette initiative, la Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy a quant à elle fondée le Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG).<sup>137,148</sup> Tout en supportant leurs recommandations par un procédé apparenté à celui du CPIC,<sup>149</sup> un système informatisé de support décisionnel clinique (*clinical decision support*, CDS) est intégré dans les systèmes de soins du territoire néerlandais pour alerter le personnel traitant d'une potentielle interaction PGx.<sup>148</sup> Ainsi, dans la mesure où la dimension PGx d'une thérapie s'avère pertinente et pour laquelle un test génétique existe, les praticiens se voient épaulés dans leur prise en charge des patients, que ce soit par le CPIC et plus concrètement par le DPWG. Étant tous deux partenaires avec le PharmGKB, les ajustements recommandés par ces consortiums sont disponibles en ligne.<sup>143</sup> Ensemble, ces initiatives reviennent à faciliter la dissémination, la compréhension et la mise en application de la PGx. D'autres ressources et bases de données moins connues existent pour la PGx clinique.<sup>72</sup> Dans l'intérêt des travaux de cette thèse, plus d'informations techniques seront fournies sur la catégorisation des variants, ainsi que la conversion des génotypes en phénotypes à la **Section 2.4**, où ces notions seront appliquées plus précisément au CYP2D6.

Un aspect crucial à ces recommandations et lignes directrices émises par les différents consortiums PGx est qu'elles n'agissent pas à titre de directives cliniques strictes, contrairement aux lignes directrices des sociétés cliniques, et que leur application n'est souvent pas exigée de la part des professionnels de la santé ou dans un contexte de soins quelconque. Certes, des biomarqueurs génétiques diagnostiques s'avèrent nécessaires dans certains cas et plusieurs sociétés cliniques sont favorables ou recommandent le génotypage pour personnaliser l'allocation de thérapies ciblées.<sup>150</sup> C'est le cas pour l'oncologie, où des avancées PGx substantielles sont maintenant une réalité clinique à prendre en compte.<sup>151</sup> Néanmoins, l'emploi de test PGx demeure marginal, faute de preuves abondantes issues d'essais randomisés contrôlés.<sup>150</sup> Cela dit, comme nous l'avons mentionné plus tôt, des sociétés cliniques en cardiologie se voient récemment de plus

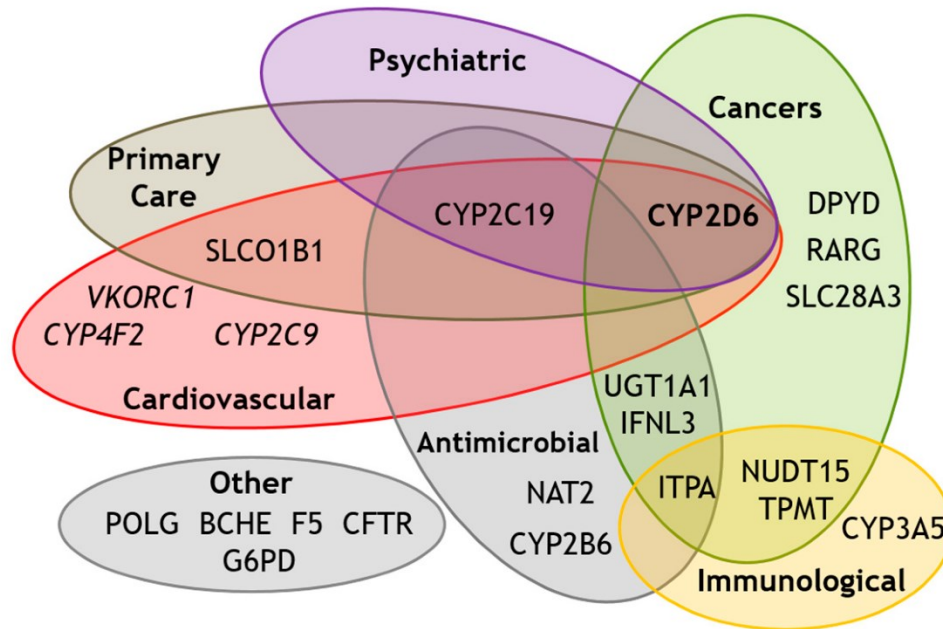
en plus favorables au génotypage préventif suivant la complétion de certaines études randomisées pour la warfarine dans des indications précises.<sup>105,115</sup> Néanmoins, la majorité des recommandations sont établies afin de suggérer des ajustements lorsque l'information génotypique du patient est déjà connue. Cette distinction amène à ce que la PGx clinique ne soit pas appliquée uniformément et dans toutes les aires thérapeutiques.<sup>150</sup> D'autant plus que les démarches recommandées relatives au génotypage des patients et aux décisions cliniques subséquentes tendent à ne pas s'équivaloir. En effet, des revues séparées des recommandations PGx provenant de consortiums PGx et d'autorités réglementaires témoignent du nombre élevé d'incohérences entre elles.<sup>152-154</sup> Celles-ci se reflètent dans la sélection des patients requérant un test PGx, le moment où un test PGx s'avère préférable (préventif/réactif), les génotypes à tester, puis les actions thérapeutiques ou les changements de posologies à apporter une fois les résultats obtenus.<sup>153,154</sup> En somme, les différentes instances PGx s'accordent sur son importance dans plusieurs aires thérapeutiques, mais le niveau d'évidence requis pour inciter le recours routinier aux tests génétiques, de même que les directives techniques et cliniques mises en place demeurent à être harmonisées pour faciliter les décisions pratiques et l'application généralisée. Des comités faisant le pont entre les consortiums PGx s'affairent à résoudre les divergences rencontrées, que ce soit au niveau des recommandations thérapeutiques, des sous-groupes à risque ou de la définition des phénotypes.<sup>155</sup>

#### **2.4 Pharmacogénomique et métabolisme des médicaments : implications du CYP2D6**

Au même titre que les autres membres de la superfamille des CYPs, le CYP2D6 contribue à différents degrés au métabolisme de multiples substrats endogènes et de xénobiotiques,<sup>14,156,157</sup> les réactions d'oxydoréduction étant l'hydroxylation, la déméthylation et la désalkylation.<sup>158</sup> Bien que son expression hépatique et intestinale soient respectivement de l'ordre de 2-4% et <1% relativement aux autres CYPs exprimés,<sup>156,159</sup> le CYP2D6 dispose d'une faible spécificité de substrat, ce qui impliquerait l'isozyme dans le métabolisme d'environ 20-25% de tous les médicaments utilisés en milieu clinique.<sup>16</sup> La **Figure 3** témoigne des aires thérapeutiques couvertes par cette absence de spécificité, parmi lesquelles se trouvent la cardiologie, la psychiatrie et l'oncologie. Notamment, on compte des agents antiarythmiques (flécaïnide, propafénone, spartéine), antipsychotiques (halopéridol), antihistaminiques (diphénhydramine), anti-dépresseurs (amitriptyline, citalopram, fluoxétine, venlafaxine), anti-cancéreux (tamoxifène), analgésiques (codéine, hydrocodone) et  $\beta$ -bloquants (carvédilol, métoprolol, nébivolol) étant des substrats du



CYP2D6.<sup>156,157,159</sup> Étant donné son implication métabolique dans plusieurs classes thérapeutiques, le CYP2D6 peut être affecté par des substrats inhibiteurs ou causer des interactions médicamenteuses.<sup>14,156</sup> Ces considérations seront discutées ultérieurement dans cette section.



**Figure 3 Diagramme de Venn et aperçu des implications pharmacogénomiques de diverses cibles métaboliques dans différentes aires thérapeutiques majeures.**

Le CYP2D6 parvient à intégrer la majorité d'entre elles.

Reproduction autorisée [libre accès, *Creative Commons Attribution License (CC BY)*] : Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. *A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics*. *Genes*. 2020;11(11):1295.

#### 2.4.1 Structure génétique, variations de séquence et nomenclature allélique

Situé au locus 22q13.1, le gène *CYP2D6* est composé de précisément 4382 nucléotides, 1497 d'entre eux formant le cadre de lecture de 9 exons et codant une protéine de 497 acides aminés.<sup>160</sup> Cette séquence s'inscrit dans une région du locus *CYP2D* qui inclue le gène non-fonctionnel *CYP2D7* et le pseudogène *CYP2D8P*.<sup>156,161</sup> Ainsi, c'est au début des années 1990, peu de temps après la complétion de son séquençage, que des variants alléliques sont initialement identifiés pour *CYP2D6* avec les techniques PCR.<sup>162</sup> Depuis, la base de données en ligne du

Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar), qui est responsable de cataloguer, de standardiser et de nommer l'ensemble des variants alléliques de gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments, cumule plus de 140 allèles et sous-allèles pour *CYP2D6*, faisant actuellement de ce pharmacogène un des plus polymorphiques.<sup>163,164</sup> La majorité des variants sont des SNPs, mais d'autres variations comme des indels, des duplications ou des délétions complètes de séquence génétique, des réarrangements en tandem ou des hybridations de séquence avec *CYP2D7* sont présentes à des fréquences variables.<sup>161,164</sup> L'émergence d'outils bio-informatiques performants exploitant le séquençage complet de *CYP2D6* témoigne du raffinement vis-à-vis la découverte, l'identification et la validation de ses variants structurels.<sup>165-167</sup>

De façon similaire à l'ensemble des pharmacogènes répertoriées sur la base de données PharmVar, une nomenclature par étoile (\*) est attribuée à chaque variant.<sup>168</sup> Par exemple, le variant *CYP2D6\*10A* (100C>T) réfère à un changement de nucléotide qui modifie la séquence d'acides aminés (P34S), alors que l'appellation *CYP2D6\*IxN* désigne une duplication de séquence sauvage par un facteur *N*. Ensemble, ces variations peuvent engendrer des conséquences fonctionnelles allant de l'absence complète ou partielle jusqu'à l'augmentation de l'activité enzymatique par rapport à la même protéine codée par une séquence sauvage.<sup>163</sup> Ces impacts seront discutés dans les sections suivantes.

#### 2.4.2 Phénotypage : des substrats marqueurs jusqu'aux génotypes

Les premières évidences scientifiques témoignant d'un impact du *CYP2D6* sur le métabolisme des médicaments précèdent son séquençage de plus d'une décennie. En 1977, une cohorte prospective de 94 patients affiche des différences de concentrations circulantes pour la débrisoquine, un agent antihypertenseur.<sup>169</sup> En effet, un sous-groupe semble démontrer un métabolisme déficitaire et une exposition accrue au médicament. Deux phénotypes dits « oxydatifs » sont alors distingués, soient les métaboliseurs normaux (*extensive/normal metabolizers*, NMs) et lents (*poor metabolizers*, PMs). Ceux-ci sont déterminés en mesurant le pourcentage de dose excrétée en un intervalle de temps préétabli, lui-même étant obtenu en calculant les concentrations urinaires de débrisoquine relativement à celles de son métabolite principal, le 4-hydroxydébrisoquine. Une valeur seuil de la distribution bimodale observée permet de catégoriser les patients en tant que NMs ou PMs. Ce faisant, le « ratio métabolique » est mesuré selon l'équation suivante :

$$\text{Ratio métabolique} = \frac{\% \text{ de dose excrétée sous forme de médicament}}{\% \text{ de dose excrétée sous forme de métabolite}}$$

Durant ces mêmes travaux, la distinction entre deux phénotypes oxydatifs est confirmée par l'entremise d'une étude de liaison incluant trois familles de patients issus de la cohorte. Ainsi, cette méthode de phénotypage permet non seulement d'établir la présence de multiples phénotypes du métabolisme de la débrisoquine, mais indique également l'implication d'un gène contrôlant le statut métabolique des patients. Puis, d'autres groupes de recherche reproduisent le phénomène et réitèrent l'hypothèse proposée de l'héritabilité comme étant tributaire du « polymorphisme oxydatif » de la débrisoquine et ayant une cause génétique.<sup>170-172</sup> En outre, ce sera presque 40 ans plus tard, lors d'une étude de liaison ayant recours à l'information génétique de *CYP2D6* chez des jumeaux monozygotes et dizygotes, que l'ampleur de l'influence héréditaire liée à ces facteurs sera établie et généralisée en lien avec le métabolisme d'autres médicaments,<sup>173</sup> dont le métoprolol qui sera central au projets de recherche couverts dans les prochains chapitres.

Suivant les premières évidences obtenues avec la débrisoquine, d'autres substrats marqueurs du CYP2D6 ont été utilisés afin de procéder à son phénotypage par ratio métabolique, notamment la spartéine,<sup>174,175</sup> un agent antiarythmique, ainsi que la dextrométhorphanne,<sup>175-177</sup> une molécule aux propriétés antitussives. Le métoprolol est aussi été employé pour le phénotypage du CYP2D6.<sup>178-180</sup> Toutefois, des corrélations plus faibles seraient observées entre les ratios métaboliques du métoprolol et les valeurs des autres substrats marqueurs, ce qui réduit son usage.<sup>181</sup> Qui plus est, des données scientifiques indiquent une variabilité inter-ethnique des valeurs de ratio métabolique avec le métoprolol qui ne sont pas reflétées avec d'autres substrats marqueurs.<sup>181,182</sup>

Bien que les approches utilisant strictement des substrats marqueurs aient permis plusieurs contributions et soient encore pertinentes au phénotypage des CYPs dans certains contextes,<sup>183,184</sup> l'information génétique s'avère plus avantageuse afin d'évaluer la capacité enzymatique et de prédire le statut métabolique d'un individu. Effectivement, l'accès facilité de l'information génétique comme paramètre constant par simple prélèvement sanguin, l'abolition des contraintes de temps associées aux collectes urinaires, l'amélioration des techniques de génotypage et la mise en place d'un système standardisé de nomenclature ont contribué à un changement de paradigme dans l'évaluation de l'activité métabolique des CYPs.<sup>163</sup> Ainsi, l'application plus répandue des

techniques de génotypage envers *CYP2D6* et la détection croissante du nombre de polymorphismes a permis d'identifier une distribution plus élaborée de profils métaboliques du *CYP2D6*.<sup>185</sup> En reliant l'information génotypique au ratio métabolique, deux phénotypes supplémentaires ont été instaurés, soient les métaboliseurs intermédiaires (*intermediate metabolizers*, IMs),<sup>186</sup> possédant un statut métabolique entre celui des PMs et des NMs, et les métaboliseurs ultra-rapides (*ultra-rapid metabolizers*, UMs),<sup>187</sup> ceux-ci disposant d'une activité métabolique supérieure aux NMs. Une classification phénotypique du *CYP2D6* par fonctionnalité allélique a ensuite été proposé comme un ajout à la mesure du ratio métabolique.<sup>188</sup>

Le phénotypage par substrats marqueurs demeure limitant et force l'utilisation seule de l'information génétique, car il peut être faussé par la prise concomitante de plusieurs médicaments substrats du *CYP2D6* (voir **Section 2.4.5**).<sup>189</sup> Le recours aux polypharmacies, de même que la hausse potentielle d'interactions médicamenteuses qu'elles occasionnent, peut inclure des agents thérapeutiques faisant varier la vitesse à laquelle une molécule est normalement métabolisée par le *CYP2D6* ou d'autres enzymes, contrairement à une allocation individuelle.<sup>190,191</sup> Ces variations pouvant se répercuter sur le métabolisme hépatique et la clairance urinaire, un calcul erroné du ratio métabolique par substrat marqueur reste un facteur confondant pour cette technique de phénotypage et augmente l'incertitude quant à la détermination du statut métabolique. De la même façon, un génotype associé à un certain statut métabolique pourrait comporter des valeurs imprécises et changeantes de ratio métabolique.<sup>187,192</sup> Ce principe peut s'appliquer aux profils PK de plusieurs médicaments métabolisés par le *CYP2D6*.<sup>193</sup>

Il est nécessaire nuancer que le génotypage réduit cette variabilité des mesures, mais ne constitue pas pour autant la seule mesure qui importe dans le contexte clinique. Ici, rappelons simplement que la prise de médicaments concomitants et la maladie présente chez un patient peuvent entrer en conflit avec les données génotypiques obtenues au préalable. Ces points concernant la phénoconversion seront traités dans la **Section 2.4.5**. D'autres facteurs physiologiques comme la capacité d'élimination rénale (*i.e.* Cl/F) et le degré de liaison aux protéines plasmatiques feront varier les profils PK observés, ce qui nécessitera des ajustements aux calculs de VD et de  $t_{1/2}$  pour individualiser les doses de manière adéquate.<sup>194</sup> L'administration d'une drogue devrait considérer le volet génotypique selon sa pleine mise en contexte clinique et avec tous les autres facteurs intervenants.

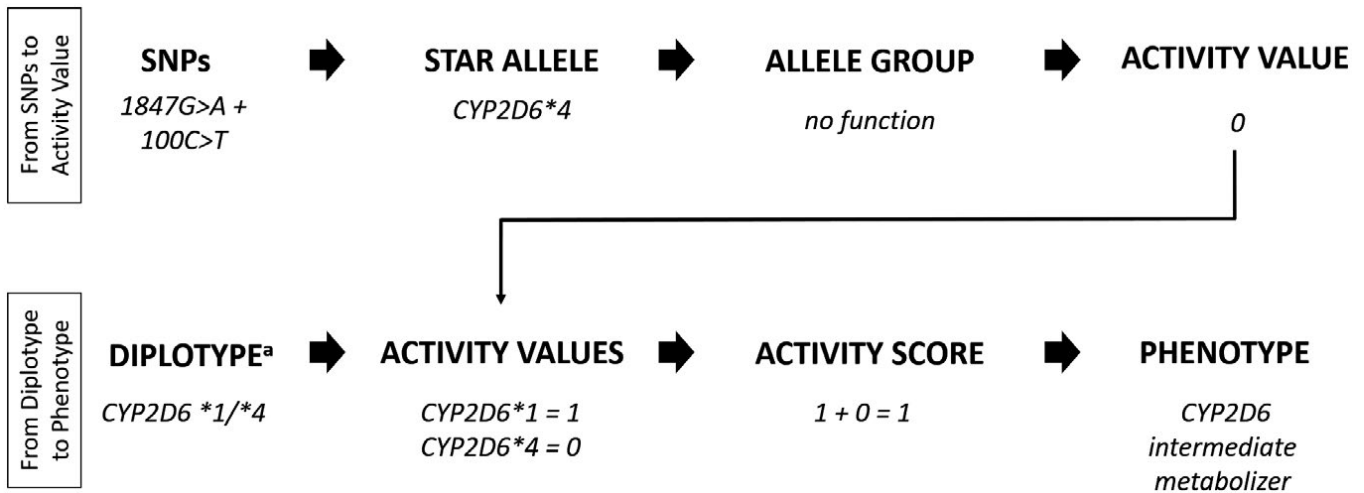
### 2.4.3 Pointage allélique et inférence phénotypique

Actuellement, plutôt que d'employer le ratio métabolique, l'activité enzymatique conférée par un allèle spécifique est quantifiée objectivement en déterminant l'activité enzymatique de la séquence possédant le variant relativement à celle de la séquence sauvage du gène, dans ce cas-ci *CYP2D6\*1*.<sup>163,195</sup> La mutagenèse dirigée *in vitro* est habituellement utilisée pour introduire un variant génétique déterminé, puis évaluer l'activité métabolique de l'enzyme face à certains substrats marqueurs en présence du variant.<sup>196</sup> Des pointages alléliques sont alors accordés à chaque variant et pour chaque allèle : 0 pour une activité métabolique nulle; 0,25 ou 0,5 pour une activité métabolique réduite; 1 pour une activité métabolique similaire à *CYP2D6\*1* (**Tableau 3**).<sup>157,196</sup> Par exemple, le variant *CYP2D6\*5*, représenté par la délétion complète du gène, possède un pointage allélique de 0, tandis que les variants *CYP2D6\*10* et *\*41* (2851C>T) ne font que diminuer partiellement l'activité enzymatique de la protéine codée et ont des pointages alléliques respectifs de 0,25 et 0,5.

**Tableau 3 Classification phénotypique du CYP2D6 selon les pointages génotypiques.<sup>182</sup>**

Phénotypes inférés par génotypes	Pointages génotypiques associés	Fonctionnalité allélique	Exemples de génotypes
UM	>2,25	Duplication d'allèles fonctionnelles	*1xN/*2, *2xN/*1, *2xN/*9
NM	1,25 - 2,25	1 allèle fonctionnelle et 1 allèle dupliquée à fonction diminuée	*1/*10xN, *2/*10xN
		2 allèles fonctionnelles	*1/*1, *1/*2, *2/*27
		1 allèle fonctionnelle et 1 à fonction diminuée	*1/*41, *2/*10, *2/*29
IM	0,25 - 1,00	1 allèle fonctionnelle et 1 non-fonctionnelle	*1/*4, *2/*31, *2/*36
		2 allèles à fonction diminuée	*10/*10, *41/*41, *10/*54
		1 allèle à fonction diminuée et 1 non-fonctionnelle	*4/*10, *6/*9, *10/*51
PM	0	2 allèles non-fonctionnelles	*4/*4, *5/*38, *6/*44

Au niveau du phénotypage, le pointage allélique de chaque allèle identifié est combiné afin de faire un pointage génotypique total. Chaque phénotype inféré du diplotype est associé à des valeurs limites définies de pointage : 0 pour les PMs, 0,25-1,00 pour les IMs, 1,25-2,25 pour les NMs et >2,25 pour les UMs (**Figure 4**).<sup>197</sup> Malgré les divergences précédemment rapportées de la part des différents consortiums PGx comme le CPIC et le DPWG dans les valeurs limites associées aux IMs et aux NMs,<sup>149,198</sup> une catégorisation maintenant standardisée des pointages génotypiques d'activité facilite l'attribution d'un phénotype.<sup>197</sup> Il est important de souligner que l'attribution précise d'un pointage allélique selon le métabolisme de substrats marqueurs ne capte qu'en partie la variabilité métabolique du CYP2D6<sup>165,199</sup> et qu'une portion de variabilité non-expliquée persiste pour les variants désignés selon le système *CYP2D6\**.<sup>165</sup> Il en demeure que l'association directe du système de pointage génotypique au procédé de classification phénotypique du CYP2D6 permet à la fois de faciliter l'interprétation de l'information génétique et de standardiser l'attribution d'un statut métabolique.



**Figure 4** Processus d'attribution phénotypique pour le CYP2D6.

Le diplotype est obtenu à partir des allèles qui disposent de scores d'activité précis.

Reproduction autorisée : Caudle KE et al. *Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group*. Clin Trans Sci. (2020) 13, 116–124.  
Copyright © 2020 Caudle KE et al.

#### 2.4.4 Distribution populationnelle

La distribution des fréquences alléliques de *CYP2D6* varie significativement lorsque celle-ci est analysée selon l'ethnicité. En effet, les données publiées les plus actuelles suggèrent que les populations asiatiques et africaines seraient fortement plus porteuses d'allèle à fonction réduite comme *CYP2D6\*10* et *\*17*, respectivement, alors que les populations d'origines européennes afficheraient des fréquences plus élevées du variant non-fonctionnel *\*4* face aux autres. La plupart des ethnicités présentent en majorité des allèles fonctionnelles, suivies d'allèles à fonction réduite, non-fonctionnelles, puis dupliquées, quoique représentées à différentes proportions.<sup>200</sup>

Ces distributions alléliques différentielles ont des impacts sur la représentation phénotypique. Par exemple, on retrouve plus de IMs qui composeraient les populations asiatiques et davantage de PMs chez les Européens, le statut métabolique NM demeurant toutefois le plus fréquent. D'autres analyses regroupant les distributions alléliques, génotypiques et phénotypiques du CYP2D6 en fonction de l'ethnicité et du pays d'origine suggèrent qu'environ 36,4% de la

population mondiale aurait un métabolisme non-normal (*i.e.* PM, IM, UM).<sup>201</sup> Ainsi, ce sont respectivement entre 0,4-5,4%, 0,4-11%, 67-90%, et 1-21% de PMs, IMs, NMs et UMs qui seraient représentés à-travers toutes les populations recensées.<sup>200</sup> Des limites s'appliquent aux données démographiques, tel que la disponibilité limitée de données pour certaines populations, du génotypage restreint de variants testés ou de l'omission du nombre de copies de gènes.<sup>163</sup> Néanmoins, ces données reflètent la variabilité considérable quant au métabolisme de cet isozyme.

#### 2.4.5 Phénoconversion et facteurs influençant le métabolisme du CYP2D6

L'activité du CYP2D6 parmi les différentes phases développementales a fait l'objet d'investigations antérieures, dont lors d'un essai réalisé à l'aide d'échantillons fœtaux de tissus hépatiques, ou provenant de participants entre 0-18 ans.<sup>202</sup> Selon le métabolisme de substrats marqueurs, ces travaux démontraient que malgré que les niveaux gestationnels d'expression de CYP2D6 n'étaient que de 3-5% comparativement à ceux près de l'âge adulte, ceux-ci devenaient similaires dès la première semaine post-natale. À l'inverse, plusieurs publications relatent les impacts du vieillissement sur l'activité métabolique des CYPs. En général, bien que certaines données suggèrent une diminution de leur activité, l'âge ne semble pas être un facteur majeur d'influence.<sup>203,204</sup> Les résultats d'un essai ayant investigué l'influence de l'âge et du sexe sur la capacité enzymatique *in vivo* des CYPs chez des volontaires adultes sains démontrait que celle du CYP2D6 n'était pas associée à ces deux paramètres, selon les ratios métaboliques de substrats marqueurs.<sup>205</sup> Ces données corroborent des résultats subséquents ayant établi que, suivant l'ajustement par modèles multivariés incluant notamment l'âge et le sexe, au-dessus de la moitié (59%) de la variabilité inter-individuelle de l'activité du CYP2D6 était directement attribuable aux niveaux différentiels d'expression de son gène, tel que mesuré par les taux d'ARNm.<sup>206</sup> Notons que seulement 23% de cette variabilité pouvait être expliquée par le génotype de *CYP2D6*, ce qui ne peut exclure l'influence d'autres facteurs environnementaux, par exemple, toujours selon l'analyse de ratios métaboliques.<sup>206</sup>

Aux facteurs démographiques s'ajoutent l'état physiopathologique comme pouvant avoir un effet de phénoconversion.<sup>193</sup> Des données concernant l'expression des CYPs chez des patients diabétiques démontraient l'influence d'un état inflammatoire systémique sur le métabolisme de certaines enzymes.<sup>207</sup> Le CYP2D6 ne serait toutefois pas influencé dans ce contexte, bien que l'augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs pro-inflammatoires corrèle avec



une baisse de son activité dans d'autres.<sup>208</sup> Le VIH réduirait l'expression de CYP2D6 de près de 90%,<sup>208,209</sup> alors qu'il demeure incertain si la présence de cancer aurait des implications majeures sur son activité.<sup>193</sup> Finalement, les maladies hépatiques ont été identifiées comme facteur de phénoconversion.<sup>209</sup> Notons que la transplantation hépatique peut parfois provoquer une phénoconversion du CYP2D6, car le génotype identifié à l'aide de tissus non-hépatiques chez le receveur différerait de ce qui est exprimé au niveau du foie du donneur.<sup>210</sup>

Bien sûr, la prise concomitante de médicaments peut elle aussi causer des interactions médicamenteuses faisant en sorte que le génotype observé ne soit pas concordant avec l'activité enzymatique des CYPs chez un patient.<sup>193</sup> Les données recueillies par la FDA relatent des inhibiteurs faibles, modérés et sévères pouvant influencer le métabolisme du CYP2D6.<sup>211</sup> Comme nous l'avons abordé dans la **Section 2.4.2**, ces données s'appuient sur les différences de profils PK, plus particulièrement de valeurs de AUC observées avec et sans médication concomitante, afin de démontrer la diminution de la vitesse à laquelle un enzyme métabolise un substrat donné. Ces interactions sont davantage visibles pour les patients avec un métabolisme UM ou EM, pour lesquels une phénoconversion peut entraîner un phénotype apparent IM ou PM. Dans le cas où un patient se voit déjà être PM, l'absence d'activité enzymatique demeure inchangée en présence d'inhibiteurs ou de co-médications empruntant la même voie métabolique.<sup>189,209</sup> En fonction de la vitesse d'élimination et de l'affinité aux cibles qu'elles inhibent, la phénoconversion apparente peut perdurer pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines.<sup>209</sup> Au final, le phénotype apparent demeure la donnée à utiliser en milieu clinique.

#### 2.4.6 Recommandations cliniques face à la pharmacogénomique du CYP2D6

Compte tenu de l'impact des polymorphismes génétiques et de sa faible spécificité de substrat, des efforts considérables ont été entrepris afin de personnaliser certains traitements selon l'information génotypique du CYP2D6.<sup>157</sup> Tel qu'abordé précédemment, le CPIC et le DPWG publient et révisent depuis plus d'une décennie des recommandations cliniques ayant pour but d'ajuster le dosage des médicaments ou les thérapies prodiguées en fonction de l'évidence PGx rapportée dans la littérature révisée par des pairs.<sup>137,146</sup> Ces recommandations sont accessibles sur le portail PharmGKB.<sup>144,145</sup> Une vaste sélection d'agents thérapeutiques métabolisés par le CYP2D6 font l'objet de recommandations générales,<sup>137</sup> quoique bien des classes pharmacologiques comportent leurs propres lignes directrices exhaustives.<sup>157</sup> Celles reliées aux  $\beta$ -

bloqueurs seront traitées à la **Section 4** en dressant un portrait global de l'évidence PGx sur cette classe de médicaments.

Quant aux autres réseaux axés sur l'avancement et l'implantation de la PGx, le CPNDS recommande fortement le génotypage de *CYP2D6* dans des cas précis. Par exemple, les femmes en allaitement présentant des douleurs postpartum et recevant une ordonnance de codéine pourraient se faire génotyper afin d'éviter une exposition toxique chez l'enfant, car le CPNDS estime que les bénéfices potentiels dépassent les risques encourus par cette approche.<sup>212</sup> Les recommandations du CPNDS s'étendent aux patients naïfs à la codéine afin de rejeter les non-répondeurs PMs ne bénéficiant pas d'effet pharmacologique significatif<sup>214</sup> ou les hyper-répondeurs UMs étant à risque d'événements secondaires graves.<sup>215</sup> Établi en France, le Réseau francophone de Pharmacogénétique (RNPGx) conseille le génotypage de *CYP2D6* dans un nombre important de thérapies psychiatriques<sup>216</sup> alors que, citant des données scientifiques conflictuelles, s'abstient d'émettre des recommandations visant d'autres thérapies.<sup>217</sup> Néanmoins, à la fois pour le CPNDS et le RNPGx, le génotypage de variants précis de *CYP2D6*, le phénotypage par pointage génotypique et des suggestions cliniques de réductions de dose ou d'alternatives thérapeutiques sont mentionnés. Donc, les considérations pratiques demeurent centrales à ces recommandations, en plus du support scientifique et clinique qui puissent les justifier.

Au moment d'écrire ces lignes, presque aucune société clinique ne requiert le génotypage du *CYP2D6* pour accompagner la prescription de traitements particuliers, car il n'existe pas d'études randomisées contrôlées antérieures démontrant de façon concrète l'utilité clinique du génotypage du *CYP2D6* pour une indication donnée. Les sociétés cliniques en oncologie n'estiment pas que le génotypage *CYP2D6* soit conseillé pour guider certaines chimiothérapies, comme le tamoxifène.<sup>151,218</sup> C'est le cas pour beaucoup d'autres sociétés qui, sans toutefois s'y opposer, ne parviennent pas à distinguer clairement une utilité clinique.<sup>150</sup> Seule l'American Psychiatric Association fait état des agents antipsychotiques dont les profils PK ou PD et la réponse clinique peuvent varier selon le statut métabolique du *CYP2D6*.<sup>219</sup> Plusieurs commentaires sur l'ajustement du dosage sont indiqués, de sorte à ce que les patients PMs évitent le dépassement d'une dose maximale aggravant l'innocuité des thérapies antipsychotiques, notamment.<sup>219</sup> À cet égard, cette ouverture au génotypage du *CYP2D6* se reflète dans la liste de biomarqueurs génétiques des agences réglementaires. Par exemple, parmi les 68 biomarqueurs PGx répertoriés

par la FDA pour CYP2D6, dont 33 pour des médicaments psychiatriques, on retrouve une contre-indication, deux avertissements pour la prescription d'opioïdes, ainsi que 16 recommandations d'ajustements posologiques pour des thérapies variées,<sup>140</sup> pour lesquels tous ces renseignements de monographies impliquent forcément le génotypage.

Pour résumer, hormis quelques traitements précis, le génotypage du CYP2D6 est généralement une recommandation informelle visant à guider le traitement en connaissance de l'information PGx des patients.<sup>157</sup> Aux yeux des sociétés cliniques et des consortiums PGx, l'évidence supportant l'application de cette pratique pour prédire la réponse à des médicaments ne se veut actuellement pas assez convaincante pour entrevoir une utilité clinique plus intégrale.

## **2.5 Les biobanques comme outil de recherche biomédicale**

Le concept des biobanques est relativement récent.<sup>220</sup> Nonobstant les perspectives divergentes sur les aspects qui puissent les constituer,<sup>221</sup> on les qualifie généralement en tant que laboratoires multidisciplinaires spécialisés dans la collecte, l'entreposage, la conservation et l'analyse anticipée de biospécimens variés en vue de leur usage dédié à des projets de recherche actuels ou ultérieurs.<sup>221-224</sup> La nature des échantillons préservés prennent la forme de tissus, de cellules, d'échantillons sanguins et plasmatiques avec ADN/ARN, protéines et/ou métabolites et sont conservées sur une base à long terme.<sup>225</sup> Par les échantillons biologiques dont elles disposent, ces infrastructures permettent de générer et de rassembler des quantités considérables d'informations, lesquelles peuvent être accédées lorsqu'il en convient, selon les projets de recherche les requérant.<sup>222</sup> Ainsi, ces bases de données informatiques peuvent comprendre l'historique biomédical, les informations sociodémographiques, les habitudes de vie et surtout les données génétiques des participants inclus. Les données génétiques sont l'une des caractéristiques centrales à certaines biobanques leur permettant d'accélérer la recherche translationnelle.<sup>226</sup> Certains observateurs attribuent l'effervescence des biobanques durant les dernières années à l'évolution des méthodes de séquençage,<sup>28,227</sup> à la demande grandissante de biospécimens en recherche<sup>225</sup> et à l'augmentation de la capacité de storage informatique des données qui découlent de leur analyse.<sup>222,228</sup> Le développement de la médecine génomique et plus largement des sciences « -omiques » agirait également en soi comme un catalyseur à l'utilisation de ces ressources.<sup>228-230</sup> Ainsi, ces initiatives se veulent être une nouvelle méthodologie facilitant la découverte, l'identification et la validation de mécanismes physiopathologiques. Que ce soit par le biais d'essai

prospectifs ou rétrospectifs, les biobanques constituent une opportunité d'élucider certains phénotypes et d'optimiser les avenues pronostiques, diagnostiques et thérapeutiques offertes aux populations atteintes.<sup>222,229,230</sup>

### 2.5.1 Types et portée des biobanques

Depuis la mise en place des premières biobanques, leur portrait d'ensemble a grandement évolué en matière de gouvernance et de taille. Parmi 456 biobanques américaines incluses dans un sondage, Henderson *et al.* rapportait qu'elles sont souvent associées à des organisations plus larges, celles-ci prenant la forme de centres universitaires ou de consortiums jusqu'à des infrastructures gouvernementales et des sociétés corporatives.<sup>227</sup> Cela dit, celles-ci seraient rattachées à une hauteur de 78% à un institut académique, confirmant la vocation de recherche des biobanques répondantes.<sup>227</sup> D'autant plus qu'au-delà d'une centaine d'entre elles auraient des affiliations hospitalières ou à des instituts de soins, ce qui faciliterait la collecte de biospécimens, le traitement de leurs données relatives et l'accessibilité à de nouveaux patients.<sup>223,227</sup> À cet effet, la diversité des travaux de recherche dépend encore une fois de l'objectif d'une biobanque en particulier. Plus de 335 (76%) affirmaient cibler des participants avec une conditions physiopathologique particulière, tandis que 40% d'entre elles incluaient des cohortes variées ou issues d'essais cliniques.<sup>227</sup> Les biobanques demeurent catégorisées selon les objectifs de recherche qu'elles tentent de remplir. Pour ces raisons, on distingue deux catégories majeures en fonction de leurs objectifs de recherche, soient les biobanques populationnelles et de cohortes.

#### 2.5.1.1 Biobanques populationnelles

Comme le suggère leur appellation, les biobanques populationnelles sont constituées de participants volontaires recrutés à partir d'une population générale de façon longitudinale, moyennant certains critères de sélection et d'inclusion, sans que ces derniers ne présentent nécessairement d'antécédents médicaux particuliers.<sup>222,224,226</sup> Les biobanques populationnelles se veulent avantageuses afin de recruter des individus sains et d'autres possédant une maladie définie afin d'effectuer des comparaison cas-contrôles et d'élucider ainsi la présence de signatures génétiques physiopathologiques. Considérant leur très grand déploiement, l'investigation de phénotypes rares peut également être facilitée,<sup>222</sup> ainsi que les impacts des habitudes de vie ou l'exposition à d'autres phénomènes environnementaux.<sup>231</sup> Créée il y a plus de deux décennies, le UK Biobank constitue un exemple phare d'une initiative nationale permettant de regrouper par le

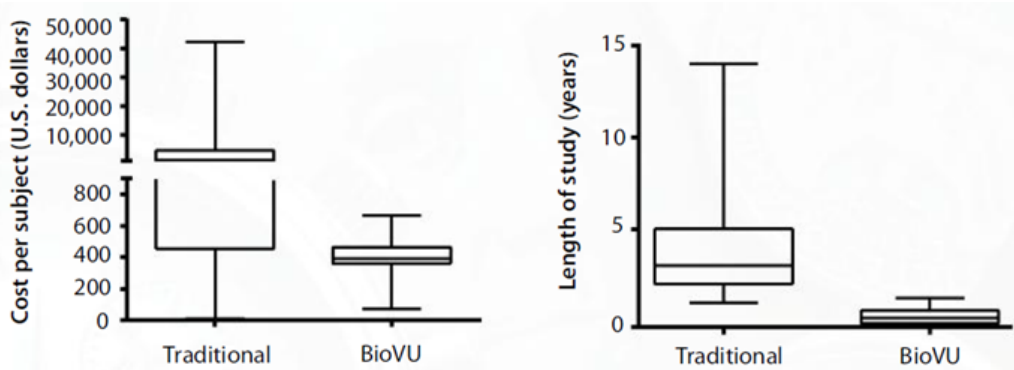
biais de cliniques médicales externes et de centres de recrutement des biospécimens de participants sains ou atteints de conditions médicales précises et issus de tout le territoire du Royaume-Uni.<sup>231</sup> En 2019, ce sont plus de 500 000 participants qui ont pu être recrutés au total et dont le consentement et l'accès à l'information génétique étaient disponibles,<sup>230</sup> avec l'objectif d'inclure 15 millions de biospécimens réservés à la recherche biomédicale. Le cas islandais deCODE Genetics figure comme un autre exemple intéressant dont les travaux s'orientent vers le séquençage génétique populationnel afin d'identifier des facteurs génomiques de maladies communes.<sup>232</sup> S'agissant d'une biobanque commerciale initialement dirigée vers le développement pharmaceutique et diagnostique, deCODE Genetics se penche désormais sur les avantages élargis de l'information génomique en matière de santé publique.<sup>232</sup>

#### 2.5.1.2 Biobanques de cohorte

D'un autre côté, les biobanques de cohorte, ou hospitalières, visent habituellement à recruter des patients directement à partir des centres hospitaliers affiliés afin d'investiguer de façon plus délibérée des physiopathologies spécifiques ou faisant partie d'un éventail élargi,<sup>222,224,226</sup> tel qu'énoncé plus haut.<sup>226</sup> De cette façon, la Biobanque de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) se prête à ce modèle en recrutant directement des participants initialement compris dans sa Cohorte Hospitalière, incluant des membres de leurs familles.<sup>233</sup> Le recrutement longitudinal et continu de patients rend possible l'accumulation de dizaines de milliers de patients. Puisque des échantillons biologiques de patients malades et parfois de volontaires sains sont prélevés et conservés, l'élucidation de phénotypes physiopathologiques et de leur composante génétique peut déterminer l'impact de différents allèles sur le développement et la progression des maladies.<sup>222,234</sup>

Depuis déjà quelques années, l'utilité et le potentiel translationnel des biobanques de cohortes a été fortement amélioré par l'intégration généralisée des dossiers médicaux électroniques. Un des exemples connus est le cas de l'Université Vanderbilt et la biobanque BioVU.<sup>235</sup> En parvenant à extraire et synthétiser sous forme dénominalisées les informations médicales de patients, ce modèle réduit considérablement le suivi des patients, qui est souvent impossible à long terme. Mieux encore, l'accumulation de biospécimens dans une biobanque, en parallèle au pairage des dossiers médicaux électroniques, rend possible des études observationnelles à grand déploiement, sans nécessité de recontacter la plupart des patients et ayant à disposition leurs informations biomédicales exhaustives.<sup>236</sup> Comme le démontre le cas de

BioVU, la réutilisation continue des données préalablement collectées engendre des réductions importantes de coûts déboursés par patients recrutés et raccourcit le temps de complétion des études amorcées (**Figure 5**).<sup>236</sup>



**Figure 5 Comparaisons des coûts médians par participants (gauche) et de la durée médiane des études (droite) des essais pharmacogénomiques traditionnels financés et ceux initiés à partir d'une biobanque.**

Reproduction autorisée : Bowton E, Field JR, Wang S, Schildcrout JS, Driest SLV, Delaney JT, et al. *Biobanks and Electronic Medical Records: Enabling Cost-Effective Research*. *Sci. Transl. Med.* 2014;6(234):234cm3-cm3  
 Copyright © 2014, with permissions from the American Association for the Advancement of Science.

La démonstration de ces bénéfices fait que la réconciliation des dossiers médicaux électroniques aux données de biobanques est désormais pratique courante en recherche translationnelle.<sup>230,237</sup> Sans compter que les données génomiques obtenues des plateformes peuvent se greffer aux informations qu'ils comprennent.<sup>230</sup> À ce sujet, le consortium eMERGE (electronic Medical Records and Genomics)<sup>238</sup> et le réseau IGNITE (Implementing GeNomics In pracTicE)<sup>239,240</sup> s'efforcent à identifier les défis et les opportunités liés à l'inclusion des données génomiques aux dossiers médicaux électroniques, mais également à l'usage de ces informations en recherche et en pratique cliniques. Ces initiatives procureraient des ressources éducatives destinées aux cliniciens et aux patients sur les bénéfices et les outils disponibles en médecine personnalisée, tout en identifiant des stratégies potentielles de génotypage ou de séquençage qui puissent élargir les découvertes PGx. Des plateformes ont justement été instaurées dans les biobanques afin d'identifier des déterminants génétiques physiopathologiques pouvant moduler la réponse aux traitements.<sup>136,228,241</sup> Le groupe eMERGE rapporte plusieurs cas où, grâce à un partage

coopératif de données génomiques, des GWAS ont été réalisés avec des biobanques de cohortes pour identifier des déterminants génétiques physiopathologiques associés au diabète, aux maladies artérielles périphériques, aux arythmies et à l'hypercholestérolémie familiale, par exemple.<sup>241-243</sup> Ainsi, le partage de données génomiques sous forme de biobanques virtuelles est de plus en plus envisagé afin de regrouper davantage de biospécimens et de dossiers de patients, ce qui favorise à son tour les collaborations multicentriques.<sup>244</sup> Par ces démarches, les tailles d'échantillons s'en trouvent augmentées et une attention particulière est portée sur l'harmonisation inter-institutionnelle du traitement d'échantillons.<sup>241,245</sup> Puis, des initiatives plus récentes procèdent au génotypage de leur cohorte et implantent la PGx clinique par des outils de CDS. L'information génomique des patients étant intégrée pour des combinaisons comme clopidogrel/voriconazole/escitalopram-*CYP2C19* et simvastatine-*SLCO1B1* procurent un soutien substantiel pour les prescripteurs.<sup>246</sup> Cette implantation institutionnelle de la PGx clinique demeure évaluée systématiquement par des comités indépendants sur le développement des recommandations PGx. Somme toute, si l'utilité clinique de ces approches n'est toutefois pas confirmée, elles incarnent assurément des stratégies novatrices d'implantation clinique PGx.

### 2.5.2 Biobanques, pharmacogénomique et métabolisme : le grand vide

Si les biobanques ont certainement démontré leur pertinence à la découverte de marqueurs physiopathologiques génétiques,<sup>242</sup> notamment par approche pangénomique, la transition généralisée de leur application en recherche PGx peine à s'effectuer. En effet, les essais aux associations de type « gène-médicament » sont fortement sous-représentés. Une revue par Coppola *et al.* des bases de données de littérature scientifique met en lumière ce contraste : entre 1996 et 2019, parmi les 4061 publications dénombrées évoquant les biobanques, ce ne sont que 23 (0,56%) d'entre elles qui stipulaient un volet PGx.<sup>245</sup> L'inclusion plus vaste des termes « médecine personnalisée » n'élevait cette proportion qu'à 3,74%. Quelques exemples ont été recensés plus haut. Pourtant, leur nombre demeure marginal et leur utilisation reste principalement axée sur le caractère descriptif de l'information génomique d'une cohorte et l'impact hypothétique de leur réponse à certains traitements.<sup>230,247</sup> En ce sens, on aperçoit beaucoup de similarités vis-à-vis les consortiums PGx abordés plus tôt qui visent à étudier la réponse clinique à des thérapies précises.<sup>128</sup> D'après la quantité massive de données que les biobanques possèdent et les approches pangénomiques envisageables, l'absence de leur utilisation à des fins PGx, plus particulièrement

PK-PGx, se justifie difficilement. Certaines limites pouvant expliquer ce phénomène peuvent être reliées au manque de données quant à la prise de médicaments chez les participants,<sup>70</sup> l'absence des mesures de concentrations plasmatiques ou autres mesures physiologiques actuelles permettant d'obtenir des associations PK- ou PD-PGx adéquates,<sup>237,248</sup> ou la validité des informations relatives aux traitements étant inscrites dans les dossiers électroniques médicaux.<sup>249</sup>

### **3 Agents $\beta$ -bloqueurs**

Les agents  $\beta$ -bloquants constituent une classe pharmacologique importante dans le traitement de plusieurs maladies cardiovasculaires, mais également non-cardiovasculaires,<sup>251,252</sup> comme la prévention des migraines. Les bénéfices multiples de l'inhibition du système  $\beta$ -adrénergique s'observent surtout au niveau des maladies cardiovasculaires. Dans ce contexte, cette section abordera les principes généraux du système et de la signalisation adrénérergiques. Les différents rôles des récepteurs seront discutés, suivi d'une description des mécanismes d'action majeurs des principaux agents  $\beta$ -bloquants ayant été appliqués en clinique, de même que leurs profils métaboliques. Rappelons que la description des autres mécanismes physiopathologiques cardiovasculaires outrepassent largement la portée de cette thèse. Cela dit, la relation PGx investiguée au courant des prochains chapitres justifie qu'un accent soit porté à la fois sur le fonctionnement du système adrénérergique et les agents cardiosélectifs  $\beta_1$ -adrénérergiques.

#### **3.1 Généralités sur le système nerveux adrénérergique**

##### **3.1.1 Principes physiologiques et signalisation sympathique**

Le système sympathique agit en tant que modulateur important de la transmission synaptique des systèmes nerveux central et périphérique. Couramment associé à la réponse de lutte ou de fuite, communément appelée « *fight-or-flight* »,<sup>253</sup> son activation enclenche une cascade de réponses physiologiques notoires et quantifiables, notamment au niveau cardiovasculaire. Ces réponses sont précisément attribuables au système adrénérergique, lequel est stimulé par une relâche de catécholamines endogènes comme l'adrénaline et la noradrénaline. Ces neurohormones sont elles-mêmes synthétisées au niveau des terminaisons nerveuses des neurones adrénérergiques. Lors d'une stimulation et d'une relâche de catécholamines, des effets cardiaques s'observent tels que la hausse de la fréquence cardiaque (FC), de la force contractile myofibrillaire, de la vitesse de conduction et du rythme de relaxation myocardique. En d'autres termes, l'activation sympathique



est synonyme d'effets chronotropes, inotropes, dromotropes et lusitropes positifs.<sup>253,254</sup> Ces mécanismes contribueront à élever le débit cardiaque pour répondre aux besoins hémodynamiques de l'organisme. De manière systémique, une hausse de résistance vasculaire périphérique, donc de tension artérielle, sera observée par des mécanismes directs et indirects. Ensemble, ces phénomènes physiologiques sont modulés de façon ubiquitaire par des récepteurs membranaires, dont les fonctions sont résumées ci-bas.

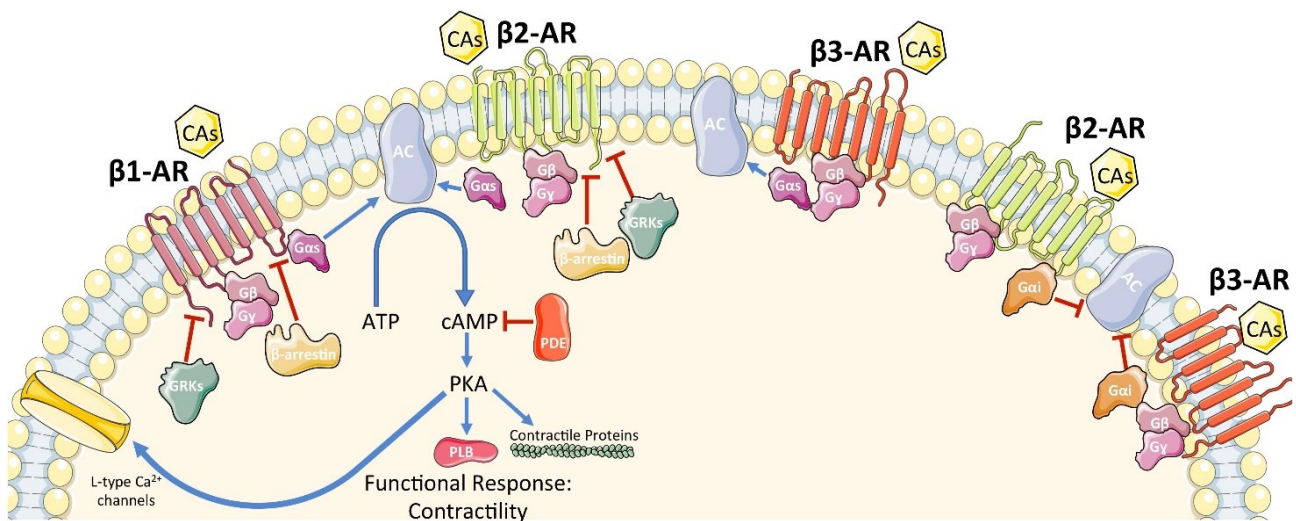
### 3.1.2 Récepteurs adrénergiques

Une des structures inhérentes au fonctionnement du système sympathique sont les récepteurs adrénergiques. On distingue deux types de récepteurs adrénergiques, soient les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ , lesquels se divisent en sous-types et isoformes.<sup>255</sup> Faisant tous partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors*, GPCR), leur conformation membranaire heptahélicoïdale permet à des ligands agonistes et antagonistes de se lier de manière compétitive à des sites de liaisons spécifiques.<sup>256</sup> En fonction de la nature du ligand et du sous-type de récepteur auquel il se lie, diverses cascades de signalisation sont enclenchées qui activent ou répriment ensuite des mécanismes physiologiques. Dans le cas des récepteurs adrénergiques, une proportion importante de ces procédés se reflète au niveau cardiovasculaire et métabolique.<sup>255</sup>

Les prochains chapitres de cette thèse étant centrés sur le métoprolol, un  $\beta$ -bloqueur dit cardiosélectif (voir **Section 3.2.1**), une attention plus particulière sera portée envers le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique. La description brève des autres sous-types demeure à titre de repère.

### 3.1.2.1 Physiologie du récepteur $\beta_1$ -adrénergique

L'expression du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique se concentre au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques du cœur, des muscles squelettiques et des reins, de même qu'au cerveau.<sup>255</sup> Au niveau cardiaque,  $\sim 70\%$  des récepteurs exprimés sont de ce sous-type.<sup>257</sup> En tant que GPCR, son couplage à une sous-unité  $G\alpha_s$  conduit à l'activation intracellulaire de l'adénylyl cyclase (AC) qui catalyse ensuite la transformation d'ATP en d'AMP cyclique (AMPc), menant finalement à l'activation phosphorylée de la protéine kinase A (PKA) et de plusieurs autres protéines cellulaires (**Figure 6**).<sup>4,256,258</sup>



**Figure 6** Signalisation cardiomyocytaire  $\beta_1$ -adrénergique. D'autres récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et protéines effectrices sont illustrés. CAs : catécholamines.

Reproduction autorisée [libre accès, Creative Commons Attribution License (CC BY)] : de Lucia C, Eguchi A and Koch WJ. *New Insights in Cardiac  $\beta$ -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging*. Front. Pharmacol. 2018 9:904.

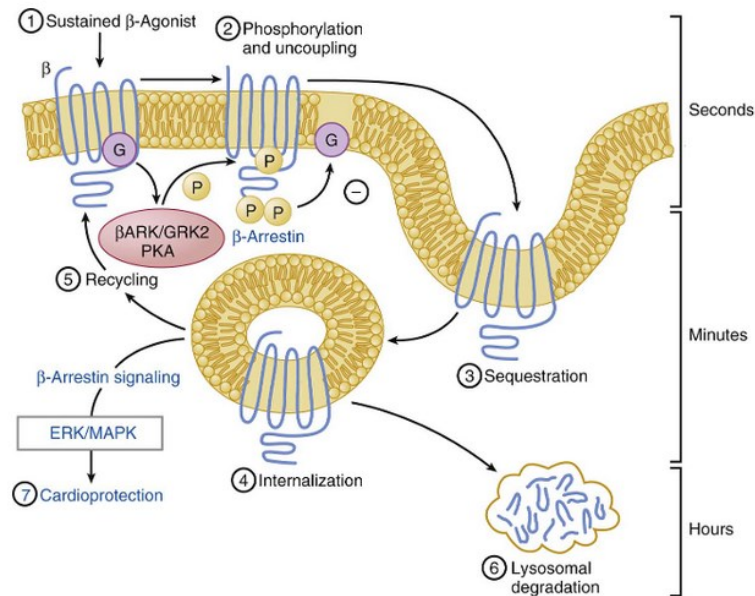
Pour les cardiomyocytes et les cellules du nœud sinusal, cette voie  $G\alpha_s$ -AC-AMPc-PKA phosphoryle les canaux calciques membranaires.<sup>258</sup> Ce mécanisme augmente la concentration intracellulaire d'ions calciques et provoque une relâche sarcoplasmique de calcium, qui elle augmente la tension des myofilaments par interaction avec des protéines impliquées dans la contraction.<sup>253</sup> Suivant l'intervention d'autres médiateurs intermédiaires, la résultante de cette deuxième portion de cascade cause enfin les effets physiologiques caractéristiques de la

signalisation adrénérge cardiaque.<sup>253,254</sup> Ce sous-type de récepteur est également présent au niveau des cellules juxtaglomérulaires de la macula densa rénale. Selon la même voie de signalisation, ces cellules effectrices seront stimulées à produire la rénine, donc à moduler l'activité neurohormonale par la voie rénine-angiotensine-aldostérone. À son tour, cette voie accentuera les effets cardiovasculaires et cardiaques.<sup>253,259</sup>

### 3.1.2.2 Mécanismes physiopathologiques : suractivation, désensibilisation et internalisation

La stimulation à l'aide d'agonistes adrénérge endogènes ou pharmacologiques peut être désirée dans certains contextes de soin. Notamment, les agonistes  $\beta_2$ -adrénérge, comme le salbutamol, sont couramment utilisés dans le traitement de l'asthme pour leur effet bronchodilatateur,<sup>260</sup> alors que l'usage d'agonistes  $\beta_1$ -adrénérge inotropes et chronotropes positifs, tels la dobutamine ou la norépinéphrine, peuvent être utilisés afin d'augmenter de façon transitoire le débit cardiaque, la résistance vasculaire périphérique et la perfusion en cas de choc cardiogénique et de décompensation.<sup>261</sup> Toutefois, la suractivation prolongée et chronique de l'axe  $\beta_1$ -adrénérge au niveau cardiovasculaire génère de multiples conséquences physiopathologiques. En effet, les mécanismes précédemment décrits pourront induire des symptômes arythmogènes<sup>258</sup> et aggraver les cardiopathies incapables de soutenir une stimulation neurohormonale continue. Entre autres, l'activation continue du tonus sympathique est l'un des mécanismes compensatoires aggravant la manifestation symptomatique de la défaillance cardiaque,<sup>253,257,262</sup> ce que l'administration d'agents  $\beta$ -bloquants arrive à réguler (voir **Section 3.4**).

Un risque encouru de l'activation prolongée du système adrénérge est de rendre réfractaires aux effets des catécholamines les cellules qui expriment ces récepteurs. En commençant par une phosphorylation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénérge médiée par  $\beta$ -arrestine et GRK2, s'ensuit un découplage à sa protéine G, donc une perte d'activation d'AC et de signalisation intracellulaire. À la longue, les mêmes kinases effectrices provoqueront une séquestration membranaire, suivie d'une internalisation et d'une dégradation du récepteur (**Figure 7**). Si aucune intervention n'est portée afin de rectifier l'activation adrénérge, l'apoptose des cardiomyocytes induite par les catécholamines est possible.



**Figure 7** Désensibilisation et internalisation des récepteurs adrénérgiques suivant une suractivation prolongée par agonistes.

Reproduction autorisée : *Braunwald's Heart Disease: A Textbook for Cardiovascular Medicine*, 10<sup>th</sup> ed. Mann, Douglas L, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Chapter 21: Mechanisms of Cardiac Contraction and Relaxation*, p.444. Copyright © 2015, with permissions from Elsevier. Reproduction autorisée selon le document source : *Adrenergic Receptors from Molecular Structure to in vivo function*. Trends Cardiovasc Med. 1997;7(5):137-45. Copyright © 1997 Hein *et al.*

### 3.1.2.3 Résumés des autres récepteurs adrénérgiques

Outre le récepteur  $\beta_1$ , les autres récepteurs adrénérgiques peuvent comporter différentes cascades de signalisation, ce qui leur confèrent des réponses physiologiques apparentées mais distinctes, selon leurs profils d'expression. Localisés au niveau post-synaptique de plusieurs régions des systèmes nerveux central et périphérique, les récepteurs  $\beta_2$  sont partiellement responsables de la vasodilatation périphérique, notamment au niveau bronchique, ainsi que l'hypertrophie musculaire squelettique et, dans une moindre mesure, la fréquence et la contractilité cardiaques. Ces sous-types de récepteurs adrénérgiques ont été ciblés à des fins thérapeutiques pour différentes physiopathologies cardiovasculaires. Enfin, le sous-type  $\beta_3$  comporte de multiples implications physiologiques, car plusieurs cascades de signalisation lui seraient associées selon sa localisation. Présent au niveau cardiaque, son rôle y demeure pourtant ambigu, alors que diverses fonctions métaboliques dans le tissu adipeux lui ont été attribuées.<sup>255,263</sup>

Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont exprimés au niveau des muscles lisses et squelettiques, du myocarde et de la paroi endothéliale.<sup>258</sup> Compte tenu de leur localisation aux terminaisons nerveuses sympathiques, on associe globalement leur stimulation à la vasoconstriction périphérique des lits vasculaires et à l'hypertrophie cardiaque.<sup>255,264</sup> Exprimés de manière similaire au sous-type  $\beta_2$ , les effets des isoformes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sont plus hétérogènes. Ils réguleraient des processus aussi vastes que le tonus vagal, la relâche de catécholamines, la vasoconstriction périphérique et d'autres procédés métaboliques.<sup>255,264</sup> Une réponse délétère liée au remodelage cardiaque serait médiée par les deux sous-types.<sup>265</sup>

### 3.2 Classes pharmacologiques des $\beta$ -bloqueurs

Les effets thérapeutiques  $\beta$ -bloqueurs varient selon leurs propriétés pharmacologiques. Quoique l'objectif de cette thèse ne soit pas de revoir en profondeur l'ensemble des caractéristiques qui définissent les  $\beta$ -bloqueurs, le médicament utilisé tout au long des prochains chapitres comme substrat, le métoprolol, se veut l'un des plus connus de cette classe. Donc, il demeure important que certaines caractéristiques de ces agents soient portées à l'avant-plan. Par soucis de concision, notons que seuls les  $\beta$ -bloqueurs les plus familiers seront traités. Le **Tableau 4** résume leurs propriétés pharmacologiques.

**Tableau 4 Propriétés pharmacologiques de  $\beta$ -bloqueurs communs.**<sup>263,266-270</sup>

Composé	Sélectivité $\beta_1$	Sélectivité $\beta_1 : \beta_2$	ESI	Stabilisation membranaire	Effets hors-cibles
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de 1<sup>ère</sup> génération</i>					
Nadolol	0	1,0	Non	0	Non
Propranolol	0	1,0	Non	++	Non
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de deuxième génération</i>					
Aténolol	+	5,7	Non	0	Non
Bisoprolol	++	103	Non	0	Non
Métoprolol	++	74	Non	±	Non
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de troisième génération</i>					
Carvédilol	0	1,6	Non	++	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antagonisme <math>\alpha_1</math></li> <li>• Propriétés antioxydantes (suppression et inhibition de synthèse de radicaux libres)</li> <li>• Bloqueur de canaux périphériques <math>Ca^{2+}</math></li> </ul>
Néбиволол	+++	321	Non	0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation périphérique médiée par relâche d'oxyde nitrique (agonisme <math>\beta_3</math>)</li> </ul>

ESI : Effet sympathomimétique intrinsèque.

### 3.2.1 Cardiosélectivité : de la première à la deuxième génération de $\beta$ -bloqueurs

Le développement et les premières utilisations cliniques des antagonistes  $\beta$ -adrénergiques remontent à la seconde moitié du vingtième siècle.<sup>252,263</sup> Parmi les premiers agents non-sélectifs développés, c'est-à-dire bloquant les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques, le propranolol et le nadolol sont des exemples de thérapies encore utilisées. Si une seule étape de raffinement peut être retenue entre les  $\beta$ -bloqueurs de première et de deuxième générations, celle-ci réside dans la sélectivité dirigée vers  $\beta_1$ . La cardiosélectivité des  $\beta$ -bloqueurs peut parfois être associée à une simple sélectivité  $\beta$ -adrénergique indifférenciée,<sup>252</sup> mais ce qui définit cette propriété se veut plus communément attribuable à la sélectivité  $\beta_1$ -adrénergique du fait de son expression dominante au niveau cardiaque. Le métoprolol, le bisoprolol et à un degré plus faible, l'aténolol font partie de cette catégorie.<sup>263</sup> Ce faisant, les effets pharmacologiques de ces agents  $\beta_1$ -sélectifs parviennent à exercer une réduction de fréquence, de contractilité et ultimement de débit cardiaques, sans provoquer un antagonisme  $\beta_2$ -adrénergique proportionnel pouvant poser un risque chez certaines populations (voir **Section 3.4.5**). Cependant, cette propriété demeure inégale entre les molécules.

### 3.2.2 Agents sympathomimétiques intrinsèques

L'activité sympathomimétique intrinsèque est une propriété présente à différents degrés pour certains  $\beta$ -bloqueurs. Aussi appelés agonistes partiels, le raisonnement derrière leur usage est d'atténuer la réduction de FC, de débit cardiaque et de résistance vasculaire périphérique occasionnées par des antagonistes  $\beta_1/\beta_2$ -adrénergiques.<sup>271</sup> En clinique, on réduirait le risque de bradycardie et/ou d'hypotension symptomatiques, tout en conservant une réponse adrénérergique inférieure<sup>271</sup> à celle induite par les catécholamines endogènes pouvant être nuisible dans certaines physiopathologies cardiovasculaires.<sup>252</sup> Une hausse de survie suivant un infarctus du myocarde serait présent pour les  $\beta$ -bloqueurs cardiosélectifs dotés d'une faible activité sympathomimétique, comme l'acébutolol.<sup>272</sup> Comparativement au placebo, ce bénéfice s'observerait jusqu'à 5 ans suivant l'initiation du traitement, entraînant une réduction absolue de mortalité  $\sim 7\%$ .<sup>273</sup> L'acébutolol peut également être utilisé pour traiter l'hypertension<sup>274</sup>. Il en demeure que les agonistes partiels procurent un effet thérapeutique moins significatif que les composés antagonistes<sup>268</sup> et ne sont pas explicitement recommandés en premier usage.<sup>251</sup> Presque aucun agent  $\beta$ -bloquant couramment utilisé en clinique ne possède de propriété sympathomimétique intrinsèque.<sup>263</sup>

### 3.2.3 Agents sympatholytiques

Plusieurs mécanismes existent afin d'exercer une sympatholyse.<sup>275</sup> N'étant pas un  $\beta$ -bloqueur, la clonidine permet d'illustrer le principe pharmacologique utilisé en clinique. En effet, cette molécule possède un effet agoniste  $\alpha_{2C}$ -adrénergique et réduit l'activité des fibres postganglionnaires des nerfs cardiaques.<sup>263,276</sup> Ayant comme substrats agonistes la noradrénaline, ces récepteurs de types GPCR et couplés à une protéine  $G_{\alpha i}$  forment une boucle de rétro-inhibition sur la cascade AC-AMPc-PKA.<sup>255,275</sup> Requête pour la relâche vésiculaire des catécholamines endogènes dans la jonction neuro-musculaire, cette fonction autorégulatrice diminue ultimement les concentrations de neurotransmetteurs disponibles au niveau post-synaptique. L'effet antihypertenseur résultant<sup>277</sup> s'accompagne d'une réduction de FC chez des patients hypertendus,<sup>276</sup> avec une stimulation du système nerveux parasympathique.<sup>255</sup> Le recours à la clonidine et autres agents sympatholytiques en hypertension s'accompagne toutefois avec des précautions : l'initiation sans titration peut entraîner une hypotension orthostatique, alors que la cessation soudaine du traitement peut provoquer une suractivation sympathique, suivie d'un phénomène rebond d'hypertension.<sup>274</sup> À long terme, une rétention fluidique s'observe avec certains agents, dont la prise concomitante de diurétiques thiazidiques parvient à contrôler.<sup>274</sup>

Enfin, un autre  $\beta$ -bloqueur de troisième génération, le bucindolol, activerait les récepteurs  $\alpha_{2C}$ -adrénergiques selon le même mécanisme.<sup>263</sup> Prometteur à première vue, les investigations ayant porté sur le bucindolol et d'autres agents sympatholytiques n'ont pas démontré de bénéfices cliniques en défaillance cardiaque.<sup>278,279</sup>

### 3.2.4 Effets hors-cibles, ou les $\beta$ -bloqueurs de troisième génération

Faute de pouvoir développer uniquement des antagonistes sélectifs  $\beta_1$ -adrénergiques et espérer davantage de bénéfices cliniques, les  $\beta$ -bloqueurs issus de la troisième génération sont aussi vasodilatateurs.<sup>263,269</sup> Donc, ils peuvent réduire la tension artérielle sans diminuer le débit cardiaque,<sup>263,270</sup> leur conférant un potentiel antihypertenseur.<sup>252</sup> D'autres  $\beta$ -bloqueurs aux propriétés vasodilatatrices ont été mentionnés; ceux de troisième génération réduisent la résistance vasculaire périphérique par des mécanismes pharmacologiques additionnels.<sup>263</sup> Le carvedilol et le nébivolol retiendront brièvement notre attention.

Ne possédant pas de cardiosélectivité marquée, le carvedilol tirent ses propriétés vasodilatatrices de l'antagonisme sélectif  $\alpha_1$ -adrénergique.<sup>263,269</sup> Des propriétés uniques et hors-cibles au carvedilol contribueraient à son effet antihypertenseur (**Tableau 3**).<sup>263,270</sup> À l'opposé, la sélectivité du nébivolol porte un ratio de 321:1 entre les récepteurs  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -adrénergiques des cardiomyocytes.<sup>280</sup> L'effet antioxydant de ces  $\beta$ -bloqueurs de troisième génération compte pour plusieurs implications cellulaires multiples,<sup>281</sup> bien que leurs implications cliniques restent à valider. Ils augmenteraient les niveaux circulants et la biodisponibilité d'oxyde nitrique par induction de la NO synthase endothéliale,<sup>281,282</sup> d'où provient justement l'effet vasodilatateur du nébivolol.<sup>269</sup> La capture directe d'espèces réactives oxydantes réduirait aussi les dommages vasculaires subséquents.<sup>283</sup> Ajoutons à cela la vasodilatation périphérique qui assurerait un contrôle glycémique et préviendrait la résistance à l'insuline.<sup>284</sup> En clinique, ces bénéfices sur les profils glycémiques et lipidiques ont été observés chez des patients pouvant être diabétiques, hypertendus ou dyslipidémiques.<sup>284</sup> Les impacts de ces propriétés sur le risque d'événements cardiovasculaire demeurent toutefois spéculatifs.

### 3.3 Pharmacocinétique des $\beta$ -bloqueurs

Le **Tableau 5** fournit un aperçu des profils PK de certains  $\beta$ -bloqueurs. En général, le caractère lipophile de ces agents permet de distinguer leurs propriétés ADME. Commenant par l'absorption, les données relatives aux propriétés biopharmaceutiques des  $\beta$ -bloqueurs rapportent, en large partie, une diffusion passive au niveau intestinal.<sup>285</sup> Bien que la majorité des agents de cette classe aient une absorption élevée (>90%),<sup>286</sup> les agents plus hydrophiles le sont naturellement moins, comme l'aténolol et le nadolol (~30-50%).<sup>8,285,287</sup> Fait intéressant, la prise concomitante de nourriture augmenterait la biodisponibilité des agents lipophiles mais réduirait celles des molécules hydrophiles. En effet, des études PK d'interactions ont montré que les concentrations circulantes de métoprolol et de propranolol seraient augmentées de 40 et 53% par ce facteur, respectivement.<sup>288</sup> Enfin, à la lumière des publications traitant de la PK clinique des  $\beta$ -bloqueurs discutés dans cette section, il ne semblerait qu'aucun d'entre eux soit un promédicament.



**Tableau 5 Propriétés pharmacocinétiques de  $\beta$ -bloqueurs communs.**<sup>263,266,267,289,290</sup>

Composé	Absorption (%)	BioD (%)	Liaison aux protéines plasmatiques (%)	t <sub>1/2</sub> (h)	Voie d'élimination	Lipophilicité
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de 1<sup>ère</sup> génération</i>						
Nadolol	~30	30-50	30	10-20	Rénal	Faible
Propranolol	>90	30-70	>90	3-5	Hépatique	Élevée
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de deuxième génération</i>						
Aténolol	~50	40-50	<5	5-8	Rénal	Faible
Bisoprolol	~90	~90	~30	9-12	Rénal/hépatique	Faible
Métoprolol	>90	40-50	12	3-8	Hépatique	Modérée
<i><math>\beta</math>-bloqueurs de troisième génération</i>						
Carvédilol	>90	~30	98	7-10	Hépatique	Élevée
Néбиволол	>90	12-96	98	10-30	Hépatique	Élevée

BioD : biodisponibilité, t<sub>1/2</sub>; Temps de demi-vie d'élimination.

La lipophilicité des  $\beta$ -bloqueurs cause des propriétés semblables pour la liaison aux protéines plasmatiques et la distribution tissulaire. Plus une molécule est lipophile, plus la fraction liée aux protéines plasmatiques sera augmentée.<sup>286</sup> Ici encore, l'aténolol comporte une fraction liée <5%, contrairement au néбиволол et au carvedilol qui atteignent 98%, par exemple. Le métoprolol affiche quant à lui une fraction liée de 12%.<sup>266</sup> La distribution tissulaire de chaque agent peut être affectée par cette propriété, notamment pour le passage de la barrière hématoencéphalique.<sup>251,286</sup> La **Section 3.4** abordera les implications cliniques de ces effets. Les VDs des agents  $\beta$ -bloquants mentionnés dans le **Tableau 5** varient considérablement. Par exemple, des valeurs de 3.2 L pour le métoprolol<sup>266</sup>, 226 L pour le bisoprolol,<sup>291</sup> puis jusqu'à environ 700 L<sup>289</sup> pour le néбиволол ont été mesurées, ce dernier étant un des plus lipophiles. Étonnamment, bien que la masse adipeuse d'un patient augmente le VD de certains  $\beta$ -bloqueurs lipophiles, ce facteur semblerait ne pas affecter ces mesures de manière constante,<sup>289</sup> ce qui peut expliquer pourquoi les publications scientifiques s'abstiennent d'indiquer explicitement ce paramètre PK clinique.

Comme toutes classes de médicaments, les  $\beta$ -bloqueurs lipophiles modérés ou élevés sont biotransformés en métabolites actifs et/ou inactifs au niveau hépatique (voir **Section 1**). Par conséquent, l'effet de premier passage hépatique diminue leur biodisponibilité, particulièrement à basse dose.<sup>286</sup> De plus, les  $\beta$ -bloqueurs lipophiles sont métabolisés par les CYPs. Cela augmente encore plus les variabilités inter-individuelles de par les polymorphismes génétiques des enzymes de Phase I et des interactions médicamenteuses.<sup>16</sup> Une investigation récente par Ågesen *et al.* des profils PK de 13  $\beta$ -bloqueurs à-travers 255 études à doses uniques et 101 à doses répétées calculait,

dans les deux situations, un coefficient de variation >40% envers les valeurs de AUC et de  $C_{\max}$  pour des  $\beta$ -bloqueurs lipophiles.<sup>290</sup> Plus spécifiquement, les coefficients de variation moyens de AUC et de  $C_{\max}$  pour le métoprolol s'élevaient respectivement à 69 et 92% en études PK de doses uniques, puis 84 et 80% en doses répétées. À bien y penser, cette variabilité interindividuelle est évidente; toutes ces molécules sont métabolisées partiellement par le CYP2D6, dont les impacts PK-PGx ont été discutés plus tôt et pour lequel le métoprolol est affecté de manière plus extensive.<sup>16,156,292</sup> D'autres enzymes polymorphiques de Phases I et II comme les CYP1A2, 2C9, 3A4 et les UGTs sont impliqués, ce qui peut complexifier l'extrapolation des concentrations plasmatiques pour d'autres agents de cette classe. Notons que presque tous les métabolites générés ne possèdent que peu ou pas d'activité pharmacologique.<sup>263,286</sup> Puisque le degré de métabolisme hépatique est associé à leur lipophilicité, les  $\beta$ -bloqueurs ayant déjà un profil hydrophile sont majoritairement éliminés par filtration glomérulaire.<sup>2,251,263</sup>

On reconnaît qu'à des doses ascendantes répétées, une accumulation systémique des  $\beta$ -bloqueurs est possible, tel que démontré dans plusieurs cohortes par les hausses de concentrations plasmatiques et de valeurs de  $t_{1/2}$  à l'équilibre, autant pour des agents lipophiles que hydrophiles.<sup>293,294</sup> Une saturation des procédés métaboliques et d'élimination ne serait donc pas à exclure pour ces médicaments. Puisque la vaste majorité sont des agents directement actifs et non des prodrogues, un patient avec une fonction hépatique ou rénale affectée peut nécessiter un ajustement de posologie ou un changement de thérapie afin d'éviter d'atteindre des concentrations supratherapeutiques, donc des événements indésirables.<sup>252</sup>

### **3.4 Survol de l'usage des $\beta$ -bloqueurs en clinique**

#### **3.4.1 Défaillance cardiaque**

En addition à un inhibiteur d'enzyme de conversion de l'angiotensine II, plusieurs  $\beta$ -bloqueurs lipophiles et cardiosélectifs comme le bisoprolol, le succinate de métoprolol, le carvedilol et, dans des sous-groupes précis, le nébivolol ont démontré à tour de rôle leur efficacité à réduire la mortalité et la morbidité associées à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite.<sup>295-298</sup> D'ailleurs l'amélioration de la fonction cardiaque et de la survie des patients se voudrait dose-dépendante.<sup>299</sup> Ainsi, les lignes directrices canadiennes,<sup>300</sup> américaines<sup>301</sup> et européennes<sup>302</sup> recommandent leur utilisation titrée à une dose maximale tolérée. L'une des seules études comparatives entre ces agents établissait la supériorité du carvedilol au tartrate de

métoprolol suivant une réduction additionnelle de mortalité toute-cause.<sup>303</sup> Ces données étant suggestives de la supériorité des  $\beta$ -bloqueurs de troisième génération, une retenue s'impose en raison de l'utilisation d'un dosage faible du tartrate de métoprolol, une formulation à libération immédiate. Certains observateurs ont proposé, données cliniques à l'appui, que la différence de survie était causée par les effets hors-cibles du carvédilol.<sup>304</sup>

Il est intéressant de constater que seul le succinate de métoprolol, une formulation à libération prolongée, soit indiqué pour la défaillance cardiaque.<sup>300,302</sup> Celle-ci permettrait une accumulation et une stabilité supérieures des concentrations plasmatiques comparativement au sel de tartrate.<sup>305</sup> Les effets chronotropes et inotropes négatifs étant soutenus, l'hypothèse est que cela réduirait la réactivation sympathique transitoire associée à la survenue d'événements cardiovasculaires et assurerait une protection continue comparativement aux autres formulations.<sup>305,306</sup> Or, bien que les lignes directrices précisent l'usage du succinate de métoprolol,<sup>300-302</sup> probablement en raison de son utilisation en essais cliniques pivots, peu de données valident cette hypothèse.<sup>304,307</sup> En fait, d'autres données provenant d'essais contrôlés ayant comparé le tartrate de métoprolol à un placebo ont antérieurement rapportés un bénéfice sur la mortalité toute-cause et le risque de transplantation,<sup>308</sup> le risque d'hospitalisations pour défaillance cardiaque, la tolérance à l'exercice et l'atténuation des symptômes.<sup>304</sup> Bien que ces deux formulations ne soient pas bioéquivalentes en termes d'exposition et de profils PK,<sup>305,306,309</sup> une réduction de FC et des profils PD similaires,<sup>310</sup> ainsi qu'un antagonisme  $\beta_1$  proportionnel seraient observés,<sup>305,309</sup> pourvu que les posologies soient comparables.<sup>304</sup> Puisqu'une formulation de tartrate de métoprolol cause une libération immédiate et une absorption plus rapide, une fraction supérieure de la dose échapperait à l'effet de premier passage hépatique, contrairement à une relâche contrôlée avec le sel de succinate ce qui, malgré les profils différents d'exposition, reviendrait ultimement à obtenir un effet thérapeutique similaire lorsque les doses sont ajustées.<sup>305</sup>

### 3.4.2 Hypertension

Tel que mentionnée en **Section 3.1.2**, l'implication des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques dans la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone contribuerait à l'effet antihypertensif des  $\beta$ -bloqueurs.<sup>253,259</sup> La sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires médiée par les catécholamines serait bloquée par antagonisme  $\beta_1$  et mitigerait la réponse hypertensive. S'ajoutent les mécanismes cardiaques typiques des  $\beta$ -bloqueurs réduisant le débit cardiaque.<sup>267</sup> Hydrophiles

comme lipophiles, des antagonistes  $\beta_1$ -adrénergiques et non-sélectifs sont recommandés en seconde ligne (*e.g.* aténolol, nadolol, métoprolol).<sup>311-313</sup> Les comorbidités justifieront la préférence de l'agent prescrit.

### 3.4.3 Maladies coronariennes

Le traitement des maladies coronariennes par agents  $\beta$ -bloquants provient principalement de leurs effets chronotropes et inotropes négatifs. En réduisant la contractilité et la FC, la demande myocardique en oxygène se trouve abaissée et les symptômes ischémiques sont ultimement diminués.<sup>253</sup> Les  $\beta$ -bloqueurs cardiosélectifs réduisent justement à la fois la fréquence et la sévérité des épisodes angineux et peuvent être administrés en première instance, selon les circonstances.<sup>314,315</sup> Pour les raisons ci-haut, ils sont aussi recommandés suivant un syndrome coronarien aigu.<sup>316,317</sup> Malgré la controverse entourant leur efficacité à long terme,<sup>318</sup> les sociétés cliniques demeurent favorables à leur utilisation.

### 3.4.4 Arythmies

Comme les catécholamines induisent des processus arythmogènes,<sup>319</sup> l'antagonisme  $\beta$ -adrénergique confère des bénéfices pour certaines conditions associées. Considérant leur potentiel régulateur sur l'automaticité, les relâches calcique et potassique, la dépolarisation et la conduction au niveau cardiaque,<sup>319,320</sup> ces agents peuvent agir comme traitement de première ligne afin de réduire la survenue de morts subites et de tachycardies ventriculaires,<sup>321,322</sup> dont les bénéfices antiarythmiques persistent en contexte post-infarctus.<sup>321</sup> D'autant plus que les effets chronotropes négatifs justifient également leur usage en première ligne pour la fibrillation auriculaire dans le cas d'une stratégie par contrôle de fréquence.<sup>323,324</sup>

### 3.4.5 Autres considérations de pharmacologie clinique

Évidemment, le traitement  $\beta$ -bloquant n'est pas sans précautions. Déjà à son initiation, une titration ascendante graduelle est requise afin d'éviter des événements cardiovasculaires comme une bradycardie symptomatique, un bloc auriculo-ventriculaire,<sup>253,325</sup> ou encore une congestion aggravant les symptômes d'insuffisance cardiaque.<sup>300-302,326</sup> Inversement, une titration descendante lors d'un arrêt de traitement réduirait le risque de morts subites liées à la sensibilité augmentée des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques aux catécholamines endogènes et à la réactivation sympathique précipitée.<sup>263,327</sup> D'après les effets métaboliques des  $\beta$ -bloqueurs de troisième génération, ces

derniers sembleraient mieux réguler les profils glycémiques et la sensibilité à l'insuline.<sup>284</sup> L'étendue des bénéfices des  $\beta$ -bloqueurs reste suffisamment grande que leur usage ne soit pas restreint chez les patients diabétiques.<sup>325</sup>

Le principe de cardiosélectivité exige d'autres considérations cliniques. Effectivement, on recommande d'éviter l'administration de  $\beta$ -bloquants en présence d'asthme ou de bronchospasme,<sup>311</sup> car l'emploi d'agents non-sélectifs peut conduire à l'antagonisme des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et provoquer une bronchoconstriction par les muscles lisses.<sup>263</sup> Même lorsqu'ils sont cardiosélectifs, leur usage est déconseillé chez les asthmatiques à cause d'une perte présumée graduelle de sélectivité avec l'augmentation des doses.<sup>326</sup> Pour la lipophilicité, celle-ci semble également être un facteur déterminant de l'efficacité des traitements  $\beta$ -bloquants, du moins en défaillance cardiaque. La distribution augmentée de ces agents au niveau du CNS réduirait davantage le tonus vagal, un facteur associé à la progression de la maladie.<sup>253</sup> L'augmentation des concentrations dans le CNS induirait aussi des symptômes variés, comme la fatigue et le sentiment dépressif, sans distinguer d'association définitive. Plus largement, la dysfonction sexuelle est aussi rapportée de manière plus ou moins constante.<sup>315,328</sup>

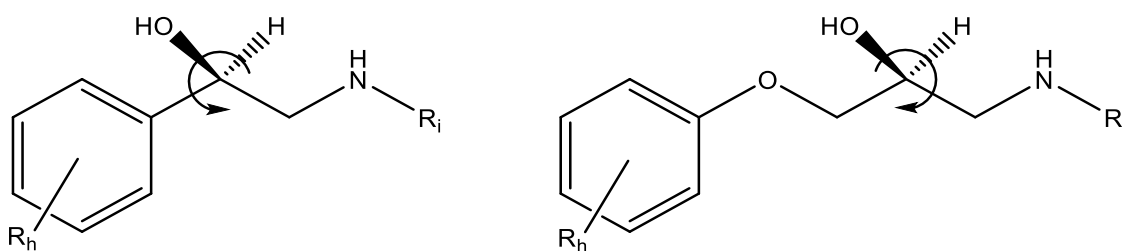
Enfin, les concentrations plasmatiques de  $\beta$ -bloqueurs et la dose se reflètent de manière non-linéaire face à la taille de leurs effets PD. La relation « dose-réponse » se traduit habituellement en une courbe sigmoïde, où la titration ascendante graduelle provoque initialement une hausse marquée de l'effet  $\beta$ -bloquant, suivi d'un plateau malgré l'augmentation subséquente de dose.<sup>286,329</sup> Certes, une part de variabilité peut être expliquée par une différence inter-individuelle de tonus sympathique et de métabolisme hépatique;<sup>290,292</sup> certains observateurs prétendent plutôt que l'antagonisme  $\beta$ -adrénergique survient dans une fenêtre thérapeutique qui ne correspondrait pas aux doses maximales tolérées. L'effet non-linéaire de ce mécanisme et la saturation des cibles à des doses non-maximales expliqueraient la baisse additionnelle marginale de FC et de tension artérielle étant non-proportionnelles lors de l'administration de doses cibles encore plus élevées.<sup>286,304,329,330</sup>

### **3.5 Sur la stéréochimie des $\beta$ -bloqueurs**

Les  $\beta$ -bloqueurs constituent l'une des classes pharmacologiques les mieux étudiées en termes de stéréochimie. Selon leur relation structure-activité, leurs différents énantiomères

peuvent afficher des profils distincts d'affinité pour les protéines plasmatiques, les récepteurs cibles ou les enzymes métaboliques avec lesquels ils interagissent.<sup>331</sup> La configuration des groupements chimiques pour chaque énantiomère d'un  $\beta$ -bloqueur serait à l'origine du caractère stéréosélectif de certaines protéines pour cette classe pharmacologique.<sup>331</sup> Or, la majorité des agents  $\beta$ -bloquants, sélectifs ou non, sont administrés sous forme racémique,<sup>263,332</sup> c'est-à-dire contenant des ratios équilibrés pour tout isomère.

Généralement, les propriétés pharmacologiques des  $\beta$ -bloqueurs, indépendamment de leurs classes, sont conférées par les énantiomères dits « lévrotatoires ». Cette appellation est attribuable aux (*R*)-énantiomères des  $\beta$ -bloqueurs comprenant une structure arylaminoéthanol (**Figure 8**), comme le propranolol et le labétalol, contrairement à ceux formés d'un aryloxyaminopropanol, tel le métoprolol et le carvedilol, où les (*S*)-énantiomères exercent une activité pharmacologique.<sup>331,333</sup>



**Figure 8 Structures arylaminoéthanol (gauche) et aryloxyaminopropanol (droite).**

Les groupements  $R_h$  et  $R_i$  dénotent les emplacements possibles de groupements arbitraires.

Ces principes structurels semblent ubiquitaires à l'ensemble des récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques. Dans le cas du récepteur adrénérgique de type 1, ou  $\beta_1$ -adrénérgique (*adrenoreceptor beta 1*, ADRB1), la conformation des groupements fonctionnels communs aux  $\beta$ -bloqueurs détermine la sélectivité et l'affinité des liaisons ioniques envers des acides aminés précis.<sup>334</sup> Pour certains, cette stéréosélectivité aux récepteurs, parfois hautement préférentielle,<sup>332</sup> engendrerait des différences de profils PK et PD pour chaque énantiomère.<sup>332</sup> Leur investigation permettrait de mieux saisir la réponse aux  $\beta$ -bloqueurs (**Tableau 4**).

En évaluant les profils PK selon les paramètres ADME, l'absorption intestinale et la distribution n'apparaissent pas être des processus stéréosélectifs envers des énantiomères de  $\beta$ -bloqueurs. Des exceptions ont été soulignées dans des investigations antérieures,<sup>335</sup> quoique les

données scientifiques les plus exhaustives ne témoignent pas d'une perméabilité ou d'une absorption stéréosélectives importantes.<sup>331,336</sup> Une fois en circulation, la fraction libre d'une majorité de ceux-ci demeure élevée (>85%).<sup>266,287,332</sup> Donc, les différences stéréosélectives de liaison aux protéines plasmatiques semblent négligeables. Il en est tout autre pour l'impact des voies métaboliques. Selon le caractère hydrophile ou lipophile d'un agent  $\beta$ -bloquant, la chiralité des  $\beta$ -bloqueurs lipophiles peut affecter la biotransformation qui survient au niveau hépatique. Par exemple, l' $\alpha$ -hydroxylation du (*S*)-métoprolol se veut stéréospécifique au CYP2D6, ce qui est avantageux afin d'évaluer son activité enzymatique. Le (*R*)-métoprolol subit plutôt des réactions de *O*-déméthylation et *N*-désalkylation.<sup>337</sup> Les répercussions stéréochimiques du CYP2D6 s'observent d'autant plus sur les profils PK en conjugaison avec son effet PGx. En effet, les données de littérature démontrent une énantiosélectivité proportionnelle à son statut métabolique.<sup>292</sup> La stratification phénotypique des valeurs de paramètres PK normalisées selon la dose entre (*R*)- et (*S*)-métoprolol illustrent les différences énantiomériques de profils PK-PGx.<sup>338-340</sup> De plus, cette énantiosélectivité demeure apparente lors de dosages multiples et à l'état d'équilibre.<sup>341</sup>

Des données cliniques modélisées à l'aide de patients sains ont démontré que les mesures de concentrations plasmatiques de chaque énantiomère du métoprolol étaient associées aux courbes « concentration-réponse » de réduction de FC induite par l'exercice.<sup>339</sup> Des constats apparentés avec la FC ont été établis envers d'autres antagonistes chiraux  $\beta_1$ -adrénergiques lipophiles métabolisés par voie hépatique,<sup>342-344</sup> affichant tous des courbes aux profils quasi-identiques. Cependant, on remarquait pour le métoprolol que plus la capacité métabolique du CYP2D6 était grande, plus les concentrations plasmatiques de (*S*)-métoprolol affichaient une courbe concentration-réponse qui corrélait de mieux en mieux aux valeurs observées.<sup>339</sup> Ces observations pourraient s'expliquer par une possible saturation de l'effet  $\beta$ -bloquant du métoprolol pour les PMs, tandis que les NMs et les UMs parviennent à demeurer dans la portion linéaire de la courbe concentration-réponse. En d'autres termes, la stéréosélectivité induite par le statut métabolique du CYP2D6 n'affecterait pas la réponse clinique, mais permettrait d'associer avec une robustesse supérieure les concentrations plasmatiques à son effet clinique.

À l'inverse, on constate aussi que certains profils PD stéréospécifiques peuvent être indépendants des profils PK, sans même être liés strictement au degré d'affinité pour une cible. En

effet, les concentrations plasmatiques de (*S*)-aténolol chez des patients coronariens seraient significativement plus élevées post-exercice par rapport à celles de (*R*)-aténolol, contrairement à des ratios similaires et des profils PK équivalents au repos.<sup>345</sup> Ces observations, quoique intéressantes, semblent dépourvues d'impact PD notoire et excluent les considérations cliniques la stéréosélectivité des profils PK-PGx. Des constats apparentés ont été établis envers d'autres antagonistes  $\beta_1$ -adrénergiques lipophiles métabolisés par voie hépatique.<sup>342-344</sup>

Nous témoignons que les propriétés stéréosélectives des  $\beta$ -bloqueurs ne peuvent être admises comme un effet de classe. Par conséquent, l'investigation et la caractérisation de leurs profils énantiomériques auront mené à plusieurs avancées des procédés bioanalytiques chiraux.<sup>337,346</sup> Les méthodes de séparation énantiomériques utilisées feront l'objet du **Chapitre 3** de cette thèse, avec un accent porté sur la bioanalyse chirale du métoprolol.

## **4 Pharmacogénétique des $\beta$ -bloqueurs**

Tel que présenté plus haut, les polymorphismes génétiques responsables d'associations PGx sont le sujet d'un domaine étendu d'investigations ayant pour but l'identification, la caractérisation, la mesure de l'effet, la validation et la classification de leurs impacts cliniques potentiels. En ce qui a trait aux agents  $\beta$ -bloquants discutés précédemment, cette section présente l'état des connaissances quant aux cibles polymorphiques ayant été étudiées jusqu'à maintenant, ainsi que l'étendue des répercussions cliniques pour chacune.

### **4.1 Cibles polymorphiques connues**

#### **4.1.1 *ADRB1***

Encodant pour le récepteur du même nom, les effets des polymorphismes génétiques de *ADRB1* ont été revus à plusieurs reprises non seulement pour leurs impacts physiopathologiques, mais aussi en lien à la réponse clinique des thérapies  $\beta$ -bloquantes. Les variations alléliques de *ADRB1* sont relativement courantes parmi la plupart des ethnicités,<sup>347</sup> quoique les plus étudiées soient les variants Arg389Gly et Ser49Gly. Chez l'humain, ces variants non-synonymes,<sup>348</sup> présents en déséquilibre de liaison significatif,<sup>349</sup> provoquent une augmentation du découplage du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique à sa protéine  $G_s$  associée.<sup>350</sup> S'ensuit la baisse d'activation d'AC et des niveaux d'AMPc, causant une activation catécholaminergique basale inférieure aux allèles



sauvages. Des données hémodynamiques humaines démontrent que ces effets se transposent en une FC et une tension artérielle diminuées au repos.<sup>351,352</sup> L'atténuation de l'activité sympathique par ces variants aurait un effet inotrope négatif<sup>350</sup> et pourrait potentiellement réduire l'arhythmogénèse adrénergique.<sup>319,353</sup>

Les répercussions cliniques des variants de *ADRB1* font l'objet d'une documentation considérable en tant que facteurs de risque. Les impacts de ces allèles entraîneraient à leur tour une réponse différentielle aux agents  $\beta$ -bloquants, chez des patients aux antécédents cardiovasculaires variés. Effectivement, les données obtenues chez des cohortes hypertensives montrent que seulement les porteurs du codon Arg389 disposeraient d'un pronostic défavorable.<sup>354,355</sup> L'effet cardioprotecteur des allèles Gly389 ou Gly49 chez les patients porteurs signifie qu'ils ne bénéficieraient pas autant d'une approche pharmacologique par  $\beta$ -bloqueurs par rapport aux porteurs Arg389 ou Ser49, compte tenu du risque cardiovasculaire diminué.<sup>356</sup> Dans l'ensemble, des données de méta-analyse pour les associations PGx en insuffisance cardiaque démontrent que l'allèle Arg389 optimiserait la réponse aux  $\beta$ -bloqueurs, notamment en améliorant davantage la fraction d'éjection ventriculaire gauche<sup>357</sup> et en réduisant de façon plus prononcée la FC.<sup>357,358</sup> Néanmoins, les études individuelles n'établissent pas de consensus.

L'absence de répliquabilité empêche de déterminer l'impact PGx réel de *ADRB1*. Des groupes d'investigateurs ayant observé un effet PGx en insuffisance cardiaque affirment que la différence de réponse au traitement pourrait être surmontée en personnalisant les doses de  $\beta$ -bloqueurs selon les variants identifiés pour Arg389<sup>359,360</sup> ou Ser49.<sup>361</sup> Une étude récente de cohorte regroupant 306 défailants cardiaques réitérait une fois de plus l'interaction significative entre les génotypes de *ADRB1* et la dose administrée de  $\beta$ -bloqueur comme un facteur possiblement déterminant de la survie en insuffisance cardiaque.<sup>360</sup> Pourtant, aucune étude n'a démontré de façon prospective l'utilité d'une approche personnalisée des thérapies  $\beta$ -bloquantes.<sup>362</sup>

#### 4.1.2 *ADRB2*

L'étendue des travaux sur les polymorphismes du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (*adrenoceptor beta 2*, *ADRB2*) vont jusqu'à inclure des champs thérapeutiques tels que le cancer<sup>363</sup> et le diabète.<sup>364</sup> On dénombre près d'une vingtaine de polymorphismes ayant été identifiés dans la séquence du gène codant pour *ADRB2*.<sup>262,365</sup> Parmi eux, les variants sélectionnés *ADRB2*

Arg16Gly et Gln27Glu ont fait l'objet d'investigations plus exhaustives en lien avec certaines conditions cardiovasculaires et leurs traitements pharmacologiques associés.<sup>357</sup> Des résultats de cohortes hypertendues relatent des baisses accentuées de FC pour les porteurs de 16Gly, contrairement à des réductions moins importantes pour les patients 27Glu traités avec métoprolol ou aténolol.<sup>357,366</sup>

Les données cliniques publiées ne parviennent pas à valider l'impact ou l'incidence d'événements cardiovasculaires des variants de *ADRB2*, peu importe la condition investiguée.<sup>367-369</sup> Les résultats non-concluants s'accordent avec ceux démontrant un effet non-cliniquement significatif de *ADRB2* sur l'efficacité des agents  $\beta$ -bloquants.<sup>357,370</sup> Or, des données récentes revendiqueraient une interaction entre *ADRB2*, la dose de maintenance de  $\beta$ -bloqueur et la survie en insuffisance cardiaque,<sup>360</sup> exigeant peut-être des études futures à plus grand déploiement.

#### 4.1.3 *ADRA2C*

Le polymorphisme génétique du récepteur pré-jonctionnel  $\alpha_{2C}$ -adrénergique (*adrenoceptor alpha 2C*, *ADRA2C*) indel 322-325 cause une délétion de 4 nucléotides du récepteur pré-synaptique  $\alpha_{2C}$ .<sup>371</sup> Cette délétion serait responsable d'une perte de fonction inhibitrice du récepteur, donc de la relâche accentuée de noradrénaline.<sup>372</sup> Cette hausse résultante des concentrations circulantes et la modulation altérée de la stimulation sympathique mèneraient ultimement au développement et à l'exacerbation de cardiomyopathies.<sup>371-373</sup> *ADRA2C* 322-325 précipiterait spécifiquement la progression d'insuffisance cardiaque, mais les données pronostiques rapportées demeurent inconstantes.<sup>374,375</sup> Au niveau thérapeutique, la découverte de ce polymorphisme a permis de réévaluer l'efficacité des thérapies  $\beta$ -bloquantes sympatholytiques sous un angle PGx. De multiples sous-études revendiquent la réduction de mortalité et d'événements pro-arythmiques chez les non-porteurs du variant *ADRA2C* 322-325 lors de la prise de bucindolol.<sup>376,377</sup> À ces résultats, l'absence d'association ou la contribution additive des polymorphismes de *ADRB1* à l'effet de *ADRA2C* ont été soulignées par certains groupes,<sup>377,378</sup> ce qui empêche de statuer définitivement sur les conséquences PGx de *ADRA2C* indel 322-325.

#### 4.1.4 *CYP2D6*

L'association PGx la plus documentée auprès des CYPs et des  $\beta$ -bloqueurs relate l'impact du statut métabolique du *CYP2D6* sur le métabolisme du métoprolol, lequel s'effectue à près de

80% par cette voie enzymatique.<sup>170</sup> À la différence des cibles précédentes, qui elles affectent directement les effets PD et cliniques des  $\beta$ -bloqueurs, plusieurs études reproduites à l'aide de petites cohortes ont permis de confirmer les différences de profils PK entre les phénotypes du CYP2D6.<sup>379,380</sup> En regroupant les données publiées sous forme de méta-analyse, les valeurs de  $C_{max}$  et de AUC, normalisées selon les doses, ainsi que celles de Cl/F, augmenteraient de plus de 5, 13 et 15 fois, respectivement, des phénotypes UM à PM.<sup>292</sup> Les valeurs de  $t_{1/2}$  varieraient entre 3-7 heures.<sup>292</sup> Les répercussions PK liées au statut métabolique du CYP2D6 sur l'énantiosélectivité du métoprolol ont été discutées à la **Section 3.5**.<sup>338-340</sup> Toutefois, il demeure incertain si les variations PK-PGx causeraient des différences hémodynamiques pouvant moduler significativement la réponse clinique. Des données obtenues grâce à des cohortes composées de patients avec différentes conditions cardiovasculaires démontrent des différences de réduction de FC, de tensions artérielles systolique (TAS) et diastolique (TAD) entre les phénotypes inclus, quoique les résultats statistiquement significatifs ne semblent pas reproductibles.<sup>330,381-383</sup> Les différences de doses quotidiennes moyennes ne seraient pas non plus affectées de manière constante par ces variations,<sup>384-388</sup> malgré les hausses proportionnelles de concentrations circulantes de métoprolol.<sup>387,389,390</sup> La survenue d'événements indésirables apparaît généralement similaire entre les phénotypes du CYP2D6.<sup>330,383,384,390</sup> Puisqu'il est question d'agents  $\beta$ -bloquants, la survenue de bradycardie (FC<60 battements/minute) serait plus fréquente chez les PMs,<sup>383,391</sup> sans qu'ils n'en deviennent symptomatiques. Suivant une étude clinique en défaillance cardiaque, Terra *et al.* concluaient que le risque de décompensation était semblable entre NMs, IMs et PMs. Une sous-étude PGx de l'essai randomisé MERIT-HF (*Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive Heart Failure*) ne parvenait finalement pas à distinguer une différence de survie ou de discontinuation de traitement.<sup>381</sup>

Il est intéressant de constater qu'en s'appuyant principalement des données PK-PGx, le DPWG recommande l'ajustement des méthodes de titrations des doses de métoprolol dans un contexte d'insuffisance cardiaque.<sup>137</sup> Effectivement, afin de réduire la survenue prétendue de bradycardie symptomatique, une titration ralentie est conseillée pour les PMs et les IMs, avec l'atteinte respective d'une dose 75 et 50% inférieure à la dose cible conventionnelle pour ces phénotypes. Les UMs devraient recevoir une dose étant 2,5 fois supérieure à la cible habituellement visée. Pourtant, aucune étude clinique ne supporte l'approche thérapeutique guidée par le génotype dans l'administration de  $\beta$ -bloqueurs pour quelconque indication, ce qui incite à ce que davantage

de données soient générées pour appliquer définitivement ces recommandations.<sup>115</sup> Les lignes directrices européennes reconnaissent toutefois que, dans les circonstances où le génotype de *CYP2D6* d'un patient devait être connu des prescripteurs, un traitement  $\beta$ -bloquant alternatif pourrait être administré, en plus de chercher à éviter la phénoconversion par des thérapies inhibitrices concomitantes.<sup>115</sup> Le prochain chapitre sera consacré à la synthèse des données cliniques citées plus haut.

Le niveau d'évidence lié à d'autres  $\beta$ -bloqueurs semble moins persuasif. Les données obtenues pour d'autres agents  $\beta$ -bloquants, peu importe leur affinité pour les CYPs, n'indiquent aucune association PK-PGx ou PD-PGx suffisamment notoire pour relever d'une pertinence clinique.<sup>137,342,382,388,392,393</sup>

#### 4.1.5 *GKR4* et *GRK5*

Les kinases couplées au GPCR (*G-protein coupled receptor kinase*, GRK) sont des kinases de type sérine/thréonine et exercent un rôle crucial dans l'endocytose des GPCR.<sup>394,395</sup> Suivant la stimulation excessive du récepteur par un agoniste, elles vont généralement médier sa phosphorylation avant qu'il soit séquestré, endocyté et dégradé,<sup>394,395</sup> d'où leur concordance avec les phénomènes de désensibilisation. Tel qu'expliqué plus bas, leur rapport au développement de maladies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque,<sup>396</sup> reste encore incertain.

Les kinases GRK4 et GRK5 médient respectivement la phosphorylation et la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques à différents degrés.<sup>397,398</sup> Un variant non-synonyme A142V de GRK4 serait associé à une diminution de 50% des probabilités d'atteindre une tension artérielle cible chez les hommes afro-américains traités avec métoprolol.<sup>399</sup> D'autres groupes montraient des résultats similaires quant à la réponse antihypertensive à l'aténolol chez des patients hypertendus de toutes origines issus de l'étude PEAR (*Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses*).<sup>400</sup> On note cependant que, tout comme pour *ADRA2C*, la présence du variant *ADRB1* Arg389Gly serait une variable confondante. D'autres analyses associaient des variants de GRK4 à un risque accru de mortalités cardiovasculaire et toute-cause, sans détecter d'effet PGx pour quelconque bras de traitement.<sup>400</sup>

En ce qui a trait à GRK5, l'allèle Leu41, qui provoque un gain de fonction, augmenterait la désensibilisation induite par agonistes et conférerait une protection cardiovasculaire face à l'activation sympathique.<sup>398</sup> Plusieurs travaux ont indiqué la contribution potentielle du variant

Leu41Gln à la réponse améliorée aux  $\beta$ -bloqueurs, conjointement à la hausse de survie en insuffisance cardiaque.<sup>370,401,402</sup> En raison de la hausse de survie, un bénéfice clinique direct moins distinctif des  $\beta$ -bloqueurs serait observé pour les porteurs d'allèle Leu41.<sup>368,402</sup> Ainsi, à la fois pour GRK4 et GRK5, ces résultats tendent à supporter l'hypothèse d'un « effet  $\beta$ -bloquant génétique » modifiant l'activité sympathique de certaines physiopathologies cardiovasculaires et leur issue, plutôt que l'effet pharmacologique propre des thérapies  $\beta$ -bloquantes.<sup>403</sup> La possibilité d'effets cliniques PGx, et non seulement d'effets génétiques physiopathologiques, devra être plus clairement établie.

## 4.2 Études pangénomiques : nouvelles approches, nouveaux variants

Considérant les résultats décevants à l'endroit des cibles polymorphiques décrites précédemment quant à leur potentiel d'association PGx, les stratégies de génotypage pangénomique ont été mises à contribution afin de découvrir des variants insoupçonnés affectant la réponse aux  $\beta$ -bloqueurs. Ces stratégies tentent de capter une variabilité provenant de gènes qui ne se limiteraient pas aux voies métaboliques et aux mécanismes physiologiques connus,<sup>127</sup> ici la cascade de signalisation adrénergique et les voies métaboliques des  $\beta$ -bloqueurs, respectivement. Ainsi, l'émergence des devis pangénomiques de cohortes de patients hypertendus traités par  $\beta$ -bloquants a permis d'identifier un effet modulateur de la tension artérielle attribuable à des polymorphismes de gènes précédemment non-investigés.<sup>404,405</sup> Certains variants seraient présents seulement chez les populations afro-américaines ou caucasiennes, la réplique des résultats étant parfois dépendante de l'ethnicité. Qui plus est, ceux-ci pourraient moduler spécifiquement l'effet des  $\beta$ -bloqueurs sur la TAS ou la TAD. Bien que la fonction de ces gènes puisse être inconnue ou que leur rôle soit indéterminé d'un point de vue cardiovasculaire, plusieurs auraient déjà été associés à un phénotype hypertendu lors d'essais pangénomiques.<sup>404-407</sup> Plus en lien avec leur effet chronotrope négatif caractéristique, les analyses pangénomiques conjuguées des cohortes hypertensives indiquent que *OR10P1* (*olfactory receptor 10P1*) et *SNX9* (*sorting nexin-9*) modèleraient la réduction de FC lors de la prise d'aténolol ou de métoprolol dans un contexte d'hypertension, peu importe l'ethnicité.<sup>408</sup> Ces marqueurs génétiques auraient des interactions physiologiques indirectes mieux établies avec ADRB2 et la transduction de signal adrénergique,<sup>409</sup> ainsi que la fonction cardiaque générale.<sup>410</sup> Cela permettrait d'assurer une plausibilité biologique justifiant en partie l'efficacité relative des  $\beta$ -bloqueurs.

En accord avec les associations PGx typiquement issues des études de cohortes, l'extrapolation de ces dernières demeurent limitées en raison des tailles d'échantillonnages restreintes et de leur nature observationnelle, sans compter les méthodes de validation employant des cohortes traitées avec un  $\beta$ -bloqueur différent. Des investigations ultérieures à portées mécanistique et thérapeutique pourront confirmer la taille d'effet et l'impact clinique des variants les plus prometteurs. Il sera également question d'élargir la découverte de déterminants prédictifs de la réponse thérapeutique à une sélection plus vaste de physiopathologies cardiovasculaires.<sup>370,405,406</sup> Les avancées considérables par investigations pangénomiques encouragent l'avenue personnalisée des traitements  $\beta$ -bloquants.

## **5 Résumé de l'état des connaissances, hypothèses et objectifs**

Le nombre grandissant d'initiatives de recherche tirant parti des biobanques suscite beaucoup d'intérêt dans la découverte de mécanismes et de biomarqueurs physiopathologiques,<sup>242,245</sup> surtout de par les données génomiques qu'elles renferment.<sup>230</sup> D'immenses efforts collaboratifs ont été faits afin d'amener les essais pangénomiques à être employées avec les biobanques inter-institutionnelles. Cependant, l'absence presque totale de leur adaptation à des fins PGx signifie qu'elles demeurent une ressource inexploitée afin d'optimiser les thérapies courantes ou en voie de développement, notamment par rapport à des déterminants génomiques prédictifs des concentrations de médicaments, des doses ou des paramètres ADME.

Le système  $\beta$ -adrénergique comporte plusieurs cibles polymorphiques pouvant altérer la réponse aux thérapies  $\beta$ -bloquantes, le CYP2D6 étant celle au potentiel PK-PGx le plus important. Cependant, on constate le manque d'évidence synthétisée pour ses impacts au niveau de la réponse clinique aux  $\beta$ -bloqueurs, surtout ceux métabolisés principalement par cette enzyme comme le métoprolol. Une fois revues, ces données pourraient permettre l'investigation d'associations plus concrètes grâce aux observations que les biobanques rendraient possibles à leur tour. À cela s'ajoute le volet stéréochimique des  $\beta$ -bloqueurs et l'intérêt à développer une méthode qui puisse soutenir un projet de recherche clinique à grand déploiement.

L'objectif primaire de cette thèse est d'étudier la capacité d'une grande cohorte observationnelle, soit une biobanque, à identifier des associations PK-PGx en utilisant les données et les tailles d'échantillons qu'elles comportent. Les objectifs spécifiques par chapitre sont :

- 1) Regrouper et synthétiser les données de littérature entourant les effets cliniques du CYP2D6 sur le traitement  $\beta$ -bloquant au métoprolol par l'entremise d'une revue systématique, suivie d'une méta-analyse. D'après les données publiées dans la littérature, l'hypothèse de notre groupe de recherche est que les paramètres pharmacodynamiques cliniques retenus (voir **Chapitre 2**) affichent une tendance statistiquement significative entre chaque phénotype inféré du CYP2D6, de sorte à indiquer que l'effet est augmenté chez les patients avec une faible capacité enzymatique;
- 2) Développer et valider une méthode bioanalytique novatrice pour la quantification du (*S*)-métoprolol et de son métabolite chiral spécifique au CYP2D6, le  $\alpha$ -hydroxymétoprolol. Puisque seul le (*S*)-métoprolol est pharmacologiquement actif, l'hypothèse liée à ce projet se veut être que la combinaison de techniques bioanalytiques servant d'une part à la séparation optique d'énantiomères, d'autre part à la purification d'échantillons biologiques permettra de quantifier de manière plus sensible et rapide le (*S*)-métoprolol, en plus de pouvoir évaluer son métabolisme par le CYP2D6 par la quantification de son métabolite. La mise en place et la validation d'une telle méthode permettra de relever les limites encourues dans la littérature scientifique antérieure, surtout en ce qui concerne l'application clinique;
- 3) Utiliser l'association PK-PGx préalablement établie entre le CYP2D6 et le métoprolol pour investiguer le concept selon lequel les biobanques peuvent être utilisées pour identifier des associations PGx prédictives des concentrations plasmatiques de médicaments. Les études antérieures les plus exhaustives sur la PK du CYP2D6 et du métoprolol ont porté sur <100 patients. Elles ont été menées selon des protocoles stricts utilisant des mesures sanguines répétées, de même que des doses fixes d'une formulation spécifique de métoprolol. L'étude menée porte sur un échantillon de 1000 personnes. L'identification d'associations PGx à des paramètres cliniques a également été entreprise.

## Chapitre 2 : Connaissances actuelles de l'impact du polymorphisme génétique du cytochrome P450 2D6 sur la réponse clinique au métoprolol – Synthèse, revue systématique et méta-analyse

### 1 Introduction

Tel que présenté au **Chapitre 1**, plusieurs données scientifiques existent en ce qui a trait aux variations PK-PGx inter-individuelles reliées au polymorphisme génétique du CYP2D6 et au métoprolol. Responsable d'environ 80% de son métabolisme hépatique,<sup>170</sup> ces effets PGx ont été précédemment synthétisés par Blake *et al.* par l'entremise d'une méta-analyse ayant permis d'estimer plus adéquatement la magnitude de l'impact PK-PGx sur le métoprolol, notamment au niveau des paramètres ADME tels AUC, Cl/F, C<sub>max</sub> et t<sub>1/2</sub>.<sup>292</sup> À cet effet, la relation PGx fût observable à-travers les quatre phénotypes du CYP2D6 de manière inversement proportionnelle, c'est-à-dire que l'augmentation de la capacité enzymatique de CYP2D6 chez certains sujets entraînait des diminutions de concentrations plasmatiques et une exposition au métoprolol moins importante.

Or, bien que de nombreuses publications soient disponibles témoignant de l'influence de CYP2D6 sur le métabolisme du métoprolol, aucune révision des données qualitatives et quantitatives traitant de l'impact de cette association PGx et de ses répercussions au niveau clinique n'était présente. L'absence de synthèse sur ces données était constatée alors que plusieurs études cliniques comportant différents devis indiquaient des résultats ambigus quant à la présence de variabilités inter-individuelles des paramètres cliniques attribuables à *CYP2D6*.<sup>330,381,382,387</sup> Traitant notamment de paramètres tels la FC, la tension artérielle systolique (TAS) et diastolique (TAD), la dose quotidienne, la survenue d'événement indésirables, ainsi que la mortalité et les hospitalisations, l'ensemble des connaissances actuelles quant à l'association PGx sur la réponse au métoprolol demeurait à être revue pour chacun d'eux. Par le fait même, et considérant le temps écoulé depuis la dernière publication ayant revue la relation PK-PGx de *CYP2D6* sur le métoprolol,<sup>292</sup> notre groupe de recherche a entrepris de réviser en parallèle ces données de littérature et d'en faire une mise à jour, augmentant potentiellement le nombre d'articles pour les analyses quantitatives. Ce faisant, les objectifs de ce projet étaient les suivants :



- i. Effectuer des recherches itératives à l'aide de mots-clés dans les bases de données biomédicales;
- ii. Identifier les études répertoriées traitant des différences de profils PK et de la réponse clinique au métoprolol entre plusieurs phénotypes inférés des génotypes de *CYP2D6*;
- iii. Extraire et résumer les données qualitatives traitant des paramètres cliniques suivants comme les doses quotidiennes moyennes de métoprolol, les différences de réduction de FC, de TAD et de TAS, la survenue d'événements indésirables de tout type et de bradycardie spécifiquement, ainsi que le taux de mortalité et/ou d'hospitalisations entre phénotypes;
- iv. Extraire les données quantitatives de chaque paramètre mentionné ci-haut afin d'effectuer des méta-analyses et obtenir des estimés d'effet regroupant plusieurs cohortes.

Puisque la classification phénotypique du *CYP2D6* comporte quatre phénotypes distincts, nous avons choisis de simplifier les analyses des paramètres cliniques en comparant les métaboliseurs PMs aux non-PMs (i.e. IMs, NMs, UMs). En effet, les métaboliseurs PMs ne possédant aucune capacité métabolique,<sup>197</sup> notre hypothèse était que ces derniers allaient avoir une réponse clinique au métoprolol de plus grande magnitude comparativement aux autres phénotypes du *CYP2D6*.

2      **Manuscrit n° 1 (publié dans *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(6):1015-33)**

***CYP2D6* polymorphism and its impact on the clinical response to metoprolol: A systematic review and meta-analysis**

**CYP2D6 phenotypes and metoprolol treatment**

Maxime Meloche<sup>1,2,3</sup>, Michael Khazaka<sup>1,4</sup>, Imad Kassem<sup>1</sup>, Amina Barhdadi<sup>1,2</sup>, Marie-Pierre Dubé<sup>2,3,5</sup>, and Simon de Denus<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Beaulieu-Saucier Université de Montréal Pharmacogenomics Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

<sup>4</sup> Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Quebec, Canada

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Corresponding author's coordinates:**

Simon de Denus, B. Pharm, M.Sc (Pharm), PhD

**E-mail: [simon.de.denus@icm-mhi.org](mailto:simon.de.denus@icm-mhi.org)**

Montreal Heart Institute

5000 Bélanger St., H1T 1C8, Montréal, Québec, Canada

**Tel. : 514-376-3330 , ext. 3947**

## Abstract

**Aims:** *CYP2D6* genetic polymorphisms are associated with metoprolol pharmacokinetics. Whether the clinical response to metoprolol is also affected remains uncertain. **Methods:** We conducted a systematic review on the effects of *CYP2D6* polymorphism on the clinical response to metoprolol. Searches were conducted using MEDLINE. Meta-analyses were performed on the impact of *CYP2D6*-inferred phenotypes on heart rate reduction (HR), diastolic (DBP) and systolic (SBP) blood pressure reduction, average daily doses, all-type adverse events (AE) and bradycardia. **Results:** Our qualitative assessment indicated inconsistent results in individual studies and endpoints, but *CYP2D6* poor metabolizers (PM) generally presented a greater reduction in HR. The meta-analysis of 15 studies, including a total of 1146 individuals, found a reduction in HR of 3 beats/min ( $p=0.017$ ), and of SBP and DBP by 3 mmHg ( $p=0.0048$ ) for PM compared to non-PM individuals using similar metoprolol doses. Bradycardia appeared more frequent by 4-fold for PM, although significant heterogeneity was observed in regards to bradycardia, which limits the scope of this finding. **Conclusions:** Patients without any *CYP2D6* metabolic capacities appear to have increased reduction in DBP, HR, and SBP during metoprolol treatment and may be at a higher risk of bradycardia compared to patients with active *CYP2D6* phenotypes. Further prospective data are required to determine whether *CYP2D6* is associated with clinical events in patients treated with metoprolol, as well as to demonstrate the clinical utility of an individualized approach of prescribing metoprolol using *CYP2D6*-inferred phenotypes.

**What is already known about this subject**

- CYP2D6 highly contributes to drug metabolism. It contains also contains several genetic polymorphisms affecting its enzymatic activity.
- Metoprolol pharmacokinetics are significantly affected between genotype-inferred phenotypes of CYP2D6, but the impacts on the clinical response of patients to patients have not been summarized.

**What this study adds**

- This paper reviews the cumulative results of the effects of CYP2D6 genetic polymorphisms for patients on metoprolol treatment.
- Patients possessing an inactive CYP2D6 phenotype have increased clinical effects and bradycardia with metoprolol, compared to those with an active CYP2D6 metabolic capacity.
- More prospective data should be generated to suggest the implementation of a personalized approach to CYP2D6-mediated  $\beta$ -blocker therapy.

**Key words**

Systematic review; Meta-analysis; Pharmacogenomics; Cytochrome P450 Enzymes; Genetic polymorphism.

## Introduction

The cytochrome P450 (CYP) 2D6 accounts for nearly 20% of all hepatic enzyme expression and is responsible for the metabolism of up to 25% of all registered drugs <sup>1</sup>. The Pharmacogenomics Knowledge Base regroups growing evidence that demonstrates a causal relationship between allelic variants of the *CYP2D6* gene and variable response to certain drugs <sup>2</sup>. More than 100 variations, primarily single nucleotide polymorphisms (SNPs) and copy-number variants, have been reported <sup>1</sup>. Such sequence variations can confer a null to increased CYP2D6 metabolic activity, and the effects on drug metabolism and pharmacokinetic profiles have been repeatedly documented across multiple drug classes <sup>3</sup>. Guidelines have been elaborated to classify the CYP2D6 metabolic activity of individuals into four genetically-inferred phenotypes: ultra-rapid metabolizers (UM), extensive, or normal, metabolizers (EM), intermediate metabolizers (IM), and poor metabolizers (PM) <sup>3-6</sup>. The predicted prevalence of *CYP2D6* genotype-predicted phenotype is estimated to be between 1 to 21%, 67 to 90%, 0.4 to 11%, and 0.4 to 5.4%, for UM, EM, IM and PM respectively, depending on the population studied <sup>7</sup>.

The selective  $\beta_1$ -antagonist metoprolol is one of the most commonly used cardiovascular drugs to treat conditions such as heart failure, hypertension, and atrial fibrillation <sup>8-10</sup>. Approximately 80% of metoprolol is metabolized by CYP2D6 <sup>11</sup>, whose metabolites exert negligible pharmacological activity <sup>12</sup>. An earlier meta-analysis has confirmed the significant effect of *CYP2D6* genotype on the pharmacokinetics of metoprolol <sup>13</sup>. Yet, whether this pharmacogenetic effect translates into differences in clinical response to metoprolol treatment is uncertain. This is largely attributable to the fact that previous studies only had small sample sizes. Hence, the objective of this article was to systematically review and summarize the impact of *CYP2D6* polymorphisms on the clinical response to metoprolol.

## Methods

This systematic review was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement<sup>14</sup>.

### **1) Data sources & Search strategy**

A series of comprehensive searches in the MEDLINE database were conducted on articles written from 1946 to September 2018 to investigate the association between *CYP2D6* and the pharmacodynamics of metoprolol. The searches were restricted to articles written in English or in French, while also including ahead-of-print, in-process, and non-indexed records. The following terms were used to guide and refine the iterative search process: metoprolol; cytochrome P-450 2D6; genomics; genes; pharmacogenetics; polymorphism; genetic; single-stranded conformation; amplified fragment length polymorphism analysis; single nucleotide; restriction fragment length; phenotype; genotype (Table S1). Database updates were activated to identify newly published articles. The reference lists of the articles retrieved were manually searched to find studies that did not appear based on our strategy.

### **2) Eligibility criteria & Study selection**

Studies to be included were considered for this review irrespectively of study design, follow-up duration, metoprolol dosing regimen, and drug formulation. Studies evaluating drug interactions between metoprolol and other *CYP2D6* substrates were excluded, unless patients took metoprolol without or before administration of a potentially interacting agent. In such cases, only the relevant baseline information was included. Previous reviews and meta-analyses were also rejected after having searched their reference lists.

In terms of subject inclusion, participants that were healthy, as well as patients with cardiovascular and non-cardiovascular diseases, were included. Studies involving special populations such as twins, or pregnant and/or lactating women were excluded. No constraints were applied on the use of polypharmacy regimens. Publications where participants had not been genotyped, or studies that had classified patients primarily according to their pharmacokinetic profiles using probe drugs, or to drug responses without consideration to genetic information, were also excluded.

### **3) Data collection & data items**

Eligibility assessment and data collection was performed independently by the first and second authors. Differences were resolved through discussions and consensus, and any remaining issues were settled with the senior author. Results from the database searches were ordered

alphabetically according to the names of the first author to easily identify duplicates, which were removed afterwards. A primary screening with the titles and abstracts of all the articles was made. Articles considered eligible for review were entirely assessed and the data were collected in a MS Excel spreadsheet. The following details were included: year of publication; first author; title of study; presence of duplicates; study design; sample size and ethnicity; patients' diseases; investigated medications and concomitant drugs; dosing regimens; follow-up; outcome measures; effects on reviewed outcomes; genotyped SNPs; and phenotype assignment.

The reviewed parameters between all phenotypes were limited to changes from baseline at study enrollment of heart rate ( $\Delta$ HR), diastolic ( $\Delta$ DBP) and systolic ( $\Delta$ SBP) blood pressure, mean daily metoprolol doses, and frequency of all-type adverse events (AE) and bradycardia. End-of-study values for each endpoint were collected. Mortality and hospitalizations, or other composite criteria reflecting death and morbidity were reviewed as well.

#### **4) Genotype-inferred phenotype assignment**

We used the inferred phenotype assigned by the authors, according to their genotype classification. In studies having reported genotypes only, we attributed inferred phenotypes in accordance with the current Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) recommendations for groups which had not been assigned one. The DPWG annotations on metoprolol and *CYP2D6* are referred by the Pharmacogenomics Knowledgebase website. Thus, subjects were categorized as UM if they carried more than two fully functional alleles (\*1, \*2, \*33, \*35, \*39, \*53), EM if they possessed two fully functional alleles or one fully functional and a semi-active allele (\*9, \*10, \*17, \*29, \*36, \*41, \*53, \*54, \*59, \*72, \*84), IM if they had only one fully functional allele and a null allele (\*3-8, \*11, \*12, \*14-16, \*18-21, \*38, \*40-42, \*44, \*51, \*56, \*57, \*60, \*62, \*68, \*69, \*92, \*96, \*99-101, \*114) or two semi-functional alleles, and PM were determined to have 2 null alleles. All known *CYP2D6* polymorphisms are indicated on the Pharmacogene Variation Consortium online database <sup>15</sup>.

#### **5) Statistical methods and meta-analyses**

Statistical analyses were carried using primarily with the *meta* package on the R software version 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing). Random-effects models for meta-analyses were chosen. Irrespective of their designs, studies having reported quantitative values for

the assessed parameters were included in our meta-analyses. For continuous variables (i.e. average daily doses,  $\Delta$ DBP,  $\Delta$ HR,  $\Delta$ SBP), data were reported as mean difference, alongside confidence intervals (C.I.) set at 95% of the distribution (Table S2). For such parameters, random-effects model were conducted using the Hartung-Knapp adjustment<sup>16</sup>. For binary outcomes (i.e. all-type AE, bradycardia), odds ratios (OR) were retrieved or calculated (Table S3). Summary effects sizes were generated by means of a restricted maximum likelihood method (REML) with an inverse-variance estimator. Other models have recently been brought forward to increase probability coverage for binary outcomes<sup>17,18</sup>. Recent simulations have shown that they do not considerably outperform REML estimations in random-effects meta-analyses with few studies<sup>19</sup>. Nevertheless, considering the criticism that has been made surrounding the application of the Hartung-Knapp adjustment<sup>20,21</sup>, we performed sensitivity analyses to compare the results to the conventional DerSimonian-Laird approach in the case of continuous variables.

Other statistical analyses were made via Comprehensive Meta-Analysis, version 2.2.064 (Biostat, Englewood, NJ, USA). The various ways of reporting results from the included studies required that certain values be pooled. For example, if individuals carrying different genotypes but having the same inferred phenotype were reported separately in some articles, their respective values were weighed and aggregated together, according to the DPWG guidelines, generating single values of mean and SD for each phenotype. The same weighing process was applied to calculate means and SDs for pooled phenotypes. Whenever needed, reported values were transformed into common units of measure. In some studies, only medians, interquartile ranges, and/or full ranges with sample sizes were reported. To transform those parameters into values that could be standardized and properly integrated into our models, we used the formulas proposed by Wan *et al.*<sup>22</sup>. Briefly, this approach utilizes the sample size, median, maximum and minimum values, or the interquartile range of a given distribution to estimate the mean and SD of a dataset. Values obtained from Wan *et al.*'s method are displayed in Table S4 (Supporting Information), and all values used in our meta-analyses for daily doses are listed in Table S5. If warranted, the estimated parameters were pooled as described earlier. Even though our primary comparison of interest was to compare PM individuals with those presenting any CYP2D6 activity (i.e., UM, EM, IM), we performed pairwise comparisons between single phenotypes as well.



## **6) Quality and risk of bias**

The first and second authors (MM, MK) performed an evaluation on the quality and risk of bias in each study. Multiple critical evaluation tools for study biases were available from different consortia and institutes, but their qualitative assessment methods were only partially adapted for pharmacogenetic studies. Thus, the following quality components were inspected without referring to general critical evaluation tools: study design, randomization, appropriateness of group comparisons, baseline characteristics, patients' diseases and medications, dosing regimens and concomitant medications, and inferred phenotype assignment from genotype. However, we did not exclude studies based on these criteria.

## **7) Ethical review**

Ethical approval was unnecessary for this systematic review and meta-analysis, because only previously published data were retrieved. No recruitment of human participants was done, and personal data were not needed to perform this review.

## **Results**

### **1) Summary of systematic review**

Figure 1 presents the article selection process. The comprehensive search generated 75 results from the MEDLINE database. Seven additional records from reference lists were added, along with 5 from manual searches, totaling 87 results. Of these, 2 articles were removed due to language barriers (German, Chinese), along with 1 off-topic systematic review, 2 earlier meta-analyses, and 1 editor correspondence. After removal of duplicates (n=10), 13 articles were excluded based on their titles and 11 on their abstracts. The remaining 47 articles were completely assessed for eligibility. Twenty-five additional articles were then excluded because they did not meet all the eligibility criteria: 5 studies did not perform any genotyping, 4 studies did not present any reviewed parameters, 1 study was a retrospective assessment of 2 prior studies, and 1 study did not classify subjects according to their CYP2D6 genotype-inferred phenotype. Fifteen articles were rejected for presenting pharmacokinetic parameters only. The complete list of fully assessed and excluded articles is available as Supporting Information (Table S6). In total, 21 studies were included for presenting clinical parameters, 15 of which were used in our meta-analyses.

Table 1 contains the main characteristics of the included studies with regards to their clinical parameters. Study designs, types of populations and diseases, medications and dosing regimens, durations and follow-ups, inferred phenotype classification, and the summarized results of every parameter reviewed are indicated. Values in the table were all explicitly reported in the original articles.

## **2) Meta-analyses of clinical parameters**

### **2.1) Average daily doses**

Fifteen studies were available to review the qualitative differences between the daily titrated metoprolol dosing across phenotypes<sup>23-37</sup>. Titration schemes varied and starting doses differed based on diagnosis. Forced titration by ascending doses was initiated according to fluctuating time periods and on patients' needs until a maximum tolerated dose or the final target dose had been achieved, which averaged between 47.5mg and 200mg daily. Generally, studies observed that PM participants did not reach target dose as often as non-PM, but those differences were not consistent across studies.

Our meta-analyses of daily metoprolol drug dosing differences between CYP2D6 inferred phenotypes included 8 studies and 789 individuals (Figure 2)<sup>24,27,32-36,38</sup>. Average daily dose values were calculated using Wan *et al.*'s formulas for 5 studies<sup>27,32-34,36</sup>. The difference in means (mg/day) was nonsignificant when comparing PM and non-PM (mean difference = -2.12 [95% CI: -14.26 to 10.03]; p=0.202). No significant heterogeneity was observed in our main analysis, with  $I^2$  reaching 28% (p=0.20). For pairwise comparisons, all phenotypes had similar dosages.

### **2.2) Heart rate reduction**

A total of 9 studies assessed the heart rate reduction at rest between the genotype-inferred phenotypes<sup>24,27,30,33,34,37,39-41</sup>. Almost all studies showed significant differences between at least two phenotypes. We also found 3 studies in which exercise-induced heart rate differences had been measured<sup>41-43</sup>, all of which showed significant differences (Table 1).

A total of 5 studies comprising 750 individuals were included in the meta-analysis (Figure 3)<sup>24,27,30,33,41</sup>. We observed that PM had a significantly greater reduction compared to non-PM when assessing the mean differences in beats/min (mean difference = 3.16 [95% CI: 0.94 to 5.37]; p=0.017). After removal of 1 fixed-dose study, the same conclusions were obtained when

comparing PM against non-PM ( $p=0.044$ ). No heterogeneity was observed in our main analysis ( $p=0.89$ ). The only two-by-two comparisons that reached significant differences were EM vs PM ( $p=0.029$ ), and UM vs PM ( $p=0.048$ ).

### 2.3) Blood pressure reduction

Eight studies published data on resting  $\Delta$ SBP,  $\Delta$ DBP between CYP2D6 genotype-inferred phenotypes<sup>24,27,30,33,34,37,39-41</sup>. In all the studies reviewed, patients were initially  $\beta$ -blocker naïve. Our systematic review showed inconsistent results across studies for both parameters. Only 1 of the studies that had examined exercise-induced heart rate variations also reported values for BP reduction after exercise<sup>42</sup>. In that study, 12 hours after a single 100mg metoprolol dose, PM still had a decrease of 14% to 17%, whereas EM had returned to baseline.

Five studies including 842 individuals suitable for meta-analysis were analyzed to determine the effect of CYP2D6 genotype-derived phenotypes on resting  $\Delta$ SBP (Figure 4)<sup>24,27,30,33,40</sup>. Our results indicated a significantly greater reduction (mmHg) for PM against non-PM (mean difference = 2.88 [95% CI: 1.47 to 4.29];  $p=0.0048$ ), which was also observed for titrated-dose studies only ( $p=0.031$ ). No significant heterogeneity was observed in this meta-analysis ( $p=0.99$ ). EM against PM was the only pairwise comparison where statistical significance was achieved (mean difference = 4.15 [95% CI: 0.18 to 8.12];  $p=0.030$ ), which was preserved when removing the fixed-dose study ( $p = 0.037$ ).

As for  $\Delta$ DBP, the same 5 studies were included in our meta-analyses (Figure 5). Significant results were observed between non-PM and PM (mean difference = 2.93 [95% CI: 1.53 to 4.32];  $p=0.0043$ ). Again, no significant heterogeneity in this meta-analysis, with  $I^2=0\%$  ( $p=0.91$ ). By excluding the 1 fixed-dose study, results remained significant ( $p=0.021$ ), with PM showing greater reduction than other phenotypes. IM and PM showed significantly greater reductions compared to EM when including all studies (EM vs. IM:  $p=0.014$ ; EM vs. PM:  $p=0.014$ ). Titrated-dose studies also showed that the phenotype with less metabolic capacity had a greater  $\Delta$ DBP, in both comparisons. For fixed-dose studies, comparisons involving EM and IM showed no statistical differences ( $p=0.150$ ). As was the case for  $\Delta$ SBP, our quantitative analysis also showed no differences in  $\Delta$ DBP between UM and other phenotypes.

## 2.4) All-type adverse events and bradycardia

In total, 6 studies reported the frequency or the number of all-cause adverse reactions, either dose-limiting or not<sup>27,30,33,34,36,38</sup>. Five studies specifically monitored the frequency of bradycardia<sup>24,30,33,36,37</sup>, which was uniformly defined as a heart rate <60 beats/min. Two studies reported symptomatic bradycardia and all bradycardia events, while two reported bradycardia without specifying whether these events were symptomatic. All studies reported the use of multiple doses.

Only 3 studies including 356 individuals were pooled to evaluate the frequency of all-type AE<sup>30,33,38</sup>. Considerable variability was observed for each individual study regarding confidence intervals. Neither PM or non-PM were more prone to adverse reactions due to their CYP2D6 phenotype (OR: 0.76 [95% CI: 0.33 to 1.74]; p=0.514) (Figure 6). No heterogeneity was found in this analysis ( $I^2=0\%$ , p=0.59) Pairwise comparisons also did not yield significant results for any group.

Values from 4 studies regrouping 643 individuals were used for meta-analyses of bradycardia<sup>24,30,33,36</sup>. Given that only 2 studies reported symptomatic bradycardia, and that the number of events was low in the two studies, we limited the meta-analyses to all cases of bradycardia. The frequency of events was significantly reduced for non-PM compared to PM (OR: 0.27 [95% CI: 0.08 to 0.89]; p=0.032) (Figure 7) The effect was more important in the 2 smaller studies, as opposed to the 2 larger ones, resulting in significant heterogeneity. As opposed to our previous comparisons, heterogeneity was high in this analysis ( $I^2=68\%$ , p=0.03) Two-by-two meta-analyses showed that only EM were significantly less prone to developing bradycardia during treatment compared to IM (OR: 0.62 [95%CI: 0.40 to 0.96]; p=0.032), but no other pairwise comparisons indicated a significant reduction of bradycardia for any phenotype. Again, UM were excluded from our meta-analyses for lack of values.

## 2.5) Mortality and hospitalizations

Hospitalizations, mortality, and other composite criteria reflecting outcome events were only evaluated once in the retrospective sub-study of the MERIT-HF trial<sup>24</sup>. Thus, no meta-analysis was done for this parameter. As part of this study, no effect on all-cause mortality and hospitalizations was observed, and early discontinuation was similar between EM, IM, and PM.

## 2.6) Sensitivity analyses

The comparisons of the results for the meta-analyses performed by both the Hartung-Knapp and the DerSimonian-Laird methods are presented in Table S7. For the PM vs non-PM meta-analyses, the effects were consistent across all analyses, although the  $\Delta$ SBP meta-analysis was not significant using the DerSimonian-Laird method ( $p = 0.093$ ). We initially sought to assess publication bias by means of funnel plot and asymmetry<sup>44</sup>, yet no parameter reached the minimum requirement of 10 included studies for such analyses to be conducted.

## Discussion

We performed a qualitative systematic review and meta-analyses to assess the effects of *CYP2D6* polymorphism on metoprolol pharmacodynamics. Our meta-analyses suggest that *CYP2D6* PM have a greater reduction in heart rate compared to non-PM by more than 3 beats/min when treated with metoprolol. This enhanced  $\beta$ -blocking effect may also lead to PM being approximately 4 times more at risk of bradycardia, although this result should be interpreted with caution because of significant heterogeneity observed for this endpoint, suggesting an overestimated effect size in smaller studies. Also, given that the doses used in the reviewed studies were similar between phenotypes, these results are therefore consistent with a previous meta-analysis<sup>13</sup>, indicating that PM present higher metoprolol plasma concentrations than non-PM when treated with a fixed metoprolol dose, thus resulting in greater reductions in heart rate and blood pressure. Both systolic and diastolic blood pressures were also significantly more reduced for PM, with average decreases both greater than non-PM by  $\sim 3$  mmHg. Larger populations than those included in our meta-analyses will be required to investigate the impact of *CYP2D6* phenotypes on other AE and reductions in cardiovascular endpoints across all four inferred phenotypes.

The clinical significance of our findings requires further investigation. Indeed, although our results suggest that PM could be at a higher risk of bradycardia, one could also argue that the great heart rate reduction in PM (3 beats/min) could result in a greater benefit from metoprolol. Indeed, a previous meta-analysis of seventeen randomized, placebo-controlled trials of  $\beta$ -blocker combining 17 831 patients with heart failure, indicated a decrease in relative risk of death by 18% per 5 beats/min (CI95%: 6% to 29%) for patients undergoing  $\beta$ -blocker treatment<sup>45</sup>, which is slightly above the differences in reduction between non-PM and PM. The clinical benefits in resting heart rate reduction have also been demonstrated during post-myocardial infarction

intervention, notably through  $\beta$ -blocker use<sup>46</sup>. Hence, PM patients would benefit more than other phenotypes from receiving metoprolol treatment at similar doses, as long as symptomatic bradycardia is avoided. One could also speculate that using higher metoprolol doses in non-PM, or using other non-CYP2D6 metabolized  $\beta$ -blockers, could lead to comparable efficacy. For example, in the pharmacogenetic sub-study of the MERIT-HF trial, the authors concluded that to achieve a one-beat reduction of heart rate, 7.7mg, 5.9mg, and 5.3mg of metoprolol CR/XL were needed for EM, IM, and PM, respectively, which was significantly different between phenotypes ( $p=0.04$ ). Thus, our results are consistent with the DPWG recommending initiation of metoprolol at lower doses for PM, given the apparent greater response and potentially higher risk of bradycardia. Nevertheless, since a greater heart rate response could not only be associated with a greater risk of bradycardia, but also with a greater clinical benefit<sup>45</sup>, the optimal metoprolol dosing algorithm based on CYP2D6 genotyping and its clinical utility remains to be established.

We found a statistically significant increase of bradycardia amongst PM compared to non-PM, although significant heterogeneity was observed in the meta-analysis. Yet, these results are consistent with those from a report by Bijl *et al.* in which PM were more likely to suffer from bradycardia than EM (OR: 3.86 [CI95%: 1.68 to 8.86];  $p=0.0014$ ). Unfortunately, we could not include their data in the current meta-analysis because specific sample sizes and values in each group were not reported. Still, the four-fold difference in the risk of bradycardia is consistent with the risk observed in the current meta-analysis. Given that only two studies specifically reported symptomatic bradycardia, we could not determine whether the differences in frequencies of bradycardia would warrant changes in medication or dosing for PM. Thus, particularly given the low incidence of symptomatic bradycardia in the two studies reporting it, future pharmacogenetic investigations on this gene-drug pair should precisely document the occurrence of symptomatic bradycardia.

$\beta$ -blockers, including metoprolol, are known to have modest blood pressure lowering effect<sup>8</sup>. Nonetheless, the results of this meta-analysis indicate that CYP2D6 genotype-inferred phenotypes could be useful to guide the selection of  $\beta$ -blocker in the treatment of hypertension. Indeed, even if individual studies did not consistently show significant differences between inferred phenotypes, our meta-analysis showed that both reductions in SBP and DBP are greater in PM compared to other phenotypes by approximately 3 mmHg. Although such a difference might

appear modest, evidence suggests that from a populational standpoint, a DBP reduction of only 2 mmHg would lead to a decrease of stroke by 15%<sup>47</sup>. According to recent estimates, an equally small SBP reduction would also significantly reduce the annual incidence of coronary heart disease, stroke, and heart failure events<sup>48</sup>.

### **Study limitations**

Our meta-analysis contains some limitations. For this systematic review, we used the DPWG guidelines to assign a phenotype to patients in studies for which only their *CYP2D6* genotypes had been mentioned. However, others could have favored the classification proposed by the Clinical Pharmacogenomics implementation Consortium. Since we focused our attention on comparisons between PM and non-PM, this would have minimal impact on our conclusions because discrepancies between the two groups are mainly related to EM and IM<sup>49</sup>.

In addition, many of the included studies only investigated a limited number of *CYP2D6* polymorphisms. As different polymorphisms may be present within specific populations<sup>7</sup>, limited genotyping assays could prove problematic with this highly polymorphic gene. These technical issues have been addressed prior to this review<sup>4,50</sup>. However, such shortcomings would have added heterogeneity to our analyses. Therefore, this limitation should not restrain the scope of our findings.

From a statistical perspective, an important limitation in our review is the small number of studies, and the small and unbalanced number of patients within the compared groups. Thus, whether *CYP2D6* inferred phenotypes has an impact of the overall risk of AE or cardiovascular events remains to be established. A greater number of patients would also be required to perform adequately powered comparisons between all four phenotypes.

A strength of our study is that our sensitivity analyses for continuous variables show that results generally remain consistent between the two methods for calculating confidence intervals. The Hartung-Knapp adjustment has been shown to be a useful tool in making better inferences and refining measurements when performing meta-analyses<sup>20</sup>. Despite those improvements, confidence intervals for random-effects models can be overly conservative in some scenarios, while becoming too restrained in others<sup>20,21</sup>. This could explain the fact that reductions in SBP were not statistically significant using the DerSimonian-Laird method, as confidence intervals

calculated were wider. Although we were able to perform meta-analyses on almost all parameters reviewed, comparisons where  $\leq 3$  studies were included may contain considerable uncertainty, regardless of low heterogeneity. Indeed, some small studies with neutral results have not reported all relevant data, thus potentially overestimating the effects observed<sup>38</sup>. While our systematic review shows certain trends that seem likely to be confirmed, careful assessment of our results is required.

To conclude, this systematic review provides a comprehensive assessment of the literature regarding the genetic influence of *CYP2D6* polymorphisms on metoprolol response. Our meta-analyses suggest that patients with a PM phenotype have greater heart rate, systolic, and diastolic blood pressure reductions compared to non-PM, and may be more subject to bradycardia. This latter finding should be interpreted with caution, given the heterogeneity observed in the analysis of this specific end point. Further prospective data are required to determine whether *CYP2D6* is associated with clinical events in patients treated with metoprolol. Ultimately, the clinical utility of *CYP2D6*-guided  $\beta$ -blocker use should be investigated in a prospective clinical trial.



## **Acknowledgements**

### **Funding**

Maxime Meloche has received scholarships from the Université de Montréal Faculty of Pharmacy and Faculty of Higher Education.

Simon de Denus holds the Université de Montréal Beaulieu-Saucier Chair in Pharmacogenomics. This study was also supported by the Montreal Heart Institute Foundation.

### **Contributions**

Maxime Meloche performed the systematic review, generated the statistical meta-analyses, and wrote parts of the manuscript.

Michael Khazaka was the second reviewer and wrote parts of the manuscript.

Imad Kassem developed the computer code used in the R software to create the meta-analyses.

Amina Barhdadi contributed to elaborate the statistical models and revised the manuscript.

Marie-Pierre Dubé contributed to the design of the analyses and revised the manuscript.

Simon de Denus designed the project, wrote parts of and revised the manuscript.

### **Conflicts of interest**

M.-P. Dubé is a co-author on a patent pertaining to pharmacogenomics-guided CETP inhibition and has minor equity interest in DalCor. M.-P. Dubé has received honoraria from Dalcor and research support (access to samples and data) from AstraZeneca, Pfizer, Servier, Sanofi and GlaxoSmithKline.

Simon de Denus has received research support through grants from Pfizer, AstraZeneca, Roche Molecular Science, and DalCor

## References

1. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):103-141.
2. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. 2012;92(4):414-417.
3. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):662-673.
4. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95(4):376-382.
5. Hicks JK, Bishop JR, Sangkuhl K, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2015;98(2):127-134.
6. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing: 2013 Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2013;93(4):324-325.
7. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 2017;19(1):69-76.
8. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet (London, England).* 1999;353(9169):2001-2007.
9. Wikstrand J, Warnold I, Tuomilehto J, et al. Metoprolol versus thiazide diuretics in hypertension. Morbidity results from the MAPHY Study. *Hypertension.* 1991;17(4):579-588.
10. Kuhlkamp V, Schirdewan A, Stangl K, Homberg M, Ploch M, Beck OA. Use of metoprolol CR/XL to maintain sinus rhythm after conversion from persistent atrial fibrillation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(1):139-146.
11. Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT, Woods HF. Oxidation phenotype--a major determinant of metoprolol metabolism and response. *N Engl J Med.* 1982;307(25):1558-1560.
12. Borg KO, Carlsson E, Hoffmann K-J, Jönsson T-E, Thorin H, Wallin B. Metabolism of metoprolol-(3H) in man, the dog and the rat. 1975;36(s5):125-135.
13. Blake CM, Kharasch ED, Schwab M, Nagele P. A meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(3):394-399.
14. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ.* 2009;339.
15. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, et al. The Evolution of PharmVar. 2019;105(1):29-32.
16. IntHout J, Ioannidis JP, Borm GFJBMRM. The Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman method for random effects meta-analysis is straightforward and considerably outperforms the standard DerSimonian-Laird method. 2014;14(1):25.

17. Bakbergenuly I, Kulinskaya E. Beta-binomial model for meta-analysis of odds ratios. 2017;36(11):1715-1734.
18. Mathes T, Kuss O. A comparison of methods for meta-analysis of a small number of studies with binary outcomes. 2018;9(3):366-381.
19. Bakbergenuly I, Kulinskaya EJBMRM. Meta-analysis of binary outcomes via generalized linear mixed models: a simulation study. 2018;18(1):70.
20. Jackson D, Law M, Rucker G, Schwarzer G. The Hartung-Knapp modification for random-effects meta-analysis: A useful refinement but are there any residual concerns? *Statistics in medicine*. 2017;36(25):3923-3934.
21. Wiksten A, Rucker G, Schwarzer G. Hartung–Knapp method is not always conservative compared with fixed-effect meta-analysis. 2016;35(15):2503-2515.
22. Wan X, Wang W, Liu J, Tong T. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. *BMC Medical Research Methodology*. 2014;14(1):135.
23. Luzum JA, Sweet KM, Binkley PF, et al. CYP2D6 Genetic Variation and Beta-Blocker Maintenance Dose in Patients with Heart Failure. *Pharm Res*. 2017.
24. Batty JA, Hall AS, White HL, et al. An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(3):321-330.
25. Baudhuin LM, Miller WL, Train L, et al. Relation of ADRB1, CYP2D6, and UGT1A1 polymorphisms with dose of, and response to, carvedilol or metoprolol therapy in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2010;106(3):402-408.
26. Fedorinov DS, Mirzaev KB, Mustafina VR, et al. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers G1846A (CYP2D6\*4) and C100T (CYP2D6\*10) of the CYP2D6 gene in coronary heart disease patients taking beta beta -blockers in the Republic of Sakha (YAKUTIA). *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018.
27. Fux R, Morike K, Prohmer AM, et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(4):378-387.
28. Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(12):1163-1173.
29. Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. Inhibition of metoprolol metabolism and potentiation of its effects by paroxetine in routinely treated patients with acute myocardial infarction (AMI). *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(3):275-282.
30. Hamadeh IS, Langaee TY, Dwivedi R, et al. Impact of CYP2D6 polymorphisms on clinical efficacy and tolerability of metoprolol tartrate. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;96(2):175-181.
31. Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and beta-adrenergic inhibition during long-term treatment: a comparison with bisoprolol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46(5):713-720.
32. Rau T, Heide R, Bergmann K, et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics*. 2002;12(6):465-472.
33. Rau T, Wuttke H, Michels LM, et al. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(3):269-272.

34. Sharp CF, Gardiner SJ, Jensen BP, et al. CYP2D6 genotype and its relationship with metoprolol dose, concentrations and effect in patients with systolic heart failure. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(3):175-184.
35. Terra SG, Pauly DF, Lee CR, et al. beta-Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(3):127-137.
36. Wuttke H, Rau T, Heide R, et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(4):429-437.
37. Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, et al. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(1):45-50.
38. Zineh I, Beitelshees AL, Gaedigk A, et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(6):536-544.
39. Koytchev R, Alken RG, Vlahov V, et al. Influence of the cytochrome P4502D6\*4 allele on the pharmacokinetics of controlled-release metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(6):469-474.
40. Yuan H, Huang Z, Yang G, Lv H, Sang H, Yao Y. Effects of polymorphism of the beta(1) adrenoreceptor and CYP2D6 on the therapeutic effects of metoprolol. *J Int Med Res.* 2008;36(6):1354-1362.
41. Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(4):302-312.
42. Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, et al. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67(5):466-477.
43. Sharma A, Pibarot P, Pilote S, et al. Modulation of metoprolol pharmacokinetics and hemodynamics by diphenhydramine coadministration during exercise testing in healthy premenopausal women. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1172-1181.
44. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Bmj.* 1997;315(7109):629-634.
45. McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA, Leung AA, Armstrong PW. Meta-analysis: B-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. *Annals of Internal Medicine.* 2009;150(11):784-794.
46. Cucherat M. Quantitative relationship between resting heart rate reduction and magnitude of clinical benefits in post-myocardial infarction: a meta-regression of randomized clinical trials. *European heart journal.* 2007;28(24):3012-3019.
47. Cook NR, Cohen J, Hebert PR, Taylor JO, Hennekens CH. Implications of Small Reductions in Diastolic Blood Pressure for Primary Prevention. *JAMA Internal Medicine.* 1995;155(7):701-709.
48. Hardy ST, Loehr LR, Butler KR, et al. Reducing the Blood Pressure-Related Burden of Cardiovascular Disease: Impact of Achievable Improvements in Blood Pressure Prevention and Control. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(10):e002276-e002276.

49. Bank PCD, Caudle KE, Swen JJ, et al. Comparison of the Guidelines of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and the Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(4):599-618.
50. Hicks JK, Swen JJ, Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr Drug Metab.* 2014;15(2):218-232.

## Legend to table

**Table 1.** Summary of included studies evaluating the effects of CYP2D6 phenotypes on the clinical response to metoprolol

AE; All-type adverse events AF, atrial fibrillation; AUC, area under the concentration-time curve; AMI, acute myocardial infarction; CAD, Coronary artery diseases; CHF, congestive heart failure; CR/XL, controlled-release/extended-release metoprolol formulation; DBP, diastolic blood pressure; DPWG, Dutch Pharmacogenomics Working Group; EM, extensive metabolizers; HF, heart failure; HR, heart rate; HT, hypertension; IHD, ischemic heart diseases; IM, intermediate metabolizers; IR, Immediate-release metoprolol formulation; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, Myocardial infarction; MTD, maximum tolerated dose; NYHA, New York Heart Association; PM, poor metabolizers.

## Legends to figures

**Figure 1.** Flow chart of the review process

**Figure 2.** Meta-analysis of daily drug doses between Non-PM and PM. <sup>381,383,385-387,389-391</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

**Figure 3.** Meta-analysis of  $\Delta$ HR between Non-PM and PM. <sup>330,381,383,385,411</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

**Figure 4.** Meta-analysis of  $\Delta$ SBP between Non-PM and PM. <sup>330,381,383,385,412</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

**Figure 5.** Meta-analysis of  $\Delta$ DBP between Non-PM and PM. <sup>330,381,383,385,412</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

**Figure 6.** Meta-analysis of all-type adverse events between Non-PM and PM. <sup>330,383,390</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; OR: Odds ratio; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

**Figure 7.** Meta-analysis of bradycardia between Non-PM and PM. <sup>330,381,383,391</sup>

CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; OR: Odds ratio; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers

## Supporting Information

**Table S1.** Online search strategy.

**Table S2.** Raw data of reduction in heart rate ( $\Delta$ HR), systolic blood pressure ( $\Delta$ SBP), and diastolic blood pressure ( $\Delta$ DBP) for the meta-analyses.

**Table S3.** Extracted raw data of the frequency of all-type adverse events (AE) and bradycardia between phenotypes contributing to meta-analyses.

**Table S4.** Estimated means and standard deviations for average daily doses using Wan *et al.*'s formulas.

**Table S5.** Summary of all extracted and estimated data contributing to the meta-analyses of the differences in titrated doses between phenotypes.

**Table S6.** Rejected studies from the systematic review for clinical parameters and reasons of exclusion after full-text assessment.

**Table S7.** Sensitivity analyses of random-effects model adjustments.



**Table 1.** Summary of included studies evaluating the effects of CYP2D6 phenotypes on the clinical response to metoprolol.

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Batty et al. (2014)</b>	Retrospective sub-study of the Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)	718 patients from a subpopulation of the MERIT-HF trial with NYHA II-IV, and with LVEF≤40%  313 patients genotyped	Mean 339 days	Patients taking metoprolol:  189 EM: *1/*1 112 IM: *1/*4 12 PM: *4/*4	Low initial dose metoprolol CR/XL (12.5 mg/day for patients NYHA III-IV, 25 mg/day for patient NYHA II); progressive, bi-weekly, upward titration for a target dose of 200 mg/day  Individual dosing regimens freely adjustable to the judgement of the investigator.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No change in dosing profiles and mean daily doses between all genotypes (p=0.29)</li> <li>• No differences between all genotypes in achieving a 200mg/day target dose (p=0.25)</li> <li>• Risks of discontinuation nonsignificant for the 3 groups compared to placebo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- EM: OR=0.55, 95%CI= [0.25–1.19], p=0.12</li> <li>- IM: OR= 0.96, 95%CI= [0.49–1.91]; p=0.92</li> <li>- PM: OR=0.59, 95%CI= [0.05–7.43]; p=0.81</li> </ul> </li> <li>• Significant decreases in resting HR at weeks 4, 6, and 8 for IM and PM compared to EM from their respective baseline values (all p&lt;0.05), but not at 2 weeks and 3 months</li> <li>• No difference of resting HR between IM and PM during all follow-up period, but greater differences in HR decreases from baseline for IM compared to EM (p=0.02), and for PM compared to EM (p=0.04) at maximum doses. No differences after 6 months, which corresponded to the longest time of measurement.</li> <li>• No difference for SBP between all genotypes (p=0.56)</li> <li>• Significant decreases of DBP for IM compared to EM after 4 weeks and 3 months (p=0.03; p=0.004), but not at weeks 2, 6, 8, and after 6 months, and between PM and EM after weeks 2 and 4, and 3 months (p=0.04; p=0.04; p=0.03), not at weeks 6 and 8, and at 6 months</li> <li>• Significant decreases of DBP for IM and PM compared to EM at maximum doses (p=0.04; p=0.01)</li> <li>• Genotype conferred no effect on all-cause mortality and hospitalization; combined endpoints were similar in all 3 groups compared to placebo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- EM: OR=0.62; 95%CI= [0.37–1.06], p=0.08</li> <li>- IM: OR=0.71; 95%CI= [0.36–1.45], p=0.36</li> <li>- PM: OR=0.80; 95%CI= [0.11–5.77], p=0.83</li> </ul> </li> </ul>
<b>Baudhuin et al. (2010)</b>	Retrospective, non-randomized cohort study	93 patients with CHF for ≥6 months, NYHA I-IV, LVEF ≤45%  19 patients treated with metoprolol	Total 14 months	Patients taking metoprolol:  5 UM: *1/*2A, *1/*2AxN 1 EM: *1/*1 10 IM: *1/*4, *1/*5, *2/*4, *2/*9, *4/*9 3 PM: *3/*10, *4/*4, *4/*6	25 mg/day metoprolol IR, doubling every 10 days until MTD achieved; target dose 200 mg/day, or 6.25 mg/day carvedilol, doubling every 10 days until MTD achieved; Target dose of 25 mg/day if BW≤85 kg, and 50 mg/day if BW>85 kg	<p><i>Phenotype comparisons for patients taking metoprolol:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsignificant difference in metoprolol dosage and MTD between all genotypes (data not shown)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Bijl et al. (2009)</b>	Prospective, population-based cohort study (Rotterdam Study)	6348 $\beta$ -blocker users at baseline (2878 at final follow-up); 199, 243, 205, and 196 metoprolol users at baseline, first, second and third follow-up	Total 14 years	<p><math>\Delta</math>HR measurements: 451 EM: <i>*1/*1</i> 255 IM: <i>*1/*4</i> 34 PM: <i>*4/*4</i></p> <p><math>\Delta</math>DBP/<math>\Delta</math>SBP measurements (same genotypes): 496 EM 276 IM 37 PM</p> <p>Phenotypes attributed according to DPWG guidelines</p>	<p>Dosage titrated on hypertensive effect and dependant on CYP2D6 genotype (data not shown)</p> <p>Co-medications tolerated during the study, including strong and weak CYP2D6 inhibitors</p> <p>Metoprolol formulation not mentioned</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HR, adjusted for age and gender, was significantly decreased in PM compared to EM (<math>p &lt; 0.0001</math>), and in IM compared to EM (<math>p = 0.013</math>)</li> <li>Metoprolol conveyed more risks of bradycardia for PM compared to EM (<math>p = 0.0014</math>)</li> <li>Mean difference in HR significantly decreased for IM and PM compared to EM that were all <math>\beta</math>-blocker users (<math>p = 0.012</math>; <math>p &lt; 0.001</math>)</li> <li>Mean difference in DBP was significant for PM compared to EM that were metoprolol users (<math>p = 0.045</math>), yet no changes were seen for SBP</li> <li>Within-person change for HR decreased significantly only for PM compared to EM (<math>p = 0.019</math>), but not between IM and EM (<math>p = 0.06</math>). Discontinuation did not lead to significant differences between any phenotype.</li> <li>DBP did not change for every phenotype when starting (<math>n = 315</math>) or discontinuing (<math>n = 161</math>) metoprolol therapy</li> <li>Differences in mean dose was observed for CYP2D6-mediated <math>\beta</math>-blockers, which consisted mainly of metoprolol (<math>p = 0.03</math>)</li> </ul>
<b>Fedorinov et al. (2018)</b>	Prospective, observational cohort study	<p>201 patients of Russian or Yakut ethnicity with CHD on routine <math>\beta</math>-blocker therapy (atenolol, bisoprolol, metoprolol)</p> <p>79 patients receiving metoprolol</p>	Specific duration not mentioned	<p>63 EM: <i>*1/*1</i>, <i>*1/*10</i> 16 IM: <i>*1/*4</i></p>	<p>Patients receiving metoprolol:</p> <p>Titrated dose between 12.-150 mg/day</p> <p>Metoprolol formulation not mentioned</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Titrated doses between the 39 patients genotyped as <i>*1/*1</i> carriers and the 16 other <i>*1/*4</i> patients did not vary significantly, although a trend was observed (<math>p = 0.071</math>)</li> <li>The differences in titrated doses were even less significant when comparing the 39 <i>*1/*1</i> with the 24 <i>*1/*10</i> carriers (<math>p = 0.240</math>)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Fux et al. (2005)</b>	Multi-center, prospective, open-label, non-randomized study	121 subjects with various cardiovascular and non-cardiovascular diseases (HT, CHD, arrhythmias, migraine, anxiety disorder) not previously treated with metoprolol	6 weeks	5 UM: More than 2 fully functional alleles 91 EM: *1/*3-*/10, *1/*41 21 IM: *8-*/10/*8-*/10, *8-*/10/*3-*/8, *8-*/10/*41, *8-*/10/*3-*/8 4 PM: *3-*/8/*3-*/8	Any daily dose allowed, with any dosing scheme of metoprolol CR/XL  Individual dosage freely adjustable based on clinical grounds	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mean daily doses did not differ between all genotypes (p=0.78)</li> <li>Tendency toward more frequent cases of cold extremities observed in the PM + IM vs. EM + UM (p=0.56, CI95% = [1.03-14.3]). Sexual dysfunction lower for PM + IM vs. EM + UM (p&lt;0.05)</li> <li>EM and IM had significant SBP, DBP, and HR reductions compared to baseline (all p&lt;0.01), not UM or PM</li> <li>Mean reductions between all phenotypes were nonsignificant for SBP (p=0.92), DBP (p=0.88), and HR (p=0.30)</li> </ul>
<b>Goryachkina et al. (2008b)</b>	Prospective, non-randomized, open-label study	187 Caucasians hospitalized after AMI occurrence  115 patients genotyped and included for analysis, including the 17 depressed AMI patients used for the previous study; Goryachkina et al. (2008a)	10 days	Patients kept for clinical parameter analyses: 5 UM: *1/*1xN 108 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4, *1/*4xN, *1/*4, *1/*10, *10/*4 2 PM: *4/*4	75mg/day ± 38 mean metoprolol IR or CR/XL  Use of concomitant drugs accepted and considered, with multiple drug classes co-administered other than β-blockers	<ul style="list-style-type: none"> <li>Median resting HR at discharge (15-20 days after admission) were different between groups with 0, 1, 2, or 3 functional alleles (p=0.01). Changes occurred between days 7-10</li> </ul>
<b>Goryachkina et al. (2008a)</b>	Prospective, non-randomized, open-label, study	34 patients taking metoprolol at baseline, with 17 depressed AMI patients, and 17 non-depressed control patients	10 days	17 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4	Titrated metoprolol IR or CR/XL on day 1  Co-administration of 20mg/day paroxetine on days 2-8, or placebo  Use of concomitant drugs accepted	<p><i>Baseline measurements:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nonsignificant differences in metoprolol dose allocation between homozygous and heterozygous genotypes before administration of paroxetine (not shown)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Hamadeh et al. (2014)</b>	Multi-center, prospective, open-label, sequential monotherapy, randomized trial (PEAR2 - Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses 2)	218 patients with uncomplicated HT starting metoprolol therapy	8 weeks	8 UM: *1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*10, *2xN/*2  184 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*3, *1/*4, *1/*5, *1/*6, *1/*10, *1/*17, *1/*41, *1/*4xN, *1/*10xN, *4/*17xN, *2/*2, *2/*4, *2/*4xN, *2/*5, *2/*10, *2/*17, *2/*41, *10/*17, *10xN/*41, *17/*17, *17/*41, *17/*41  15 IM: *3/*17, *4/*17, *4/*10, *4/*41, *5/*10, *5/*17  11 PM: *3/*4, *4/*4, *4/*5, *4/*6	Starting dose 100mg/day metoprolol IR for 2 weeks, titration up to 200mg/day or MTD for 6 weeks if blood pressure > 120/70 mmHg and HR > 55 BPM  Treatment interrupted with 50mg decreases every 2 days until stopped	<ul style="list-style-type: none"> <li>Significant differences in changes for HR from baseline values when comparing all 4 phenotypes (p&lt;0.0001), but not for SBP (p=0.91) and DBP (p=0.37)</li> <li>No difference in AE frequencies between all genotypes, including bradycardia (p=0.87). No difference in the type of AE observed (p=0.41)</li> <li>No difference in metoprolol mean doses between all genotypes (p=0.77). Only 5% of all subjects (9 EM, 1 IM) did not reach the maximum recommended dose of 200mg/day</li> </ul>
<b>Hamelin et al. (2000)</b>	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-period crossover study	16 healthy male subjects	Blood and urine samplings collected 48 hours after metoprolol dose	10 EM: *1/*1, *1/*5 6 PM: *4/*4, *4/*5	100mg single dose metoprolol IR on day 3  Co-administration of 50mg/day diphenhydramine, or placebo for 5 days, for 2 periods	<p><i>Baseline measurements:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Exercise HR profiles were more decreased for PM than for EM (p&lt;0.0009) and persisted from 3 to 12 hours post-dose. After 12 hours, HR was decreased by 14% ± 2 for PM taking only metoprolol, compared to 5% ± 7 for EM.</li> <li>Decrease in SBP during exercise initially more pronounced for PM than for EM compared to baseline (p&lt;0.0001). After 12 hours, PM still had a decrease of 14% to 17%, whereas EM returned to baseline values.</li> <li>Decrease in HR more pronounced between 8 and 12 hours for PM than for EM (p&lt;0.05)</li> </ul>
<b>Kirchheiner et al. (2004)</b>	Prospective, non-randomized, controlled study	29 healthy volunteers	Blood samples collected for 24 hours after single dose	12 UM: *1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35  13 EM: 2 Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41  4 PM: *3-*6/*3-*6	100mg single dose metoprolol IR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Marginal effect on resting HR between all phenotypes, but significant (p=0.03)</li> <li>Significant reductions for PM compared to EM (p=0.027) and UM (p=0.017) when evaluating exercise-induced heart rate differences, but not between EM and UM phenotypes</li> <li>No significant effect on resting DBP and SBP between any phenotypes</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Koytchev et al. (1998)</b>	Prospective, randomized, 3-period cross-over, bioequivalence study	36 healthy Caucasians  22 subjects included for pharmacogenetic analyses	Total 15 days	16 EM: *1/*1 6 IM: *1/*4  <b>Phenotypes attributed according to DPWG guidelines</b>	200mg/day metoprolol CR/XL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resting HR decreased more significantly for IM than for EM compared to baseline (p&lt;0.05)</li> <li>• No significant differences for resting SBP and DBP between IM and EM, even though a trend was observed.</li> </ul>
<b>Luzum et al. (2017)</b>	Retrospective chart-review from the Ohio State University-Coriell Personalized Medicine Collaborative	102 patients with systolic HF  33 patients treated with metoprolol	Median 5.3 years  Median 1.7 years for the duration of treatment for patients taking metoprolol	Comparison of 3 classification schemes for genotype-inferred phenotypes;  *4 allele carriers: 23 EM, 9 IM, 1 PM CIPC: 28 EM, 4 IM, 1 PM DPWG: 21 EM, 11 IM, 1 PM	Patients taking metoprolol:  Titration of normalized* metoprolol CR/XL (n=32) or IR (n=1)  <i>*Normalization of metoprolol daily maintenance dose defined as [Carvedilol dose x 4 = Metoprolol dose]</i>  Co-medications permitted, including CYP2D6-interacting drugs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CYP2D6 genotype-inferred phenotype significantly associated with decreased maintenance dose of metoprolol for both single and double <i>CYP2D6</i>*4 allele carriers compared to non-carriers (p=0.023, OR=0.13; 95% CI = [0.02-0.75])</li> <li>• Significant trend also observed for the DPWG classification (p=0.014, OR=0.18; 95%CI= [0.03-0.66])</li> <li>• Nonsignificant differences in dosing regimens observed for the CIPC classification (p=0.12, OR=0.19; 95% CI = [0.24-1.58])</li> <li>• Regardless of the method of phenotype classification (DPWG, CIPC, *4 polymorphism), none of the PM or IM subjects achieved the recommended target metoprolol dose for treating systolic HF</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Nozawa et al. (2005)</b>	Prospective, non-randomized, comparative study	72 patients with various cardiovascular disease (AF, IHD, HT, hypertrophic cardiomyopathy) on routine treatment with metoprolol or bisoprolol for ≥2 weeks  38 patients treated with metoprolol	Baseline values taken 3 and 4 hours after dosing	30 EM: *1/*1, *1/*10 8 IM: *10/*10  Homozygous and heterozygous EM analyzed separately	Patients taking routine metoprolol IR  Initiation of metoprolol or bisoprolol treatment at least 2 weeks before the beginning of study  Dosing regimens not titrated during study	<i>Baseline measurements for patients taking metoprolol:</i> · Dosing regimen differences nonsignificant between all 3 phenotypes
<b>Rau et al. (2002)</b>	Prospective, cross-sectional study	91 Caucasians with various cardiovascular diseases (HT, CAD, HF, MI), ranging from NYHA I-III	Median 12.6 months	52 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*9, *1/*41, *2/*2, *2/*41  31 IM: *1/*0, *2/*0, *9/*0, *10/*0, *41/*0, *41/*41  8 PM: *0/*0  *0 includes null alleles *3, *4, and *6  <b>Phenotypes attributed according to DPWG guidelines</b>	47.5mg/day median metoprolol CR/XL  Dose titration based on clinical grounds, individual daily drug doses constant for at least 2 weeks before blood sampling  78 patients treated with concomitant cardiovascular drugs	· No difference and wide variability between groups in daily drug doses (p=0.79)

**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Rau et al. (2009)</b>	Prospective, non-randomized, longitudinal study	91 naïve β-blocker patients with various cardiovascular diseases (AF, CAD, HF, HT), all treated with metoprolol  <b>Different cohort from Rau et al. (2002)</b>	90 days	63 EM: 2 fully functional, or 1 fully and 1 partly functional allele 8 IM: *0/*10, *0/*41 17 PM: *0/*0  *0 includes null alleles *3, *4, and *6  Patients regrouped as PM (17) and non-PM (71)	47.5mg/day mean dose of metoprolol CR/XL for PM and non-PM  Titration allocated on medical grounds  Other cardiovascular co-medications allowed during study	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dose considered too low to witness any disparities in side effects. However, 14 PM out of 71 non-PM subjects (20%) had doses increases during treatment (p&lt;0.004), compared to 1 in 17 (6%) for PM subjects (p=0.99)</li> <li>• Average daily dose was not significantly different for the 2 groups (p=0.73)</li> <li>• PM had significantly higher decreases compared to non-PM in resting HR (p=0.013), and resting DBP (p=0.007), but no significant differences observed for resting SBP (p=0.36)</li> <li>• Infrequent general AE between groups (p=0.55), but significantly more occurrences of bradycardia among PM (Log rank P=0.0001)</li> <li>• More PM reduced their resting HR to &lt;60 BPM and had bradycardia compared to non-PM (p&lt;0.001)</li> </ul> <p>Differences in plasma concentrations were associated with significantly and persistently enhanced drug effects between phenotypes</p>
<b>Sharma et al. (2005)</b>	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-period crossover study	20 healthy premenopausal women	Total 2 months	16 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4, *1/*5  4 PM: *4/*4, *4/*5	100mg single dose metoprolol IR on day 3  Co-administration of 50mg/day diphenhydramine, or placebo for 5 days, for 2 periods	<p><i>Baseline measurements:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No significant difference between the profile of PM and EM in terms of stroke volume index (P&gt;0.05). However, the exercise cardiac index appeared different (p=0.009)</li> <li>• Exercise HR and exercise rate-pressure products were significantly different between PM and EM (p&lt;0.05)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

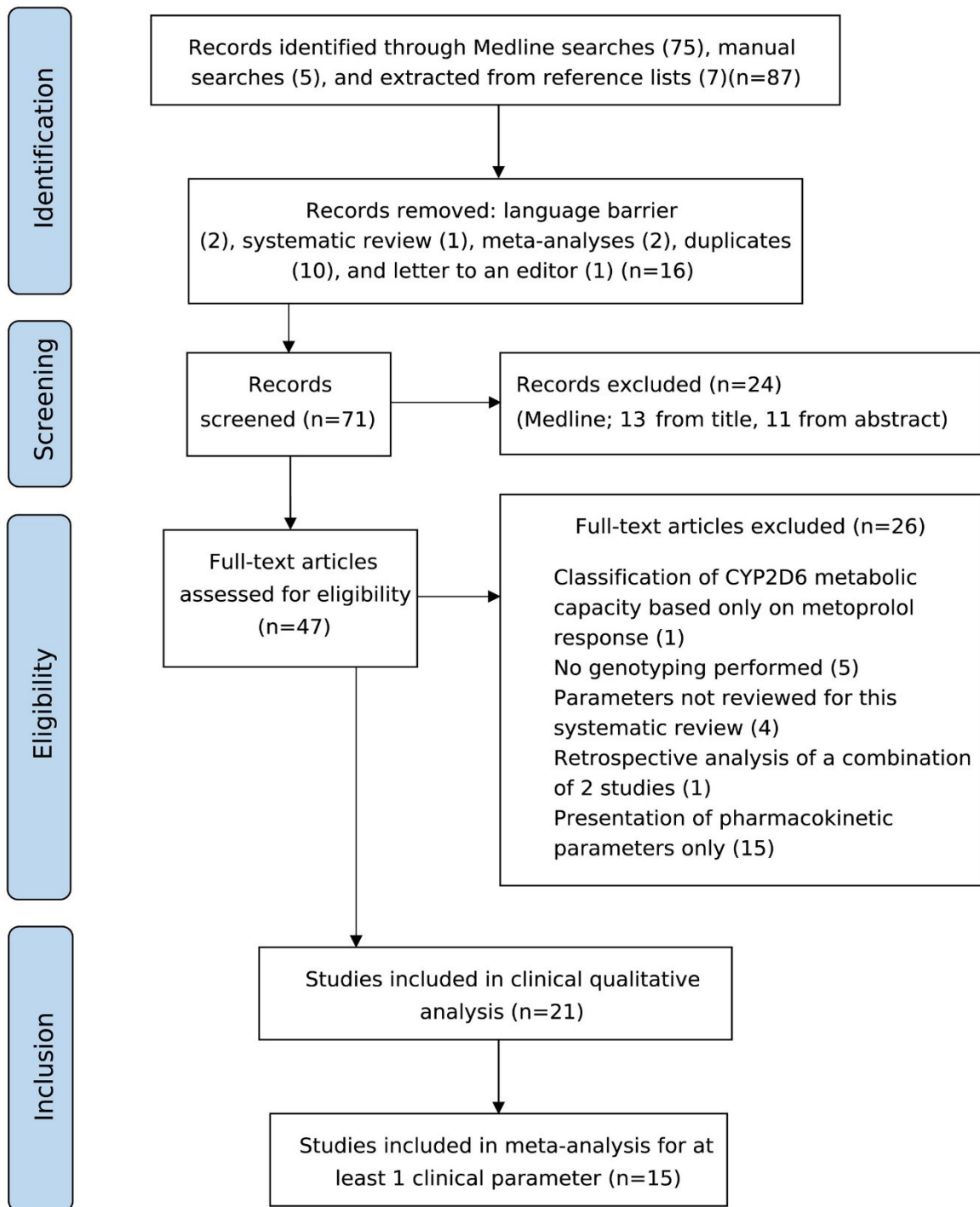
Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Sharp et al. (2009)</b>	Multi-center, prospective, non-randomized, open-label study	52 patients with systolic HF (NYHA II-IV, LVEF ≤45%) not previously on metoprolol therapy	Blood sampling performed at least 2 weeks after maximum tolerated dose achieved  Specific duration not mentioned	27 EM: *1/*1 22 IM: *1/*4 3 PM: *4/*4  Phenotypes attributed according to DPWG guidelines	23.75mg/day median initial metoprolol CR/XL, doubled every 2- to 4-week intervals Titration occurred until MTD of 190 mg/day was achieved (median MTD 95mg/day)  Other treatments permitted during the study	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsignificant differences between EM and IM for percentage change of HR (p=0.71), and between all 3 phenotypes for percentage change of SBP (p=0.79), and DBP (p=0.40)</li> <li>• Nonsignificant AE-related withdrawals between all phenotypes (p=0.79)</li> <li>• Nonsignificant difference in the number of patients who achieved MTD between all phenotypes (p=0.26)</li> <li>• Proportions not statistically different between patients with 1 or 2 functional alleles that improved condition with metoprolol therapy (p=0.71)</li> </ul>
<b>Terra et al. (2005)</b>	Multi-center, prospective study	61 naïve β-blocker users, with symptomatic ischemic or non-ischemic HF (NYHA II-III, LVEF ≤40%) 51 patients genotyped	10 weeks	37 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*3, *1-*2/*4, *1-*2/*6, *1-*2/*9, *1-*2/*10, *1-*2/*17, *1-*2/*29, *1-*2/*41  10 IM: Any combination of 2 reduced function alleles *9, *10, *17, *29, *41, or 1 reduced function allele with another null allele *3, *4, *6  4 PM: *3-*4/*3-*4, *3-*4/*6, *6/*6	25mg/day for patients NYHA II, and 12.5mg/day metoprolol CR/XL for patients NYHA III as starting dose. Titration biweekly until 200mg dose achieved, or MTD Other co-medications allowed during the study	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No differences between all groups in cardiac decompensation rates, which was the composite criteria of death, HF hospitalization, increase in other HF medications, or need to discontinue metoprolol (p=0.61)</li> <li>• Final daily dose differences nonsignificant (p=0.45)</li> </ul>
<b>Wuttke et al. (2002)</b>	Retrospective, pharmacovigilance census by means of standardized questionnaires	24 German subjects treated with metoprolol	22 months for recruitment	8 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*41 7 IM: *1/*4, *1/*5, *2/*3, *2/*41, *41/*4 9 PM: *3-5/*4-6  Patients divided into PM (9) and non-PM (15)	47.5mg/day median metoprolol IR dose at time of AE  Dosing regimens titrated and based on clinical grounds	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients who had AE tended to be 5 times more likely to be PM, yet the till AE occurrence, or the time required for dose reduction were nonsignificant between PM and non-PM (p=0.29; p=0.26)</li> <li>• Nonsignificant differences in daily metoprolol doses and between EM and PM (p=0.51)</li> <li>• Trend observed for bradycardia occurrences when comparing PM to non-PM, but nonsignificant (p=0.089)</li> </ul>



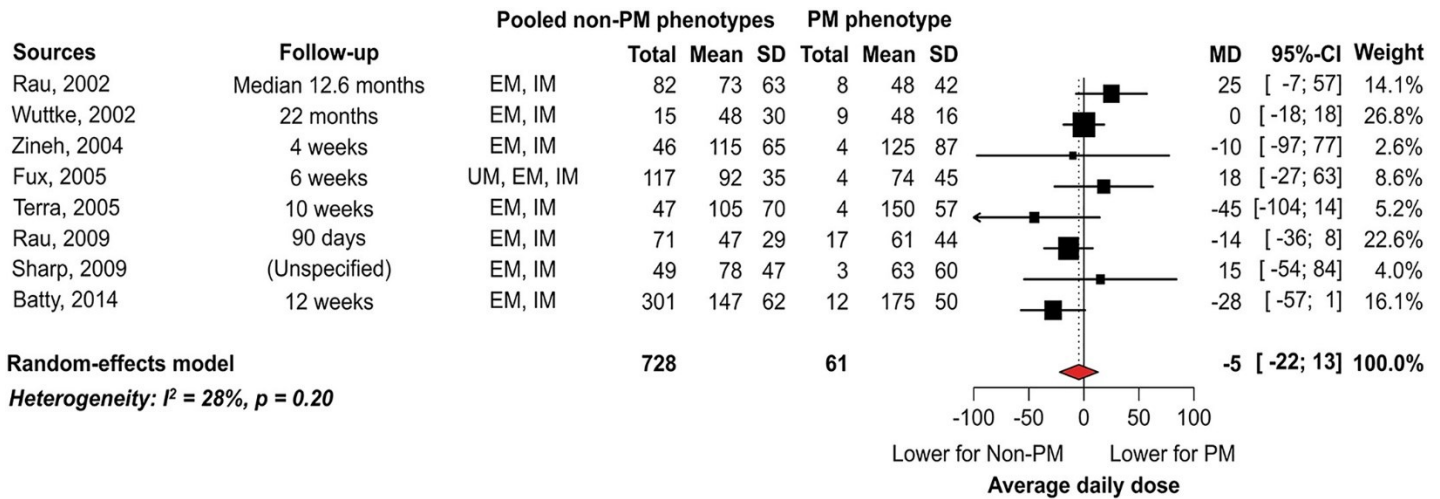
**Table 1. (cont.)**

Author (Year)	Study design	Population and Disease	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimen	Results of reviewed parameters
<b>Yuan et al. (2008)</b>	Prospective, observational, randomized study	300 Chinese Han patients with essential HT and homozygous Arg389 carriers for the <i>ADRB1</i> gene  276 patients included in the analyses	8 weeks	Group A: 40 EMA: *1/*1, *1/*2, *2/*2 43 IMA: *1/*5, *2/*5, *1/*10, *2/*10 60 PMA: *5/*5, *5/*10, *10/10  Group B (same genotypes): 38 EMB 27 IMB 68 PMB	Subgroups A (3), fixed dose: 100mg/day metoprolol (PMA, IMA, EMA)  Subgroups B (3), ascending doses: PM: 25mg/day (PMB) IM: 50mg/day (IMB) EM: 100mg/day (EMB)  Metoprolol formulation not mentioned	<ul style="list-style-type: none"> <li>Significant difference in resting SBP observed between IMA and EMA (p=0.027), and between PMA and EMA (p=0.046)</li> <li>Differences in resting DBP decreased more for PMA than for EMA compared to their respective baseline values (p=0.022)</li> <li>No difference of resting SBP and DBP between EMB, IMB, and PMB (statistical analysis not shown)</li> <li>Resting HR for all 6 groups were significantly decreased compared to before treatment; differences between phenotypes not assessed, but values of HR reduction and final HR were all similar. Ascending doses were given according to CYP2D6 phenotype.</li> </ul>
<b>Zineh et al. (2004)</b>	Prospective, non-randomized study	50 patients with uncomplicated HT	4 weeks	42 EM: Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *17, *29, *41, *45, and *46  4 IM: *3-*6/*9, *3-*6/*10, *3-*6/*17, *3-*6/*29, *3-*6/*41, *3-*6/*45, *3-*6/*46  4 PM: *3-*6/*3-*6  EM patients initially divided into subgroups (High EM, Medium EM, Low EM), but subsequently regrouped to create a common general phenotype for quantitative analyses.	Start 100mg/day metoprolol, titration doubled doses weekly until one of the following criteria was achieved: clinical DBP was reduced to ≤90 mmHg or till patient had side effects that precluded upward titration of drug, or 400mg/day achieved  Other co-medications allowed during study, including CYP2D6 inhibitors  Metoprolol formulation not mentioned	<ul style="list-style-type: none"> <li>Based on quartile data of <i>S</i>-metoprolol AUCs and CYP2D6 activity scores, no difference was observed for general and dose-limiting AE</li> <li>No differences for changes in DBP between all <i>S</i>-metoprolol AUC quartiles, but differences in DBP not reported directly for any phenotype</li> <li>Total daily metoprolol doses not significantly different between phenotypes (p=0.74)</li> </ul>

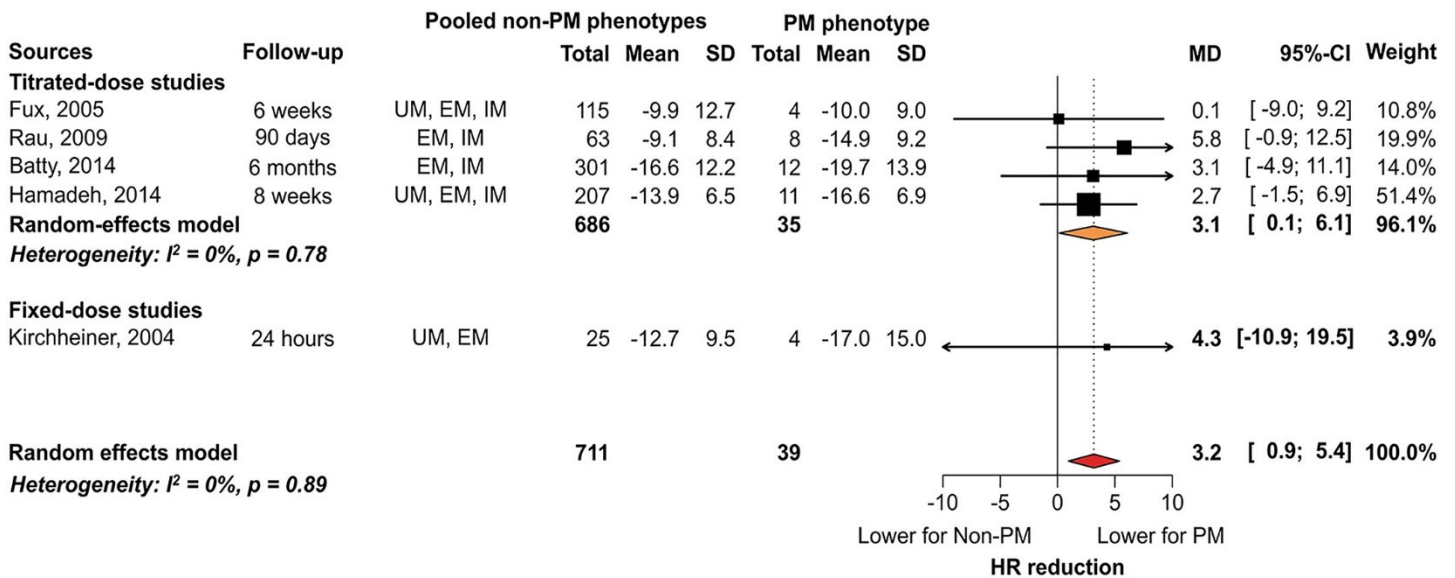
AE; All-type adverse events AF, atrial fibrillation; AUC, area under the concentration-time curve; AMI, acute myocardial infarction; CAD, Coronary artery diseases; CHF, congestive heart failure; CR/XL, Controlled-release/Extended-release metoprolol formulation; DBP, diastolic blood pressure; DPWG, Dutch Pharmacogenomics Working Group; EM, extensive metabolizers; HF, heart failure; HR, heart rate; HT, hypertension; IHD, ischemic heart diseases; IM, intermediate metabolizers; IR, Immediate-release metoprolol formulation; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, Myocardial infarction; MTD, maximum tolerated dose; NYHA, New York Heart Association; PM, poor metabolizers.



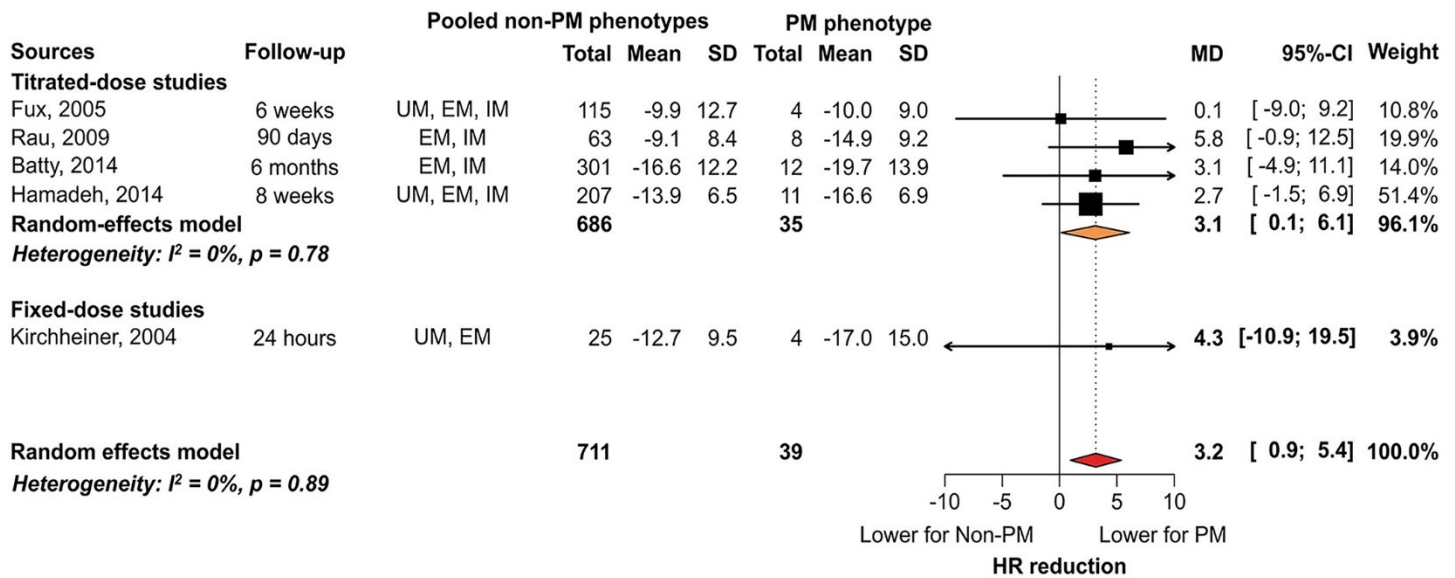
**Figure 1.** Flow chart of the review process.



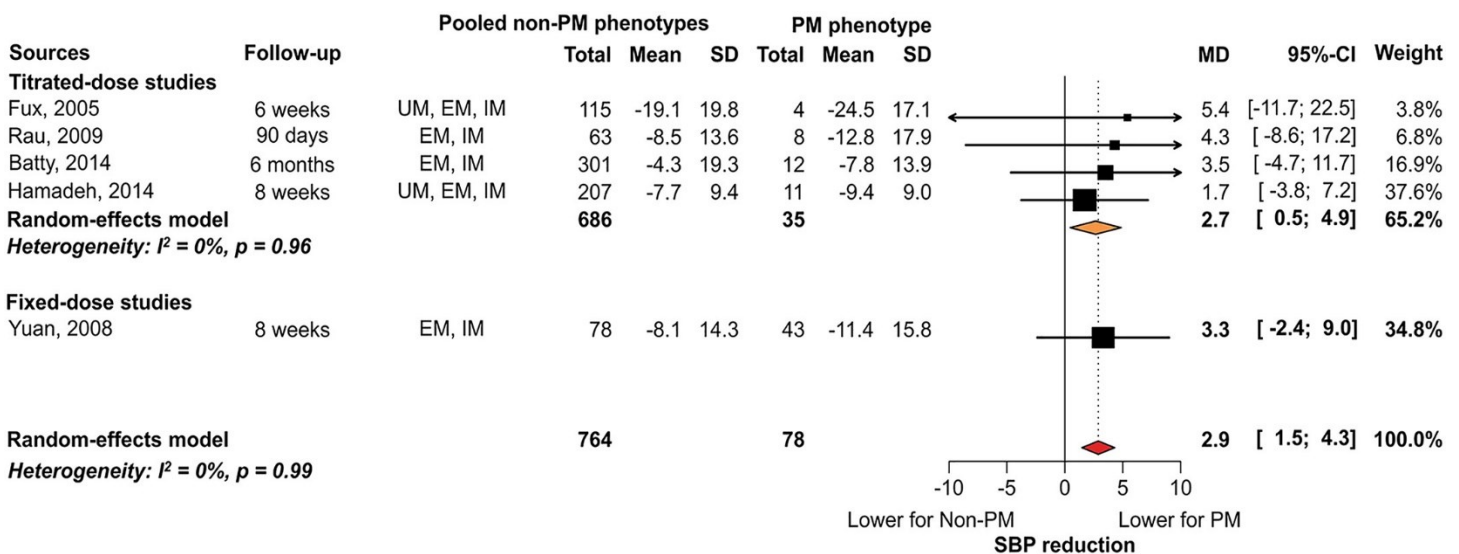
**Figure 2. Meta-analysis of daily drug doses between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



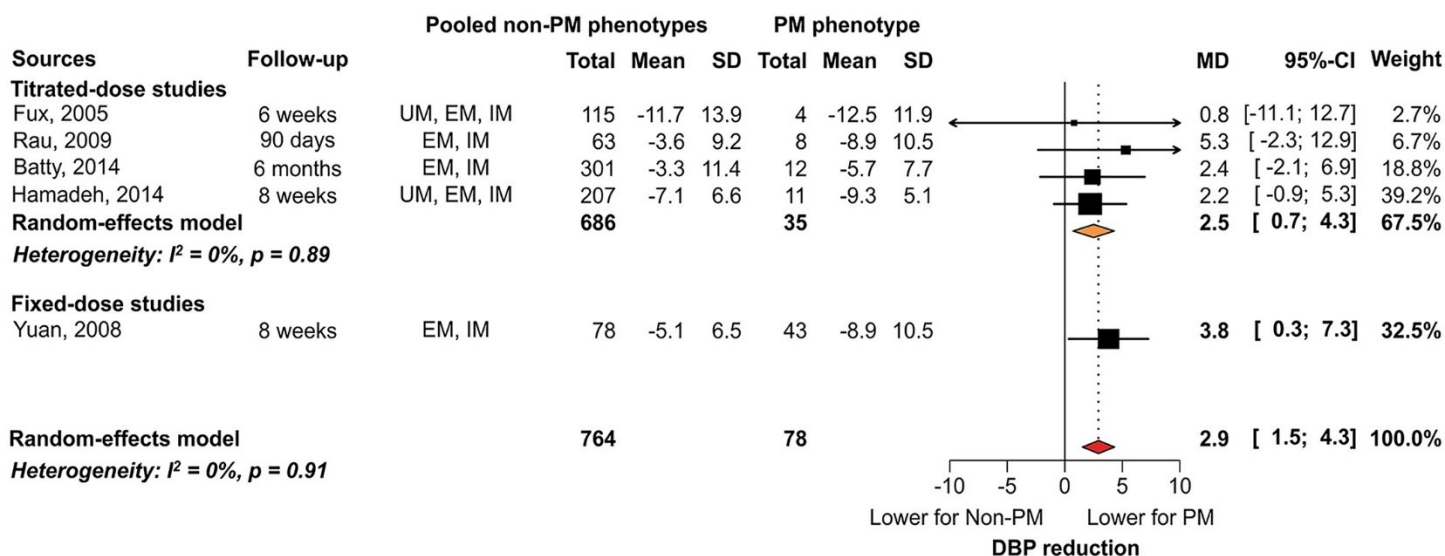
**Figure 3. Meta-analysis of  $\Delta$ HR between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



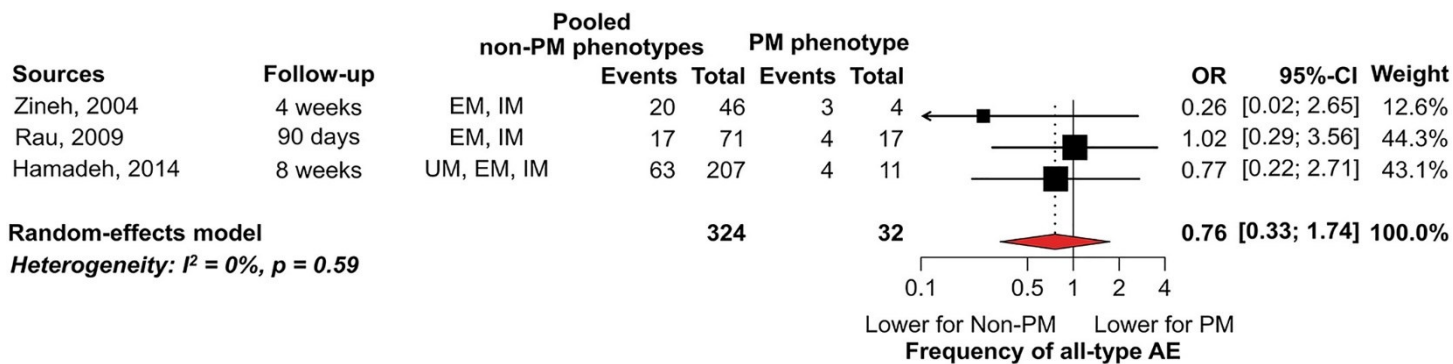
**Figure 3. Meta-analysis of  $\Delta$ HR between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



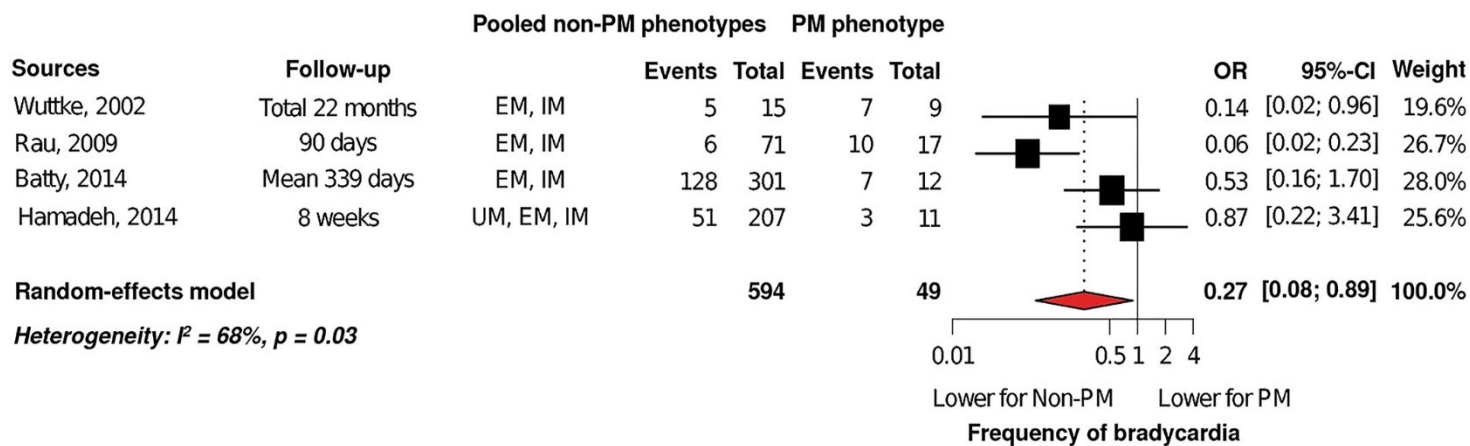
**Figure 4. Meta-analysis of  $\Delta$ SBP between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



**Figure 5. Meta-analysis of  $\Delta$ DBP between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; MD: Mean difference; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



**Figure 6. Meta-analysis of all-type adverse events between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; OR: Odds ratio; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.



**Figure 7. Meta-analysis of bradycardia between Non-PM and PM.** CI: Confidence intervals; EM: Extensive metabolizers; IM: Intermediate metabolizers; OR: Odds ratio; PM: Poor metabolizers; SD: Standard deviation; UM: Ultra-rapid metabolizers.

### 3 Discussion

À notre connaissance, cette revue systématique est la première à synthétiser de façon exhaustive les données publiées durant plus de deux décennies en lien avec l'impact clinique de CYP2D6 dans la thérapie au métoprolol et ce, sans restriction quant aux conditions traitées ou aux posologies administrées. Comme en témoigne notre revue de littérature, il demeure que peu d'études ont été publiées sur l'association PGx entre CYP2D6 et la réponse clinique au métoprolol. Sur les 21 articles identifiés par nos recherches, 15 d'entre eux comportaient des valeurs quantitatives pouvant être introduites dans nos méta-analyses, en plus de ne pas toujours comporter tous les paramètres évalués. Il est nécessaire de mettre en perspective qu'au moment d'effectuer notre méta-analyse, quelques publications étudiant les variations de FC à l'exercice et la réponse clinique générale avaient été synthétisées de manière qualitative.<sup>292</sup> En portant un regard critique sur la littérature publiée, il est également intéressant de constater l'hétérogénéité des devis d'essais employés, des mesures effectuées, de la classification des phénotypes inclus, des génotypes testés et des durées variables d'observation, sans qu'une composante temporelle puisse nécessairement en être la cause. Malgré ces limites, nous sommes parvenus à regrouper suffisamment de valeurs pour obtenir des estimés d'effet suggérant que le polymorphisme génétique de *CYP2D6* affectait la réponse clinique au métoprolol, plus particulièrement le phénotype PM, au niveau de la réduction de FC, de TAS/TAD et de la survenue d'épisodes bradycardiques. Étonnement, ces différences ont été obtenues sans que des variations de doses moyennes quotidiennes entre métaboliseurs PMs et non-PMs ne soient observées, ce qui ajoute une certaine la validité à l'interprétation selon laquelle celles-ci peuvent être attribuables à un effet PK- puis PD-PGx.

De façon certaine, nous pouvons attribuer le regroupement d'autant de valeurs de doses dans notre méta-analyse au recours à la transformation des valeurs statistiques présentées dans les publications.<sup>413</sup> En effet, un facteur non-négligeable était la présentation des données cliniques non-normalement distribuées en utilisant les termes conventionnels de médianes, de quartiles et/ou de valeurs extrêmes, alors que les modèles mathématiques servant à construire les méta-analyses requièrent habituellement l'utilisation de moyennes et d'écart-types.<sup>414</sup> Ajoutons à cette technique l'emploi de modèles statistiques plus performants que les méthodes méta-analytiques traditionnelles afin d'obtenir des estimés d'effet robustes, autant pour les variables continues que

dichotomiques,<sup>415</sup> même lorsque peu d'études (<5) sont synthétisées,<sup>416</sup> comme ce le fût dans notre cas.

Depuis la publication du manuscrit, la nouvelle classification harmonisée entre le CPIC et le DPWG servant à l'inférence phénotypique du CYP2D6 a été émise.<sup>197</sup> Tel que décrit au **Chapitre 1**, les seuils de pointages alléliques ont été ajustés afin d'être identiques pour ces deux consortiums,<sup>149,198</sup> permettant ainsi l'attribution uniforme des phénotypes UM, NM et IM selon les génotypes identifiés. Cependant, la classification du phénotype PM n'a pas été affectée, car le CPIC et le DPWG reconnaissaient déjà son attribution seulement lorsque les deux copies de gènes comportent des variants alléliques conférant une activité enzymatique nulle au CYP2D6. Nous pouvons aussi souligner une étude publiée après la nôtre et n'ayant pu être incluse dans nos analyses. Parmi 136 patients post-infarctus, les comparaisons effectuées entre NMs, IMs et PMs corroborent nos modèles, soient que la FC enregistrée à l'exercice est plus faible à mesure que l'activité du CYP2D6 diminue, sans se répercuter sur la dose quotidienne.<sup>384</sup> Encore une fois, cette étude tend à souffrir des limites similaires à celles rapportées dans notre revue systématique, soient la faible étendue du génotypage de *CYP2D6* et surtout la taille d'échantillon restreinte. Du point de vue de l'inférence phénotypique et des données non-inclues, les conclusions de notre méta-analyse demeurent inchangées.

En ce qui concerne les données ayant été mises à jour par rapport à la dernière méta-analyse sur les paramètres PK<sup>292</sup>, nous avons choisi de conserver les classifications faites dans chacun des articles parce que les informations génotypiques complètes des cohortes n'étaient généralement pas disponibles. Tout comme la méta-analyse de Blake *et al.*, les tendances que nous avons obtenues indiquent un effet PK-PGx définitif sur les quatre paramètres évalués qui est similaire à ce que leur groupe avait obtenu,<sup>292</sup> nos analyses agissant à titre confirmatoire grâce à des tailles d'échantillons plus grandes et des estimés plus précis (voir **Annexe 1**).

D'une perspective plus holistique, la mesure de l'impact PGx clinique de CYP2D6 sur le traitement  $\beta$ -bloquant avec métoprolol s'avère pertinente. En effet, selon les propriétés pharmacologiques attribuables aux  $\beta$ -bloqueurs cardiosélectifs, leur efficacité réside en la réduction de la signalisation adrénergique,<sup>263</sup> laquelle peut s'observer par la réduction de FC.<sup>263,417</sup> Ainsi, des données antérieures de méta-régressions d'études cliniques randomisées suggèrent que les patients sous thérapies  $\beta$ -bloquantes ayant une réduction accrue de FC au repos, observée selon



la ligne de base, sembleraient davantage en bénéficier. Plus précisément, une analyse de Cucherat *et al.* indiquait une réduction de mortalités cardiaque et toute-cause suivant un infarctus du myocarde, les auteurs calculant une réduction relative de mortalité cardiaque jusqu'à 30% par baisse de 10 battements/minute.<sup>418</sup> Une méta-régression ultérieure par McAlister *et al.* concluait qu'une baisse de seulement 5 battements/minute pouvait entraîner une réduction relative de mortalité totale de 18% chez des populations défailantes cardiaques.<sup>419</sup> Bien qu'une réduction de FC ne puisse expliquer l'ensemble des bénéfices associés aux  $\beta$ -bloqueurs cardioselectifs,<sup>263</sup> cette mesure pourrait s'avérer efficace pour évaluer l'antagonisme adrénergique et optimiser le bénéfice clinique d'une potentielle approche personnalisée au métoprolol.<sup>420</sup>

Concernant la même association PGx de réduction de FC présentée dans nos travaux, la plus grande cohorte ayant évalué les différences de mortalité et d'hospitalisations était une sous-étude de l'essai MERIT-HF.<sup>381</sup> Malgré qu'une tendance ait été observée, les résultats de cette sous-étude ne permettaient pas de distinguer un bénéfice clinique entre les différents phénotypes de CYP2D6 pour les patients insuffisants cardiaques traités avec métoprolol. Ces conclusions peuvent être attribuables au fait que moins de 10% de la cohorte initiale était incluse, sans compter l'absence du phénotype UM et la faible représentation des métaboliseurs PMs. Or, un dosage moins élevé entre métaboliseurs lents jusqu'à normaux avait été nécessaire pour diminuer la FC lorsque la dose était normalisée pour 1 battement/minute. Le fait que nos méta-analyses aient indiqué que les métaboliseurs PMs et non-PMs aient des différences de réduction de FC à des doses similaires pourrait supporter la rationnelle selon laquelle une personnalisation du dosage clinique permettrait à tous les phénotypes de bénéficier de manière optimale au traitement  $\beta$ -bloquant avec métoprolol. De tels ajustements de doses sont justement recommandés par le DWPG.<sup>137</sup> Mentionnons toutefois que d'autres analyses de la cohorte de MERIT-HF ne montraient pas que la réduction accrue de FC menait à une diminution du risque de mortalité, les auteurs ne parvenant pas non plus de statuer sur une FC cible.<sup>421</sup> Ces résultats s'opposent à ceux d'autres groupes de recherche<sup>422</sup> et pourraient s'expliquer par le devis *post-hoc* des analyses, le nombre restreint de patients inclus dans chaque sous-groupe ou l'importance de la FC pré-traitement pour chaque patient traité. Des études prospectives et à plus grand déploiement demeurent nécessaires pour cerner l'étendue de l'impact PGx clinique du CYP2D6 sur le traitement au métoprolol.

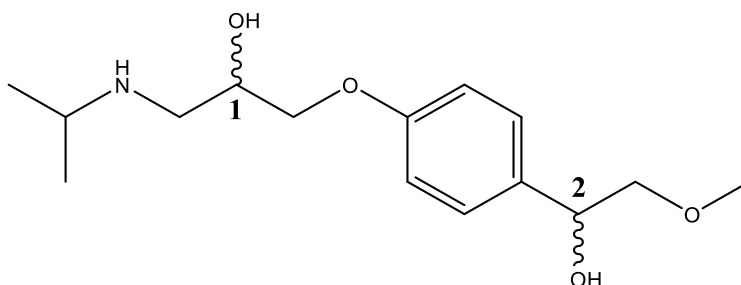
Si l'on ignore les résultats obtenus en comparant les métaboliseurs PMs aux non-PMs, qu'advient-il de l'association opposée, soit des métaboliseurs UMs comparativement aux non-UMs ? Si les PMs semblent plus susceptibles de bénéficier du traitement  $\beta$ -bloquant au métoprolol, quitte à ce qu'ils développent plus fréquemment des épisodes bradycardiques, n'y aurait-il pas un risque d'inefficacité pour les UMs ? Bien que cette hypothèse soit plausible face aux associations PGx observées, nous n'avons pu agréger suffisamment de données de littérature pour faire des analyses valables sur ce phénotype. En effet, cinq études avaient inclus des UMs dans leur cohorte, dont seulement deux qui rapportaient des données d'intérêt pour notre méta-analyse. Le phénotype UM est peu fréquent dans les populations,<sup>200,201</sup> ce qui ajouterait à pourquoi ces cohortes n'étaient composées d'à peine plus de 10 participants UMs. De plus, les études identifiées s'échelonnent sur plus de deux décennies. Bien qu'il existe à présent du matériel de référence sur le génotypage de *CYP2D6*,<sup>423</sup> certaines techniques de génotypage utilisées n'ayant pas testé la présence de CNVs, donc de duplications augmentant l'activité enzymatique, auraient pu causer des erreurs de phénotypage.<sup>80</sup> Bref, la faible prévalence et l'assignation erronée de phénotype non-UM par manque de couverture génotypique a peut-être à son tour restreint ces sous-groupes. Des cohortes plus larges et le recours à un génotypage plus exhaustif auraient potentiellement permis de surmonter cette limite. Quoi qu'il en soit, d'un point de vue qualitatif, les UMs tendraient à ne pas avoir des réductions de FC ou de TAS/TAD significativement inférieures aux autres groupes, ainsi que pour les autres paramètres synthétisés.

À la lumière des résultats PK-PGx obtenus par notre revue systématique et nos méta-analyses, il était évident que, bien que ces résultats soient reproductibles à-travers la plupart des études extraites de la littérature, celles-ci comportaient des tailles d'échantillons et un nombre de participants par phénotype qui étaient trop restreints. De la même façon que pour les paramètres PK, les associations PGx statistiquement significatives des paramètres cliniques nous ont incité à élargir notre investigation dans notre cohorte observationnelle (**Chapitre 4**) afin d'inclure la FC comme second critère de jugement.

## Chapitre 3 : Bioanalyse chirale et quantification simultanée du métoprolol et de son métabolite spécifique au CYP2D6

### 1 Introduction

À la suite de notre revue de littérature, nos analyses supplémentaires des paramètres PK ont permis d'apprécier les différentes techniques bioanalytiques employées afin de quantifier le métoprolol et certains de ses métabolites dans des matrices biologiques. En effet, plusieurs études indiquaient les valeurs de concentrations plasmatiques de métoprolol sous forme racémique, tandis que d'autres parvenaient à développer des méthodes suffisamment performantes pour quantifier chacun des énantiomères, soient le (*S*)- et le (*R*)-métoprolol (**Figure 9**). Cette approche est justifiée, car seul l'énantiomère (*S*)-métoprolol exerce un effet pharmacologique significatif.<sup>337,424</sup> Par le développement de méthodes de quantification chirales, des groupes d'investigateurs<sup>339,425</sup> peuvent observer non seulement les profils PK de chacun des énantiomères, mais également leurs effets PD isolés, tout en tenant compte de l'influence PGx du CYP2D6 (**Section 3.5**). Dans le but de mener une éventuelle étude prospective dans laquelle le métoprolol serait quantifié, cette méthodologie plus élaborée fût considérée par notre groupe.



**Figure 9** Métoprolol (1) et  $\alpha$ -hydroxymétoprolol (1,2).  
Les lignes ondulées signifient un centre chiral aux conformations possibles (*S*)- et (*R*)-.

En consultant les données de littérature sur les techniques bioanalytiques chirales développées pour la quantification du métoprolol, des limites partagées par certaines publications sont devenues apparentes à plusieurs niveaux, celles-ci se résumant comme suit :

- i. La sensibilité sous-optimale de certains détecteurs utilisés ne permettant pas de quantifier les énantiomères à des niveaux plasmatiques faibles, ou les gammes de concentrations trop restreintes pour couvrir l'étendue des valeurs observées en milieu clinique;
- ii. Les temps d'analyse trop prolongés pour obtenir une séparation optique acceptable;
- iii. L'absence de quantification de métabolites, plus précisément ceux issus du métabolisme du CYP2D6;
- iv. Les techniques de purification d'échantillons empêchant de réduire les niveaux d'impuretés qui interfèrent avec la détection d'analytes et réduisent la sensibilité;
- v. Les techniques de séparation utilisant les colonnes chirales dans les méthodes récentes, ce qui les rend trop onéreuses et les confinent à un usage trop spécifique pour une applicabilité convenable ou une réutilisation.

Plusieurs méthodes bioanalytiques chirales et non-chirales sont rapportées dans la littérature scientifique pour la quantification du métoprolol et de ses métabolites. Parmi celles-ci, les types d'instrumentation varient grandement, mais en raison de la sensibilité améliorée en LC-MS/MS, son utilisation est maintenant priorisée lors de la quantification de  $\beta$ -bloqueurs.<sup>426</sup>

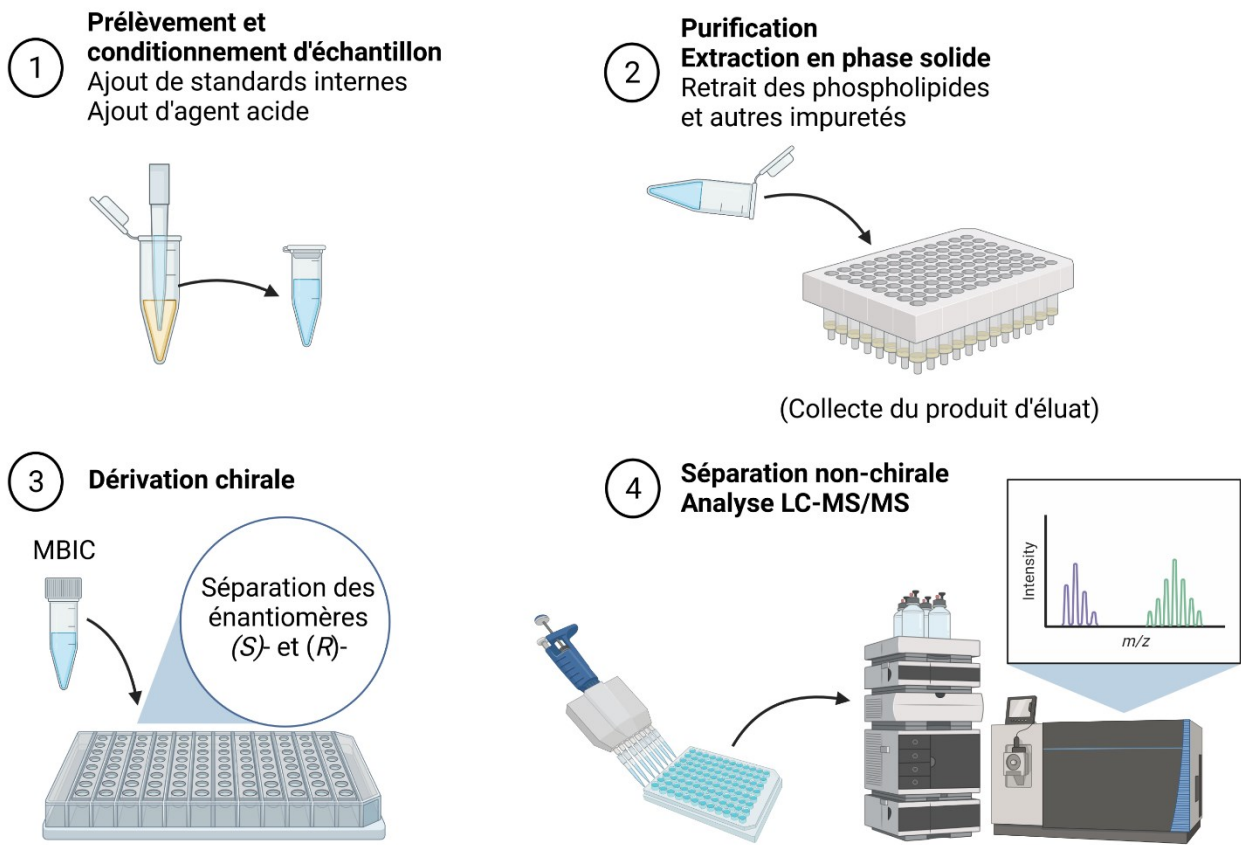
Deux approches reconnues sont couramment utilisées en laboratoire afin d'effectuer une séparation énantiomérique pour des molécules. D'abord, le principe de dérivation consiste à faire réagir les composés d'intérêt avec un agent dérivatif optiquement pur. Une fois la réaction complétée, chaque analyte chiral dérivé comporte une affinité différente envers les groupements chimiques greffés à une colonne chromatographique achirale, qu'elle soit gazeuse ou liquide. Ce faisant, des temps de séparation différents pour les dérivatifs sont obtenus pour chaque énantiomère.<sup>427</sup> Lors d'une quantification par MS/MS, cette technique permet également de potentialiser les signaux de chaque analyte en augmentant leur ionisation dans la source du détecteur, ce qui améliore la sensibilité.<sup>427</sup>

Dans le cas des  $\beta$ -bloqueurs, notamment le métoprolol, la dérivation chirale est facilitée par la présence d'une amine secondaire contenue dans la structure aryloxyaminopropanol (**Figure 8**).<sup>337</sup> Plusieurs dérivatifs chiraux ont été utilisés antérieurement avec des capacités relatives de

séparation.<sup>346</sup> La seconde méthode, qui consiste en l'utilisation de colonnes chromatographiques chirales séparant directement les énantiomères sans réaction au préalable, est de plus en plus fréquente dans le développement de méthodes récentes destinées à la quantification de  $\beta$ -bloqueurs.<sup>346,428,429</sup> L'étape de dérivation peut être évitée, ce qui abolit le besoin d'agent dérivatif pur et réduit les étapes de conditionnement d'échantillons. En revanche, un élément qui limite grandement le recours à cette approche est l'équipement onéreux et la rigidité de leurs conditions chromatographiques, ce qui restreint leur optimisation pour des analytes spécifiques.<sup>346</sup>

Bien que les techniques de séparation et de détection comme la LC-MS/MS soient les plus sensibles en bioanalyse pour la quantification des analytes d'intérêt, les principes derrière son fonctionnement peuvent accentuer l'interférence causées par d'autres composants présents dans les échantillons biologiques. L'ionisation des phospholipides présents dans le plasma humain provoque un « effet de matrice »,<sup>430</sup> c'est-à-dire qu'ils modifient l'intensité du signal émis par les analytes vers le détecteur, à la hausse ou à la baisse.<sup>431</sup> Ce facteur peut causer une variabilité dans l'obtention des résultats de chaque échantillon analysé et, à plus long terme, diminuer la reproductibilité des méthodes par contamination de l'appareil.<sup>431,432</sup> Ainsi, nous estimions qu'employer une méthode de purification telle que l'extraction en phase solide (*solid phase extraction*, SPE) pouvait éliminer les effets de suppression ou de potentialisation de signal par la matrice.<sup>433,434</sup>

Cette technique a précédemment été appliquée avec des résultats convaincants pour d'autres classes de médicaments aux propriétés physico-chimiques distinctes,<sup>435,436</sup> incluant des systèmes antérieurs utilisés pour les  $\beta$ -bloqueurs.<sup>437</sup> Notre groupe proposait que la conjugaison de nouvelles approches de type SPE à la dérivation chirale indirecte serait suffisamment performante pour surmonter les défis bioanalytiques présentés dans la littérature scientifique de sorte à quantifier le métoprolol et son métabolite spécifique au CYP2D6, le  $\alpha$ -hydroxymétoprolol (**Figure 9**), de manière sensible, facilitée, généralisable et accessible. À des fins visuelles, la **Figure 10** ci-bas résume les étapes de manipulation.



**Figure 10** Schématisation des manipulations requises pour le développement de la méthode bioanalytique présentée.  
(Figure créée à partir de BioRender.com)

**Isocyanate derivatization coupled with phospholipid removal microelution-solid phase extraction for the simultaneous quantification of (S)-metoprolol and (S)- $\alpha$ -hydroxymetoprolol in human plasma with LC-MS/MS.**

Maxime Meloche, B.Sc.<sup>a,b,c</sup>

[maxime.meloche-brouillette@umontreal.ca](mailto:maxime.meloche-brouillette@umontreal.ca)

Martin Jutras, B.Sc.<sup>a</sup>

[martin.jutras@umontreal.ca](mailto:martin.jutras@umontreal.ca)

Isabelle St-Jean, M.Sc.<sup>a</sup>

[isabelle.st-jean.2@umontreal.ca](mailto:isabelle.st-jean.2@umontreal.ca)

Simon de Denus, B.Pharm., M.Sc.(Pharm), Ph.D.<sup>a,b,c</sup>

[simon.dedenus@icm-mhi.org](mailto:simon.dedenus@icm-mhi.org)

Grégoire Leclair, B.Pharm., Ph.D.<sup>a</sup>

[gregoire.leclair@umontreal.ca](mailto:gregoire.leclair@umontreal.ca)

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, H3T 1J4, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> Montreal Heart Institute, H1T 1C8, Montreal, Quebec, Canada

<sup>c</sup> Université de Montréal Beaulieu-Saucier Pharmacogenomics Centre, H1T 1C8, Montreal, Quebec, Canada

**Corresponding author:**

Grégoire Leclair, B.Pharm., Ph.D.

**E-mail: [gregoire.leclair@umontreal.ca](mailto:gregoire.leclair@umontreal.ca)**

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

C.P. 6128, succursale Centre-ville , Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

## Highlights

- Novel sensitive method developed and validated for quantifying (*S*)-metoprolol and one of its metabolites in human plasma
- Phospholipid removal microelution-solid phase extraction with simple 4-step protocol minimizes matrix effects and allows good recovery using minimal sample volumes
- Excellent chiral separation using isocyanate derivatization
- Successful application on a clinical cohort of patients taking metoprolol

## Abstract

A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay was developed and validated for the quantification of (*S*)-metoprolol (MET) and its main metabolite, (*S*)- $\alpha$ -hydroxymetoprolol (OH-MET). Human plasma samples (50  $\mu$ L) were spiked with both analytes and their deuterated internal standards (IS) (*S*)-MET-(d7) and  $\alpha$ -OH-MET-(d5). Phospholipid removal microelution-solid phase extraction (PRM-SPE) was performed using a 4-step protocol with Oasis PRiME MCX  $\mu$ Elution 96-well cartridges. The eluates were reconstituted in 100  $\mu$ L of acetonitrile with 50  $\mu$ g/mL (*S*)- $\alpha$ -methylbenzyl isocyanate (MBIC) for chiral derivatization. After 60 minutes at room temperature, the reaction was quenched using 100  $\mu$ L of water 2% formic acid. Chromatographic separation of the derivatized analytes was performed on a Kinetex phenyl-hexyl core-shell stationary phase with an elution gradient. Mobile phases were composed of a mixture of water and methanol, with ammonium formate and formic acid as buffers. Total runtime was 15 minutes. Analyte detection was performed by an AB/SCIEX 4000 QTRAP mass spectrometer with multiple reaction monitoring. Chromatograms showed MBIC successfully reacted with racemic MET,  $\alpha$ -OH-MET, and their respective IS. Detection by positive electrospray ionization did not reveal derivatized by-products. Quantification ranges were validated for (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET between 0.5-500 and 1.25-500 ng/mL, respectively, with correlation coefficients ( $r^2$ ) >0.9906. The PRM-SPE assay showed low matrix effects (86.9-104.0%) and reproducible recoveries (69.4-78.7%) at low, medium, and high quality control (QC) levels. Precision and accuracy were all comprised between 85-115% for all three QCs, and between 80-120% for the lower limit of quantification, for intra- and inter-day values (n=6, 3 consecutive days). Non-derivatized analytes were stable at room temperature, after 3 freeze-thaw cycles, and stored for 30 days at -80°C (n=4). Reinjection reproducibility of a previously validated batch was achieved after



8 days under auto-sampler conditions, indicating the stability of (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET derivatives. Its clinical use was established in a cohort of 50 patients and could be used to further investigate the clinical impact of (*S*)-MET concentrations.

### **Abbreviations**

$\alpha$ -OH-MET,  $\alpha$ -hydroxymetoprolol; CYP2D6, cytochrome P450 2D6; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HQC, high quality control; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantification; MBIC, (*S*)- $\alpha$ -methylbenzyl isocyanate; MET, metoprolol; MHI, Montreal Heart Institute; MQC, medium quality control; MRM, Multiple reaction monitoring; PRM, phospholipid removal microelution; SPE, solid phase extraction; RSD, relative standard deviation.

### **Key words**

Metoprolol; Phospholipid removal microelution-solid phase extraction; Isocyanate derivatization; LC-MS/MS; Chiral assay.

## 1. Introduction

Metoprolol (MET) is a  $\beta_1$ -adrenergic receptor antagonist used to treat multiple cardiovascular conditions including hypertension and heart failure [1, 2]. Administered as a racemic mixture either in the form of a tartrate or succinate salt using immediate- or extended-release formulations, only its (*S*)-enantiomer displays significant pharmacological properties compared to its (*R*)-isomer [3]. Nearly 80% of MET metabolism is mediated by the hepatic cytochrome P450 (CYP) 2D6 enzyme [4]. More precisely, (*S*)-MET preferentially undergoes oxidation to form pairs of (*S*)- $\alpha$ -hydroxymetoprolol (OH-MET) diastereoisomers, which bear approximately 10% of (*S*)-MET's potency altogether [5]. More than 140 genetic variants have been identified in *CYP2D6*, many causing important differences in metabolizing capacity and ultimately drug concentrations of CYP2D6 substrates [6]. Considering the concentration-effect association between (*S*)-MET and its clinical response [7], the stereoselective analysis of MET is critical to adequately characterize its pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles.

Several chiral assays have been described regarding the quantification of MET. Ranging from gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) [8], to high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection [9, 10], to LC-tandem mass spectrometry (MS/MS) [11], their applications across various biological matrices have been demonstrated. Nevertheless, LC-MS/MS detection typically provides better analytical performance, with greater sensitivity for lower limits of quantification (LLOQ) and shorter run times [11].

Two main approaches are generally considered for the development of a chiral assay for MET. Indirect separation methods require pre-column derivatization with optically pure chiral reagents. Previous enantioselective techniques for MET have included isocyanate [12], chloroformate [13], and phenylacetate derivatives [14], among others. While the reagents utilized vary in their chemical structures, the rationale behind these approaches focuses on the chiral derivatization of the functional amino group present in most  $\beta$ -blocking agents. In fact, this technique is often useful for enhancing detectability and increasing compound resolution [15]. For example, new hydrazonoyl and dansyl reagents were recently used by Khedr *et al.* for a greater sensitivity over 3-fold of five  $\beta$ -blockers in rabbit plasma [16]. However, most recent methods

have not combined chiral derivatization with more sensitive detectors, thus restraining the bioanalytical potential of indirect approaches.

Despite the advantages of chiral derivatization, the additional steps necessary for an efficient procedure and satisfactory reaction yield have caused later techniques developed for the enantioselective analysis of  $\beta$ -blockers to resort mostly to direct separation through chiral stationary phases. Notably, polysaccharide- and glycopeptide-based supports have been employed numerous times for the stereoselective separation of MET and its metabolites [9, 11, 17]. Even if these methods have demonstrated their clinical applicability, they contain multiple limitations, whether it be the high expenditures associated to direct separation systems compared to pre-column chiral reagents, the LLOQ thresholds too elevated to properly measure  $\beta$ -blockers at low plasma concentration levels, or the extended injection run times when analyzing MET and its metabolites that make them impractical for larger clinical cohorts.

Many sample pretreatments have been reported for  $\beta$ -blockers, including liquid-liquid extraction [18], microextraction-packed sorbents [19], and solid phase extraction (SPE) [9, 16, 20]. Goryński *et al.* reported an efficient microelution-SPE method compatible with LC-MS/MS for eight  $\beta$ -blockers and bronchodilators [21]. Although fully validated, its clinical application was not assessed, and the sample preparation and SPE sorbent development protocol contained certain technical complexities. With the advent of phospholipid removal microelution (PRM)-SPE, the reduction of matrix effects (ME) has greatly improved the performance of current LC-MS/MS methods, virtually cancelling phospholipid interference [22]. Indeed, methods of detection using ionization, such as electrospray processes, can cause endogenous phospholipids to significantly impact the reproducibility of LC-MS/MS methods because of signal suppression or enhancement [23]. Moreover, PRiME (process, robustness, improvements, matrix effects, ease of use) clean-up procedures have demonstrated efficient ME cancellation for various compounds, such as antipsychotics [24] and anaesthetics [25]. Such processes require less solvents, are safe, and result in cleaner pre-chromatographic extracts, which ultimately can reduce the sample quantities needed for proper quantification [26]. However, despite the purification improvements provided by these PRiME procedures, they do not take full advantage of the lipophilic and alkaline properties of MET, unlike mixed-mode cationic sorbents for basic drugs [27]. To our knowledge, cationic PRM-SPE with PRiME clean-up procedures have not been applied to the chiral analysis of MET.

Thus, the objective of this study was to develop a novel LC-MS/MS assay for the simultaneous quantification of active (*S*)-MET and its associated (*S*)- $\alpha$ -OH-MET enantiomers in human plasma. We aimed to overcome the limitations of past methods by coupling pre-column isocyanate derivatization with rapid mixed-mode, cationic PRM-SPE. Then, its clinical application was assessed with samples of randomly selected patients from an observational cohort.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals and reagents**

Racemic metoprolol (MET) tartrate (>99% purity) and the (*S*)- $\alpha$ -methylbenzyl isocyanate (MBIC) reagent (98% purity) were obtained from Millipore Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Racemic  $\alpha$ -hydroxymetoprolol ( $\alpha$ -OH-MET) (98% purity),  $\alpha$ -OH-MET-(d5) (95% purity), and (*S*)-MET-(d7) (98% purity) were ordered from Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canada). Optically pure deuterated (*S*)- $\alpha$ -OH-MET was not commercially available for our analyses.

### **2.2. Preparation of stock, working, and quality control solutions**

A single mixed stock solution containing both analytes was prepared in methanol with concentrations of 0.5 mg/mL for MET and 1.25 mg/mL for  $\alpha$ -OH-MET. Because MET is prescribed as a racemate and presents each enantiomer in similar quantities, the racemic mixtures were used for working solutions. Subsequent dilutions were performed using ultra-pure water and acetonitrile (80:20 v/v) to prepare working solutions into medication-free human plasma K<sub>2</sub>EDTA. Working solutions of 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 250, and 500 ng/mL were prepared for (*S*)-MET, with proportionate concentrations of 1.25, 2.50, 5, 12.5, 25, 50, 125, 250, and 500 ng/mL for (*S*)- $\alpha$ -OH-MET. Concentrations of 1.5 and 3.75, 30 and 75, and 400 ng/mL were obtained for the low (LQC), medium (MQC), and high quality control (HQC) samples of (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET, respectively. Separately, internal standards (IS) (*S*)-MET-(d7) and racemic  $\alpha$ -OH-MET-(d5) were mixed in methanol at 100  $\mu$ g/mL before being diluted to 250 ng/mL as a working IS solution.

### **2.3. Sample preparation**

#### **2.3.1. Sample conditioning and PRM-SPE procedure**

Frozen plasma samples were thawed at room temperature before processing. From those, a 50- $\mu$ L aliquot of plasma was spiked with working solutions of MET/ $\alpha$ -OH-MET. Ten  $\mu$ L of IS and 50  $\mu$ L water 4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1 v/v) were added. Then, aliquots were vortexed for 30 seconds.

All extractions were carried out in a SPE vacuum manifold. The extraction process was performed using Oasis PRiME MCX 96-well  $\mu$ Elution plates (2 mg sorbent/well, 30  $\mu$ m) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with a 4-step protocol for elution. Samples were loaded under a 120-250 mmHg vacuum without prior conditioning the cartridges. Two sequential washes were performed with 200  $\mu$ L of water 100mM ammonium formate and 2 % formic acid, followed by 200  $\mu$ L methanol. The analytes and IS were eluted using 2 x 30  $\mu$ L methanol 6% ammonium hydroxide. The collected eluates were evaporated at 50°C under nitrogen flow for 10 minutes.

### **2.3.2. Derivatization procedure**

A fresh stock solution of MBIC in acetonitrile was prepared to obtain a concentration of 50 mg/mL, which was stored at 4°C under dark conditions prior to its use. For the derivatization procedure, the derivative was further diluted to 50  $\mu$ g/mL before adding 100  $\mu$ L of the solution into the PRM-SPE wells for reconstitution after evaporation of the eluates. The wells were covered and left at ambient conditions for 60 minutes before quenching the reaction with 100  $\mu$ L of water 2% formic acid.

### **2.4. Chromatographic equipment and conditions**

Analysis of (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET derivatives were carried on an 1100 Series HPLC system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) with modules comprising a binary pump (G1312A), column oven (G1316A), and autosampler (G1367A). Separation of the derivatives was performed on a reversed-phase Kinetex phenyl-hexyl core-shell column (100mm x 3mm, 100Å, 2.6  $\mu$ m)(Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintained at 45°C and equipped with a SecurityGuard ULTRA Cartridge. Mobile phase A consisted of water with 5mM ammonium formate with 0.1% formic acid, and mobile phase B was made of methanol/water (96:4 v/v) with 0.1% formic acid. The composition of the gradient was optimized from 52% to 65% B within 8 minutes, increased from 8 to 10 minutes at 98% B and maintained until 12 minutes. A reset to 52% B was made from 12 to 15 minutes for re-equilibration. Flow rate and injection volume were set at 750  $\mu$ L/min and 5  $\mu$ L, respectively. All extracted samples were stored in the autosampler at 5°C before injection. An acetonitrile/isopropanol/methanol/water (1:1:1:1 v/v/v/v) mixture was used as needle wash to prevent carryover. To avoid excess contamination of the detector, the mobile phase was diverted to waste from 0 to 3 minutes, and from 10 to 15 minutes.

## 2.5. Mass spectrometer and conditions

The HPLC system was coupled with an AB/SCIEX 4000 QTRAP triple-quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada). The Turbo V electrospray ionization source was operated in positive ion mode with the source voltage optimized at 5,500 V and maintained at 650°C. The nebulizer gas, heater gas, and curtain gas were set constant at 50, 60, and 30 psi, respectively. Data transformation and processing were performed with the Analyst software version 1.6.2.

Multiple reaction monitoring (MRM) scan mode was employed to detect transitions from precursor to product ion. For both analytes, values for entrance potential (EP), declustering potential (DP), collision energy (CE), and collision cell exit potential (CXP) were set at 10 V, 80 V, 27 V, and 7 V, respectively. Detection of the derivatives were made by measuring the following transitions:  $m/z$  415→268 for (*S*)-MET,  $m/z$  431→284 for (*S*)- $\alpha$ -OH-MET,  $m/z$  422→275 for (*S*)-MET-(d7), and  $m/z$  436→289 for  $\alpha$ -OH-MET-(d5). Dwell time was 260 milliseconds.

## 2.6. Assay validation

Selectivity, specificity, carryover, linearity, accuracy, precision, recovery, ME, and stability were assessed for validation in certified drug-free human plasma. For this assay, the 2018 U.S. Food & Drug Administration's Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [28] criteria were followed.

### 2.6.1. Selectivity, sensitivity, and specificity

Selectivity was evaluated by analyzing a double blank from 6 different lots of drug-free K<sub>2</sub>EDTA plasma. Any signal detected from the blank calibrators needed to be <20% of the mean LLOQ signal response of both analytes at their corresponding retention times, whereas a peak signal <5% relative to the mean IS signal response should be required.

As for sensitivity, the same process was applied for which six matrix samples were spiked ( $n=3$ ) with the analytes at LLOQ. Samples fortified with IS only were analyzed as well. Acceptance criteria required the analyte response signals to be >5 times greater than the blank matrix signal. Accuracy needed to be  $\pm 20\%$  of the nominal concentration for each sample, while a maximum relative standard deviation (RSD), or coefficient of variation, of 20% was permitted when evaluating precision.

Sequential analyses of a sample spiked at the upper limit of quantification levels for both analytes, followed by 2 double blanks were performed to assess carryover. Signals from the analytes in the blank matrix should be <20% that of the LLOQ.

### **2.6.2. Calibration curve and linearity**

Calibration curves were established by comparing the area ratios of the analyte with its respective IS. A linear regression was utilized to plot concentrations of (S)-MET, whereas (S)- $\alpha$ -OH-MET was best fitted through a quadratic regression. Both curves used a least square (1/x) weighting process.

The linearity of the method was determined using a blank calibrator with 9 non-zero concentrations covering both quantification ranges. For each validation run, a minimum of 6 non-zero concentrations had to be within 15% of the nominal concentrations with  $\leq 15\%$  RSD, except at LLOQ where margins of  $\pm 20\%$  were accepted. Linearity was validated if retrieved regression coefficients ( $r^2$ ) were  $\geq 0.985$ .

### **2.6.3. Accuracy and precision**

Overall accuracy and precision of the method were evaluated through intra- and inter-day variations in nominal concentrations. Six replicates at LLOQ, LQC, MQC, and HQC levels were prepared on 3 different days. Requirements for accuracy were that measured concentrations differ by not more than  $\pm 15\%$  from the nominal concentrations, and that RSD values of  $\pm 15\%$  are not exceeded for precision. In the case of LLOQ, a  $\pm 20\%$  margin for both parameters was accepted when compared to nominal values.

### **2.6.4. Extraction recovery and matrix effects**

The absolute recovery of the PRM-SPE procedure was validated by comparing the mean area response of analyte-IS signal ratios between six pre- and post-extracted replicates in plasma at LQC, MQC, and HQC levels. In both conditions, IS were added after extraction to adequately compare each analyte recovery. Absolute recovery was calculated using the following equation:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Area ratio}_{\text{pre-extraction}}}{\text{Area ratio}_{\text{post-extraction}}} \times 100$$

As for relative ME, analytes were initially derivatized in acetonitrile and quenched with water 2% formic acid before being spiked in post-extracted plasma matrix (n=6, six different lots). Samples from the solvent were used as neat samples. In each case, IS were not added to compare peak areas. Relative ME were therefore measured as follows:

$$\%ME = \frac{\text{Peak area}_{\text{post-extraction}}}{\text{Peak area}_{\text{neat solution}}} \times 100$$

IS-normalized ME were also calculated as proposed by De Nicolò *et al.* [29]. Analytes were spiked after the plasma blanks and solution samples were extracted, then were derivatized along with their IS. Both their mean signals post-extraction were measured as described above, but using area ratios with their respective IS. No deviation limits from the nominal concentration accuracy were set for recovery and ME, but RSD thresholds were set at 15% for all QC levels.

#### **2.6.5. Stability**

Stability experiments were carried for non-derivatized (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET. For every condition tested, validation was performed by preparing 4 replicates at LQC and HQC levels that were treated with the complete method afterwards. Mean signal responses were compared by calculating the area ratios of analyte/IS. Benchtop stability of the analytes in the stock solution was evaluated after 8 hours. Three freeze-thaw cycles were performed by storing all samples at -80°C and allowing them to return to room temperature. Long-term stability was assessed by analyzing spiked samples that were stored at -80°C for 30 days, which represented the longest period between patients' samples reception and analysis. In addition, reinjection reproducibility was done using a previously validated batch that remained under autosampler conditions for 8 days, containing calibration curves, as well as LLOQ, LQC, MQC, and HQC samples (n=6). For benchtop, freeze-thaw, and long-term stability, and for reinjection reproducibility, acceptable precision and accuracy were set at  $\pm 15\%$ .

#### **2.7. Clinical applicability**

The validated assay was applied to quantify plasma (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET concentrations in 50 patients from the Montreal Heart Institute (MHI) Hospital Cohort. Patients undergoing MET therapy at the baseline visit were randomly selected. Plasma samples were collected at the baseline visit. The sample collection protocol and all other methodological aspects of the MHI Hospital Cohort have been described [30]. The study was approved by the MHI's Scientific and Ethics Committees. At the time of enrollment, each patient gave a written informed consent to participate in the MHI Hospital Cohort.



## 2.8. Statistical analyses

Data regarding method validation were analyzed using Microsoft Excel spreadsheet (Office 2016, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Results in tables are reported as means, standard deviations, and %RSD. The figure representing analyte concentrations in patient samples were generated using box-and-whisker plots with GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Method development

#### 3.1.1. Optimization of the solid phase extraction procedure

MET and  $\alpha$ -OH-MET are alkaline compounds (pKa  $\sim$ 9.7) containing a secondary amine that makes them readily suitable for retention with mixed-mode, anionic sorbents. After evaluation of a 3-step technique provided by the manufacturer, which consisted of combining the first wash buffer with the sample before loading the cartridges, recovery was lower than with recommended 4-step method at approximately 55%. Therefore, 4-step was preferred for the final method and for which amines showed similar recoveries by using Oasis MCX  $\mu$ Elution 96-well extraction plates, with clean eluates demonstrating the efficient minimization of ME [27, 31].

#### 3.1.2. Optimization of derivatization conditions

The secondary amino group of MET and  $\alpha$ -OH-MET allows for direct isocyanate derivatization, which produces its corresponding urea derivative [32]. Kim *et al.* have demonstrated the usefulness of MBIC as a chiral derivatizing reagent in resolving salbutamol enantiomers through reversed-phase HPLC [33]. Since it was not tested on other drug classes, we sought to determine its ability to adequately separate other compounds. Isothiocyanate reagents are usually preferred because of their improved chemical selectivity for amines compared to isocyanates [34]. Nonetheless, the clean composition of the eluate following the PRM-SPE procedure favored the reaction of MBIC with MET enantiomers and  $\alpha$ -OH-MET diastereoisomers. A summary of the derivatization reaction is shown in Figure 1.

Derivatization conditions such as reaction time and temperature, MBIC concentration, reconstitution volume, and solvent composition at injection were tested to obtain optimal signals for both derivatives. After iterative adjustments, a reaction time of 60 minutes at room temperature in the 96-well collection plate was selected for derivatization. The high concentration of 50 $\mu$ g/mL

of MBIC compared to the analytes was chosen arbitrarily to favor the derivatization reaction. Then, samples were analyzed on a Kinetex C18 column to confirm the derivatization of the racemic mixture before switching to the phenyl-hexyl stationary phase for chiral separation. Initially, water was not added as a quencher, which resulted in inconsistent signal response for equal concentrations, probably due to the still partially ongoing derivatization. To terminate the reaction, acidified water with 2% formic acid was added for a final water-acetonitrile ratio of 1:1 in the samples. Due to the signal enhancing effect of the MBIC derivative, the 4-fold dilution of the sample volume did not affect the detectability at LLOQ levels. However, regardless of the optimization, (*S*)- $\alpha$ -OH-MET displayed a sensitivity of about 40% relative to (*S*)-MET at equal concentrations. Since the (*S*)-MET signal response peak achieved the guideline requirements for signal-to-noise ratio at LLOQ but not (*S*)- $\alpha$ -OH-MET, we opted to equalize the signals by preparing a stock solution with a concentration ratio of 1 : 2.5 for MET and  $\alpha$ -OH-MET, respectively, instead of equal values as was originally planned.

### 3.1.3. Optimization of LC-MS/MS conditions

The characteristics and final settings of the LC-MS/MS parameters are summarized in Table S1. The main goal was to acquire signals from (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET that would ensure quantification reproducibility. Various mobile phases composed of methanol and acetonitrile, with and without ammonium formate or formic acid buffers were tested. Optimization of the elution gradient was made to minimize acquisition time, provide adequate peak shapes, and avoid variability in retention times. We found that a moderate elution gradient between 50 and 70% of mobile phase B was essential for good (*S*)- and (*R*)- $\alpha$ -OH-MET resolution. The final gradient from 52 to 65% B in 8 minutes was considered best to balance between shorter elution time for (*S*)-MET and good separation and resolution for (*S*)- $\alpha$ -OH-MET. Acknowledging the fact that (*S*)- $\alpha$ -OH-MET contains two chiral centers, we followed the same approach as previous works where the enantiomers associated with (*S*)-MET metabolism were separated from the ones obtained by (*R*)-MET, without the necessity to further differentiate all four diastereoisomers of its metabolite [9, 17]. Previous reports indicate that (*S*)- $\alpha$ -OH-MET diastereoisomers having the same chiral center as (*S*)-MET eluate with similar retention times, whereas (*R*)- $\alpha$ -OH-MET diastereoisomers elute more closely together [10, 17, 20]. Depending on the separation method, the same elution order is also maintained for MET enantiomers and  $\alpha$ -OH-MET diastereoisomers. Although quantification of (*R*)-MET and (*R*)- $\alpha$ -OH-MET could have been attempted, we did not

proceed to analyze them because of their limited pharmacological effect. Given the optimal conditions mentioned above, final retention times were 4.05, 4.13, 8.13, and 8.24 minutes for (*S*)- $\alpha$ -OH-MET-d5, (*S*)- $\alpha$ -OH-MET, (*S*)-MET-d7, and (*S*)-MET, respectively, and were reproducible across the full concentration ranges. Figures 3 and 4 display representative MRM chromatograms for all four compounds.

All MS parameters were optimized after a full ion mass scan had been performed. No derivatization by-products were detected. Another metabolite, MET acid, was examined when analyzing patient samples because of the same potential transitions of precursor and product ions with MET enantiomers. (*S*)- and (*R*)-MET acid peaks were present on MET chromatograms, but their differences in retention times of over 3 minutes allowed us to reject any possibility of cross-analyte interference. Like (*R*)-MET, quantification of MET acid enantiomers were not performed because of the pharmacological relevance of (*S*)-MET metabolism only. The transitions mentioned earlier for (*S*)-MET, (*S*)- $\alpha$ -OH-MET and their respective IS responded in almost equal ways to differences in EP, DP, CE, and CXP. Thus, the same values for these parameters were applied for their higher mass responses. Figure 2 presents the full MRM scan spectra for both analytes. As shown,  $[M+H]^+$  parent ions had very low intensity during MRM scans relative to product ions, indicating near complete fragmentation.

## **3.2. Method validation**

### **3.2.1. Selectivity and specificity**

Weighted linear and quadratic functions resulted in  $r^2$  values between 0.9906 and 0.9998, and from 0.9964 to 0.9998 for (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET, respectively.

### **3.2.2. Accuracy and precision**

Results for intra-day and inter-day accuracy and precision are summarized in Table 1. Both parameters were within acceptable ranges for (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET. Intra-day accuracy and precision were each contained within 92-106% and 1.6-6.2%, and inter-day values varied within 97-104% and 5.3-11%, respectively. Based on the bioanalytical validation criteria selected, the method was considered accurate and precise.

### **3.2.3. Recovery and matrix effects**

Extraction recovery and ME for the microelution-SPE procedure are summarized in Table 2. Overall, recovery of both analytes was between 69-79% and was reproducible across all QC levels, with an accuracy bias ranging from 2 to 4%. Since the SPE method implied the removal of

phospholipids, both relative and IS-normalized ME were minimized when compared to neat solutions and were comprised between 87-104%, along with precision values ranging from 0.65 to 9.0%. Although higher relative ME were observed for higher concentrations regarding (*S*)-MET, the acceptable levels did not warrant further analyses of potential phospholipid co-elution. The microelution-SPE procedure was therefore considered suitable for this method.

#### **3.2.4. Stability**

Non-derivatized (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET proved to be stable after 8 hours at room temperature, after 3 freeze-thaw cycles, and after 30 days stored at -80°C (Table 3). Reinjection reproducibility was also confirmed with a validated batch (Table 4).

### **3.3. Method application**

Patient samples were analyzed once validation was completed. Blood samplings were collected at random timepoints since the last dose for every patient undergoing MET treatment. (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET quantification was performed without knowledge of individual dosage. The analysis of the cohort samples was performed in a single batch with calibrations curves at the start and end of the batch, along with double blank and blank IS calibrators, rinses, LQC, MQC, and HQC samples. A total of 87 injections were performed in a single continuous run. All calibration and QC samples were within acceptance limits. Representative chromatograms of patient samples are indicated in Figures 3D and 4D. Main MET daily dosage was 84.0 mg  $\pm$  67.7 (median 50.0). Among the 50 patients who constituted the cohort, (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET concentrations were below LLOQ thresholds in two and four samples for each analyte, with ranges between 0.7-118 ng/mL (median 20.0), and 3.2-143 ng/mL (median 20.7) for the remaining ones, respectively (Figure S1). Although concentrations levels were on the lower part of both concentration ranges, they were in accordance with values from other clinical cohorts [7, 35], for which concentrations were almost all comprised within our validated ranges. Thus, quantification of both analytes was successful in samples from patients taken as part of the MHI Hospital Cohort.

### **4. Conclusion**

The combination of isocyanate derivatization and PRM-SPE resulted in a sensitive LC-MS/MS quantification method of pharmacologically active (*S*)-MET and its metabolite (*S*)- $\alpha$ -OH-MET. MBIC proved to be a suitable agent for  $\beta$ -blocker derivatization, as indicated by the high signal response, acceptable intra- and inter-day variabilities, wide linear concentrations ranges, and consistent values upon re-injection reproducibility. The minimization of ME normally

observed with human plasma samples, along with good analyte recovery and reduced sample volumes, demonstrated the benefits of the PRM-SPE procedure to our assay. In addition to the uncomplicated sample preparation and a significantly reduced run time for the chiral analysis of MET and its main metabolite, our method brings a cost advantage compared to previous assays using direct separation that require expensive materials and apparatus. Finally, the measurements obtained in samples from a clinical cohort further established the clinical applicability of our assay. The availability and affordability of the materials used throughout the development of this method could allow for broader applications in a clinical laboratory setting.

### **Funding**

This work was supported by the Université de Montréal Beaulieu-Saucier Chair in Pharmacogenomics and the Montreal Heart Institute Foundation.

## References

- [1] J. Wikstrand, I. Warnold, J. Tuomilehto, G. Olsson, H.J. Barber, K. Eliasson, D. Elmfeldt, B. Jastrup, N.B. Karatzas, J. Leer, et al., Metoprolol versus thiazide diuretics in hypertension. Morbidity results from the MAPHY Study. *Hypertension*. 17(4) (1991) 579-88. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.17.4.579>
- [2] C.W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt, J. Butler, D.E. Casey, Jr., M.H. Drazner, G.C. Fonarow, S.A. Geraci, T. Horwich, J.L. Januzzi, M.R. Johnson, E.K. Kasper, W.C. Levy, F.A. Masoudi, P.E. McBride, J.J. McMurray, J.E. Mitchell, P.N. Peterson, B. Riegel, F. Sam, L.W. Stevenson, W.H. Tang, E.J. Tsai, B.L. Wilkoff, 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 62(16) (2013) e147-239. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.019>
- [3] G. Wahlund, V. Nerme, T. Abrahamsson, P.-O. Sjöquist, The  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenoceptor affinity and  $\beta_1$ -blocking potency of S- and R-metoprolol. *British Journal of Pharmacology*. 99(3) (1990) 592-596. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb12974.x>
- [4] M.S. Lennard, J.H. Silas, S. Freestone, L.E. Ramsay, G.T. Tucker, H.F. Woods, Oxidation phenotype--a major determinant of metoprolol metabolism and response. *N Engl J Med*. 307(25) (1982) 1558-60. <https://doi.org/10.1056/nejm198212163072505>
- [5] V.K. Vashistha, A. Kumar, Stereochemical facets of clinical  $\beta$ -blockers: An overview. *Chirality*. 32(5) (2020) 722-735. <https://doi.org/10.1002/chir.23200>
- [6] A. Gaedigk, M. Ingelman-Sundberg, N.A. Miller, J.S. Leeder, M. Whirl-Carrillo, T.E. Klein, t.P.S. Committee, The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. *Clin Pharmacol Ther*. 103(3) (2018) 399-401. <https://doi.org/10.1002/cpt.910>
- [7] A. Seeringer, J. Brockmoller, S. Bauer, J. Kirchheiner, Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise-induced heart rate. *Eur J Clin Pharmacol*. 64(9) (2008) 883-8. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0504-8>
- [8] B. Yilmaz, S. Arslan, Development and Validation of GC-MS Method for Determination of Metoprolol in Human Urine. *Journal of Chromatographic Science*. 48(8) (2010) 613-617. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.8.613>
- [9] I. Baranowska, W. Adolf, S. Magiera, Enantioselective determination of metoprolol and its metabolites in human urine high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) and tandem mass spectrometry (MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1004 (2015) 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.019>
- [10] V.B. Boralli, E.B. Coelho, P.M. Cerqueira, V.L. Lanchote, Stereoselective analysis of metoprolol and its metabolites in rat plasma with application to oxidative metabolism. *Journal of Chromatography B*. 823(2) (2005) 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.038>
- [11] P. Sharma, P. Contractor, S. Guttikar, D.P. Patel, P.S. Shrivastav, Development of a sensitive and rapid method for quantitation of (S)-(-)- and (R)-(+)-metoprolol in human plasma by chiral LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 4(1) (2014) 63-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.008>
- [12] M.M. Bhatti, R.T. Foster, Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of metoprolol. *J Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*. 579(2) (1992) 361-5. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80405-F](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80405-F)

- [13] V. Lanchote, P. Bonato, P. Cerqueira, V. Pereira, E. Cesarino, Enantioselective analysis of metoprolol in plasma using high-performance liquid chromatographic direct and indirect separations: Applications in pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 738 (2000) 27-37. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00476-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00476-4)
- [14] K.H. Kim, J.H. Lee, M.Y. Ko, K.S. Shin, J.S. Kang, W.C. Mar, J.R. Youm, Determination of metoprolol enantiomers in human urine by GC-MS using (-)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride as a chiral derivatizing agent. *Chromatographia* 55(1) (2002) 81-85. <https://doi.org/10.1007/BF02492319>
- [15] V. David, S.C. Moldoveanu, T. Galaon, Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biodmed Chromatogr.* 35(1) (2021) e5008. <https://doi.org/10.1002/bmc.5008>
- [16] A. Khedr, A.N. Khayyat, A.-N.A. El-Shorbegi, A.K. Kammoun, A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of five  $\beta$ -blockers after labeling with either hydrazonoyl chloride or dansyl chloride reagent. *Journal of Chromatography B*. 1160 (2020) 122383. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122383>
- [17] B. Mistry, J.L. Leslie, N.D. Eddington, Enantiomeric separation of metoprolol and  $\alpha$ -hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 758(2) (2001) 153-61. [https://10.1016/s0378-4347\(01\)00166-9](https://10.1016/s0378-4347(01)00166-9)
- [18] B.P. Jensen, C.F. Sharp, S.J. Gardiner, E.J. Begg, Development and validation of a stereoselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of S- and R-metoprolol in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 865(1-2) (2008) 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.02.006>
- [19] H. Elmongy, H. Ahmed, A.A. Wahbi, A. Amini, A. Colmsjo, M. Abdel-Rehim, Determination of metoprolol enantiomers in human plasma and saliva samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 30(8) (2016) 1309-17. <https://dx.doi.org/10.1002/bmc.3685>
- [20] P.M. Cerqueira, E.J. Cesarino, C. Bertucci, P.S. Bonato, V.L. Lanchote, Stereoselective metabolism of metoprolol: Enantioselectivity of  $\alpha$ -hydroxymetoprolol in plasma and urine. *Chirality*. 15(6) (2003) 542-549. <https://doi.org/10.1002/chir.10244>
- [21] K. Goryński, A. Kiedrowicz, B. Bojko, Development of SPME-LC-MS method for screening of eight beta-blockers and bronchodilators in plasma and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 127 (2016) 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.001>
- [22] O.A. Ismaiel, T. Zhang, R.G. Jenkins, H.T. Karnes, Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878(31) (2010) 3303-16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.012>
- [23] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*. 852(1) (2007) 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>
- [24] D. Koller, P. Zubiaur, M. Saiz-Rodríguez, F. Abad-Santos, A. Wojnicz, Simultaneous determination of six antipsychotics, two of their metabolites and caffeine in human plasma by LC-MS/MS using a phospholipid-removal microelution-solid phase extraction method for sample preparation. *Talanta*. 198 (2019) 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.112>
- [25] J.-B. Ma, L.-M. Zhao, Q.-H. Rui, Y.-F. Liao, Y.-M. Chen, J. Xu, Y. Zhu, Y.-G. Zhao, Application of carbon nanosorbent for PRiME pass-through cleanup of 10 selected local anesthetic

- drugs in human plasma samples. *Analytica Chimica Acta*. 960 (2017) 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.033>
- [26] M.F. Alpendurada, Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J Chromatogr A*. 889(1-2) (2000) 3-14. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00453-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00453-2)
- [27] Y.-J. Xue, J.B. Akinsanya, J. Liu, S.E. Unger, A simplified protein precipitation/mixed-mode cation-exchange solid-phase extraction, followed by high-speed liquid chromatography/mass spectrometry, for the determination of a basic drug in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20(18) (2006) 2660-2668. <https://doi.org/10.1002/rcm.2645>
- [28] U.S. Department of Health and Human Services, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>, (2018).
- [29] A.D. Nicolò, M. Cantù, A. D'Avolio, Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis*. 9(14) (2017) 1093-1105. <https://10.4155/bio-2017-0059>
- [30] V. Turcot, J. Brunet, C. Daneault, J.C. Tardif, C. Des Rosiers, G. Lettre, Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank, *J Hum Nutr Diet*. 28(6) (2015) 646-658. <https://doi.org/10.1111/jhn.12272>
- [31] Y. Xu, L. Du, E.D. Soli, M.P. Braun, D.C. Dean, D.G. Musson, Simultaneous determination of a novel KDR kinase inhibitor and its N-oxide metabolite in human plasma using 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 817(2) (2005) 287-96. <https://10.1016/j.jchromb.2004.12.019>
- [32] X.X. Sun, L.Z. Sun, H.Y. Aboul-Enein, Chiral derivatization reagents for drug enantioseparation by high-performance liquid chromatography based upon pre-column derivatization and formation of diastereomers: enantioselectivity and related structure. *Biomed Chromatogr*. 15(2) (2001) 116-132. <https://doi.org/10.1002/bmc.41>
- [33] K.H. Kim, T.K. Kim, Y.H. Kwon, Y.T. Sohn, Resolution of salbutamol enantiomers in human urine by reversed-phase high performance liquid chromatography after derivatization with (S)-(-)-alpha-methylbenzyl isocyanate. *Arch Pharm Res*. 20(5) (1997) 486-90. <https://doi.org/10.1007/BF02973945>
- [34] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review. *J Pharm Biomed Anal*. 47(1) (2008) 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.013>
- [35] J.A. Batty, A.S. Hall, H.L. White, J. Wikstrand, R.A. de Boer, D.J. van Veldhuisen, P. van der Harst, F. Waagstein, A. Hjalmarson, J. Kjekshus, A.J. Balmforth, M.-H.S. Group, An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. *Clin Pharmacol Ther*. 95(3) (2014) 321-30. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.193>



**Table 1.** Intra- and inter-run accuracy and precision for (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET derivatives.

Nominal concentrations (ng/mL), QC level	Intra-run values (n=6; one day)			Inter-run values (n=18; three days)		
	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
<b>(<i>S</i>)-metoprolol</b>						
<b>0.500, LLOQ</b>	0.504	100.7	6.2	0.502	100.4	6.3
<b>1.50, LQC</b>	1.39	92.3	2.4	1.49	99.6	6.9
<b>30.0, MQC</b>	29.2	97.4	1.6	30.0	100.0	5.3
<b>400, HQC</b>	378	94.6	1.9	400	100.0	11.3
<b>(<i>S</i>)-<math>\alpha</math>-OH-MET</b>						
<b>1.25, LLOQ</b>	1.28	102.5	5.3	1.30	104.3	6.6
<b>3.75, LQC</b>	3.69	98.5	4.6	3.64	97.0	7.4
<b>75.0, MQC</b>	79.5	105.8	1.7	73.7	98.3	8.7
<b>400, HQC</b>	425	106.3	3.2	400	100.0	7.1

QC: Quality control sample; LLOQ: Lower limit of quantification; LQC: Low-level quality control; MQC: Medium-level quality control; HQC: High-level quality control.

**Table 2.** Recovery and matrix effects for mixed-mode, cationic PRM-SPE of (*S*)-MET and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET derivatives (n=6).

Nominal concentrations (ng/mL), QC level	Absolute recovery			Matrix effects (6 different lots of plasma)					
				Relative			IS-normalized		
	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
<b>(<i>S</i>)-metoprolol</b>									
<b>1.50, LQC</b>	1.12	74.9	4.1	1.51	100.7	9.0	1.54	102.9	5.6
<b>30.0, MQC</b>	20.8	69.4	2.3	29.2	97.2	5.0	29.5	98.3	0.6
<b>400, HQC</b>	293	73.3	5.5	347	86.9	2.6	416	104.0	1.6
<b>(<i>S</i>)-<math>\alpha</math>-OH-MET</b>									
<b>3.75, LQC</b>	2.95	78.7	3.4	3.45	99.2	6.9	3.84	102.3	4.0
<b>75.0, MQC</b>	53.6	71.5	3.2	73.7	98.3	5.3	77.1	102.6	4.2
<b>400, HQC</b>	296	74.1	3.8	372	93.2	5.8	412	102.9	3.7

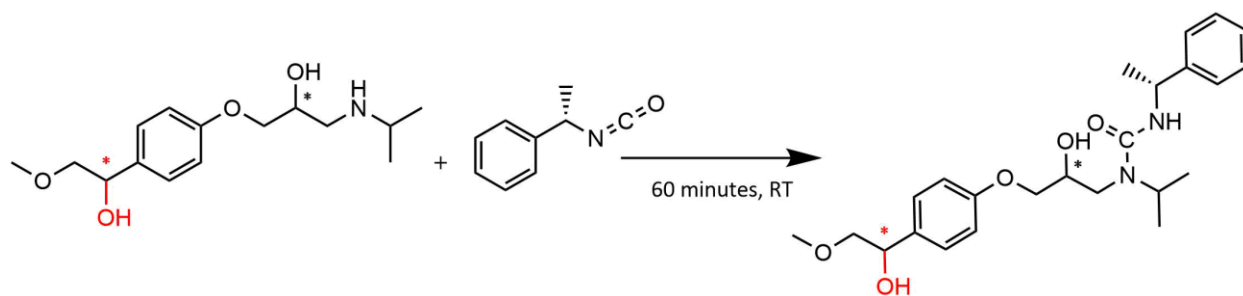
**Table 3.** Stability of (S)-MET and (S)- $\alpha$ -OH-MET derivatives (n=4).

Storage conditions	QC levels	(S)-MET			(S)- $\alpha$ -OH-MET		
		Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	Real concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
Benchtop stability, 8h (RT)	LQC	1.49	99.1	3.9	3.63	96.9	4.2
	HQC	403	100.8	1.1	416	104.3	2.8
Freeze-thaw stability, 3 cycles (-80°C)	LQC	1.43	95.1	5.2	3.47	92.5	2.3
	HQC	379	94.6	0.6	370	92.5	3.4
Long-term stability, 30 days (-80°C)	LQC	1.47	97.9	3.9	4.06	108.5	4.6
	HQC	399	99.8	1.6	387	96.8	0.8

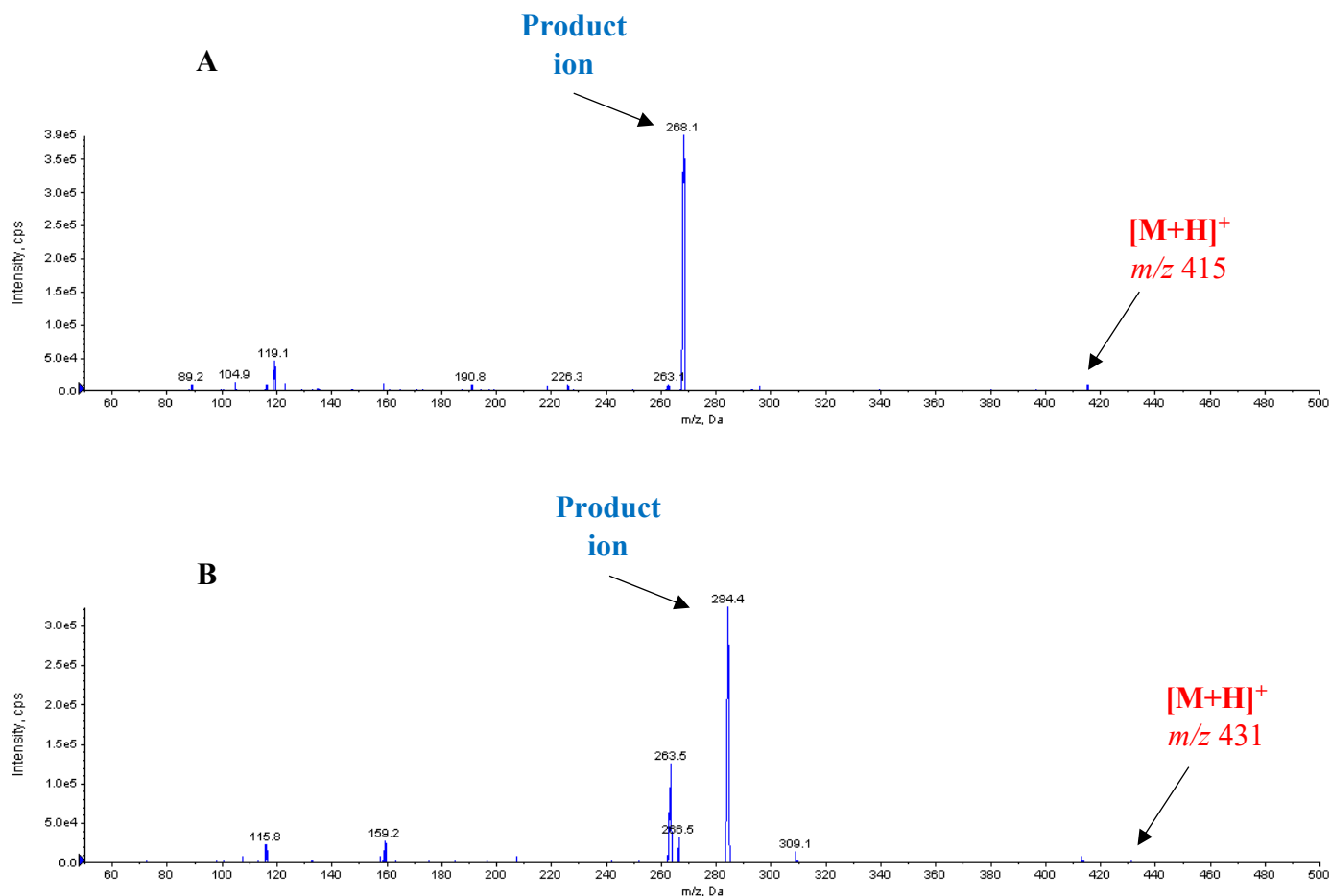
RT: Room temperature.

**Table 4.** 8-day reinjection reproducibility of a previously validated run of (S)-MET and (S)- $\alpha$ -OH-MET derivatives (n=6) under autosampler conditions, quantified against a calibration curve.

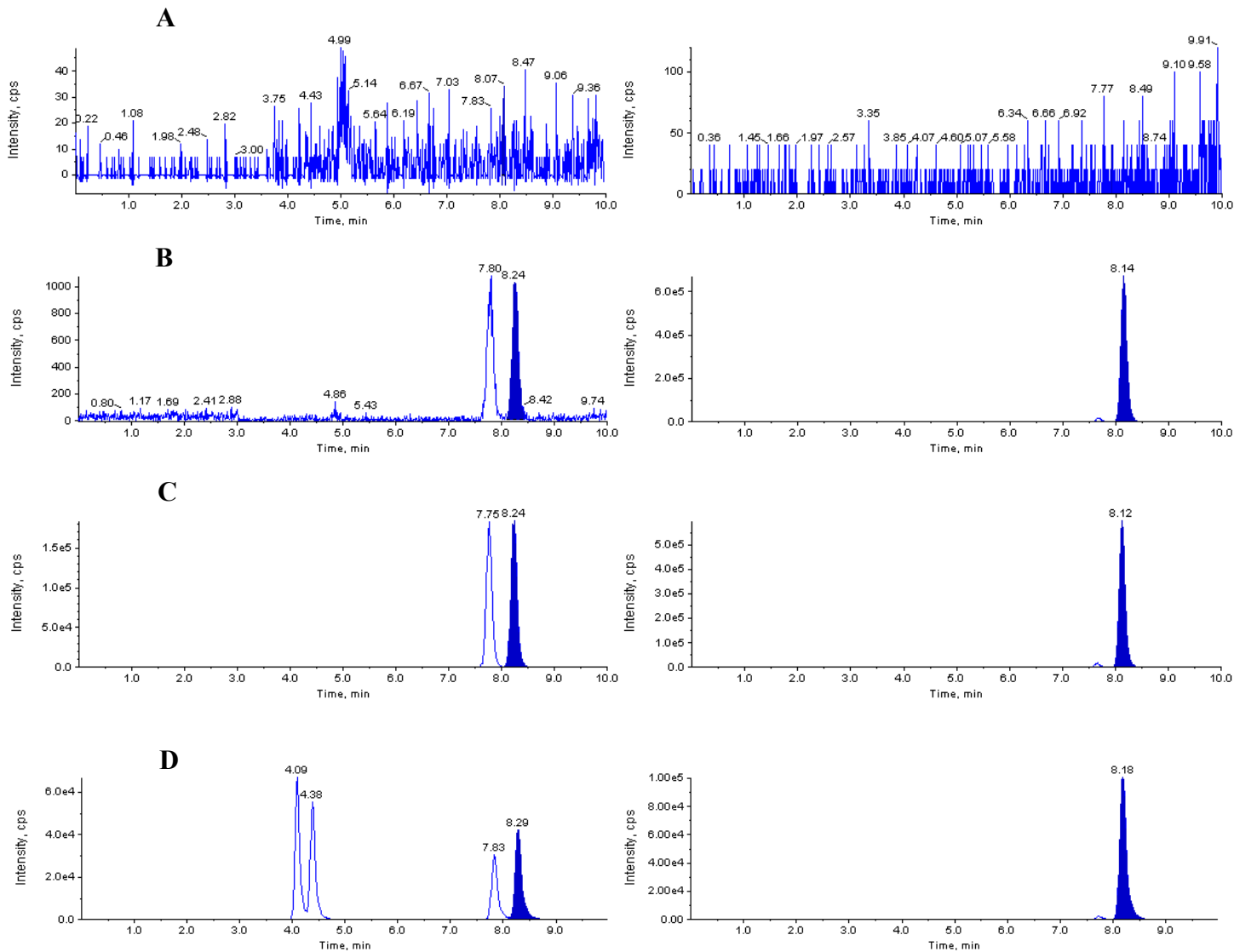
Analyte	Nominal concentrations (ng/mL), QC level	Real concentrations (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
(S)-MET	0.500, LLOQ	0.523	104.7	2.6
	1.50, LQC	1.41	93.7	7.7
	30.0, MQC	31.8	106.0	1.9
	400, HQC	367	91.9	9.5
(S)- $\alpha$ -OH-MET	1.25, LLOQ	1.37	109.5	3.9
	3.75, LQC	3.53	94.1	3.3
	75.0, MQC	79.3	105.7	1.9
	400, HQC	410	102.5	2.6



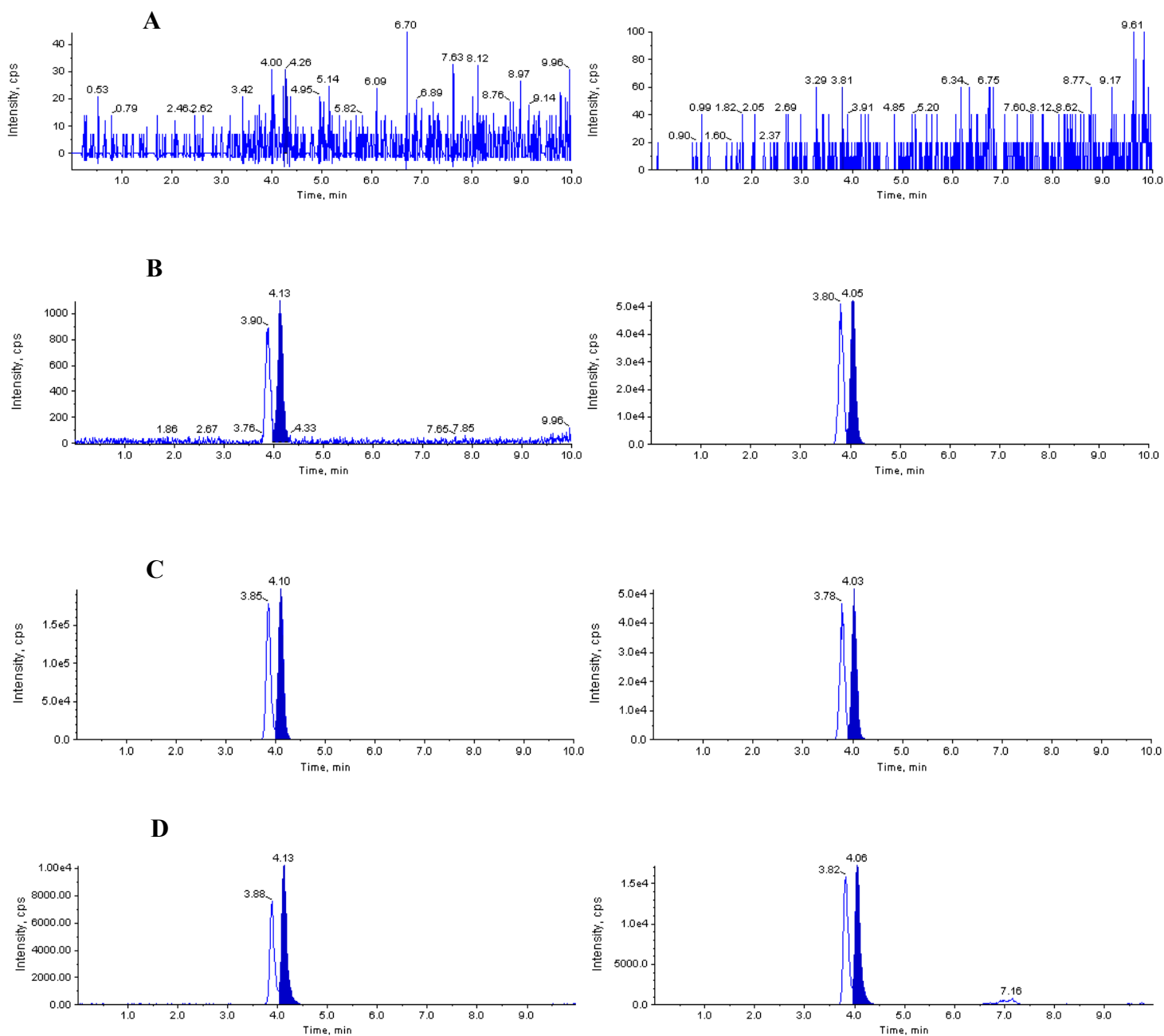
**Figure 1.** Schematic representation of the derivatization reaction of MET and  $\alpha$ -OH-MET (red) with MBIC. RT: Room temperature.



**Figure 2.** Product ion mass spectra of ions of A) *S*-MET and B) *S*- $\alpha$ -OH-MET. Negligible peaks are indicated for precursor ions, which signifies near-complete fragmentation of the derivatized analytes.



**Figure 3.** Representative LC-MS/MS chromatograms of A) blank plasma, B) plasma spiked with racemic MET at LLOQ, C) plasma spiked with 200 ng/mL racemic MET, and D) a representative patient sample. Distinct peaks of MET acid enantiomers can be seen on the last panel. (*S*)-MET peaks are shown in the left pane, and (*S*)-MET-d7 (250 ng/mL) in the right pane.



**Figure 4.** Representative LC-MS/MS chromatograms of A) blank plasma, B) plasma spiked with racemic  $\alpha$ -OH-MET at LLOQ, C) plasma spiked with 500 ng/mL racemic  $\alpha$ -OH-MET, and D) a representative patient sample. (*S*)- $\alpha$ -OH-MET peaks are shown in the left pane, and (*S*)- $\alpha$ -OH-MET-d5 (125 ng/mL) in the right pane.

### 3 Discussion

Des progrès considérables ont été faits depuis les premières méthodes de séparation optique impliquant des  $\beta$ -bloqueurs.<sup>346</sup> Grâce aux résultats publiés ci-haut, nous avons démontré que la combinaison des méthodes bioanalytiques utilisées à la fois pour la purification d'échantillons plasmatiques, pour la séparation chirale et pour la détection d'énantiomères permettait de surmonter les problématiques identifiées dans la littérature scientifique antérieure.<sup>346</sup> Selon nos recherches, la combinaison de ces méthodes n'avait jamais été rapportée pour la quantification d'analytes chiraux, encore moins pour celle du métoprolol et de ses métabolites. Par l'entremise de ce projet, nous avons pu non seulement démontrer la validité bioanalytique de notre approche selon des lignes directrices rigoureuses émises par la FDA, mais aussi son applicabilité clinique grâce à une petite cohorte observationnelle.

Lorsqu'ils ne sont pas les analytes d'intérêt, la présence de phospholipides constitue l'une des plus grandes sources d'interférences en bioanalyse.<sup>438</sup> Des effets de matrice importants sont générés lorsqu'une méthode de détection par ionisation est utilisée,<sup>430</sup> comme la LC-MS/MS. Afin de minimiser la suppression ou la potentialisation des signaux, plusieurs techniques de purification d'échantillons ont été mises au point pour les matrices biologiques (*e.g.* plasma). Cependant, les nombreuses formes de phospholipides endogènes présents dans ces matrices ne parviennent pas à être retirées en quantités suffisantes par la majorité des techniques traditionnelles afin d'éliminer les signaux d'interférences.<sup>431</sup> Ultimement, la présence résiduelle de ces entités peut affecter la reproductibilité des méthodes bioanalytiques.<sup>431</sup>

Pour le développement de notre méthode chirale, ce facteur était critique à sa validation. En effet, dû à la présence excessive de phospholipides, des données publiées antérieures montraient que la mesure des concentrations d'énantiomères du carvédilol, dont les propriétés physico-chimiques sont analogues à celles du métoprolol, demeurerait variable même avec l'ajout d'un standard interne isotopique pouvant corriger les fluctuations d'appareil LC-MS/MS.<sup>439</sup> Ces considérations méthodologiques nous ont exigé à utiliser la SPE comme technique de purification. Des extraits plus propres peuvent être obtenus, ce qui augmente la sensibilité des méthodes et permet l'utilisation de volumes d'échantillon plus faibles.<sup>430</sup> En effet, 50  $\mu$ L de plasma ont été requis pour une gamme de concentrations quantifiables entre 0.5-500 ng/mL. À la connaissance de notre groupe, les méthodes utilisées utilisaient entre 100-1000  $\mu$ L. Des techniques variées de

SPE ont démontré une excellente efficacité à retirer les phospholipides et à extraire des médicaments en milieux biologiques,<sup>435,436</sup> incluant des composés à pH alcalins<sup>434</sup> comme le métoprolol.

En plus de l'emploi de la SPE, la nature basique du métoprolol nous a permis d'employer cette technique selon la technologie PRiME (*process, robustness, improvements, matrix effects, ease of use*). Utilisées sous forme de cartouches SPE, la technologie PRiME nécessite moins de manipulations, de conditionnement et de volumes de solvants pour extraire les analytes, les effets de matrice étant quasiment nuls.<sup>435,436</sup> La technologie SPE de microélution par échange cationique, spécifique à notre projet, emploie un adsorbant anionique greffé à la paroi interne de celles-ci pour la rétention des composés chargés positivement et qui démontrent une certaine lipophilicité.<sup>434</sup> Ces conditions étaient appropriées pour l'analyse du métoprolol et de son métabolite  $\alpha$ -hydroxymétoprolol, d'autant plus que cette technologie à microélution n'a que rarement été utilisée dans la littérature scientifique. Clairement, nous avons pu optimiser les usages de SPE précédemment rapportés dans notre méta-analyse (**Chapitre 2**) pour la quantification chirale du métoprolol.<sup>339</sup>

Tel que mentionné au début de ce chapitre et dans le manuscrit, la dérivation a été utilisée à plusieurs reprises et avec différents réactifs afin de séparer les énantiomères du métoprolol. La dérivation des amines est généralement faite à l'aide de composés isothiocyanates à cause de leur affinité supérieure pour ce groupement relativement aux autres dérivatifs.<sup>346,440</sup> La pureté de notre éluat issu de la technologie SPE PRiME peut être l'élément nous ayant permis d'utiliser un agent isocyanate et d'obtenir une réaction aussi efficace. La potentialisation des signaux des analytes dérivés et la réduction d'impuretés peuvent être tributaires de la haute sensibilité de notre méthode.

Une première critique de notre méthode est l'absence de séparation complète des quatre diastéréoisomères du métabolite  $\alpha$ -hydroxymétoprolol. Quoique cet aspect puisse paraître comme une limite, la formation de paires de diastéréoisomères est plutôt judicieuse. En effet, cela rend possible la quantification simultanée des deux métabolites directement issus de l'hydroxylation du (*S*)-métoprolol, soient le (*S,S*)- et le (*S,R*)- $\alpha$ -hydroxymétoprolol. Cette rationnelle nous a permis de réduire de façon majeure les temps d'analyse observés pour des méthodes chirales antérieures.<sup>428,441</sup> Notamment, des résultats de plusieurs groupes ont servi à établir l'ordre d'élution des quatre diastéréoisomères pour finalement confirmer que les métabolites hydroxylés du (*S*)-



métoprolol éluaient ensemble, pareillement pour les diastéréoisomères issus du métabolisme du (*R*)-métoprolol,<sup>442,443</sup> à savoir le (*R,S*)- et le (*R,R*)- $\alpha$ -hydroxymétoprolol. Le centre chiral déjà présent sur le métoprolol serait tributaire de la séparation chromatographique observée, tandis que l'hydroxylation subséquente, formant un second centre optique, aurait des impacts négligeables sur les temps de rétention. Conséquemment, notre méthode correspond exactement aux besoins ciblés lors de sa conception, puisque nous avons établi l'analyse chirale de l'énantiomère pharmacologiquement actif du métoprolol et de ses métabolites produits par le CYP2D6.

Une seconde observation relevant de la spécificité de notre méthode serait la détection de deux énantiomères d'un autre métabolite, l'acide de métoprolol. Alors que la haute résolution obtenue de ces énantiomères semble adaptée à sa quantification, les données les plus exhaustives suggèrent que ce métabolite serait formé à partir d'un métabolisme double du CYP2D6, en commençant par une *O*-déméthylation, suivie d'une oxydation secondaire.<sup>444</sup> Cela dit, ces produits enzymatiques ne résultent pas nécessairement du métabolisme du (*S*)-métoprolol<sup>337</sup> et seraient accessoires à l'évaluation métabolique du CYP2D6.

Pour apprécier l'applicabilité clinique de notre méthode, nous avons sélectionné aléatoirement 50 des 1007 échantillons de patients provenant de la cohorte utilisée pour notre étude clinique, dont traitera entièrement le prochain chapitre. Nos valeurs ont indiqué des concentrations circulantes comparables à celles obtenues dans l'étude PGx de MERIT-HF<sup>381</sup> et selon le même ordre de grandeur que d'autres cohortes observationnelles.<sup>339,389</sup> Il est possible d'entrevoir ces techniques bioanalytiques être appliquées à d'autres classes pharmacologiques. En effet, certaines molécules comme le bupropion, la sertraline et l'oméprazole, les deux premières étant respectivement utilisées en soins psychiatriques et la troisième pour les ulcères gastrointestinaux, possèdent des structures chimiques similaires au métoprolol, les rendant appropriées pour la dérivation chirale par isocyanate. D'autant plus que les formes énantiomériques pharmacologiquement actives (*i.e.* ésoméprazole) soient également commercialisées, les méthodes bioanalytiques chirales recensées rencontrent des limites semblables à celles abordées dans ce chapitre.<sup>445,446</sup> Des recommandations PGx ont également été émises pour ces médicaments avec les génotypes de certains CYPs afin d'ajuster leur dosage selon le phénotype de certains CYPs.<sup>137,447,448</sup> Dans la mesure où des associations PK-PGx puissent être identifiées avec ces médicaments, il pourrait être intéressant d'employer une méthode chirale afin de regrouper les

patients prenant la formulation énantiomérique et ceux avec la forme racémique de chaque médicament pour mesurer l'énantiomère actif et augmenter l'échantillonnage des cohortes investiguées.

Ainsi, nous avons démontré que l'utilisation de la purification par SPE avec technologie en microélution PRiME, couplée à la dérivation chirale, permettent de surmonter les défis bioanalytiques posés par les méthodes chirales précédemment élaborées.

## **Chapitre 4 : Identification de déterminants pharmacogénétiques par mesures des concentrations plasmatiques de métoprolol à l'aide d'une biobanque**

### **1 Introduction**

Les deux dernières décennies ont vu une augmentation exponentielle de l'utilisation des grandes cohortes observationnelles afin d'identifier des marqueurs génétiques physiopathologiques<sup>76,117</sup> et prédictifs de la réponse PGx.<sup>70</sup> Renfermant elles aussi des cohortes longitudinales et des biospécimens de patients, les biobanques ne font pas exception à cette pratique, quoique leur usage en recherche à des fins PGx demeure relativement restreint.<sup>245</sup> Malgré toutes les données disponibles dans la littérature scientifique, il ne semble pas exister d'essais observationnels à portée PK-PGx maximisant leur potentiel d'application à des cohortes hospitalières ou populationnelles, où des mesures de concentrations de médicaments pairées à l'information génétique et autres variables cliniques des patients sont requises.<sup>241</sup>

Des travaux intéressants permettent d'espérer qu'une preuve de concept selon laquelle les grandes cohortes observationnelles puissent être utilisées à identifier des associations PK-PGx prédictives des concentrations de médicaments soit atteignable. Il y a déjà quelques années, DeGorter *et al.* rapportaient que la quantification plasmatique de statines et de stéroïdes, en parallèle au génotypage de cibles PGx connues envers ces thérapies, avait permis d'associer leurs concentrations plasmatiques respectives aux doses quotidiennes, mais aussi de déterminer par régressions linéaires multiples l'impact des polymorphismes génétiques sur ces seuils.<sup>449</sup> L'élaboration d'un algorithme de dosage fondé sur des paramètres cliniques et PGx dans une cohorte rétrospective issue de BioVU menait aux mêmes conclusions, sans que les associations entre l'information PGx et la dose ne s'avèrent toutefois significatives.

Si l'on considère les limitations d'un tel cadre méthodologique, les biobanques à grand déploiement renfermant de grandes cohortes observationnelles deviennent cruciales à l'avancement de ce type de recherche PK- et PD-PGx. En effet, tenant compte du recrutement prospectif et monocentrique de seulement ~300 patients échelonnés sur deux ans et le pourcentage très élevé de variabilité expliquée par les variants PGx ciblés,<sup>449</sup> il est difficile de percevoir une application pangénomique statistiquement puissante. Le nombre insuffisant de patients afin de

mener des GWAS-PGx, du moins pour des traits PGx complexes, en plus du manque probable de reproductibilité nécessaire à la validation pourraient devenir des inconvénients majeurs à mesure que le domaine progresse.

D'après les travaux présentés au **Chapitre 2** de cette thèse, l'association PK-PGx entre le CYP2D6 et le métoprolol s'avérait être une association intéressante à reproduire à l'aide d'une grande cohorte observationnelle pour l'identification de variants PGx prédictifs des concentrations de médicaments. À cette fin, nous avons entrepris de recruter des patients issus de la Cohorte Hospitalière de l'ICM et inclus dans sa biobanque institutionnelle. D'autres publications issues de notre centre de recherche résument bien le processus de recrutement et de collecte des données.<sup>450</sup> Brièvement, le recrutement s'effectue à la fois directement lors de consultations médicales ou par campagnes publicitaires. Suivant l'obtention du consentement éclairé des participants volontaires et par l'entremise de questionnaires, des informations sociodémographiques, biomédicales et médicamenteuses, psychologiques et reliées aux habitudes de vie sont collectées, entre autres, en plus de prélèvements sanguins. À l'exception des données inscrites aux dossiers médicaux, celles-ci demeurent protégées dans son réseau informatique. Grâce à l'inclusion possible de participants non-issus directement de l'ICM, cette preuve de concept à l'aide d'une biobanque de cohorte permettrait d'étendre la faisabilité de notre approche chez les biobanques populationnelles.

Les résultats de notre méta-analyse démontrent également que des associations PD-PGx entre CYP2D6 et la FC, la TAS/TAD et la survenue de bradycardie seraient présentes pour les patients avec différents phénotypes inférés du CYP2D6. Ces associations ont été précédemment observées à l'aide de cohortes prospectives sous un devis PK traditionnel ou dans le cadre d'une sous-étude d'essai randomisé. Donc, le recours aux biobanques de cohortes pourrait suffire à identifier des déterminants PGx prédictifs non seulement des profils PK ou des concentrations plasmatiques de médicaments, mais aussi des paramètres hémodynamiques associés aux  $\beta$ -bloqueurs ou à d'autres classes pharmacologiques. Le dosage pourrait également être un paramètre où des associations PGx significatives sont découvertes.

D'après les résultats obtenus précédemment, les objectifs spécifiques à ce projet étaient les suivants, tels que décrit dans le protocole de recherche ayant servi à sa conception :

- i. Répliquer l'association entre le polymorphisme génétique ou phénotypes inférés de *CYP2D6* et les concentrations plasmatiques moyennes de métoprolol ajustées aux doses individuelles des participants inclus;
- ii. Évaluer l'impact de l'association *CYP2D6*-métoprolol sur les paramètres cliniques comme la FC et la dose quotidienne de tartrate de métoprolol

Bien que notre groupe ait développé une méthode de quantification chirale pour le métoprolol, la taille d'échantillon utilisée pour cette étude exigeait que la portion bioanalytique soit exécutée rapidement. Afin d'alléger les manipulations et de réduire le temps d'analyse, il a été convenu de développer une méthode non-chirale simplifiée. En optant pour la mesure des concentrations racémiques, des temps d'analyse de 15 minutes par échantillon ont pu être réduits à seulement 4 minutes par échantillon, donc une réduction de plus de trois fois les délais initiaux. Cette décision fût prise selon les données antérieures de la littérature qui suggéraient que l'association entre les phénotypes du *CYP2D6* et les concentrations plasmatiques de métoprolol était observable autant d'un point de vue racémique que chirale. Ces affirmations s'avéraient valables pour les concentrations plasmatiques moyennes<sup>451</sup> et les valeurs de  $C_{max}$ ,<sup>292</sup> à la fois chez les participants sains<sup>411</sup> et les patients malades, qu'ils soient naïfs<sup>387</sup> ou qu'ils aient été précédemment exposés au métoprolol.<sup>330</sup>

Donc, alors qu'il puisse sembler contre-productif de ne pas avoir eu recours aux nouvelles méthodes bioanalytiques développées pour la quantification chirale de  $\beta$ -bloquants, la mesure des valeurs racémiques ne diminuait pas la qualité scientifique du projet et comptait optimiser son déroulement. Notons également la création de connaissances par cette nouvelle méthode qui surmontent les défis bioanalytiques précédents et qui pourront être reprises par d'autres groupes de recherches pour cette classe de médicaments, voire pour d'autres classes thérapeutiques où la quantification chirale s'avère judicieuse, tel que discuté au **Chapitre 3**.

Une grande variabilité des niveaux de concentrations plasmatiques a été observée dans les publications antérieures, indiquant qu'un large domaine de valeurs de concentrations puisse être attendu pour le métoprolol. Dans le contexte de cet essai où un échantillon de sang aléatoire sera utilisé, nous prévoyons une plus grande variabilité dans les mesures. Ainsi, sur la base des données

précédentes, et en augmentant la variance d'une cohorte à 350 ng/ml, nous prévoyons qu'une puissance statistique ( $1-\beta$ ) de 85% sera obtenue en mesurant des concentrations de 20 ng/ml dans le groupe UM (n=20), 40 ng/ml dans le groupe EM (n=800), 80 ng/ml dans le groupe IM (n=100) et 180 ng/ml dans le groupe PM (n=80) avec un seuil de significativité  $\alpha=0,05$ .

**Leveraging large observational studies to discover genetic determinants of drug concentrations: A proof-of-concept study.**

Maxime Meloche, BSc,<sup>1,2,3</sup> Grégoire Leclair, BPharm, PhD,<sup>1</sup> Martin Jutras, BSc,<sup>1</sup> Essaïd Oussaïd, MSc,<sup>2,3</sup> Marie-Josée Gaulin, MSc,<sup>2,3</sup> Ian Mongrain, MSc,<sup>2,3</sup> David Busseuil, PhD,<sup>2,3</sup> Jean-Claude Tardif, MD<sup>2,3,4</sup> Marie-Pierre Dubé, PhD,<sup>2,3,4</sup> & Simon de Denus, BPharm, MSc, PhD,<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy and <sup>4</sup> Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec

<sup>2</sup> Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec

<sup>3</sup> Université de Montréal Beaulieu-Saucier Pharmacogenomics Center, Montreal, Quebec

**Address for correspondence:**

Simon de Denus, B.Pharm, PhD

Montreal Heart Institute

5000 Bélanger St, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada

Tel.: 514-376-3330; Fax: 514-375-1355

E-mail: [simon.dedenus@icm-mhi.org](mailto:simon.dedenus@icm-mhi.org)

**Conflict of interest statement**

S.D. reports grants outside the submitted work from Pfizer, AstraZeneca, and RMS/Dalcor. A patent pertaining to pharmacogenomics-guided CETP inhibition was granted and J.C.T. and M.P.D. are mentioned as authors. J.C.T. and M.P.D. have a minor equity interest in DalCor. J.C.T. has received research grants from Amarin, AstraZeneca, DalCor, Esperion, Ionis, Sanofi and Servier; honoraria from DalCor, Pfizer, Sanofi, and Servier. M.P.D. has received honoraria from Dalcor, GSK and Illumina, and has research support (access to samples and data) from AstraZeneca, Pfizer, Servier, Sanofi, and GlaxoSmithKline. All other authors declared no competing interests for this work.

## **Funding**

This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the Université de Montréal Beaulieu-Saucier Chair in Pharmacogenomics (S.D.), the Molson Foundation (S.D.), the Université de Montréal Faculty of Pharmacy (M.M.), and the Université de Montréal department of Higher Education and Postdoctoral Studies (M.M.).

**Key words:** pharmacogenomics; pharmacogenetics; phenotype; genotype; metabolism.



## Abstract

Large, observational genetic studies are commonly used to identify genetic factors associated with diseases and disease-related traits. Such cohorts have not been commonly used to identify genetic predictors of drug dosing or concentrations, perhaps because of the heterogeneity in drug dosing and formulation, and the random timing of blood sampling. We hypothesized that large sample sizes relative to traditional pharmacokinetic studies would compensate for this variability and enable the identification of pharmacogenetic predictors of drug concentrations. We performed a cross-sectional, proof-of-concept association study to replicate the well-established association between metoprolol concentrations and *CYP2D6* genotype-inferred metabolizer phenotypes in participants from the Montreal Heart Institute Hospital Cohort undergoing metoprolol therapy. Plasma concentrations of metoprolol and  $\alpha$ -hydroxymetoprolol ( $\alpha$ -OH-metoprolol) were measured in samples collected randomly regarding the previous metoprolol dose. A total of 999 individuals were included. The metoprolol daily dose ranged from 6.25mg to 400mg (mean  $84.3 \pm 57.1$  mg). *CYP2D6*-inferred phenotype was significantly associated with both metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol in unadjusted and adjusted models (all  $p < 10^{-12}$ ). Models for metoprolol daily dose showed consistent results. Our study suggests that randomly drawn blood samples from biobanks can serve as a new approach to discover genetic associations related to drug concentrations and dosing, with potentially broader implications for genome-wide association studies on the pharmacogenomics of drug metabolism.

## Introduction

The discovery of pharmacogenomic (PGx) determinants influencing drug concentrations, dosing, and overall pharmacokinetics (PK) is critical to the emergence of precision medicine.(1) Typical PGx-PK studies generally involve small to medium sample sizes ( $n < 100$ ) using “classic” PK study designs.(2) Although classic PK studies are indispensable to determine the PK parameters of a drug, such as its half-life and clearance, they present several limitations to discover new PGx markers. First, these studies are generally limited to one drug and require multiple blood samples taken at specific intervals, which are not routinely performed outside this context.(3) Thus, costly investigations necessitating the recruitment of new patients are generally required for each study. Second, because they usually include few patients, they are underpowered to identify common genetic determinants that have a modest effect on a drug’s concentrations, or rare genetic factors that could have a major impact on dosing requirements.

Large, observational genetic studies have been used successfully to identify genetic factors associated with diseases and traits.(4-6) Most commonly, data are collected on multiple conditions or phenotypes and are being leveraged to conduct genetic association studies on multiple phenotypes. Because blood samples are frequently drawn at baseline in these studies, we hypothesized that such studies could also be used to identify new genetic predictors of drug concentrations. Although it could be argued that the random timing of blood sampling since the last dose taken, as well as the variability in drug dosing, formulation, and manufacturer could instill too much heterogeneity for such an approach, we hypothesized that using large sample size would compensate for this variability.

The cytochrome P450 (CYP) 2D6 is involved in the hepatic metabolism of drugs.(7) Over 140 genetic variants of *CYP2D6* have been reported and their impacts range from null to increased metabolic activity.(8) A harmonized classification of CYP2D6 genotype-inferred metabolising phenotypes based on their cumulative impact was recently brought forward by major PGx consortia. (8) Four phenotypes are established, including poor (PM), intermediate (IM), normal (NM), and ultrarapid metabolizers (UM).

Metoprolol is a lipophilic  $\beta_1$ -adrenergic receptor antagonist used to treat various cardiovascular conditions, including angina, atrial fibrillation, and hypertension. It is primarily metabolized by CYP2D6 into  $\alpha$ -hydroxymetoprolol ( $\alpha$ -OH-metoprolol), which exhibits approximately 10% of metoprolol’s potency.(9) Previous investigations using classic PK designs

have consistently found that metoprolol concentrations decrease across all four CYP2D6 genotype-inferred phenotypes, from PM to UM, and the opposite has been shown for  $\alpha$ -OH-metoprolol.(2, 3, 10)

In order to test our hypothesis that randomly collected blood samples collected in observational studies could be used to identify genetic markers of drug concentrations, we performed a proof-of-concept association study to replicate the well-established association between metoprolol concentrations and CYP2D6 genotype-inferred metabolizer phenotypes. We used plasma samples collected at random timepoints relative to the previous metoprolol dose in participants from the Montreal Heart Institute (MHI) Hospital Cohort.(11, 12)

## **Methods**

### ***Study design***

We performed a cross-sectional study that included participants from the MHI Hospital Cohort taking metoprolol at the baseline visit. The methods of the MHI Hospital Cohort, including its sample collection protocol, have been reported elsewhere.(11, 12)

### ***Study population***

The study population included self-reported “White” males and females aged  $\geq 18$  years, who reported being treated with oral metoprolol and who had plasma collected according to the standardized plasma collection protocol of the MHI Biobank. We put no restriction regarding the dose or formulation used. In Canada, only metoprolol tartrate is available. The only exclusion criterion was a history of liver transplant, as the genotypes from the donor and the recipient could differ.(13) Given the exploratory nature of our approach, we sought to include a convenience sample of 1000 individuals.

### ***Study endpoints***

The primary objective of this study was to replicate the association between CYP2D6 genotype-inferred phenotypes and the primary study endpoint of plasma concentrations of racemic metoprolol. Association between CYP2D6 phenotype and  $\alpha$ -OH-metoprolol, metoprolol daily dosing, and resting heart rate were also investigated.

### ***Measurement of metoprolol and $\alpha$ -hydroxymetoprolol concentrations***

The plasma samples of individuals included as part of this study was collected as previously described.(11) Briefly, blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid vacutainer tubes on ice. Plasma was obtained by centrifugation within 30 minutes (1900g at 4°C for 15 min). The plasma was then transferred to 1-mL microtubes, rapidly frozen at -21°C, and then stored at -80°C on the same day. Blood sampling was performed randomly regarding the intake of metoprolol or other concomitant medications, time of day, or food intake. Metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol measurements were conducted in the bioanalytical laboratory of the Platform of Biopharmacy at Université de Montréal. The analyses were conducted blinded to any information related to the samples, including *CYP2D6* genotypes and metoprolol doses. Lower limits of quantification (LLOQ) were set at 1 ng/mL for metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol, with upper limits set at 1000 ng/mL. The complete bioanalytical method is described in the Supplementary Material section, along with a schematic representation of sample preparation.

### ***Genotyping and *CYP2D6* metabolism***

DNA isolation was performed under GLP conditions using the Gentra Autopure LS<sup>®</sup> system as previously described.(10, 14) The targeted regions of genomic DNA were amplified through PCR before conducting single-base extension using either Agena's iPLEX<sup>®</sup> ADME PGx Pro Panel 1.0 or MHI ADME Panel V3.0 (Agena Bioscience, San Diego, CA, USA) as previously described.(15) Subsequent conditioning of the extension conditions was made using Clean Resin before being dispensed on a SpectroChipII Array using a MassARRAY Nanodispenser (Agena Bioscience, San Diego, CA). Data acquisition was made on the MassARRAY<sup>®</sup> Analyzer Compact (Agena Bioscience MALDI-TOF mass spectrometer (Agena Bioscience, San Diego, CA)). *CYP2D6* variant alleles genotyped were \*1, \*2, \*3, \*4, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11, \*12, \*14, \*15, \*17, \*19, \*20, \*29, \*41, \*69, and \*109. *CYP2D6* alleles were assigned according to the PharmVar core alleles (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>). As for copy number variants (CNVs), 7 probes were designed, with target sequences located on introns 4 and 6, and exon 9 of *CYP2D6*. For both variant alleles and CNVs, the different extended mass intensities were analyzed using the MassArray Typer software Version 4.1, including analysis application Typer Analyzer Version 4.1.0.83 with PGxReporter v3.51 software. Using allelic activity scores, genotypes, and copy

number variants, we categorized participants into PM, IM, NM, and UM phenotypes according to the most recent CYP2D6 classification guidelines.(8)

### ***Statistical analyses***

We performed descriptive statistics of clinical and genetic variables for all included participants. Frequencies and proportions were reported for categorical variables, while means, standard deviations and medians were used for continuous variables. Multiple linear regression analyses were conducted to investigate the relationship between CYP2D6 genotype-inferred phenotypes and the study endpoints. To do so, we considered a crude model and different adjusted models with increasing number of covariables for each analysis. Candidate adjustment variables were age, sex, metoprolol dose, and weight for models of analyte concentrations and metoprolol dosing, with the addition of a history atrial fibrillation/flutter and the use of heart rate lowering drugs for the endpoint of heart rate. Also, for every fully adjusted model, we considered concomitant uses of CYP2D6 inhibitors. The complete list of all medications taken by the cohort were screened to identify CYP2D6 inhibitors. We referred to the Food & Drug Administration (FDA) Table of Inhibitors to provide an objective list of such medications to consider (16). Furthermore, we also built models where patients' phenotype was converted prior to multivariable adjustment by multiplying the patients' CYP2D6 activity scores by factors of 0.5 and 0 for the concomitant intake of moderate and strong CYP2D6 inhibitors, respectively (17). CYP2D6 genotype-inferred phenotype was treated as an ordinal variable and coded as 0, 1, 2, or 3 for PM, IM, NM, and UM, respectively. Although inferred phenotypes are widely used in PK association studies,(18-20) as a sensitivity analysis, we also assessed a single key variant of *CYP2D6*\*4, rs3892097, which is prevalent within populations of European descent (21). When necessary, to satisfy the normality assumption, a regression model for each outcome and its natural logarithm transformation were fitted and the distributions of residuals were compared. In all analyses, the residuals of the models with transformed outcomes are more normal than the residuals of the models with original outcomes. Therefore, we kept the models with transformed outcomes. Samples with concentrations lower than LLOQ were attributed a value of 0. Statistical tests were two-tailed and a p-value <0.05 was considered statistically significant. All analyses were carried using SAS v9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### ***Ethics statement***

The MHI Hospital Cohort protocol has been approved by the institution's Scientific and Ethics Committees. All participants have provided a signed, informed consent prior to their inclusion in the MHI Hospital Cohort. This investigation was approved by the Cohort management committee, as well as the MHI's Scientific and Ethics Committees.

## **Results**

### ***Study population***

A total of 1007 participants from the MHI Cohort met our inclusion and exclusion criteria. Of these, complete *CYP2D6* genotyping was unsuccessful for 7 patients, while plasma volume was insufficient at the time of analysis for one patient. Thus, 999 patients were included in the analyses. At baseline, patients presented characteristics consistent with a population with cardiovascular disorders treated with metoprolol (Table 1). Specifically, it was constituted mainly of males (73%), aged  $66.5 \pm 8.7$  years with a weight of  $84.4 \pm 17.0$  kg. As expected, patients were treated with multiple concomitant cardiovascular medications (Table 1). Regarding metoprolol, the mean daily dose was  $84.3 \pm 57.1$  mg, with total daily doses ranging from 6.25 mg to 400 mg. Frequencies of *CYP2D6* diplotypes, genotypes, and inferred phenotypes are listed in Table 1 and Table S1. Of the 999 patients, phenotypes could not be determined in 3 because of triallelic genotyping results. In total, 4.4%, 34.3%, 54.4% and 6.8% were PM, IM, NM, and UM, respectively. Only 36 patients (3.6%) used either one or more moderate and/or strong inhibitors, of which 33 were reclassified with lower phenotypic activity. Since considering the use of *CYP2D6* inhibitors gave very similar results either as a covariable or as a phenoconversion factor, we present only the models where it was used as a covariable.

### ***CYP2D6 and plasma concentrations***

The mean metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol concentrations in the cohort were  $111.0 \pm 141.4$  ng/ml (median 59.3) and  $48.7 \pm 52.5$  ng/ml (median 35.1), respectively. Only 2% of patients presented metoprolol concentrations below LLOQ, and 4% for  $\alpha$ -OH-metoprolol. Those with values below LLOQ for both analytes comprised 1% of the population, indicating that few patients had not taken metoprolol recently.

Metoprolol concentrations decreased with higher metabolizing capacity (Figure 1A). The association between CYP2D6 and metoprolol concentrations was highly significant across all models (all  $p < 10^{-14}$ ). Age, sex, metoprolol, and weight daily dose were significantly associated with metoprolol concentrations in the fully adjusted model (Table 2). We observed that the association between CYP2D6 genotype-inferred phenotype and metoprolol concentrations increased when metoprolol daily dose was introduced in the multivariable model.

Concentrations of  $\alpha$ -OH-metoprolol increased with higher CYP2D6 metabolizing capacity (Figure 1B). The association between CYP2D6-inferred phenotype and  $\alpha$ -OH-metoprolol remained highly significant in the fully adjusted model (all  $p < 10^{-63}$ ). Age, sex, metoprolol daily dose, but not weight were also significantly associated with  $\alpha$ -OH-metoprolol concentrations (Table 3). Finally, the concomitant use of CYP2D6 inhibitors was significantly associated with both metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol concentrations.

### ***CYP2D6 and daily metoprolol dosing***

We observed a significant, yet more modest, association between CYP2D6-inferred phenotype and metoprolol daily dose ( $p = 9 \times 10^{-5}$ ). Other than CYP2D6-inferred phenotype, only weight was associated with metoprolol daily dose in the fully adjusted model (Table 4).

### ***CYP2D6 and heart rate***

Consistent with the observed decrease metoprolol concentrations with greater metabolic capacity, we observed increasing heart rate with increases in CYP2D6 inferred metabolizing capacity (Figure 2). This association was significant in the crude and the adjusted models (all  $p < 0.0003$ ; Table S2).

### ***Sensitivity analyses: single-variant models***

For sensitivity analyses, we also investigated whether similar associations could be obtained using a single variant, rs3892097, which presented an allelic frequency of 15,94% in our cohort. As was found for the genotype-inferred phenotype classification, in all unadjusted and adjusted models, the presence of the rs3892097 variant was significantly associated between both plasma concentration levels of metoprolol (all  $p < 5 \times 10^{-08}$ ) and  $\alpha$ -OH-metoprolol (all  $p < 10^{-48}$ ; Tables S3 and S4). For the secondary endpoints of daily metoprolol heart rate and dosing, again, rs3892097 was associated with these endpoints, albeit more modestly in all models (Tables S5 and S6).

## Discussion

As part of this study, we provide proof to the concept that using randomly collected plasma samples as part of genetic cohort studies can be leveraged to identify predictors of drug concentrations. We observed highly significant associations between CYP2D6-inferred metabolizer phenotype, as well as the rs3892097 variant, and plasma concentrations of metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol measured in samples randomly drawn since the previous metoprolol dose at the baseline visit of the MHI Hospital Cohort. Our investigation provides consistent results in the magnitude of these inferred phenotypes with those from a previous meta-analysis assessing the effect of CYP2D6-inferred metabolizer phenotype on the variability in PK profiles of metoprolol.(2) Thus, the results of this study support the concept that random blood samples collected as part of large observational studies can be leveraged to conduct PGx association studies in unselected patients treated with a broad range of doses of a given medication to identify predictors of drug concentrations.

The most immediate implication of our study is the possibility that large observational genetic cohorts could be leveraged to identify PGx markers related to drug dosing requirements and drug concentrations, either as a single variant or using a complete phenotype classification, with the caveat that plasma or serum samples and information regarding drug dosing have also been collected. Our approach may facilitate the emergence of collaborative, multi-cohort, international consortia to conduct exploratory GWAS of drug concentrations, beyond studies that initially focus on one or a few selected drugs investigated as part of a clinical study or drug monitoring programs. Such collaborations already represent a hallmark of genomic discovery for complex traits and diseases.(4-6). The cumulative experience from investigations of common diseases has shown that initial single-cohort investigations generally allow the discovery of common variants with large effects that explain only a small proportion of genetic factors in complex diseases. For example, initial GWAS of hypertension that included only thousands individuals led to few genetic discoveries,(22) while recent initiatives have included an excess of one million participants and reported over nine hundred loci associated with hypertension.(23) Based on the experience and results of the aforementioned GWAS of complex diseases, (4-6, 23) large prospective PGx endeavors using biorepositories not initially design to study drug pharmacokinetics, in addition to aforementioned existing resources, could provide sample sizes



required for the discovery of new and unsuspected genes or signalling pathways. (24-27) Moreover, such collaborative efforts could also incorporate clinical therapeutic drug monitoring PGx studies(28, 29).

A noteworthy observation is that CYP2D6 phenotypes were more significantly associated to concentration levels of metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol compared to metoprolol dosing. This is partly because doses used in the clinic are dependent on the prescriber's preferences.(30) Therefore, drug doses by themselves may not be a suitable proxy to evaluate genetic determinants of dosing requirements or PK parameters and show that drug concentration measurements are critical. This is emphasized by drugs with only a single dosing regimen in clinical practice such as clopidogrel despite the presence of inter-individual variability and genetic determinants of PK profiles and efficacy.(31, 32)

Interestingly, our models highlighted increases in resting heart rate relative associated higher CYP2D6 metabolic capacity. It is important to highlight that this observation should be made with caution. Due to the cross-sectional nature of this analysis, it does not in fact reflect “response” to metoprolol. Thus, despite this observation in previous smaller prospective studies,(33) bias and chance cannot be excluded. Given the association between higher heart rate and worse outcomes in cardiovascular disease,(34) studies investigating the impact of CYP2D6 metabolizer status on the clinical outcomes of patients undergoing metoprolol therapy appear warranted.

### ***Strengths and limitations:***

A strength of our investigation is that we validated our concept using two PGx associations between *CYP2D6* and two analytes of metoprolol metabolism which have been repeatedly validated. Moreover, the associations observed regarding the plasma concentrations of both analytes were consistent with those previously reported. (2)

Another strength from this study is that it was conducted in a “real-life”, polymedicated population presenting multiple morbidities. This represents a strength for two reasons. As most previous studies investigating the association between *CYP2D6* and metoprolol's PK focused exclusively on healthy individuals, the current study validates that it can be extended to “real-life” populations. Ultimately, these are the populations in which PGx and precision medicine are

expected to improve drug efficacy and safety. Regarding the concept and hypothesis tested here, this makes our findings more widely generalizable and applicable to other unselected populations which constitute most large cohorts used in genetic research.

One limitation is that the exact formulation of metoprolol was not routinely collected. Despite this limitation, which would have added heterogeneity to our analyses, we were able to convincingly validate the drug-gene pair association. Furthermore, a caveat to our finding is that, considering that metoprolol's half-life ranges between 3 and 7 hours from NM to PM,(2) whether our approach can be extended to drugs with shorter half-lives warrants confirmation. Finally, the usefulness to identify rare factors, genetic or other, that can influence the concentrations of metoprolol requires further studies. Expanding the size of collaborative PGx investigations to sufficient sizes to explore the contribution of rare variants, as well as sex-specific PGx associations, could help explain part of the “missing heritability” in PGx.

In conclusion, our results provide supporting evidence that randomly drawn blood samples from biorepositories could be leveraged to identify genetic determinants associated to drug concentrations and dosing. New methods or uses for already existing databases may be exploited to discover PGx associations related to drug metabolism and response without the limitations associated with current approaches like GWAS and traditional PK studies.

### **Study Highlights**

- **What is the current knowledge on the topic ?**

Observational cohorts have been leveraged numerous times to identify genetic determinants of disease-related traits. Whether biobanks can be utilized to identify pharmacogenomic determinants affecting drug concentrations and other clinical parameters remains largely untested.

- **What question did this study address ?**

Using the Montreal Heart Institute Hospital Cohort and its information comprised within the MHI Biobank, we investigated if pharmacogenetic associations could be observed with the level of statistical significance of genome-wide association studies. We sought to recreate a pharmacogenomic association previously validated through traditional pharmacokinetic study design between metoprolol plasma concentrations and CYP2D6 genotype-inferred phenotypes.

- **What does this study add to our knowledge ?**

With a sample of approximately 1000 patients, we demonstrate that single, random blood samplings can be used to identify pharmacogenomic associations influencing average metoprolol plasma concentrations, along with those of its associated CYP2D6 metabolite. Even after correcting for cofactors through simple multivariable modelling, statistical significance GWAS magnitude persists. Additional associations regarding drug response, such as average daily dosage and heart rate, can be detected, even when analyzing a single *CYP2D6* polymorphism.

- **How might this change clinical pharmacology or translational science ?**

This study suggests that biorepositories can be leveraged to discover and validate pharmacogenetic targets associated to variations in drug metabolism, and potentially clinical response. Biobanks represent a new resource by which pharmacogenomics consortia could identify predictors of drug metabolism, overcoming methodological limitations encountered in traditional pharmacokinetic studies and GWAS.

### **Acknowledgements**

None.

### **Author contributions**

M.M., E.O., M.J.G., and S.D. wrote the manuscript, M.M., G.L., M.J., E.O., I.M., M.P.D., J.C.T. and S.D. designed the research, M.M., E.O., M.J.G., D.B., and J.C.T. performed the research, M.M., E.O., I.M., M.P.D., and S.D. analyzed the data, and G.L. and D.B. contributed new reagents/analytical tools.

## References

1. Abdullah-Koolmees H, van Keulen AM, Nijenhuis M, Deneer VHM. Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgX Guidelines. *Front Pharmacol*. 2021;11(1976).
2. Blake CM, Kharasch ED, Schwab M, Nagele P. A meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(3):394-399.
3. Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, Jobin J, Desgagnes P, Poirier P, et al. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;67(5):466-477.
4. Auer PL, Teumer A, Schick U, O'Shaughnessy A, Lo KS, Chami N, et al. Rare and low-frequency coding variants in CXCR2 and other genes are associated with hematological traits. *Nat Genet*. 2014;46(6):629-634.
5. Ehret GB, Ferreira T, Chasman DI, Jackson AU, Schmidt EM, Johnson T, et al. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. *Nat Genet*. 2016;48(10):1171-1184.
6. Zhao W, Rasheed A, Tikkanen E, Lee JJ, Butterworth AS, Howson JMM, et al. Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease. *Nat Genet*. 2017;49(10):1450-1457.
7. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141.
8. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci*. 2020;13(1):116-124.
9. Laurent-Kenesi MA, Funck-Brentano C, Poirier JM, Decolin D, Jaillon P. Influence of CYP2D6-dependent metabolism on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol and nifedipine, alone and in combination. *Br J Clin Pharmacol*. 1993;36(6):531-538.
10. Batty JA, Hall AS, White HL, Wikstrand J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, et al. An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(3):321-330.
11. Turcot V, Brunet J, Daneault C, Tardif JC, Des Rosiers C, Lettre G. Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28(6):646-658.
12. Chami N, Chen MH, Slater AJ, Eicher JD, Evangelou E, Tajuddin SM, et al. Exome Genotyping Identifies Pleiotropic Variants Associated with Red Blood Cell Traits. *Am J Hum Genet*. 2016;99(1):8-21.
13. Coller JK, Ramachandran J, John L, Tuke J, Wigg A, Doogue M. The impact of liver transplant recipient and donor genetic variability on tacrolimus exposure and transplant outcome. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(9):2170-2175.
14. Mottet F, Vardeny O, de Denus S. Pharmacogenomics of heart failure: a systematic review. *Pharmacogenomics*. 2016;17(16):1817-1858.
15. de Denus S, Rouleau JL, Mann DL, Huggins GS, Pereira NL, Shah SH, et al. CYP3A4 genotype is associated with sildenafil concentrations in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(2):232-237.

16. US Food and Drug Administration. Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers. Available: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>. Last updated March 6, 2020. Accessed on September 9, 2021.
17. Cicali EJ, Elchynski AL, Cook KJ, Houder JT, Thomas CD, Smith DM, et al. How to Integrate CYP2D6 Phenoconversion Into Clinical Pharmacogenetics: A Tutorial. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(3):677-687.
18. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics.* 2002;12(6):465-472.
19. Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(4):302-312.
20. Sharma A, Pibarot P, Pilote S, Dumesnil JG, Arsenault M, Belanger PM, et al. Modulation of metoprolol pharmacokinetics and hemodynamics by diphenhydramine coadministration during exercise testing in healthy premenopausal women. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1172-1181.
21. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 2017;19(1):69-76.
22. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447(7145):661-678.
23. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, Mifsud B, Pazoki R, Gao H, et al. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits. *Nat Genet.* 2018;50(10):1412-1425.
24. Nelson MR, Bacanu SA, Mosteller M, Li L, Bowman CE, Roses AD, et al. Genome-wide approaches to identify pharmacogenetic contributions to adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(1):23-33.
25. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000433.
26. Giacomini KM, Yee SW, Mushiroda T, Weinshilboum RM, Ratain MJ, Kubo M. Genome-wide association studies of drug response and toxicity: an opportunity for genome medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(1):70-70.
27. Singh S, El Roubi N, McDonough CW, Gong Y, Bailey KR, Boerwinkle E, et al. Genomic Association Analysis Reveals Variants Associated With Blood Pressure Response to Beta-Blockers in European Americans. *Clin Transl Sci.* 2019;12(5):497-504.
28. Jukić MM, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Impact of CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure and Therapeutic Failure: A Retrospective Study Based on 2,087 Patients. *Am J Psychiatry.* 2018;175(5):463-470.
29. Jukic MM, Smith RL, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Effect of CYP2D6 genotype on exposure and efficacy of risperidone and aripiprazole: a retrospective, cohort study. *Lancet Psychiatry.* 2019;6(5):418-426.
30. Andrade JG, Krahn AD, Skanes AC, Purdham D, Ciaccia A, Connors S. Values and Preferences of Physicians and Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation Who Receive Oral Anticoagulation Therapy for Stroke Prevention. *Can J Cardiol.* 2016;32(6):747-753.

31. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360(4):354-362.
32. Claassens DMF, Vos GJA, Bergmeijer TO, Hermanides RS, van 't Hof AWJ, van der Harst P, et al. A Genotype-Guided Strategy for Oral P2Y12 Inhibitors in Primary PCI. *N Engl J Med.* 2019;381(17):1621-1631.
33. Meloche M, Khazaka M, Kassem I, Barhdadi A, Dubé M-P, de Denus S. CYP2D6 polymorphism and its impact on the clinical response to metoprolol: A systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(6):1015-1033.
34. Steinberg BA, Kim S, Thomas L, Fonarow GC, Gersh BJ, Holmqvist F, et al. Increased Heart Rate Is Associated With Higher Mortality in Patients With Atrial Fibrillation (AF): Results From the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of AF (ORBIT-AF). *J Am Heart Assoc.* 2015;4(9):e002031.

## Figure legends

**Figure 1.** Plasma concentrations of metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol. Concentrations of metoprolol (left) and  $\alpha$ -OH-metoprolol (right) by CYP2D6-inferred phenotype. Data presented as untransformed values. IM: intermediate metabolizer; NM: normal metabolizer; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer. Central bar of the box: median; lower bar of the box: first quartile; upper bar of the box: third quartile; diamond: mean; bar below the box: minimum (excluding outliers); bar above the box: maximum (excluding outliers).

**Figure 2.** Resting heart rate across CYP2D6 genotype-inferred phenotypes. Data presented as untransformed values. IM: intermediate metabolizer; NM: normal metabolizer; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer. Central bar of the box: median; lower bar of the box: first quartile; upper bar of the box: third quartile; diamond: mean; bar below the box: minimum (excluding outliers); bar above the box: maximum (excluding outliers).

**Table 1. Baseline cohort characteristics.**

	All† 999 (100%)	PM 44 (4%)	IM 342 (34%)	NM 542 (54%)	UM 68 (7%)
<b>Socio-demographic variables</b>					
Age, n (%)	66.5±8.7	68.4±7.7	66.3±8.8	66.6±8.6	65.7±9.9
Female, n (%)	269 (27)	11 (25)	90 (26)	142 (26)	26 (38)
Self-reported White ethnicity, n (%)	999 (100)	44 (100)	342 (100)	542 (100)	68 (100)
<b>Lifestyle and physical measure</b>					
<b>Smoking status, n (%)</b>					
Never-smoker	278 (28)	12 (27)	89 (26)	158 (29)	19 (28)
Past-smoker	638 (64)	29 (66)	227 (66)	336 (62)	43 (63)
Current-smoker	83 (8)	3 (7)	26 (8)	48 (9)	6 (9)
Weight (kg)	84.4±17.0	81.2±13.9	85.0±16.1	84.5±17.9	82.1±16.4
BMI	30.0±5.4	30.0±4.6	30.1±5.2	30.0±5.6	29.9±5.4
<b>Cardiovascular chronic conditions at baseline</b>					
Hypertension, n (%)	784 (78)	33 (75)	280 (82)	420 (77)	50 (74)
<b>Diabetes, n (%)</b>					
Type 1	7 (1)	0 (0)	3 (1)	4 (1)	0 (0)
Type 2	296 (30)	16 (36)	113 (33)	140 (26)	26 (38)
Dyslipidemia, n (%)	847 (85)	41 (93)	295 (86)	455 (84)	53 (78)
Myocardial infarction, n (%)	428 (43)	22 (50)	143 (42)	231 (43)	31 (46)
Atrial fibrillation or flutter, n (%)	358 (36)	15 (34)	120 (35)	190 (35)	31 (46)
<b>Medications</b>					
Aspirin, n (%)	788 (79)	35 (80)	278 (81)	422 (78)	52 (76)
Other antiplatelet agents, n (%)	149 (15)	9 (20)	56 (16)	70 (13)	13 (19)
ACE inhibitors, n (%)	342 (34)	16 (36)	126 (37)	182 (34)	17 (25)
Angiotensin II receptor blockers, n (%)	281 (28)	13 (30)	101 (30)	149 (27)	18 (26)
Calcium channel blocker, n (%)	261 (26)	13 (30)	98 (29)	133 (25)	17 (25)
Warfarin, n (%)	199 (20)	13 (30)	71 (21)	100 (18)	14 (21)
Novel oral anticoagulants, n (%)	36 (4)	1 (2)	11 (3)	20 (4)	3 (4)
Digoxin, n (%)	43 (4)	2 (5)	11 (3)	25 (5)	5 (7)



	All† 999 (100%)	PM 44 (4%)	IM 342 (34%)	NM 542 (54%)	UM 68 (7%)
<b>Amiodarone, n (%)</b>	36 (4)	0 (0)	16 (5)	18 (3)	2 (3)
<b>Other antiarrhythmic agents, n (%)</b>	14 (1)	0 (0)	2 (1)	10 (2)	2 (3)
<b>Diuretics, n (%)</b>	321 (32)	18 (41)	106 (31)	178 (33)	19 (28)
<b>Statins, n (%)</b>	818 (82)	37 (84)	287 (84)	438 (81)	53 (78)
<b>Oral hypoglycemic agents, n (%)</b>	255 (26)	12 (27)	100 (29)	121 (22)	21 (31)
<b>Plasma concentrations</b>					
<b>Mean metoprolol plasma concentrations (ng/mL)</b>	111±141	270±230	151±153	101±130	82.7±117
<b>Mean α-OH-metoprolol plasma concentrations (ng/mL)</b>	48.7±52.5	2.4±6.2	16.0±15.9	52.2±53.7	64.8±50.8
<b>Daily metoprolol dose</b>					
<b>Mean daily dose (mg)</b>	84.3±57.1	81.0±56.2	75.5±51.8	88.6±59.0	95.8±61.5
<b>Daily metoprolol dose, by categories, n (%)</b>					
≤ 12.5	16 (2)	2 (5)	8 (2)	6 (1)	0 (0)
> 12.5-25	144 (14)	5 (11)	65 (19)	65 (12)	8 (12)
> 25-50	351 (35)	17 (39)	122 (36)	189 (35)	23 (34)
> 50-100	318 (32)	13 (30)	107 (31)	177 (33)	21 (31)
> 100-150	63 (6)	1 (2)	13 (4)	44 (8)	3 (4)
> 150-200	91 (9)	6 (14)	22 (6)	51 (9)	12 (18)
> 200	14 (1)	0 (0)	4 (1)	9 (2)	1 (1)
<b>CYP2D6 inhibitors</b>					
<b>Moderate</b>	7 (0.7)	0 (0)	1 (0.3)	5 (0.9)	1 (1.5)
<b>Strong</b>	29 (2.9)	2 (4.6)	13 (3.8)	11 (2.0)	3 (4.4)

ACE: angiotensin-converting enzyme; BMI: body mass index; NM: normal metabolizer; IM: intermediate metabolizer; LLOQ: lower limit of quantification; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer. †Metabolizing phenotype could not be inferred in 3 participants due to triallelic variants. Values are presented as means ± S.D. unless otherwise specified.

**Table 2. Association between metoprolol concentrations and CYP2D6 genotype-inferred phenotypes.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>CYP2D6-inferred phenotype</b>	-0.506 (0.062)	1.4×10 <sup>-15</sup>	-0.511 (0.061)	3.0×10 <sup>-16</sup>	-0.632 (0.051)	7.0×10 <sup>-33</sup>	-0.634 (0.051)	1.7×10 <sup>-33</sup>	-0.6306 (0.0503)	1.5×10 <sup>-33</sup>
<b>Age</b>	-	-	0.017 (0.005)	0.0005	0.015 (0.004)	0.0001	0.012 (0.004)	0.0025	0.0121 (0.0040)	0.0024
<b>Female sex</b>	-	-	0.398 (0.094)	2.3×10 <sup>-5</sup>	0.392 (0.077)	4.6×10 <sup>-7</sup>	0.298 (0.081)	0.0002	0.2855 (0.0803)	0.00040
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	0.013 (0.001)	7.7×10 <sup>-85</sup>	0.013 (0.001)	1.2×10 <sup>-87</sup>	0.0133 (0.0006)	5.5×10 <sup>-89</sup>
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	-0.008 (0.002)	0.0002	-0.0080 (0.0022)	0.0002
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3851 (0.0978)	0.00009

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight, and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 4.821, Model 2: 4.012, Model 3: 3.191, Model 4: 4.003, Model 5: 3.667. SE: Standard error.

**Table 3. Association between  $\alpha$ -OH-metoprolol concentrations and CYP2D6 genotype-inferred phenotype.**

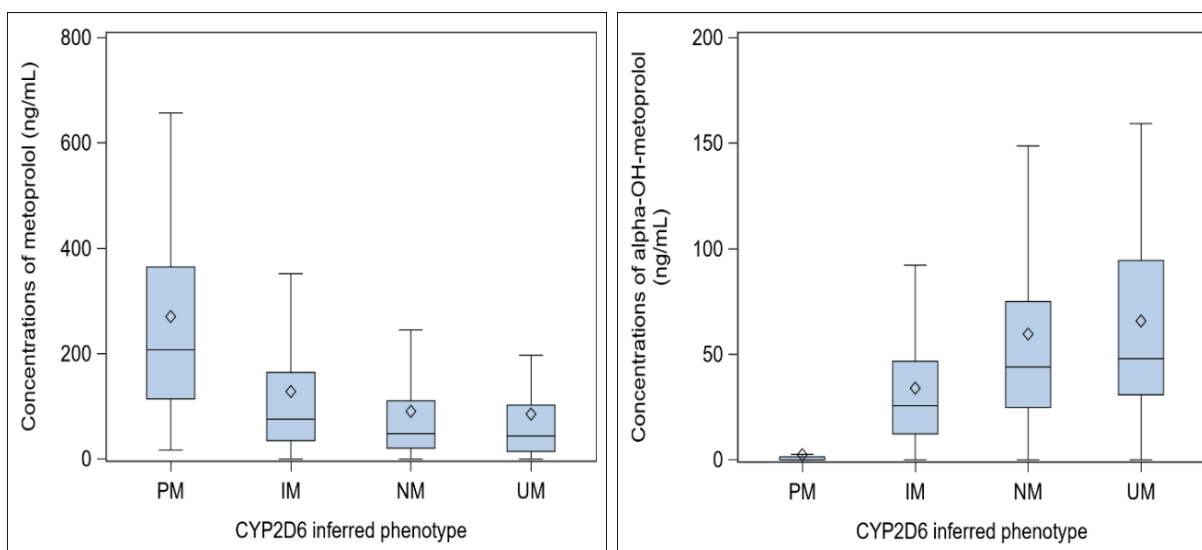
Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>CYP2D6 inferred phenotype</b>	0.877 (0.051)	$2.3 \times 10^{-58}$	0.876 (0.050)	$1.4 \times 10^{-59}$	0.790 (0.044)	$3.1 \times 10^{-63}$	0.789 (0.044)	$3.5 \times 10^{-63}$	0.7851 (0.0432)	$6.8 \times 10^{-64}$
<b>Age</b>	-	-	0.018 (0.004)	$6.4 \times 10^{-6}$	0.016 (0.003)	$1.4 \times 10^{-6}$	0.015 (0.003)	$1.7 \times 10^{-05}$	0.0150 (0.0034)	0.00001
<b>Female sex</b>	-	-	0.224 (0.077)	0.0035	0.214 (0.066)	0.0013	0.175 (0.070)	0.0124	0.1879 (0.0690)	0.00656
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	0.009 (0.001)	$1.4 \times 10^{-64}$	0.010 (0.001)	$3.6 \times 10^{-65}$	0.0096 (0.0005)	$4.4 \times 10^{-66}$
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	-0.003 (0.002)	0.0709	-0.0035 (0.0018)	0.06045
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.4219 (0.0840)	$6.0 \times 10^{-07}$

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 1.936, Model 2: 0.929, Model 3: 0.348, Model 4: 0.689, Model 5: 0.554. SE: standard error.

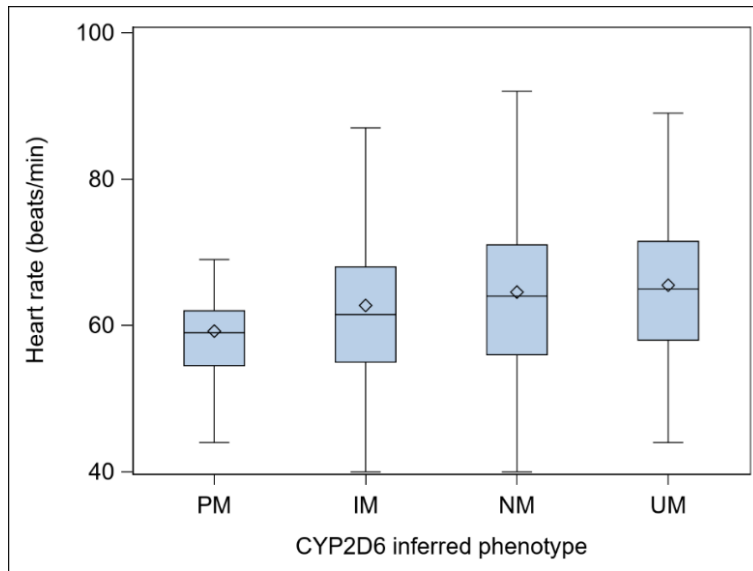
**Table 4. Association between CYP2D6 genotype-inferred phenotype and metoprolol daily dosing.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>CYP2D6 inferred phenotype</b>	0.115 (0.031)	0.0002	0.114 (0.031)	0.0002	0.114 (0.031)	0.0002	0.1141 (0.0307)	0.00021
<b>Age</b>	-	-	0.002 (0.002)	0.4619	0.004 (0.002)	0.0860	0.0042 (0.0024)	0.08601
<b>Female sex</b>	-	-	0.025 (0.047)	0.6008	0.094 (0.049)	0.0565	0.0948 (0.0492)	0.05413
<b>Weight</b>	-	-	-	-	0.006 (0.001)	6.9×10 <sup>-6</sup>	0.0059 (0.0013)	0.00001
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-0.0336 (0.0599)	0.57479

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and weight, Model 4: model adjusted for age, sex, weight, and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 4.041, Model 2: 3.942, Model 3: 3.333 Model 4: 3.242. SE: standard error.



**Figure 1. Plasma concentrations of metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol.** Concentrations of metoprolol (left) and  $\alpha$ -OH-metoprolol (right) by CYP2D6-inferred phenotype. Data presented as untransformed values. IM: intermediate metabolizer; NM: normal metabolizer; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer. Central bar of the box: median; lower bar of the box: first quartile; upper bar of the box: third quartile; diamond: mean; bar below the box: minimum (excluding outliers); bar above the box: maximum (excluding outliers).



**Figure 2. Resting heart rate across CYP2D6 genotype-inferred phenotypes.** Data presented as untransformed values. IM: intermediate metabolizer; NM: normal metabolizer; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer. Central bar of the box: median; lower bar of the box: first quartile; upper bar of the box: third quartile; diamond: mean; bar below the box: minimum (excluding outliers); bar above the box: maximum (excluding outliers).

### 3 Discussion

Dans le cadre de cet article, l'apport principal du projet LEVEL-PGx à la littérature scientifique est qu'il répond directement et positivement à la question d'investigation initiale, c'est-à-dire que des associations PGx influençant les concentrations plasmatiques de médicaments puissent être identifiées à l'aide de grandes cohortes observationnelles, ou biobanques. En ayant recours à des échantillons uniques et collectés à des temps aléatoires chez une population polymédicamentée, nous avons pu démontrer l'association précédemment observée entre les phénotypes inférés du CYP2D6 et les concentrations plasmatiques moyennes de métoprolol. Bien que des cofacteurs n'aient pas été pris en considération dans nos modèles multivariés, comme la formulation, la significativité statistique importante des associations suffit à prouver notre concept. De plus, les valeurs de concentrations obtenues, lorsque normalisées selon la dose moyenne quotidienne de chaque patient, s'accordent avec celles de Blake *et al.* obtenues par méta-analyse.<sup>292</sup> Ainsi, bien que nos estimations ayant servies à générer l'hypothèse initiale de recherche ne se soient pas avérées complètement précises, autant du point de vue des concentrations plasmatiques moyennes que pour la distribution populationnelle de chaque phénotype, celle-ci se veut non seulement validée, mais également corroborée par des résultats antérieurs rassemblant de multiples cohortes restreintes, soit la méthodologie PK-PGx actuelle la plus répandue que notre approche tente d'optimiser.

Il est intéressant de noter que nous avons pu établir cette association PK-PGx sans la nécessité de quantifier le (*S*)-métoprolol. Des résultats observationnels récents de l'étude PEAR-2 ont démontré des variations de Cl/F entre différents groupes de pointages génotypiques de 37 patients à l'aide des concentrations plasmatiques de (*S*)-métoprolol.<sup>452</sup> Dans le cadre de notre projet, la significativité de nos associations se veut elle aussi sans équivoque : dans une grande cohorte observationnelle avec des échantillons uniques et aléatoires, l'effet PK-PGx du CYP2D6 sur les concentrations plasmatiques de métoprolol peut être détecté avec robustesse sans que la bioanalyse chirale de l'énantiomère pharmacologiquement actif ne soit requise. Bien que nous n'ayons pas utilisé notre méthode chirale décrite dans le **Chapitre 3**, notre approche demeure valable, la simplification des analyses ayant abrégé considérablement les délais d'analyse.

Nos résultats démontrent que l'association entre le phénotype inféré de *CYP2D6* et les concentrations du métabolite  $\alpha$ -hydroxymétoprolol se sont avérées plus significatives relativement

à celles de métoprolol. Cela était attendu, car puisque la formation de  $\alpha$ -hydroxymétoprolol est exclusive et dépendante du CYP2D6,<sup>337</sup> la relation entre les niveaux plasmatiques de métabolite et sa voie enzymatique est beaucoup plus franche que pour le métoprolol. Il en résulterait en un pourcentage plus grand de variabilité expliquée. Additionnellement, nous avons calculé que l'association entre les niveaux plasmatiques des deux analytes avec le phénotype inféré était davantage significative comparativement à celle faite entre le dosage individuel des patients et leurs concentrations plasmatiques. Le dosage d'un médicament peut être décidé selon les préférences et les perceptions d'un prescripteur face aux effets d'une pharmacothérapie particulière.<sup>453,454</sup> Or, de façon similaire au métabolite, ces résultats peuvent s'expliquer du fait que les concentrations plasmatiques d'un médicament métabolisé par un enzyme agiront comme marqueur plus proximal de son activité et de ses effets PGx, comparativement à la dose. Néanmoins, l'effet PK-PGx réaffirme la représentativité des concentrations plasmatiques en matière d'exposition. Ce principe se veut pertinent notamment lors d'un suivi thérapeutique pharmacologique, durant lequel les concentrations cibles sont établies afin d'obtenir une exposition précise, soit pour une efficacité clinique ou une diminution de toxicité. Dans notre cas, nous avons observé une association entre la FC de base et le phénotype du CYP2D6 dans les modèles multivariés qui s'aligne aux effets PGx détectés dans notre méta-analyse précédente (**Chapitre 2**). Si la relation concentration-effet des  $\beta$ -bloqueurs se veut dose-dépendante et linéaire<sup>299</sup> jusqu'à saturation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques,<sup>304</sup> l'effet PGx demeurerait à être confirmé de façon prospective quant à la personnalisation du traitement au métoprolol fondé sur le profil génotypique.

Ces considérations amènent à aborder d'autres issues cliniques. Le devis transversal de notre projet ne permettait pas de déterminer qu'il s'agit définitivement d'une différence de réponse au métoprolol. Bien que ces issues n'aient pas été prises en compte dans nos analyses, il nous était impossible de s'appuyer sur la littérature et d'associer la PGx du CYP2D6 à la mortalité ou aux hospitalisations. Cette affirmation est également valable pour la survenue d'événements indésirables symptomatiques, quoique peu de données publiées pointent vers un effet PGx d'une magnitude aussi significative que pour les profils PK, même à hautes doses.<sup>330,387,390</sup> Alors que nos résultats montrent un effet PD-PGx potentiel pour le métoprolol, des études ultérieures avec devis prospectifs seront requises pour confirmer l'envergure de telles influences.



Nos analyses multivariées permettent d'établir des constats pertinents en ce qui a trait aux cofacteurs inclus dans nos modèles. Nous avons déterminé que les concentrations plasmatiques de métoprolol étaient significativement plus élevées chez les femmes à des doses quotidiennes équivalentes. Ces résultats sont en accord avec des observations précédentes obtenues avec des cohortes restreintes de participants sains chez qui les femmes affichaient une exposition plus marquée au métoprolol.<sup>179,340</sup> Des résultats antérieurs par Hamelin *et al.* rapportaient justement des variations significatives de profils PK-PGx du métoprolol entre hommes et femmes lorsque stratifiés selon leur phénotypes inférés.<sup>340</sup> Les concentrations plasmatiques du métabolite étaient quant à elles plus grandes chez les hommes, ce qui suggère un métabolisme plus rapide chez ces derniers, tout en tenant compte des composantes génétiques. Par ailleurs, des différences de concentrations plasmatiques reliées au sexe s'appliqueraient à d'autres substrats du CYP2D6.<sup>455-457</sup> Nos modèles ajustés indiquent une contribution statistiquement significative persistante du sexe aux niveaux des concentrations plasmatiques.

Plusieurs hypothèses physiologiques ont été soulevées afin d'expliquer l'influence métabolique du sexe et ses répercussions multifactorielles sur les profils PK. Celles-ci incluent des paramètres tels que les débits cardiaque et rénal, la Cl/F, l'indice de masse corporelle et la masse lipidique, la variabilité de liaison aux protéines plasmatiques, ou encore l'expression différentielle des enzymes hépatiques,<sup>458,459</sup> de même que les différences hormonales et leur potentiel d'interaction avec certains médicaments.<sup>458,460</sup> Le degré d'influence de chacun de ces facteurs mérite d'être investigué avec considération, puisque les femmes sont communément plus à risque de souffrir d'événements indésirables.<sup>461,462</sup> Il est raisonnable de supposer qu'une proportion de ces événements soit directement causée par des concentrations supérieures, voire supratherapeutiques chez les femmes. Des publications indiqueraient une influence PGx importante sur l'issue des traitements en fonction du sexe pour certaines maladies polygéniques.<sup>463,464</sup> Bien que notre étude ne soit pas dirigée à évaluer directement les impacts PK-PGx selon le sexe, nos observations s'accordent avec l'intérêt croissant à considérer ce paramètre lors de futures investigations PGx.<sup>464</sup> Au moment d'écrire ces lignes, des efforts sont effectués par notre groupe de recherche afin d'étudier ces caractéristiques.

Nos analyses de sensibilité avec l'utilisation d'un seul variant, *CYP2D6\*4*, servent à témoigner de la validité de notre approche à identifier des variants polymorphiques précis lors

d'études pangénomiques. En effet, bien qu'une classification phénotypique indique une contribution statistiquement significative de *CYP2D6* sur les concentrations plasmatiques et des profils PK du métoprolol, rappelons que l'identification de SNPs ou de gènes individuels correspondrait davantage au type de résultats issus des GWAS. Considérant que la significativité de chacune des associations PGx observées dans nos modèles dépasse largement les seuils établis, d'autres déterminants génétiques pourraient être identifiés par approche agnostique grâce aux biobanques.

Un autre élément important dans nos modèles s'agit des cofacteurs d'interactions médicamenteuses. Pour une grande taille d'échantillon, il en convient que les polypharmacies individuelles peuvent varier considérablement, dont les substrats et les inhibiteurs du CYP2D6. Or, si la stratification des interactions médicamenteuses et le degré d'inhibition substrat-spécifique du CYP2D6 avaient été modélisés, la complexité de l'approche décrite aurait été excessive. Une critique peut être émise visant le niveau d'évidence derrière la classification des inhibiteurs, tel qu'établi par la FDA. Parmi les 22 inhibiteurs de CYP2D6 répertoriés par ces autorités, Cicali *et al.* établissaient que 38% des classifications d'inhibiteurs faibles, modérés ou sévères ne concordaient pas avec la magnitude des changements observés pour les valeurs d'AUC de substrats spécifiques en concomitance avec ceux-ci.<sup>465</sup> La complexité des interactions médicamenteuses et les particularités méthodologiques des études individuelles les ayant évalué expliqueraient ces disparités.

Différents programmes existent afin d'effectuer la phénoconversion des phénotypes inférés lors de la prise concomitante d'inhibiteurs du CYP2D6.<sup>189</sup> Selon les modalités employées d'une approche, comme l'activité enzymatique anticipée selon un génotype spécifique et le niveau d'inhibition des co-médications, celle-ci peut mener ou non à un changement de phénotype chez des patients.<sup>466</sup> Or, chacune de ces approches s'équivaldrait en termes de prédiction des interactions médicamenteuses lorsqu'une composante PGx de *CYP2D6* est incluse et ce, peu importe l'aire thérapeutique.<sup>189,466</sup> En accord avec les recommandations en vigueur les plus reconnues, nous avons opté pour l'approche utilisée par le CPIC et la FDA, laquelle ne considère pas l'impact des inhibiteurs faibles du CYP2D6, une pratique acceptée en matière d'interactions médicamenteuses.<sup>189</sup> Puis, il est pertinent de mentionner que d'autres cofacteurs n'ayant pas été pris en compte dans nos modèles multivariés affecteraient peut-être le métabolisme général des

CYPs. Celles-ci pourraient s'agir de comorbidités, plus particulièrement les maladies inflammatoires chroniques tel le diabète.<sup>193</sup> Ce second facteur aurait pu se révéler critique à nos résultats, car 30% de notre cohorte était atteinte de diabète de type 2. Tout en tenant compte de la PGx pour ces cibles, rappelons que des essais antérieurs avec substrats métaboliques révélaient que parmi les CYPs métaboliseurs de xénobiotiques, l'expression et l'activité fonctionnelle du CYP2D6 ne se trouvaient pas affectées par cette condition ou d'autres marqueurs inflammatoires y étant associés (voir **Section 2.4.5**).<sup>467</sup> L'information présente dans la Biobanque de l'ICM aurait permis d'inclure la présence de comorbidités. Quoi qu'il en soit, dans le contexte de l'étude LEVEL-PGx, nous pouvons conclure que la prise en compte générale des co-médications s'avère suffisante pour rehausser la validité et la généralisabilité de notre approche avec de grandes cohortes observationnelles. Cela se justifie malgré la fraction restreinte (3,6%) de notre cohorte ayant utilisé en concomitance des inhibiteurs modérés ou sévères du CYP2D6 ayant pu affecter les concentrations plasmatiques du métoprolol.

Finalement, il semblerait incertain à savoir si nos conclusions s'appliquent à des médicaments ayant des valeurs de  $t_{1/2}$  qui diffèrent significativement de celles du substrat utilisé. Effectivement, puisque le métoprolol possède une valeur de  $t_{1/2}$  entre 3-7h,<sup>292</sup> l'applicabilité de notre approche pourrait dépendre de ce paramètre. Or, des données récentes provenant d'une cohorte psychiatrique de 4700 patients suggéraient que les ratios métaboliques de certains médicaments métabolisés par le CYP2D6 corrélaient avec l'activité enzymatique des génotypes identifiés.<sup>468</sup> Des tendances similaires pouvaient être établies entre chacun de ces substrats, dont les  $t_{1/2}$  variaient entre 5 et 77h. Il est à concéder que, dans le cas où des prélèvements uniques et aléatoires soient utilisés pour des analyses ultérieures, une estimation approximative du temps depuis la dernière dose puisse être envisagée. Cet aspect sera discuté plus-bas dans le **Chapitre 5**. Outre ce détail méthodologique, de même que la spécificité de substrat qui puisse causer une variabilité irréductible entre chaque association PGx,<sup>199</sup> ces résultats supportent en partie la généralisabilité de notre approche à des médicaments aux profils PK variés comportant des valeurs dispersées de  $t_{1/2}$ .

## Chapitre 5 : Discussion générale

### 1 Résumé des volets abordés dans cette thèse

Les découvertes en matière de médecine personnalisée ont subi une croissance considérable dans la dernière décennie. Parallèlement, les avancées méthodologiques de recherche se sont multipliées, surtout afin d'élucider les composantes génétiques responsables du développement et de la progression de maladies monogéniques ou à traits complexes. L'étendue de ces ressources devient de plus en plus disponible et applicable en PGx, autant pour optimiser la réponse clinique à des médicaments que pour mieux établir leur devenir dans l'organisme. Le recours aux biobanques est déjà amorcé dans le champ génétique physiologique et de façon plus restreinte, quoique grandissante, en PGx. À notre connaissance, peu de groupes s'étaient penchés sur leur capacité à établir des associations prédictives des concentrations de médicaments. À l'aide de points de données uniques et aléatoires obtenus de biospécimens d'une cohorte polymédicamentée, il demeurerait alors inconnu si une telle approche permettait d'établir des associations PK-PGx robustes, encore moins à des seuils requis dans un cadre pangénomique. Dans cet esprit, la visée de cette thèse de doctorat était de recréer une association PGx préalablement établie à l'aide d'essais traditionnels PK, cette fois grâce à la Cohorte Hospitalière de l'ICM. Les travaux recensés consistaient en la synthèse des impacts PK- et PD-PGx de la cible PGx sur l'agent  $\beta$ -bloqueur étudié. Développer de nouvelles approches bioanalytiques aura été un apport additionnel à ces travaux. Par le biais d'une grande cohorte observationnelle, la culmination de ces efforts que se trouve être l'étude LEVEL-PGx aura permis d'investiguer les niveaux de concentrations de médicaments et la réponse clinique des patients selon leur profil génotypique.

L'apport des travaux présentés dans cette thèse est séparé en deux sections. D'abord, les résultats principaux de chacun d'eux seront résumés afin de mieux distinguer les connaissances produites lors de leur déroulement. Puis, les retombées potentielles de nos travaux dans le domaine de la recherche PGx, de même que les implications liées à l'utilisation croissante de l'information contenue dans les biobanques et leur intégration à la recherche biomédicale seront abordées. À titre de réflexion générale sur le domaine, certains travaux récents ayant investigués des avenues similaires de recherche PGx seront décrits et comparés.

## 2 Résultats principaux des avancées scientifiques présentées

Les **Chapitres 2 à 4** ont servi à mettre en contexte et à étayer les résultats des travaux constituant la rationnelle de cette thèse. Un rappel des résultats importants sert à témoigner de l'avancement des connaissances à-travers chacun d'eux :

- i. Entre les métaboliseurs PMs et non-PMs, l'influence des polymorphismes génétiques de *CYP2D6* sur les profils PK du métoprolol semblerait se répercuter sur la réduction de TAS, de TAD et de FC, ainsi que sur la survenue de bradycardie lors de la prise de cette thérapie  $\beta$ -bloquante;
- ii. Lorsque les données répertoriées de littérature étaient méta-analysées, les différences de réponse clinique entre PMs et non-PMs s'observeraient à des doses similaires;
- iii. Couplée à la détection sensible par LC-MS/MS, la conjugaison de méthodes de séparation énantiomérique aux technologies actuelles de purification, respectivement la dérivation indirecte par agent chiral et la SPE PRiME, permettent de surmonter les défis bioanalytiques précédemment rencontrés dans la quantification chirale du métoprolol. La quantification de l'énantiomère pharmacologiquement actif, le (*S*)-métoprolol, ainsi que les métabolites résultant du métabolisme du *CYP2D6*, se veut plus sensible et généralisable que les méthodes antérieures d'énantioséparation pour  $\beta$ -bloqueurs;
- iv. L'utilisation d'une grande cohorte hospitalière observationnelle recueillant des prélèvements sanguins uniques et aléatoires de patients traités avec métoprolol s'avère capable de recréer l'association PK-PGx préalablement démontrée entre les concentrations plasmatiques moyennes de metoprolol et *CYP2D6*;
- v. Le recours à une biobanque de cohorte démontre que l'association PK-PGx semble influencer la réponse clinique au métoprolol, soient la FC et la dose;
- vi. L'usage de modèles multivariables confirme la robustesse de l'association lorsque d'autres facteurs cliniques sont intégrés et en présence de polypharmacies;
- vii. La signification des associations identifiées démontre qu'une preuve de concept est établie comme quoi les biobanques de cohortes peuvent être utilisées pour la conduite d'essais GWAS PK-PGx.

Un aspect commun aux travaux contenus dans cette thèse et aux avancées qu'ils procurent sont qu'ils incorporent tous le développement ou l'application de nouvelles méthodologies afin de mener à des avancées pertinentes dans leurs champs respectifs.

### **3 Avancées des connaissances, retombées potentielles et perspectives d'avenir**

#### **3.1 Sur l'utilisation des biobanques en recherche pharmacogénomique**

Les cohortes observationnelles contenant des biospécimens et utilisées à des fins PGx ont précédemment souffert d'un échantillonnage restreint destiné à mesurer la réponse aux médicaments, ce qui réduit ultimement la possibilité de mener à la découverte d'associations génétiques.<sup>70,241</sup> Or, depuis l'obtention des résultats de l'étude LEVEL-PGx et l'achèvement des projets présentés dans cette thèse, on dénombre déjà plusieurs initiatives à volet PGx faisant appel aux biobanques et contenant des cohortes largement plus grandes qu'auparavant afin de caractériser leurs profils PGx. Comme nous en avons fait allusion en **Section 2.5.2 du Chapitre 1**, un bon nombre de publications dirigent pour l'instant des analyses populationnelles descriptives de leur génotypes en espérant pouvoir mitiger les effets secondaires potentiels associés aux traitements des patients.<sup>469-472</sup> Ces applications sont évidemment justifiées, mais la description des profils PGx des patients s'effectue sans pour autant concrétiser leur pleine utilité. Les déterminants génétiques de gènes codant pour des enzymes métaboliques de phases I et II, des transporteurs, des récepteurs cibles ou des complexes HLA sont répertoriés, tel qu'établi par le CPIC et PharmGKB.<sup>143,145,146</sup> Par ces annotations génotypiques traditionnelles, la biobanque d'Estonie prétendrait identifier >40% de sa cohorte de quelques 44 000 patients pouvant nécessiter des ajustements de doses et éviter des effets indésirables.<sup>470</sup> Prenons également les résultats récents du UK Biobank : grâce au séquençage d'exome et au génotypage de 14 pharmacogènes d'intérêt chez >487 000 participants, McInnes *et al.* révélaient que 99,5% d'entre eux pourraient avoir une réponse atypique à au moins 1 des 45 médicaments prescrits ayant des recommandations cliniques par le CPIC.<sup>473</sup> On rapportait que 24% des patients se voyaient administrés un traitement dont leur profil PGx pouvait occasionner une réponse différentielle, avec >10 médicaments pouvant voir leurs dosages ajustés. D'autres cas apparentés de caractérisation et de description des profils PGx dans des cohortes observationnelles à grand déploiement ont été faits afin d'adresser le risque d'exposition à des effets indésirables ou à une inefficacité de traitement, notamment ceux du

Massachusetts General Brigham Biobank<sup>247</sup> et du Danish National Biobank,<sup>474</sup> pour en nommer quelques-uns.

D'autres travaux récents peuvent être soulignés allant au-delà de la caractérisation descriptive des profils PGx populationnels. À la suite d'une analyse ciblée de pharmacogènes d'intérêt dans une population de >325 000 participants, la prise de simvastatine était associée aux génotypes de *NAT2*, un enzyme hépatique de Phase II impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques.<sup>475</sup> Les auteurs observaient également que les niveaux circulants de LDL étaient significativement affectés par cette association PGx, laquelle fût également reproduite dans une cohorte du consortium eMERGE, discuté au **Chapitre 1**.<sup>241</sup> Des résultats additionnels des auteurs démontraient des différences significatives de LDL circulants entre utilisateurs et non-utilisateurs de simvastatine, peu importe le génotype de *NAT2* (\*1/\*1, \*1/\*5, \*5/\*5). Si des échantillons sanguins ont été obtenus pour mesurer les concentrations circulantes de LDL chez les participants retenus, n'aurait-il pas été informatif d'obtenir les concentrations plasmatiques de simvastatine afin de rallier un modèle PK-PD-PGx ? De telles données pourraient s'avouer être une mesure proximale enrichissante pour juger de l'efficacité antihypercholestérolémique de cet agent, appuyant du même coup un changement de dose ou de thérapie. Ces données procureraient peut-être l'information nécessaire pour personnaliser les doses de cette thérapie et obtenir des effets cliniques similaires pour chaque génotype.

L'utilisation croissante de biobanques à très grand déploiement, soient les références ci-haut comportant entre 36 000 et 488 000 patients, pour des investigations PGx laisse entrevoir que la problématique récurrente d'échantillonnage pour ce domaine pourra être surmontée, tout en démontrant l'ampleur éventuelle de la médecine personnalisée. Comme notre étude LEVEL-PGx le démontre, leur exploitation en recherche PGx pourrait s'effectuer grâce à l'analyse des profils PK et de la réponse aux médicaments pour optimiser l'identification d'associations cliniquement valides et utiles.

### **3.2 Métabolisme des médicaments et progrès des méthodologies pharmacogénomiques**

Cette discussion serait incomplète sans mentionner les développements méthodologiques PGx à plus petite échelle et publiés durant la progression de cette thèse. Il est valable de comparer nos travaux présentés à ceux ayant abordé des thèmes similaires, particulièrement dans le cadre

des thérapies psychiatriques, où l'effervescence de la PGx clinique se veut plus marquée.<sup>474,476,477</sup> De façon préliminaire, l'usage de cohortes rétrospectives (n~2000) supporterait l'approche personnalisée des thérapies antipsychotiques et antidépressives selon les phénotypes inférés du CYP2C19 et du CYP2D6.<sup>478,479</sup> Suite à l'analyse d'une base données de suivi thérapeutique pharmacologique, des résultats démontraient que les concentrations plasmatiques de thérapies psychiatriques étaient influencées par les polymorphismes génétiques de CYPs *a priori* connus, en plus des concentrations de métabolites et des ratios métaboliques de ces drogues. Leurs phénotypes allaient jusqu'à significativement moduler les doses de ces traitements. On pouvait même y distinguer un taux d'échec thérapeutique accru chez les phénotypes PM et UM, potentiellement dû à l'augmentation d'événements indésirables et l'inefficacité thérapeutique, respectivement. À première vue, il semblerait que les banques de données pour suivi thérapeutique pharmacologique soient un outil de recherche intéressant pour établir la validité de plusieurs associations PK-PGx. Bien qu'elles se révèlent être utiles, une fraction négligeable des thérapies actuellement prescrites est couramment évaluée dans ces bases de données. Selon la preuve de concept établie par LEVEL-PGx, les étapes de notre méthodologie entendent à surmonter ces défis.

Toujours en lien avec nos projets présentés, d'autres travaux illustrent le potentiel d'application des devis pangénomiques à des fins PK-PGx. Combinant le génotypage pangénomique à l'aide du HapMap et du 1KGP, la quantification bioanalytique et l'élaboration de modèles multivariés, une publication décrivait la présence de déterminants PK-PGx chez un sous-groupe de patients traités à la clozapine.<sup>480</sup> D'une part, la combinaison de ces techniques permettait d'identifier des variants génétiques de gènes codants plusieurs enzymes de Phases I et II (*e.g. CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, UGT1A4, UGT2B10*).<sup>480</sup> D'autre part, des analyses de colocalisation suggéraient un partage insoupçonné des voies métaboliques de la clozapine avec de multiples xénobiotiques, lesquelles affecteraient potentiellement les concentrations plasmatiques du médicament et de son métabolite actif. Ces composés comprennent des acides gras linoléiques, la vitamine A, l'acide arachidonique, certains stéroïdes endogènes, la nicotine et la caféine. Cette dernière pourrait agir de manière compétitive avec le métabolisme et la clairance de la clozapine puisqu'elles sont toutes deux métabolisées par le CYP1A2. Puis, les SNPs de *CYP1A1* et *CYP1A2* ayant été identifiés dans une région riche en sites de liaisons favorisant la réponse aux xénobiotiques, ces associations laissaient supposer qu'un modèle mécanistique pourrait être établi quant à la PGx de la clozapine, mais également envers les interactions avec d'autres composés qui



affecteraient les concentrations de médicaments. Ces résultats pangénomiques soulignent la possibilité d'identifier des cibles PK-PGx d'intérêt, en plus des retombées inattendues sur l'élucidation d'autres facteurs d'interaction pouvant jouer un rôle mécanistique et associé à une issue PGx. Si ce cas d'étude devait être appliqué aux  $\beta$ -bloqueurs, il est possible d'envisager que l'identification d'une telle composante faisant varier les concentrations plasmatiques, voire la FC ou la dose, puisse entraîner des répercussions PGx et cliniques semblables à celles identifiées dans d'autres GWAS ayant investigué cette classe pharmacologique.<sup>404,407,481</sup>

Enfin, une étude pangénomique au devis similaire et publiée durant le déroulement de LEVEL-PGx a démontré, à l'aide de deux cohortes longitudinales distinctes, qu'il était possible d'identifier des déterminants génétiques associés aux concentrations d'agents immunosuppresseurs inhibiteurs de calcineurine, comme le tacrolimus, chez des patients transplantés.<sup>250</sup> Ces nouveaux déterminants tendaient à conserver leur significativité après ajustement pour la présence de variants de *CYP3A5*, une cible PGx *a priori* connue pour cette classe pharmacologique. Ici, la méthodologie utilisée reflète les mesures cliniques enregistrées dans des bases de données de suivi thérapeutique pharmacologique, à savoir que 24 mesures de concentrations minimales étalées sur 6 mois ont été utilisées, les échantillons plasmatiques ayant été prélevés précisément 12 heures suivant la dernière dose. Comparativement à LEVEL-PGx, l'avantage de cette méthode permet d'effectuer un suivi à-travers le temps des profils PK d'un médicament, puis de déterminer avec plus de robustesse si la toxicité observée est associée aux dernières valeurs mesurées dans chaque groupe phénotypique. Sans compter le temps de puis la dernière dose pourrait réduire la portion de variabilité inexplicée dans les modèles multivariés générés et traitant des concentrations plasmatiques. Un défaut de cette méthode est que la néphrotoxicité n'ait pas pu être associée aux niveaux de concentrations d'immunosuppresseurs, car les mesures de fonction rénale n'avaient pas été prises au même temps que les prélèvements. Contrairement à ces travaux, nous avons pu établir que les associations PK-PGx s'accordaient avec les résultats PD-PGx observés prises au même moment. Cependant, la prise de considération du temps depuis la dernière dose s'avère être des paramètres dont l'inclusion bénéficierait à la robustesse des associations PGx grâce aux biobanques, notamment dans le cas où un traitement nécessite des doses quotidiennes multiples. La présence de mesures répétées servirait à ajouter une crédibilité quant aux issues cliniques ayant un volet PD-PGx et associées aux concentrations de médicaments entre phénotypes. Si plusieurs bases de données pharmacologiques parviennent à

définir le temps de puis la dernière dose, cela témoigne de la faisabilité de cette stratégie de notre côté.

Ici, nous réitérons que le fait d'avoir employé les données d'une biobanque élargit l'application de telles approches à de nombreuses thérapies,<sup>482</sup> tout en pouvant simultanément investiguer la variabilité PGx des paramètres cliniques mesurés selon la réponse à un médicament, hormis quelques contraintes. Il deviendrait envisageable de refléter sur les éventuelles découvertes pangénomiques liées au métabolisme des médicaments de manière similaire à celles associées à la réponse clinique aux  $\beta$ -bloqueurs abordées au **Chapitre 1**.<sup>404,408,481</sup> Au moment d'écrire ces lignes, notre groupe de recherche tente justement d'approfondir les résultats obtenus dans LEVEL-PGx. En effet, des analyses pangénomiques sont conduites afin d'identifier de nouveaux marqueurs PGx potentiellement prédictifs des concentrations plasmatiques de métoprolol. À constater les découvertes effectuées à l'aide de sous-groupes issus de cohortes prospectives en suivi thérapeutique pharmacologique, la place des GWAS PK-PGx est décidément appelée à grandir.<sup>78</sup>

### **3.3 Pharmacocinétique et pharmacodynamie : vers de nouvelles conceptions d'essais pharmacogénomiques ?**

Le principe d'associations PK-PGx sur lesquelles cette thèse a porté pourraient être interprété différemment afin d'identifier d'autres associations PD-PGx, sans pour autant relever de l'analyse pangénomique. Par exemple, nous pouvons envisager que la méthodologie par laquelle nous avons recréé l'association PK-PGx du métoprolol-*CYP2D6* soit flexible afin de stratifier des effets PD-PGx. Une stratification phénotypique pourrait être envisagée afin de déterminer, à l'intérieur de chaque phénotype, quelles sont les concentrations circulantes se transposant en un effet clinique optimal.<sup>248</sup> Certaines variables cliniques pourraient bénéficier de l'ajout, voire être remplacées, par une mesure plus proximale et représentative de l'efficacité d'un traitement. L'introduction de modèles multivariés PD-PGx, préalablement ajustés au phénotype PK-PGx, permettrait de déterminer les concentrations de métoprolol associées à un effet  $\beta$ -bloquant optimal et asymptomatique pour chaque classe de métaboliseurs, pourvu que la variabilité inter-individuelle soit adéquatement cernée. Inversement, l'inclusion du phénotype du *CYP2D6* permettrait l'ajout d'autres cibles polymorphiques impliquées dans la cascade sympathique  $\beta$ -adrénergique, tel que *ADRB1*, et d'en évaluer l'impact PD-PGx selon les concentrations plasmatiques mesurées. Des travaux similaires ont été réalisés sur la paroxétine. Les résultats de

travaux similaires démontraient avec succès que les polymorphismes génétiques du gène codant le transporteur *5-HTTLPR* modulaient ses concentrations circulantes d'ARNm, au point où une variation indel pouvait guider les concentrations plasmatiques de paroxétine corrélant significativement à la réponse clinique en dépression majeure.<sup>248,483</sup>

Évidemment, cette approche serait facilitée par l'usage d'une biobanque générée à l'aide d'une cohorte observationnelle comme celle de l'ICM, pourvu que les concentrations plasmatiques soient mesurées dans les biospécimens collectés. Ces exemples, quoique prometteurs, soulèvent au même moment des défis logistiques potentiels observés par d'autres groupes de recherches quant à la collecte non-systématique de prélèvements sanguins et la prise partielle de mesures cliniques dans certains contextes de biobanques.<sup>237,484</sup>

### **3.4 Bénéficiaire de la détection des variants rares**

L'utilisation de plateformes de génotypage est une méthode répandue afin d'identifier des variants de pharmacogènes en recherche clinique. Ces plateformes parviennent à évaluer la présence de plusieurs centaines de variants sur des gènes spécifiques, incluant des CNVs. Évidemment, un désavantage s'agit de leur génotypage de cibles connues et leur nécessité à devoir être mises à jour périodiquement en fonction de la découverte de nouveaux variants fonctionnels. À l'opposé, l'initiative PGRNseq entend à regrouper les données de séquençage de >80 pharmacogènes sélectionnées pour leur pertinence clinique, selon les informations présentées des bases de données du PharmGKB et du CPIC.<sup>485</sup> Suivant sa validation grâce à une concordance de séquences identifiées >99,8% avec des échantillons du projet HapMap, l'application de la plateforme PGRNseq a été testée avec ~5600 patients sélectionnés à partir des dossiers électronique médicaux du projet eMERGE.<sup>486</sup> Tout comme les cohortes mentionnés plus haut (**Section 3.1**), les résultats obtenus réitèrent le potentiel d'appliquer ces technologies à la PGx à l'échelle populationnelle.

Certaines initiatives PGx faisant appel aux biobanques ayant été référées plus haut dans cette discussion ont recours à des technologies de génotypage et de séquençage qui facilitent la détection de variants possédant des fréquences alléliques faibles.<sup>110</sup> Disposant de grandes tailles d'échantillons, leur application permet d'établir un profil plus exhaustif des profils métaboliques de médicaments au niveau populationnel.<sup>107,482,487</sup> Rappelons qu'en raison du haut degré de

polymorphisme génétique que les CYPs affichent,<sup>164</sup> une proportion non-négligeable des variations de séquence génétique seraient des variants rares,<sup>99</sup> une affirmation qui se vaudrait pour un grand nombre de pharmacogènes.<sup>488</sup> Les avancées de ces techniques de génotypage et de séquençage s'appliquent justement à *CYP2D6*.<sup>161,488,489</sup> Par exemple, suite au séquençage d'exome dans une cohorte observationnelle de >31 000 patients, l'initiative du Helix DNA Discovery Project et sa base ouverte de données génétiques découvrait 49 nouveaux variants (38%) à perte de fonction parmi les 128 identifiés pour *CYP2D6*.<sup>472</sup> Au total, >1200 génotypes uniques étaient identifiés, ainsi que plusieurs autres pour *CYP2C9*, *CYP2C19* et *CYP4F2*. Des découvertes suivant cette ligne ont été faites à plus petite échelle, où l'utilisation du séquençage et la prédiction bio-informatique de l'effet de nouveaux variants rares sur les ratios métaboliques pour certains substrats du CYP2D6 (*i.e.* tamoxifène, venlafaxine) augmentaient significativement la prédictibilité des profils individuels de concentrations, même en présence d'inhibiteurs.<sup>165</sup> Considérant que le génotypage d'allèles ne capterait que <40% de la variabilité inter-individuelle,<sup>173</sup> les grandes cohortes observationnelles et les biobanques se révèlent donc importantes pour une prédiction optimisée du métabolisme des médicaments, du moins pour *CYP2D6*. En ce sens, et comme en témoigne la **Section 3.2**, tirer parti des devis GWAS-PGx, de leur application dans le métabolisme des médicaments et de leur capacité à découvrir de nouvelles associations, cela apparaît être une avenue capable de révéler des cascades métaboliques convergentes et pouvant augmenter la prédiction des profils PK au-delà des voies enzymatiques de Phases I et II.<sup>110,487</sup> Notons cependant que l'homologie de séquence entre *CYP2D6*, *CYP2D7* et *CYP2D8P* sera une limite à franchir dans le cas étudié,<sup>163</sup> sans compter l'aspect récurrent des coûts associés à l'implantation du séquençage PGx.<sup>110</sup> À mesure que les biobanques grandissent en taille et en nombre, les opportunités de caractériser les variants rares en PGx devraient montrer une tendance similaire.<sup>482</sup>

### 3.5 À propos des scores de risques polygéniques

Les techniques d'analyses pangénomiques procurent désormais la possibilité d'identifier de multiples gènes ayant des contributions modestes au développement ou à la progression des maladies à traits complexes. En combinant la présence de dizaines ou de centaines de variants génétiques identifiés par GWAS, leur impact cumulatif peut être transformé en un score de risque polygénique (SRP) prédictif d'un état pathophysiologique.<sup>490,491</sup> Contrairement à l'identification

de variants génétiques pour des maladies monogéniques, dont la portée est davantage diagnostique (e.g. *PCSK9*, *CFTR*), les SRPs se veulent plutôt probabilistes; la présence d'allèles s'additionne en un score prédictif, lequel reflète le risque pronostic lié au développement d'un phénotype commun. Des phénotypes comme la survenue de maladies coronariennes, psychiatriques et pour certains cancers ont été proposés antérieurement.<sup>490,491</sup> Des résultats prometteurs ont été produits avec l'aide des biobanques pour générer et valider des SRPs. Par l'entremise de la biobanque BioVU, des SRPs prédictifs des niveaux circulants de triglycérides, de HDL et de LDL, en plus d'un SRP composite pour la survenue de maladies coronariennes ont été générés.<sup>492</sup> Ces résultats impliquent des percées majeures par rapport à des investigations semblables, soient en traitant des maladies coronariennes et en prédisant des bilans lipidiques, et dont les données ont aussi été issues de biobanques de cohortes.<sup>228,491,493</sup>

On dénombre peu de SRPs PGx proposés dans la littérature.<sup>494</sup> Pour certains, les tailles de cohortes limiteraient grandement la portée des analyses pangénomiques, puis des SRPs qui en découlent. Les points soulevés ci-haut amènent à penser que la création de SRPs à partir de GWAS PGx pourrait mener à une prédiction robuste des profils PK et de la réponse au médicament, si ce n'est que de considérer la combinaison de génotypes issus de quelques pharmacogènes d'intérêt. Certes, ces considérations vont au-delà des modèles multivariables employés dans nos travaux. Néanmoins, la preuve de concept établie par ces derniers permet d'envisager ces approches pour de futures investigations ciblant des déterminants PGx prédictifs des concentrations ou des profils PK, entres autres.

### **3.6 Résoudre les enjeux contemporains des biobanques pour augmenter le potentiel translationnel de la pharmacogénomique clinique**

Les perspectives liées à l'implantation générale de la PGx clinique font l'objet d'une grande quantité de publications scientifiques, à commencer par la démonstration d'une utilité clinique quelconque lors des grands essais pivots à devis randomisés contrôlés.<sup>57</sup> Certains observateurs vont jusqu'à s'interroger de la nécessité des grands essais randomisés en raison des limites qu'elles imposent relativement à d'autres sources de données.<sup>495</sup> À cet effet, les biobanques et les grandes cohortes observationnelles, notamment celles utilisant l'information (pharmaco)génétique, soulèvent quant à elles des problématiques éthiques, logistiques et légales qui se prêtent aux thèmes abordés dans cette thèse.<sup>225,226,245,496</sup> La **Figure 11** en fournit un aperçu.

Enjeux	Implications
<b>Consentement</b>	Défis éthiques reliés au consentement unique des participants pour l'utilisation de leur information génomique. Discussions quant à l'autorisation ciblée par les participants (consentement dynamique).
<b>Partage et confidentialité</b>	Enjeux liés au partage inter-institutionnel d'information (pharmaco)génétique et avec des entités commerciales. Possibilité d'identification subséquente en cas d'usages de données dénominalisées.
<b>Retour de données PGx</b>	Critères nécessaires au retour d'information pharmacogénétique incluant la validité clinique et la capacité à changer le cours d'un traitement selon les données additionnelles ( <i>actionability</i> ). Nécessité de développer des directives quant au retour d'information pharmacogénétique aux patients.
<b>Conservation d'échantillons</b>	Considérations liées aux conditions optimales de préservation et de capacité logistique de storage de biospécimens variés sur un horizon prolongé de temps, incluant la représentativité physiopathologique et génétique des biospécimens collectés.

**Figure 11 Enjeux généraux reliés aux biobanques avec données (pharmaco)génétiques.**

Le public reconnaît généralement l'apport de la recherche conduite avec des biobanques recueillant l'information génétique, indiquant que ces dernières bénéficient au progrès scientifique et mènent à développer des thérapies novatrices.<sup>497-499</sup> Cela n'empêche pas que leurs participants soient concernés par le maintien de leur vie privée et de la confidentialité des données qui y sont préservées, comme l'information génétique ou PGx.<sup>496,498,500,501</sup> De plus, dans le cadre de l'avancement de la médecine personnalisée et génomique, le partage inter-institutionnel de l'information génétique implique le consentement de telles modalités par les participants. Il existe un nombre grandissant de provisions éthiques et légales entourant les biobanques, surtout en ce qui a trait à la restriction de l'accès aux données.<sup>501,502</sup> En raison de la quantité et de la nature des informations rassemblées, l'accès à la vie privée et le partage des données requièrent l'approbation de comités scientifiques et éthiques. Ces aspects tendent à devenir des points essentiels dans les formulaires de consentement destinés aux participants,<sup>230,245,502</sup> dont la prise en compte améliore la transparence et le recrutement. Puis, une mesure du maintien de la confidentialité s'inscrit par la dénominalisation des données,<sup>230,237</sup> une considération non-négligeable dans le cas de génotypes/phénotypes physiopathologiques ou PGx rares.<sup>501</sup>

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, la notion de confidentialité va de pair avec le consentement des patients en ce qui a trait à l'utilisation des données génétiques. Il est généralement acquis qu'un participant issu d'une biobanque donne son consentement de façon prospective afin que ses données, si jugées pertinentes, puissent être utilisées dans n'importe quel

contexte raisonnable de recherche scientifique. Cette approche se veut acceptable, surtout dans un contexte de dénominalisation.<sup>503</sup> Or, on note que la capacité de se retirer d'une biobanque est une préférence importante pour une proportion considérable de participants.<sup>503</sup> Le concept de consentement dynamique, ou consentement ciblé, permettrait aux participants de décider les aires de recherches ou le type d'utilisation de données, en plus de pouvoir réviser périodiquement leur consentement initial, de sorte à inclure le point de vue du patient dans la remédiation des enjeux de confidentialité des données.<sup>504</sup> Il semblerait que l'incitation à une réciprocité soit favorisée entre le consentement des participants et la divulgation de l'utilisation des données de biobanques par les chercheurs impliqués.<sup>230</sup>

Le recours à ce type de consentement dynamique peut toutefois s'avérer problématique en situation réelle. Pour la PGx, il est raisonnable de penser que l'identification de déterminants génétiques prédictifs d'une inefficacité ou d'une toxicité puisse ne pas bénéficier à des participants chez qui le traitement en question n'est pas prescrit ou ne prévoit pas l'être, ce qui rencontre la problématique de l'utilité de participer. Cependant, il est souvent impossible de prévoir quelle sera l'étendue des utilisations et des développements futurs en recherche biomédicale issue des biobanques.<sup>505</sup> Cet argument possède un poids considérable lorsqu'il est question d'essais pangénomiques, où les découvertes fortuites sont possibles. À cela s'ajoute le nombre grandissant d'études faisant appel aux données de biobanques, lequel rend complexe la standardisation d'un modèle de consentement dynamique.<sup>506</sup> On peut également douter de la faisabilité pratique de devoir recontacter les participants lorsque des projets utilisant de grandes cohortes observationnelles nécessitent à ce qu'ils réévaluent leur consentement, par exemple.<sup>506</sup> De ce point de vue, le consentement traditionnel et unique semblerait demeurer pour l'instant la meilleure option, quitte à ce qu'un niveau de communication soit offert auprès du participant et que ses protections lui étant émises face aux risques encourus, comme la fuite d'information ou le bris de confidentialité, soient clairement reconnues, avec un droit de rétroaction de sa part.<sup>505</sup>

Faisant suite aux enjeux ci-haut, la communication traitant du retour d'information PGx demeure un autre sujet aux ramifications éthiques multiples. Il est admis que les résultats PGx qui se qualifient pour un retour d'information doivent être valides et utiles pour influencer l'allocation d'un traitement,<sup>507</sup> une position partagée par les patients et les professionnels de la santé.<sup>508,509</sup> Des questionnaires établissent que ~60% des biobanques répondantes n'offriraient pas la possibilité de

communiquer les résultats aux participants.<sup>510</sup> Des résultats qualitatifs de participants interrogés sur le sujet suggèrent pourtant que les découvertes PGx fortuites provenant de biobanques soient divulguées clairement lorsqu'elles sont cliniquement utiles, peu importe le temps écoulé depuis le recrutement.<sup>511</sup> Malgré l'absence de lignes directrices encadrant le retour d'information génétique ou PGx issue de biobanques, il reste que la décision d'un participant à se faire communiquer de tels résultats, ainsi que la pertinence et l'utilité cliniques de ces derniers demeurent des considérations centrales au développement de recommandations futures.<sup>230</sup> Intégrer les données PGx aux dossiers médicaux électroniques devrait s'accorder selon ces principes de pertinence clinique pour les patients, sans quoi l'exposition à un risque lié à la confidentialité serait inutilement créée. L'utilisation d'outils CDS s'agit d'un ajout à envisager pour faciliter leur interprétation et proposer les changements de traitements à apporter de la part des cliniciens.<sup>512-514</sup> Le réseau eMERGE et le réseau hospitalier affilié à l'Université du Colorado comprennent désormais des centres ayant intégré l'information PGx issues de biobanques aux dossiers médicaux électroniques, en plus d'avoir créé des outils CDS et effectuant un retour aux participants lorsque valable.<sup>246,515</sup> Ces informations PGx vont jusqu'à englober à la fois des données de géotypage, de séquençage ou de SRPs.<sup>515</sup> En intégrant tous ces aspects dans un contexte de soins, l'implantation et l'utilité cliniques de la PGx sous l'angle des grandes cohortes observationnelles de recherche pourront être proprement évaluées dans leur ensemble.

Enfin, d'un point de vue technique, les grandes cohortes observationnelles permettent aux institutions de recherche d'établir un lien entre les informations contenues dans les biospécimens, telles que les informations génomiques et endophénotypiques. Les informations contenues peuvent aussi être liées à de multiples sources, telles que les données sur les antécédents médicaux et les prescriptions provenant de registres électroniques ou de dossiers individuels. Il convient de noter que les biobanques de cohortes, comme celle de l'ICM,<sup>233</sup> recueillent des informations sur les médicaments à partir de bases de données d'ordonnances, généralement remplies par des entrées manuelles. Par conséquent, ces ensembles de données sont non seulement sujets à des informations potentiellement imprécises de la part du personnel soignant qui entre les valeurs, mais peuvent aussi contenir des informations incomplètes sur l'observance.<sup>249</sup> Un fardeau considérable peut apparaître lors de la sélection d'une cohorte dans laquelle les polypharmacies peuvent avoir un impact sur les profils PK. Cela sert à justifier certaines limites de notre étude LEVEL-PGx et des autres études observationnelles transversales, lesquelles ne peuvent pas toujours déterminer avec



robustesse un lien entre la réponse clinique aux médicaments et leurs influences PGx. Dans le cas de nos travaux, une revue et une sélection manuelles des données furent requises afin d'identifier adéquatement les interactions médicamenteuses potentiellement présentes dans la cohorte. Cette considération technique représente assurément une barrière logistique à l'implantation inter-institutionnelle et décentralisée des biobanques et à leur partage de données PGx.<sup>245,484</sup> Heureusement, des solutions sous forme de système standardisé et d'algorithmes d'entrée de données ont été proposées qui, une fois mises sur pied, allégeraient le déploiement d'initiatives inter-institutionnelles.<sup>484,516,517</sup> Les difficultés rencontrées par notre groupe démontre de cette utilité pour les méthodologies PGx et ce, déjà au sein d'un seul centre. Ces propositions se valent autant pour les analyses et les annotations génomiques, pour le traitement et l'entreposage de biospécimens,<sup>230,516</sup> et pour les dossiers électroniques des patients remplis et modifiés par les prescripteurs.<sup>249</sup> Puisque la majorité des participants proviennent directement de la Cohorte Hospitalière de l'ICM, la représentativité des données et des échantillons collectés peut poser un enjeu important. Comment s'assurer que les résultats obtenus à partir d'une cohorte hospitalière puissent représenter les phénotypes ? Certains observateurs estiment que les phénotypes de ces cohortes pourraient être plus sévères que dans une population générale.<sup>482</sup> Nous estimons que les biobanques populationnelles parviennent à capter à la fois la variabilité et les valeurs nécessaires à ce qu'elles soient représentatives d'une population donnée. Pour ce qui est du volet PGx, les populations incluses sont composées de patients prenant les thérapies investiguées selon des diagnostics définis. Il devient alors raisonnable de penser que la majorité des découvertes faites au sein d'un groupe ou d'un sous-groupe s'appliqueraient à l'ensemble d'une population, de sorte à appuyer la généralisabilité derrière le principe de la PGx préventive.

Nous avons élaboré sur les avenues futures des grandes cohortes observationnelles et des biobanques en PGx, ainsi que les bénéfices pouvant être entrevus quant à la prédiction des concentrations de médicaments et des profils PK. Comme nous l'avons déjà abordé au **Chapitre 1 (Section 2.5)**, ces bénéfices peuvent s'étendre et prédire la réponse clinique aux médicaments. On note des exemples de systèmes de soins et de centres hospitaliers ayant déjà implanté ou prévoyant des programmes dédiés à la PGx clinique, dont les données génétiques proviennent tout droit de biobanques institutionnelles.<sup>246,472,475,515</sup> Or, la mise en place des grandes cohortes observationnelles avec biospécimens comporte encore à ce jour des enjeux qui devront être réconciliés à mesure que leur utilisation deviendra répandue en PGx.

## Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectif principal d'investiguer la possibilité selon laquelle les grandes cohortes observationnelles, ou biobanques, pouvaient être mises à profit afin de découvrir, d'identifier et de valider des déterminants PGx prédictifs des concentrations de médicaments, mais également de leur dosage. Grâce à l'utilisation d'une association préalablement confirmée pour métoprolol-*CYP2D6*, nous pouvons affirmer que cette méthodologie à grand déploiement présentée soit envisageable pour surmonter les contraintes imposées par les devis PK traditionnels couramment employés dans les essais PK-PGx.

Ainsi, l'utilisation d'un grand nombre de patients chez qui était connue l'information génotypique, en plus de prélèvements sanguins uniques et aléatoires ayant été obtenus afin d'en faire la mesure des concentrations de médicaments, témoigne du potentiel de notre approche et de ses applications futures. Les modèles multivariés employés servent à montrer que bien que d'autres cofacteurs exercent une influence sur les associations observées, l'aspect PGx prédictif demeure significatif, à un point tel où des études pangénomiques ayant recours à des biobanques inter-institutionnelles, qu'elles soient de cohorte ou populationnelles, peuvent être considérées. D'autant plus que nos méta-analyses sur l'impact des polymorphismes génétiques de *CYP2D6* sur la réponse clinique au métoprolol mettent en lumière des effets PD-PGx qui ont été observés à plus grande échelle avec notre approche observationnelle. Nos avancées pourraient éventuellement permettre déterminer la validité derrière une approche personnalisée à certaines thérapies  $\beta$ -bloquantes, quoique plusieurs classes de médicaments pourraient être investiguées par notre approche observationnelle. Enfin, les techniques bioanalytiques mises au point durant ces travaux de doctorat s'inscrivent dans la même veine de découverte de nouvelles méthodologies. Celles-ci resservent les problématiques précédemment rencontrées en bioanalyse et pourraient être adaptées à d'autres classes de molécules afin d'en faire la quantification chirale. Au niveau clinique, la validation de notre preuve de concept ne demeure cependant qu'une étape parmi toutes celles à franchir afin de surmonter les défis d'application concernant les biobanques et la PGx. Il est possible d'espérer que l'avènement de nouvelles méthodes concrètes en recherche PGx facilitera à établir sa validité et son utilité cliniques afin que tous puissent éventuellement bénéficier de traitements personnalisés, jusqu'aux plus fins aspects de leur génome.

## Bibliographie

1. Cao X, Yu L, Sun D. Drug Absorption Principles. Dans: Krishna R, Yu L, rédacteurs. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Boston, MA: Springer US; 2008. p. 75-100.
2. Buxton ILO. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
3. Doogue MP, Polasek TM. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf*. 2013;4(1):5-7. Epub 2013/02/01.
4. Blumenthal DK. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
5. Glassman PM, Muzykantov VR. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. 2019;370(3):570-80.
6. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(3):255-70.
7. Caldwell J, Gardner I, Swales N. An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. 1995;23(2):102-14.
8. Giacomini KM, Sugiyama Y. Membrane Transporters and Drug Response. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
9. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(10):1340-56.
10. Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. 2009;61(5):541-58.
11. Erickson MA, Penning TM. Drug Toxicity and Poisoning. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
12. Batchelor HK, Marriott JF. Paediatric pharmacokinetics: key considerations. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(3):395-404. Epub 2015/04/10.
13. Lu H, Rosenbaum S. Developmental Pharmacokinetics in Pediatric Populations. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 2014;19(4):262-76.

14. Gonzalez FJ, Coughtrie M, Tukey RH. Drug Metabolism. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
15. Kiang TKL, Ensom MHH, Chang TKH. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005;106(1):97-132.
16. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-41.
17. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004;14(1):1-18. Epub 2004/05/07.
18. Vuppalanchi R. 4 - Metabolism of Drugs and Xenobiotics. Dans: Saxena R, rédacteur. *Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach*. Saint Louis: W.B. Saunders; 2011. p. 45-52.
19. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. 2006;57(1):119-37.
20. Markert CL, Møller F. MULTIPLE FORMS OF ENZYMES: TISSUE, ONTOGENETIC, AND SPECIES SPECIFIC PATTERNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1959;45(5):753-63.
21. Yu J, Petrie ID, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Mechanisms and Clinical Significance of Pharmacokinetic-Based Drug-Drug Interactions with Drugs Approved by the U.S. Food and Drug Administration in 2017. *Drug Metabolism and Disposition*. 2019;47(2):135.
22. Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol*. 1998;107:15-24. Epub 2003/10/28.
23. Schlötterer C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(1):63-9.
24. Fan J, de Lannoy IAM. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*. 2014;87(1):93-120.
25. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental analysis. *Methods Mol Biol*. 2012;929:377-89. Epub 2012/09/26.
26. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.
27. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51. Epub 2001/02/22.

28. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
29. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* (London, England). 2005;366(9489):941-51. Epub 2005/09/13.
30. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. *Genomic Medicine — An Updated Primer*. 2010;362(21):2001-11.
31. Southan C. Has the yo-yo stopped? An assessment of human protein-coding gene number. *Proteomics*. 2004;4(6):1712-26.
32. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D884-d91. Epub 2020/11/03.
33. Frankish A, Diekhans M, Jungreis I, Lagarde J, Loveland JE, Mudge JM, et al. GENCODE 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D916-d23. Epub 2020/12/04.
34. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61. Epub 2007/10/19.
35. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1590-605. Epub 2008/05/03.
36. Glossary of Genomics Terms. *JAMA*. 2013;309(14):1533-5.
37. Lachance J. Hardy–Weinberg Equilibrium and Random Mating. Dans: Kliman RM, rédacteur. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 208-11.
38. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008;453(7191):56-64.
39. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
40. Fairley S, Lowy-Gallego E, Perry E, Flicek P. The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Research*. 2019;48(D1):D941-D7.
41. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, et al. The 1000 Genomes Project: data management and community access. *Nature Methods*. 2012;9(5):459-62.
42. Salari K, Watkins H, Ashley EA. Personalized medicine: hope or hype? *European heart journal*. 2012;33(13):1564-70.
43. Royal CDM, Dunston GM. Changing the paradigm from 'race' to human genome variation. *Nat Genet*. 2004;36(11):S5-S7.

44. Zaiou M, El Amri H. Cardiovascular pharmacogenetics: a promise for genomically-guided therapy and personalized medicine. 2017;91(3):355-70.
45. Hasin Y, Seldin M, Lusk A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*. 2017;18(1):83.
46. Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(6):353-65.
47. Leon-Mimila P, Wang J, Huertas-Vazquez A. Relevance of Multi-Omics Studies in Cardiovascular Diseases. 2019;6.
48. Ikediobi ON. Somatic pharmacogenomics in cancer. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(5):305-14. Epub 2008/08/06.
49. Milanez-Almeida P, Martins AJ, Germain RN, Tsang JS. Cancer prognosis with shallow tumor RNA sequencing. *Nature Medicine*. 2020;26(2):188-92.
50. Iorio F, Knijnenburg TA, Vis DJ, Bignell GR, Menden MP, Schubert M, et al. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell*. 2016;166(3):740-54.
51. Hutter C, Zenklusen JC. The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data. *Cell*. 2018;173(2):283-5. Epub 2018/04/07.
52. Yang W, Soares J, Greninger P, Edelman EJ, Lightfoot H, Forbes S, et al. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Research*. 2012;41(D1):D955-D61.
53. Sharma A, Buschmann MM, Gilbert JA. Pharmacomicrobiomics: The Holy Grail to Variability in Drug Response? *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(2):317-28. Epub 2019/04/03.
54. Motulsky AG. DRUG REACTIONS, ENZYMES, AND BIOCHEMICAL GENETICS. *Journal of the American Medical Association*. 1957;165(7):835-7.
55. Kalow W. Unusual responses to drugs in some hereditary conditions. *Can Anaesth Soc J*. 1961;8:43-52. Epub 1961/01/01.
56. Meyer UA. Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(9):669-76.
57. Roden DM, McLeod HL, Relling MV, Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, et al. Pharmacogenomics. *The Lancet*. 2019;394(10197):521-32.
58. Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004;5(9):669-76. Epub 2004/09/17.
59. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama*. 1998;279(15):1200-5. Epub 1998/04/29.

60. Landrigan CP, Parry GJ, Bones CB, Hackbarth AD, Goldmann DA, Sharek PJ. Temporal Trends in Rates of Patient Harm Resulting from Medical Care. 2010;363(22):2124-34.
61. Tanoshima R, Khan A, Biala AK, Trueman JN, Drögemöller BI, Wright GEB, et al. Analyses of Adverse Drug Reactions–Nationwide Active Surveillance Network: Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety Database. 2019;59(3):356-63.
62. Birkenfeld AL, Jordan J, Hofmann U, Busjahn A, Franke G, Krüger N, et al. Genetic Influences on the Pharmacokinetics of Orally and Intravenously Administered Digoxin as Exhibited by Monozygotic Twins. 2009;86(6):605-8.
63. Akyea RK, Kai J, Qureshi N, Iyen B, Weng SF. Sub-optimal cholesterol response to initiation of statins and future risk of cardiovascular disease. *Heart*. 2019;105(13):975-81. Epub 2019/04/17.
64. Wei C-Y, Michael Lee M-T, Chen Y-T. Pharmacogenomics of adverse drug reactions: implementing personalized medicine. *Human Molecular Genetics*. 2012;21(R1):R58-R65.
65. Chan SL, Jin S, Loh M, Brunham LR. Progress in understanding the genomic basis for adverse drug reactions: a comprehensive review and focus on the role of ethnicity. *Pharmacogenomics*. 2015;16(10):1161-78. Epub 2015/05/16.
66. Dugger SA, Platt A, Goldstein DB. Drug development in the era of precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018;17(3):183-96.
67. Bienfait K, Chhibber A, Marshall J-C, Armstrong M, Cox C, Shaw PM, et al. Current challenges and opportunities for pharmacogenomics: perspective of the Industry Pharmacogenomics Working Group (I-PWG). *Human Genetics*. 2021.
68. Tremaine L, Brian W, DelMonte T, Francke S, Groenen P, Johnson K, et al. The role of ADME pharmacogenomics in early clinical trials: perspective of the Industry Pharmacogenomics Working Group (I-PWG). *Pharmacogenomics*. 2015;16(18):2055-67.
69. Identifying and Quantifying Heterogeneity. *Introduction to Meta-Analysis*. p. 107-25.
70. McInnes G, Yee SW, Pershad Y, Altman RB. Genomewide Association Studies in Pharmacogenomics. ;n/a(n/a).
71. Daly AK. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nat Rev Genet*. 2010;11(4):241-6. Epub 2010/03/20.
72. Hertz DL, Arwood MJ, Stocco G, Singh S, Karnes JH, Ramsey LB. Planning and Conducting a Pharmacogenetics Association Study. 2021;110(3):688-701.
73. Ross S, Anand SS, Joseph P, Paré G. Promises and challenges of pharmacogenetics: an overview of study design, methodological and statistical issues. *JRSM Cardiovascular Disease*. 2012;1(1):cvd.2012.012001.

74. Elbers CC, van Eijk KR, Franke L, Mulder F, van der Schouw YT, Wijmenga C, et al. Using genome-wide pathway analysis to unravel the etiology of complex diseases. 2009;33(5):419-31.
75. Slatkin M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(6):477-85.
76. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*. 2019;20(8):467-84.
77. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021;1(1):59.
78. Linskey DW, Linskey DC, McLeod HL, Luzum JA. The need to shift pharmacogenetic research from candidate gene to genome-wide association studies. ;0(0):null.
79. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. 2003;348(6):538-49.
80. van der Lee M, Kriek M, Guchelaar H-J, Swen JJ. Technologies for Pharmacogenomics: A Review. 2020;11(12):1456.
81. Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hänseler E. Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 1):1072-7. Epub 2000/08/06.
82. Rebsamen MC, Desmeules J, Daali Y, Chiappe A, Diemand A, Rey C, et al. The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction. *The Pharmacogenomics Journal*. 2009;9(1):34-41.
83. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. 2009;60(1):2.12.1-2..8.
84. Frederiksen T, Areberg J, Schmidt E, Bjerregaard Stage T, Brøsen K. Quantification of In Vivo Metabolic Activity of CYP2D6 Genotypes and Alleles Through Population Pharmacokinetic Analysis of Vortioxetine. 2021;109(1):150-9.
85. Hertz DL, Snavely AC, McLeod HL, Walko CM, Ibrahim JG, Anderson S, et al. In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. 2015;80(5):1122-30.
86. Ahmed S, Zhou Z, Zhou J, Chen S-Q. Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14(5):298-313. Epub 2016/10/08.
87. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-6.



88. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*. 1986;319(6050):226-30.
89. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. 1993;11(10):1936-42.
90. Jørgensen JT, Winther H, Askaa J, Andresen L, Olsen D, Møllerup J. A Companion Diagnostic With Significant Clinical Impact in Treatment of Breast and Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:676939. Epub 2021/08/10.
91. Monographie de Produit. HERCEPTIN. Trastuzumab pour injection. Hoffmann-La Roche Limited. Dernière révision: 19 février 2021.
92. Vathiotis IA, Charpidou A, Gavrielatou N, Syrigos KN. HER2 Aberrations in Non-Small Cell Lung Cancer: From Pathophysiology to Targeted Therapy. 2021;14(12):1300.
93. Xiao Y, Ding J, Ma D, Chen S, Li X, Yu K. Predicting Pathological Complete Response in Neoadjuvant Dual Blockade With Trastuzumab and Pertuzumab in HER2 Gene Amplified Breast Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:877825. Epub 2022/06/07.
94. Santos PCJL, Pereira AC. Type of LDLR mutation and the pharmacogenetics of familial hypercholesterolemia treatment. 2015;16(15):1743-50.
95. Brunham LR, Ruel I, Aljenedil S, Rivière J-B, Baass A, Tu JV, et al. Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial Hypercholesterolemia: Update 2018. *Canadian Journal of Cardiology*. 2018;34(12):1553-63.
96. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;116(3):496-526.
97. Yiannakopoulou E. Pharmacogenomics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(2):105-9. Epub 2012/10/10.
98. Maranville JC, Cox NJ. Pharmacogenomic variants have larger effect sizes than genetic variants associated with other dichotomous complex traits. *The Pharmacogenomics Journal*. 2016;16(4):388-92.
99. Kozyra M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes, and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. *Genetics in Medicine*. 2017;19(1):20-9.
100. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007;116(3):496-526. Epub 2007/11/16.

101. Roden DM. Pharmacogenetics. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
102. BRANDT JT, CLOSE SL, ITURRIA SJ, PAYNE CD, FARID NA, ERNEST II CS, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. 2007;5(12):2429-36.
103. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. 2009;360(4):354-62.
104. Claassens DMF, Vos GJA, Bergmeijer TO, Hermanides RS, van 't Hof AWJ, van der Harst P, et al. A Genotype-Guided Strategy for Oral P2Y12 Inhibitors in Primary PCI. 2019;381(17):1621-31.
105. Gage BF, Bass AR, Lin H, Woller SC, Stevens SM, Al-Hammadi N, et al. Effect of Genotype-Guided Warfarin Dosing on Clinical Events and Anticoagulation Control Among Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty: The GIFT Randomized Clinical Trial. JAMA. 2017;318(12):1115-24.
106. Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(3):326-31. Epub 2008/02/29.
107. Roden DM, Van Driest SL, Wells QS, Mosley JD, Denny JC, Peterson JF. Opportunities and Challenges in Cardiovascular Pharmacogenomics: From Discovery to Implementation. Circulation research. 2018;122(9):1176-90.
108. Cui J-J, Wang L-Y, Tan Z-R, Zhou H-H, Zhan X, Yin J-Y. MASS SPECTROMETRY-BASED PERSONALIZED DRUG THERAPY. 2020;39(5-6):523-52.
109. Clarke NJ. Mass Spectrometry in Precision Medicine: Phenotypic Measurements Alongside Pharmacogenomics. Clin Chem. 2016;62(1):70-6. Epub 2015/11/12.
110. Arbitrio M, Scionti F, Di Martino MT, Caracciolo D, Pensabene L, Tassone P, et al. Pharmacogenomics Biomarker Discovery and Validation for Translation in Clinical Practice. 2021;14(1):113-9.
111. Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR, Goldstein JA, Rieder MJ, Flockhart DA, et al. VKORC1 polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. Pharmacogenomics. 2008;9(10):1445-58. Epub 2008/10/16.
112. WATZKA M, GEISEN C, BEVANS CG, SITTINGER K, SPOHN G, ROST S, et al. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. 2011;9(1):109-18.
113. Mega JL, Walker JR, Ruff CT, Vandell AG, Nordio F, Deenadayalu N, et al. Genetics and the clinical response to warfarin and edoxaban: findings from the randomised, double-blind

ENGAGE AF-TIMI 48 trial. *Lancet* (London, England). 2015;385(9984):2280-7. Epub 2015/03/15.

114. Asiimwe IG, Zhang EJ, Osanlou R, Jorgensen AL, Pirmohamed M. Warfarin dosing algorithms: A systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(4):1717-29. Epub 2020/10/21.

115. Magavern EF, Kaski JC, Turner RM, Drexel H, Janmohamed A, Scourfield A, et al. The role of pharmacogenomics in contemporary cardiovascular therapy: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy. *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2021.

116. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. 2005;308(5720):385-9.

117. Manolio TA. Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(8):549-58.

118. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. 2010;363(2):166-76.

119. Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-6.

120. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-22. Epub 2017/03/18.

121. Yang S-K, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet*. 2014;46(9):1017-20.

122. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui C-H, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. 2019;105(5):1095-105.

123. Illing PT, Purcell AW, McCluskey J. The role of HLA genes in pharmacogenomics: unravelling HLA associated adverse drug reactions. *Immunogenetics*. 2017;69(8):617-30.

124. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina J-M, Workman C, Tomažič J, et al. HLA-B\*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. 2008;358(6):568-79.

125. Martin MA, Hoffman JM, Freimuth RR, Klein TE, Dong BJ, Pirmohamed M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for HLA-B Genotype and Abacavir Dosing: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(5):499-500. Epub 2014/02/25.

126. Park HW, Kim DK, Kim SH, Kim S, Chae DW, Yang MS, et al. Efficacy of the HLA-B(\*)58:01 Screening Test in Preventing Allopurinol-Induced Severe Cutaneous Adverse

Reactions in Patients with Chronic Renal Insufficiency-A Prospective Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(4):1271-6. Epub 2018/12/24.

127. Limdi NA, Veenstra DL. Expectations, validity, and reality in pharmacogenetics. *J Clin Epidemiol.* 2010;63(9):960-9. Epub 2009/12/10.

128. Giacomini KM, Yee SW, Mushiroda T, Weinshilboum RM, Ratain MJ, Kubo M. Genome-wide association studies of drug response and toxicity: an opportunity for genome medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(1):70-.

129. Liu C, Yang W, Pei D, Cheng C, Smith C, Landier W, et al. Genomewide Approach Validates Thiopurine Methyltransferase Activity Is a Monogenic Pharmacogenomic Trait. 2017;101(3):373-81.

130. Tamm R, Mägi R, Tremmel R, Winter S, Mihailov E, Smid A, et al. Polymorphic variation in TPMT is the principal determinant of TPMT phenotype: A meta-analysis of three genome-wide association studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(5):684-95. Epub 2016/10/23.

131. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000433. Epub 2009/03/21.

132. Peters EJ, McLeod HL. Ability of whole-genome SNP arrays to capture 'must have' pharmacogenomic variants. *Pharmacogenomics.* 2008;9(11):1573-7. Epub 2008/11/21.

133. Motsinger-Reif AA, Jorgenson E, Relling MV, Kroetz DL, Weinshilboum R, Cox NJ, et al. Genome-wide association studies in pharmacogenomics: successes and lessons. 2013;23(8):383-94.

134. Baan FHvd, Klungel OH, Egberts AC, Leufkens HG, Grobbee DE, Roes KC, et al. Pharmacogenetics in randomized controlled trials: considerations for trial design. 2011;12(10):1485-92.

135. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genome-wide study. *N Engl J Med.* 2008;359(8):789-99. Epub 2008/07/25.

136. Yee SW, Momozawa Y, Kamatani Y, Tyndale RF, Weinshilboum RM, Ratain MJ, et al. Genomewide Association Studies in Pharmacogenomics: Meeting Report of the NIH Pharmacogenomics Research Network-RIKEN (PGRN-RIKEN) Collaboration. *Clin Pharmacol Ther.* 2016;100(5):423-6. Epub 2016/06/04.

137. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):662-73. Epub 2011/03/18.

138. Lakiotaki K, Kanterakis A, Kartsaki E, Katsila T, Patrinos GP, Potamias G. Exploring public genomics data for population pharmacogenomics. *PLOS ONE.* 2017;12(8):e0182138.

139. Kim JA, Ceccarelli R, Lu CY. Pharmacogenomic Biomarkers in US FDA-Approved Drug Labels (2000–2020). 2021;11(3):179.
140. Yamazaki S. A retrospective analysis of actionable pharmacogenetic/genomic biomarker language in FDA labels. 2021;14(4):1412-22.
141. Food and Drug Administration. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. : [modifié le 8 novembre 2021; cité le 3 janvier 2022]. Disponible: <https://www.fda.gov/medical-devices/precision-medicine/table-pharmacogenetic-associations>
142. Ehmann F, Caneva L, Prasad K, Paulmichl M, Maliepaard M, Llerena A, et al. Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. The Pharmacogenomics Journal. 2015;15(3):201-10.
143. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. Clin Pharmacol Ther. 2021;110(3):563-72. Epub 2021/07/04.
144. McDonagh EM, Whirl-Carrillo M, Garten Y, Altman RB, Klein TE. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. Biomarkers in Medicine. 2011;5(6):795-806.
145. Barbarino JM, Whirl-Carrillo M, Altman RB, Klein TE. PharmGKB: A worldwide resource for pharmacogenomic information. 2018;10(4):e1417.
146. Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. Clin Pharmacol Ther. 2011;89(3):464-7. Epub 2011/01/29.
147. Caudle KE, Klein TE, Hoffman JM, Muller DJ, Whirl-Carrillo M, Gong L, et al. Incorporation of pharmacogenomics into routine clinical practice: the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline development process. Curr Drug Metab. 2014;15(2):209-17. Epub 2014/02/01.
148. Swen JJ, Wilting I, de Goede AL, Grandia L, Mulder H, Touw DJ, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte. Clin Pharmacol Ther. 2008;83(5):781-7. Epub 2008/02/07.
149. Bank PCD, Caudle KE, Swen JJ, Gammal RS, Whirl-Carrillo M, Klein TE, et al. Comparison of the Guidelines of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and the Dutch Pharmacogenetics Working Group. Clin Pharmacol Ther. 2018;103(4):599-618. Epub 2017/10/11.
150. Luzum JA, Petry N, Taylor AK, Van Driest SL, Dunnenberger HM, Cavallari LH. Moving Pharmacogenetics Into Practice: It's All About the Evidence! 2021;110(3):649-61.
151. Miteva-Marcheva NN, Ivanov HY, Dimitrov DK, Stoyanova VK. Application of pharmacogenetics in oncology. Biomarker Research. 2020;8(1):32.

152. Kordou Z, Skokou M, Tsermpini EE, Chantratita W, Fukunaga K, Mushiroda T, et al. Discrepancies and similarities in the genome-informed guidance for psychiatric disorders amongst different regulatory bodies and research consortia using next generation sequencing-based clinical pharmacogenomics data. *Pharmacol Res.* 2021;167:105538. Epub 2021/03/12.
153. Shugg T, Pasternak AL, London B, Luzum JA. Prevalence and types of inconsistencies in clinical pharmacogenetic recommendations among major U.S. sources. *npj Genomic Medicine.* 2020;5(1):48.
154. Shugg T, Pasternak AL, Luzum JA. Comparison of clinical pharmacogenetic recommendations across therapeutic areas. *Pharmacogenet Genomics.* 2022;32(2):51-9. Epub 2021/08/20.
155. Abdullah-Koolmees H, van Keulen AM, Nijenhuis M, Deneer VHM. Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgX Guidelines. *Front Pharmacol.* 2021;11(1976).
156. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(11):689-723. Epub 2009/10/13.
157. Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. 2020;11(11):1295.
158. Wang B, Yang L-P, Zhang X-Z, Huang S-Q, Bartlam M, Zhou S-F. New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. *Drug Metabolism Reviews.* 2009;41(4):573-643.
159. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal.* 2005;5(1):6-13.
160. Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *The Lancet.* 1990;336(8714):529-32.
161. Yang Y, Botton MR, Scott ER, Scott SA. Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. 2017;18(7):673-85.
162. Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5240-3.
163. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JAG, Black JL, et al. PharmVar GeneFocus: CYP2D6. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2020;107(1):154-70.
164. Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE, et al. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. 2018;103(3):399-401.

165. Lee Mvd, Allard WG, Vossen RHAM, Baak-Pablo RF, Menafra R, Deiman BALM, et al. Toward predicting CYP2D6-mediated variable drug response from *CYP2D6* gene sequencing data. 2021;13(603):eabf3637.
166. Chen X, Shen F, Gonzaludo N, Malhotra A, Rogert C, Taft RJ, et al. Cyrius: accurate CYP2D6 genotyping using whole-genome sequencing data. *The Pharmacogenomics Journal*. 2021;21(2):251-61.
167. Twist GP, Gaedigk A, Miller NA, Farrow EG, Willig LK, Dinwiddie DL, et al. Constellation: a tool for rapid, automated phenotype assignment of a highly polymorphic pharmacogene, CYP2D6, from whole-genome sequences. *npj Genomic Medicine*. 2016;1(1):15007.
168. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-allele) Nomenclature Database. *Methods Mol Biol*. 2013;987:251-9. Epub 2013/03/12.
169. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet (London, England)*. 1977;2(8038):584-6. Epub 1977/09/17.
170. Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT, Woods HF. Oxidation phenotype--a major determinant of metoprolol metabolism and response. *N Engl J Med*. 1982;307(25):1558-60. Epub 1982/12/16.
171. McGourty JC, Silas JH, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism--population and family studies. *Br J Clin Pharmacol*. 1985;20(6):555-66. Epub 1985/12/01.
172. Lennard MS, Tucker GT, Silas JH, Woods HF. Debrisoquine polymorphism and the metabolism and action of metoprolol, timolol, propranolol and atenolol. *Xenobiotica*. 1986;16(5):435-47. Epub 1986/05/01.
173. Matthaei J, Brockmoller J, Tzvetkov MV, Sehr D, Sachse-Seeboth C, Hjelmberg JB, et al. Heritability of metoprolol and torsemide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(6):611-21.
174. Lennard MS, Iyuan AO, Jackson PR, Tucker GT, Woods HF. Evidence for a dissociation in the control of sparteine, debrisoquine and metoprolol metabolism in Nigerians. *Pharmacogenetics*. 1992;2(2):89-92.
175. Bozkurt A, Basci NE, Isimer A, Sayal A, Kayaalp SO. Metabolic ratios of four probes of CYP2D6 in Turkish subjects: a cross-over study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1996;21(4):309-14. Epub 1996/10/01.
176. Laurent-Kenesi MA, Funck-Brentano C, Poirier JM, Decolin D, Jaillon P. Influence of CYP2D6-dependent metabolism on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol and nifedipine, alone and in combination. *Br J Clin Pharmacol*. 1993;36(6):531-8. Epub 1993/12/01.

177. Johnson JA, Burlew BS. Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(3):350-5. Epub 1996/03/01.
178. Lennard MS, Tucker GT, Woods HF, Silas JH, Iyuan AO. Stereoselective metabolism of metoprolol in Caucasians and Nigerians--relationship to debrisoquine oxidation phenotype. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;27(5):613-6. Epub 1989/05/01.
179. Luzier AB, Killian A, Wilton JH, Wilson MF, Forrest A, Kazierad DJ. Gender-related effects on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66(6):594-601. Epub 1999/12/29.
180. Berger B, Bachmann F, Duthaler U, Krähenbühl S, Haschke M. Cytochrome P450 Enzymes Involved in Metoprolol Metabolism and Use of Metoprolol as a CYP2D6 Phenotyping Probe Drug. 2018;9(774).
181. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 2007;63(4):321-33.
182. Sohn DR, Shin SG, Park CW, Kusaka M, Chiba K, Ishizaki T. Metoprolol oxidation polymorphism in a Korean population: comparison with native Japanese and Chinese populations. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;32(4):504-7. Epub 1991/10/01.
183. Bosilkovska M, Samer CF, Déglon J, Rebsamen M, Staub C, Dayer P, et al. Geneva cocktail for cytochrome p450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(3):349-59. Epub 2014/04/12.
184. Donzelli M, Derungs A, Serratore MG, Noppen C, Nezc L, Krähenbühl S, et al. The basel cocktail for simultaneous phenotyping of human cytochrome P450 isoforms in plasma, saliva and dried blood spots. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(3):271-82. Epub 2013/11/13.
185. Sachse C, Brockmöller J, Hildebrand M, Müller K, Roots I. Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics.* 1998;8(2):181-5. Epub 1999/02/18.
186. Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM. Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 2000;10(7):577-81. Epub 2000/10/19.
187. Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Mörike K, et al. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.* 1998;8(1):15-26. Epub 1998/03/25.
188. McElroy S, Richmond J, Lira M, Friedman D, Silber BM, Milos PM, et al. CYP2D6 Genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. *AAPS PharmSci.* 2000;2(4):1-11.



189. Cicali EJ, Elchynski AL, Cook KJ, Houder JT, Thomas CD, Smith DM, et al. How to Integrate CYP2D6 Phenoconversion Into Clinical Pharmacogenetics: A Tutorial. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(3):677-87.
190. A LL, Herraíz AG, Cobaleda J, Johansson I, Dahl ML. Debrisoquin and mephenytoin hydroxylation phenotypes and CYP2D6 genotype in patients treated with neuroleptic and antidepressant agents. *Clin Pharmacol Ther.* 1993;54(6):606-11. Epub 1993/12/01.
191. Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab.* 2008;9(4):310-22. Epub 2008/05/14.
192. Lohmann P, Rao M, Ludwig M, Griese E, Zanger U, Mörike K, et al. Influence of CYP2D6 genotype and medication on the sparteine metabolic ratio of psychiatric patients. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 2001;57(4):289-95.
193. Klomp SD, Manson ML, Guchelaar H-J, Swen JJ. Phenoconversion of Cytochrome P450 Metabolism: A Systematic Review. 2020;9(9):2890.
194. Thummel KE, Shen DD, Isoherranen N. Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
195. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genetics In Medicine.* 2016;19:215.
196. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):234-42. Epub 2007/11/01.
197. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci.* 2020;13(1):116-24.
198. Hicks JK, Swen JJ, Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr Drug Metab.* 2014;15(2):218-32. Epub 2014/02/15.
199. Lee Mvd, Guchelaar H-J, Swen JJ. Substrate specificity of CYP2D6 genetic variants. ;0(0):null.
200. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 2017;19(1):69-76.

201. Koopmans AB, Braakman MH, Vinkers DJ, Hoek HW, van Harten PN. Meta-analysis of probability estimates of worldwide variation of CYP2D6 and CYP2C19. *Translational Psychiatry*. 2021;11(1):141.
202. Stevens JC, Marsh SA, Zaya MJ, Regina KJ, Divakaran K, Le M, et al. Developmental Changes in Human Liver CYP2D6 Expression. 2008;36(8):1587-93.
203. Kinirons MT, Crome P. Clinical Pharmacokinetic Considerations in the Elderly. *Clinical Pharmacokinetics*. 1997;33(4):302-12.
204. Kinirons MT, O'Mahony MS. Drug metabolism and ageing. 2004;57(5):540-4.
205. Bebia Z, Buch SC, Wilson JW, Frye RF, Romkes M, Cecchetti A, et al. Bioequivalence revisited: Influence of age and sex on CYP enzymes. 2004;76(6):618-27.
206. Ning M, Duarte JD, Rubin LH, Jeong H. CYP2D6 Protein Level Is the Major Contributor to Interindividual Variability in CYP2D6-Mediated Drug Metabolism in Healthy Human Liver Tissue. 2018;104(5):974-82.
207. Gravel S, Chiasson J-L, Turgeon J, Grangeon A, Michaud V. Modulation of CYP450 Activities in Patients With Type 2 Diabetes. 2019;106(6):1280-9.
208. Jones AE, Brown KC, Werner RE, Gotzkowsky K, Gaedigk A, Blake M, et al. Variability in drug metabolizing enzyme activity in HIV-infected patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(5):475-85. Epub 2010/01/20.
209. Shah RR, Smith RL. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(2):222-40. Epub 2014/06/11.
210. Monek O, Paintaud G, Bechtel Y, Miguet JP, Manton G, Bechtel PR. Influence of donor and recipient genotypes on CYP2D6 phenotype after liver transplantation: a study of mutations CYP2D6\*3 and CYP2D6\*4. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998;54(1):47-52. Epub 1998/05/20.
211. US Food and Drug Administration. Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers (last updated March 6, 2020). Accessed on 12 July 2022. : ; . Disponible: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>]
212. Madadi P, Amstutz U, Rieder M, Ito S, Fung V, Hwang S, et al. Clinical practice guideline: CYP2D6 genotyping for safe and efficacious codeine therapy. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. 2013;20(3):e369-96. Epub 2013/11/12.
213. Crews KR, Monte AA, Huddart R, Caudle KE, Kharasch ED, Gaedigk A, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6, OPRM1, and COMT Genotypes and Select Opioid Therapy. 2021;n/a(n/a).

214. Codeine Therapy and CYP2D6 Genotype. Dans: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, et al., rédacteurs. Medical Genetics Summaries. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
215. Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, et al. Codeine Intoxication Associated with Ultrarapid CYP2D6 Metabolism. 2004;351(27):2827-31.
216. Quaranta S, Dupouey J, Colle R, Verstuyft C. Pharmacogenetics of antidepressant drugs: State of the art and clinical implementation – recommendations from the French National Network of Pharmacogenetics. Therapies. 2017;72(2):311-8.
217. Quaranta S, Thomas F. Pharmacogenetics of anti-cancer drugs: State of the art and implementation – recommendations of the French National Network of Pharmacogenetics. Therapies. 2017;72(2):205-15.
218. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Hayes DF. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. J Oncol Pract. 2016;12(4):384-9. Epub 2016/03/10.
219. Association AP. The American Psychiatric Association Practice Guideline for the Treatment of Patients With Schizophrenia 2020.
220. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. J Mol Med (Berl). 1996;74(6):297-312. Epub 1996/06/01.
221. Shaw DM, Elger BS, Colledge F. What is a biobank? Differing definitions among biobank stakeholders. 2014;85(3):223-7.
222. Harati MD, Williams RR, Movassaghi M, Hojat A, Lucey GM, Yong WH. An Introduction to Starting a Biobank. Dans: Yong WH, rédacteur. Biobanking: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 7-16.
223. Riegman PHJ, Dinjens WNM, Oosterhuis JW. Biobanking for Interdisciplinary Clinical Research. Pathobiology. 2007;74(4):239-44.
224. Hewitt R, Watson P. Defining biobank. Biopreserv Biobank. 2013;11(5):309-15. Epub 2014/05/20.
225. Biospecimen Complexity and the Evolution of Biobanks. 2019;17(3):264-70.
226. De Souza YG, Greenspan JS. Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. AIDS. 2013;27(3):303-12.
227. Henderson GE, Cadigan RJ, Edwards TP, Conlon I, Nelson AG, Evans JP, et al. Characterizing biobank organizations in the U.S.: results from a national survey. Genome Medicine. 2013;5(1):3.

228. Carey DJ, Fetterolf SN, Davis FD, Faucett WA, Kirchner HL, Mirshahi U, et al. The Geisinger MyCode community health initiative: an electronic health record–linked biobank for precision medicine research. *Genetics in Medicine*. 2016;18(9):906-13.
229. Green ED, Guyer MS. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature*. 2011;470(7333):204-13. Epub 2011/02/11.
230. Savatt J, Pisieczko CJ, Zhang Y, Lee MTM, Faucett WA, Williams JL. Biobanks in the Era of Genomic Data. *Current Genetic Medicine Reports*. 2019;7(3):153-61.
231. Ollier W, Sprosen T, Peakman T. UK Biobank: from concept to reality. *Pharmacogenomics*. 2005;6(6):639-46. Epub 2005/09/07.
232. deCode genetics : [cité le 6 décembre 2021]. Disponible: <https://www.decode.com/>
233. La Biobanque de la Cohorte hospitalière de l'ICM : [cité le 7 février 2022]. Disponible: <https://www.icm-mhi.org/fr/recherche/infrastructures-services/biobanque>
234. Shalhoub J, Davies KJ, Hasan N, Thapar A, Sharma P, Davies AH. The Utility of Collaborative Biobanks for Cardiovascular Research. 2012;63(5):367-77.
235. Roden D, Pulley J, Basford M, Bernard G, Clayton E, Balsler J, et al. Development of a Large-Scale De-Identified DNA Biobank to Enable Personalized Medicine. 2008;84(3):362-9.
236. Bowton E, Field JR, Wang S, Schildcrout JS, Driest SLV, Delaney JT, et al. Biobanks and Electronic Medical Records: Enabling Cost-Effective Research. 2014;6(234):234cm3-cm3.
237. Olson JE, Bielinski SJ, Ryu E, Winkler EM, Takahashi PY, Pathak J, et al. Biobanks and personalized medicine. 2014;86(1):50-5.
238. Kullo IJ, Haddad R, Prows CA, Holm I, Sanderson SC, Garrison NA, et al. Return of results in the genomic medicine projects of the eMERGE network. *Front Genet*. 2014;5:50. Epub 2014/04/12.
239. Sperber NR, Carpenter JS, Cavallari LH, J. Damschroder L, Cooper-DeHoff RM, Denny JC, et al. Challenges and strategies for implementing genomic services in diverse settings: experiences from the Implementing GeNomics In pracTice (IGNITE) network. *BMC Medical Genomics*. 2017;10(1):35.
240. Weitzel KW, Alexander M, Bernhardt BA, Calman N, Carey DJ, Cavallari LH, et al. The IGNITE network: a model for genomic medicine implementation and research. *BMC Medical Genomics*. 2016;9(1):1.
241. McCarty CA, Chisholm RL, Chute CG, Kullo IJ, Jarvik GP, Larson EB, et al. The eMERGE Network: A consortium of biorepositories linked to electronic medical records data for conducting genomic studies. *BMC Medical Genomics*. 2011;4(1):13.

242. McGuire AL, Basford M, Dressler LG, Fullerton SM, Koenig BA, Li R, et al. Ethical and practical challenges of sharing data from genome-wide association studies: the eMERGE Consortium experience. *Genome Res.* 2011;21(7):1001-7. Epub 2011/06/03.
243. Abul-Husn NS, Manickam K, Jones LK, Wright EA, Hartzel DN, Gonzaga-Jauregui C, et al. Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U.S. health care system. *Science.* 2016;354(6319). Epub 2016/12/23.
244. van Draanen J, Davidson P, Bour-Jordan H, Bowman-Carpio L, Boyle D, Dubinett S, et al. Assessing Researcher Needs for a Virtual Biobank. *Biopreserv Biobank.* 2017;15(3):203-10. Epub 2016/12/09.
245. Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, Incoronato M, Bevilacqua P, Messina F, et al. Biobanking in health care: evolution and future directions. *Journal of Translational Medicine.* 2019;17(1):172.
246. Aquilante CL, Kao DP, Trinkley KE, Lin C-T, Crooks KR, Hearst EC, et al. Clinical implementation of pharmacogenomics via a health system-wide research biobank: the University of Colorado experience. *Pharmacogenomics.* ;0(0):null.
247. Shah SN, Gammal RS, Amato MG, Alobaidly M, Reyes DD, Hasan S, et al. Clinical Utility of Pharmacogenomic Data Collected by a Health-System Biobank to Predict and Prevent Adverse Drug Events. *Drug Safety.* 2021;44(5):601-7.
248. Hertz DL, Ramsey LB, Gopalakrishnan M, Leeder JS, Van Driest SL. Analysis Approaches to Identify Pharmacogenetic Associations with Pharmacodynamics. ;n/a(n/a).
249. Rowan CG, Flory J, Gerhard T, Cuddeback JK, Stempniewicz N, Lewis JD, et al. Agreement and validity of electronic health record prescribing data relative to pharmacy claims data: A validation study from a US electronic health record database. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2017;26(8):963-72. Epub 2017/06/14.
250. Oetting WS, Wu B, Schladt DP, Guan W, van Setten J, Keating BJ, et al. Genetic Variants Associated With Immunosuppressant Pharmacokinetics and Adverse Effects in the DeKAF Genomics Genome-wide Association Studies. *Transplantation.* 2019;103(6):1131-9. Epub 2019/02/26.
251. Frishman WH, Saunders E.  $\beta$ -Adrenergic Blockers. 2011;13(9):649-53.
252. Poirier L, Tobe SW. Contemporary use of  $\beta$ -blockers: clinical relevance of subclassification. *The Canadian journal of cardiology.* 2014;30(5 Suppl):S9-s15. Epub 2014/04/02.
253. Braunwald's Heart Disease: a Textbook for Cardiovascular Medicine, Tenth Edition. 2015. Elsevier Saunders.
254. Ladage D, Schwinger RHG, Brixius K. Cardio-Selective Beta-Blocker: Pharmacological Evidence and Their Influence on Exercise Capacity. 2013;31(2):76-83.

255. Westfall TC, Macarthur H, Westfall DP. Neurotransmission: The Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
256. Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. 1993;2(8):1198-209.
257. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):203-42. Epub 1991/06/01.
258. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205.
259. Hilal-Dandan R. Renin and Angiotensin. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
260. Blake KV, Lang JE. Asthma. Dans: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, rédacteurs. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
261. Reed BN, Rodgers JE. Acute Decompensated Heart Failure. Dans: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, rédacteurs. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
262. Muthumala A, Drenos F, Elliott PM, Humphries SE. Role of  $\beta$  adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: Systematic review and meta-analysis. 2008;10(1):3-13.
263. Westfall TC, Macarthur H, Westfall DP. Adrenergic Agonists and Antagonists. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
264. Tan CM, Limbird LE. The  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptors. Dans: Perez DM, rédacteur. *The Adrenergic Receptors: In the 21st Century*. Totowa, NJ: Humana Press; 2006. p. 241-65.
265. Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res.* 2008;77(3):452-62. Epub 2007/11/23.
266. Morris J, Dunham A. Metoprolol. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
267. Ripley TL, Saseen JJ.  $\beta$ -Blockers:A Review of Their Pharmacological and Physiological Diversity in Hypertension. 2014;48(6):723-33.
268. Brixius K, Bundkirchen A, Bölc B, Mehlhorn U, Schwinger RH. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *British journal of pharmacology.* 2001;133(8):1330-8. Epub 2001/08/11.

269. Toda N. Vasodilating  $\beta$ -adrenoceptor blockers as cardiovascular therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100(3):215-34.
270. Vanhoutte PM, Gao Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013;13(2):265-73.
271. Prichard BNC. Pharmacologic aspects of intrinsic sympathomimetic activity in beta-blocking drugs. *Am J Cardiol*. 1987;59(13):F13-F7.
272. Boissel JP, Leizorovicz A, Picolet H, Peyrieux JC. Secondary prevention after high-risk acute myocardial infarction with low-dose acebutolol. *Am J Cardiol*. 1990;66(3):251-60. Epub 1990/08/01.
273. Cucherat M, Boissel JP, Leizorovicz A. Persistent reduction of mortality for five years after one year of acebutolol treatment initiated during acute myocardial infarction. The APSI Investigators. *Acebutolol et Prévention Secondaire de l'Infarctus*. *Am J Cardiol*. 1997;79(5):587-9. Epub 1997/03/01.
274. MacLaughlin EJ, Saseen JJ. Hypertension. Dans: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, rédacteurs. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
275. Kubista H, Boehm S. Molecular mechanisms underlying the modulation of exocytotic noradrenaline release via presynaptic receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;112(1):213-42.
276. Elghozi J-L, Laude D, Janvier F. Clonidine Reduces Blood Pressure and Heart Rate Oscillations in Hypertensive Patients. 1991;17(6):935-40.
277. Kable JW, Murrin LC, Bylund DB. In Vivo Gene Modification Elucidates Subtype-Specific Functions of  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptors. 2000;293(1):1-7.
278. A Trial of the Beta-Blocker Bucindolol in Patients with Advanced Chronic Heart Failure. 2001;344(22):1659-67.
279. Cohn JN, Pfeffer MA, Rouleau J, Sharpe N, Swedberg K, Straub M, et al. Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). 2003;5(5):659-67.
280. Bristow MR, Nelson P, Minobe W, Johnson C. P-121: Characterization of  $\beta_1$ -adrenergic receptor selectivity of nebivolol and various other beta-blockers in human myocardium. *American Journal of Hypertension*. 2005;18(S4):51A-2A.
281. Dandona P, Ghanim H, Brooks DP. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. *J Hypertens*. 2007;25(4):731-41. Epub 2007/03/14.
282. Fongemie J, Felix-Getzik E. A Review of Nebivolol Pharmacology and Clinical Evidence. *Drugs*. 2015;75(12):1349-71.

283. Maggi E, Marchesi E, Covini D, Negro C, Perani G, Bellomo G. Protective effects of carvedilol, a vasodilating beta-adrenoceptor blocker, against in vivo low density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1996;27(4):532-8.
284. Fonseca VA. Effects of  $\beta$ -blockers on glucose and lipid metabolism. *Current Medical Research and Opinion*. 2010;26(3):615-29.
285. Yang Y, Faustino PJ, Volpe DA, Ellison CD, Lyon RC, Yu LX. Biopharmaceutics Classification of Selected  $\beta$ -Blockers: Solubility and Permeability Class Membership. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(4):608-14.
286. Frishman WH, Alwarshetty M.  $\beta$ -Adrenergic Blockers in Systemic Hypertension. *Clinical Pharmacokinetics*. 2002;41(7):505-16.
287. Caldwell GW, Easlick SM, Gunnet J, Masucci JA, Demarest K. In vitro permeability of eight  $\beta$ -blockers through Caco-2 monolayers utilizing liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. 1998;33(7):607-14.
288. Melander A, Danielson K, Scherstén B, Wåhlin E. Enhancement of the bioavailability of propranolol and metoprolol by food. 1977;22(1):108-12.
289. Cheymol G, Poirier J-M, Carrupt P-A, Testa B, Weissenburger J, Levron J-C, et al. Pharmacokinetics of  $\beta$ -adrenoceptor blockers in obese and normal volunteers. 1997;43(6):563-70.
290. Ågesen FN, Weeke PE, Tfelt-Hansen P, Tfelt-Hansen J, for E-N. Pharmacokinetic variability of beta-adrenergic blocking agents used in cardiology. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2019;7(4):e00496.
291. Leopold G, Pabst J, Ungethüm W, Bühring K-U. Basic Pharmacokinetics of Bisoprolol, a New Highly Beta1-selective Adrenoceptor Antagonist. 1986;26(8):616-21.
292. Blake CM, Kharasch ED, Schwab M, Nagele P. A meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(3):394-9.
293. Kendall MJ, John VA, Quarterman CP, Welling PG. A single and multiple dose pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of conventional and slow-release metoprolol. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1980;17(2):87-92.
294. Dixon MS, Thomas P, Sheridan DJ. A randomized double-blind study of bisoprolol versus atenolol in mild to moderate essential hypertension. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1990;38(1):21-4.
295. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet (London, England)*. 1999;353(9169):2001-7. Epub 1999/06/22.
296. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9146):9-13. Epub 1999/02/19.



297. Eichhorn EJ, Bristow MR. The Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. *Current controlled trials in cardiovascular medicine*. 2001;2(1):20-3. Epub 2002/01/25.
298. Flather MD, Shibata MC, Coats AJS, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, et al. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *European heart journal*. 2005;26(3):215-25.
299. Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT, Adams KF, Fowler MB, Hershberger RE, et al. Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. MOCHA Investigators. *Circulation*. 1996;94(11):2807-16. Epub 1996/12/01.
300. McDonald M, Virani S, Chan M, Ducharme A, Ezekowitz JA, Giannetti N, et al. CCS/CHFS Heart Failure Guidelines Update: Defining a New Pharmacologic Standard of Care for Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021;37(4):531-46.
301. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(16):e147-239. Epub 2013/06/12.
302. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2021;42(36):3599-726.
303. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JGF, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *The Lancet*. 2003;362(9377):7-13.
304. Packer M. Do beta-blockers prolong survival in heart failure only by inhibiting the beta1-receptor? A perspective on the results of the COMET trial. *J Card Fail*. 2003;9(6):429-43. Epub 2004/02/18.
305. Sandberg A, Blomqvist I, Jonsson UE, Lundborg P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a new controlled-release formulation of metoprolol: A comparison with conventional tablets. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1988;33(1):S9-S14.
306. Andersson B, Aberg J, Lindelöw B, Täng MS, Wikstrand J. Dose-related effects of metoprolol on heart rate and pharmacokinetics in heart failure. *J Card Fail*. 2001;7(4):311-7. Epub 2002/01/10.

307. Wikstrand J, Hjalmarson A, Waagstein F, Fagerberg B, Goldstein S, Kjekshus J, et al. Dose of metoprolol CR/XL and clinical outcomes in patients with heart failure: analysis of the experience in metoprolol CR/XL randomized intervention trial in chronic heart failure (MERIT-HF). *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(3):491-8. Epub 2002/07/27.
308. Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, et al. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet (London, England)*. 1993;342(8885):1441-6. Epub 1993/12/11.
309. Lückner P, Moore G, Wieselgren I, Olofsson B, Bergstrand R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison of Metoprolol CR/ZOK Once Daily with Conventional Tablets Once Daily and in Divided Doses. 1990;30(S2):S17-S27.
310. Kukin ML, Mannino MM, Freudenberger RS, Kalman J, Buchholz-Varley C, Ocampo O. Hemodynamic comparison of twice daily metoprolol tartrate with once daily metoprolol succinate in congestive heart failure. 2000;35(1):45-50.
311. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb CD, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. 2018;71(6):e13-e115.
312. Rabi DM, McBrien KA, Sapir-Pichhadze R, Nakhla M, Ahmed SB, Dumanski SM, et al. Hypertension Canada's 2020 Comprehensive Guidelines for the Prevention, Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *Canadian Journal of Cardiology*. 2020;36(5):596-624.
313. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European heart journal*. 2018;39(33):3021-104.
314. Mancini GBJ, Gosselin G, Chow B, Kostuk W, Stone J, Yvorchuk KJ, et al. Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Diagnosis and Management of Stable Ischemic Heart Disease. *Canadian Journal of Cardiology*. 2014;30(8):837-49.
315. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2019;41(3):407-77.
316. Bangalore S, Bhatt DL, Steg PG, Weber MA, Boden WE, Hamm CW, et al.  $\beta$ -blockers and cardiovascular events in patients with and without myocardial infarction: post hoc analysis from the CHARISMA trial. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2014;7(6):872-81. Epub 2014/10/02.

317. GROUP TMTR. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomised placebo-controlled international trial. *European heart journal*. 1985;6(3):199-226.
318. Hong J, Barry AR. Long-Term Beta-Blocker Therapy after Myocardial Infarction in the Reperfusion Era: A Systematic Review. *Pharmacotherapy*. 2018;38(5):546-54. Epub 2018/03/31.
319. Grandi E, Ripplinger CM. Antiarrhythmic mechanisms of beta blocker therapy. *Pharmacol Res*. 2019;146:104274. Epub 2019/05/18.
320. Knollmann BC, Roden DM. Antiarrhythmic Drugs. Dans: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, rédacteurs. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
321. Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, Bryant WJ, Callans DJ, Curtis AB, et al. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. 2018;138(13):e272-e391.
322. Deyell MW, AbdelWahab A, Angaran P, Essebag V, Glover B, Gula LJ, et al. 2020 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society Position Statement on the Management of Ventricular Tachycardia and Fibrillation in Patients With Structural Heart Disease. *Canadian Journal of Cardiology*. 2020;36(6):822-36.
323. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European heart journal*. 2020;42(5):373-498.
324. Andrade JG, Aguilar M, Atzema C, Bell A, Cairns JA, Cheung CC, et al. The 2020 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society Comprehensive Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation. *Canadian Journal of Cardiology*. 2020;36(12):1847-948.
325. Parker RB, Nappi JM, Cavallari LH. Chronic Heart Failure. Dans: DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin TD, Ellingrod V, rédacteurs. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
326. McMurray J, Cohen-Solal A, Dietz R, Eichhorn E, Erhardt L, Hobbs FD, et al. Practical recommendations for the use of ACE inhibitors, beta-blockers, aldosterone antagonists and angiotensin receptor blockers in heart failure: putting guidelines into practice. *Eur J Heart Fail*. 2005;7(5):710-21. Epub 2005/08/10.
327. Fonarow GC, Abraham WT, Albert NM, Stough WG, Gheorghiade M, Greenberg BH, et al. Influence of beta-blocker continuation or withdrawal on outcomes in patients hospitalized with heart failure: findings from the OPTIMIZE-HF program. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(3):190-9. Epub 2008/07/12.

328. Ko DT, Hebert PR, Coffey CS, Curtis JP, Foody JM, Sedrakyan A, et al. Adverse Effects of  $\beta$ -Blocker Therapy for Patients With Heart Failure: A Quantitative Overview of Randomized Trials. *Archives of Internal Medicine*. 2004;164(13):1389-94.
329. Abrahamsson B, Lucker P, Olofsson B, Regardh CG, Sandberg A, Wieselgren I, et al. The relationship between metoprolol plasma concentration and beta 1-blockade in healthy subjects: a study on conventional metoprolol and metoprolol CR/ZOK formulations. *J Clin Pharmacol*. 1990;30(S2):S46-54. Epub 1990/02/01.
330. Hamadeh IS, Langaee TY, Dwivedi R, Garcia S, Burkley BM, Skaar TC, et al. Impact of CYP2D6 polymorphisms on clinical efficacy and tolerability of metoprolol tartrate. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;96(2):175-81.
331. imarikova R, Habala L, Valentova J, Markuliak M. Survey of Pharmacological Activity and Pharmacokinetics of Selected  $\beta$ -Adrenergic Blockers in Regard to Their Stereochemistry. 2019;9(4):625.
332. Mehvar R, Brocks DR. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J Pharm Pharm Sci*. 2001;4(2):185-200. Epub 2001/07/24.
333. Nathanson JA. Stereospecificity of beta adrenergic antagonists: R-enantiomers show increased selectivity for beta-2 receptors in ciliary process. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;245(1):94-101. Epub 1988/04/01.
334. Nagatomo T, Koike K. Recent advances in structure, binding sites with ligands and pharmacological function of beta-adrenoceptors obtained by molecular biology and molecular modeling. *Life Sci*. 2000;66(25):2419-26. Epub 2000/07/14.
335. Wetterich U, Spahn-Langguth H, Mutschler E, Terhaag B, Rosch W, Langguth P. Evidence for Intestinal Secretion as an Additional Clearance Pathway of Talinolol Enantiomers: Concentration- and Dose-dependent Absorption in Vitro and in Vivo. *Pharmaceutical Research*. 1996;13(4):514-22.
336. Uwai Y. Enantioselective Drug Recognition by Drug Transporters. *Molecules*. 2018;23(12). Epub 2018/11/24.
337. Vashistha VK, Kumar A. Stereochemical facets of clinical  $\beta$ -blockers: An overview. 2020;32(5):722-35.
338. Huang J, Chuang SK, Cheng CL, Lai ML. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;65(4):402-7. Epub 1999/05/01.
339. Seeringer A, Brockmoller J, Bauer S, Kirchheiner J. Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise-induced heart rate. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(9):883-8.

340. Sharma A, Pibarot P, Pilote S, Dumesnil JG, Arsenault M, Belanger PM, et al. Toward optimal treatment in women: the effect of sex on metoprolol-diphenhydramine interaction. *J Clin Pharmacol*. 2010;50(2):214-25.
341. Cerqueira PM, Cesarino EJ, Mateus FH, Mere Y, Jr., Santos SR, Lanchote VL. Enantioselectivity in the steady-state pharmacokinetics of metoprolol in hypertensive patients. *Chirality*. 1999;11(7):591-7. Epub 1999/07/28.
342. Jung E, Ryu S, Park Z, Lee JG, Yi JY, Seo DW, et al. Influence of CYP2D6 Polymorphism on the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Characteristics of Carvedilol in Healthy Korean Volunteers. *J Korean Med Sci*. 2018;33(27):e182. Epub 2018/07/03.
343. Parker BM, Rogers SL, Lymperopoulos A. Clinical pharmacogenomics of carvedilol: the stereo-selective metabolism angle. 2018;19(14):1089-93.
344. Seht D, Meineke I, Tzvetkov M, Gültepe S, Brockmüller J. Carvedilol pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to CYP2D6 and ADRB pharmacogenetics. 2011;12(6):783-95.
345. Stoschitzky K, Egginger G, Zernig G, Klein W, Lindner W. Stereoselective features of (R)- and (S)-atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic, and radioligand binding studies. 1993;5(1):15-9.
346. Yang Y, Wang Y, Bao Z, Yang Q, Zhang Z, Ren Q. Progress in the Enantioseparation of  $\beta$ -Blockers by Chromatographic Methods. 2021;26(2):468.
347. Taylor MRG. Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors. *The Pharmacogenomics Journal*. 2007;7(1):29-37.
348. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(18):12670-4. Epub 1999/04/23.
349. Johnson JA, Terra SG.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Polymorphisms: Cardiovascular Disease Associations and Pharmacogenetics. *Pharmaceutical Research*. 2002;19(12):1779-87.
350. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, et al. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11288-93. Epub 2006/07/18.
351. Humma LM, Puckett BJ, Richardson HE, Terra SG, Andrisin TE, Lejeune BL, et al. Effects of beta1-adrenoceptor genetic polymorphisms on resting hemodynamics in patients undergoing diagnostic testing for ischemia. *Am J Cardiol*. 2001;88(9):1034-7. Epub 2001/11/13.
352. Ranade K, Jorgenson E, Sheu WH, Pei D, Hsiung CA, Chiang FT, et al. A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. *Am J Hum Genet*. 2002;70(4):935-42. Epub 2002/02/21.

353. Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, et al. Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 2002;66(8):723-8. Epub 2002/08/29.
354. Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Råstam L, et al. Polymorphism in the  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Gene and Hypertension. 2001;104(2):187-90.
355. Fiuzat M, Neely ML, Starr AZ, Kraus WE, Felker GM, Donahue M, et al. Association between adrenergic receptor genotypes and beta-blocker dose in heart failure patients: analysis from the HF-ACTION DNA substudy. 2013;15(3):258-66.
356. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;74(1):44-52. Epub 2003/07/05.
357. Shahin MH, Rouby NE, Conrado DJ, Gonzalez D, Gong Y, Lobmeyer MT, et al.  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Gene Affects the Heart Rate Response of  $\beta$ -Blockers: Evidence From 3 Clinical Studies. 2019;59(11):1462-70.
358. Liu WN, Fu KL, Gao HY, Shang YY, Wang ZH, Jiang GH, et al.  $\beta$ 1 adrenergic receptor polymorphisms and heart failure: a meta-analysis on susceptibility, response to  $\beta$ -blocker therapy and prognosis. *PLoS One*. 2012;7(7):e37659. Epub 2012/07/21.
359. Biolo A, Clausell N, Santos KG, Salvaro R, Ashton-Prolla P, Borges A, et al. Impact of beta1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol*. 2008;102(6):726-32. Epub 2008/09/09.
360. Guerra LA, Lteif C, Arwood MJ, McDonough CW, Dumeny L, Desai AA, et al. Genetic polymorphisms in ADRB2 and ADRB1 are associated with differential survival in heart failure patients taking  $\beta$ -blockers. *The Pharmacogenomics Journal*. 2022;22(1):62-8.
361. Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nyström E, Mobini R, Schaufelberger M, et al. Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(3):221-31. Epub 2005/09/13.
362. Piccini JP, Abraham WT, Dufton C, Carroll IA, Healey JS, van Veldhuisen DJ, et al. Bucindolol for the Maintenance of Sinus Rhythm in a Genotype-Defined HF Population. *The GENETIC-AF Trial*. 2019;7(7):586-98.
363. Wang Y, Jiang S. The role of ADRB2 gene polymorphisms in malignancies. *Molecular Biology Reports*. 2021;48(3):2741-9.
364. Rokamp KZ, Olsen NV, Færch L, Kristensen PL, Thorsteinsson B, Pedersen-Bjergaard U. Impact of Genetic Polymorphism in the  $\beta$ 2-Receptor Gene on Risk of Severe Hypoglycemia in Patients With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(8):2901-8. Epub 2018/05/15.

365. Leineweber K, Heusch G.  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-Adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. 2009;158(1):61-9.
366. Barbato E, Penicka M, Delrue L, Van Durme F, De Bruyne B, Goethals M, et al. Thr164Ile polymorphism of beta2-adrenergic receptor negatively modulates cardiac contractility: implications for prognosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart*. 2007;93(7):856-61. Epub 2007/06/16.
367. Magvanjav O, McDonough CW, Gong Y, McClure LA, Talbert RL, Horenstein RB, et al. Pharmacogenetic Associations of  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Polymorphisms With Cardiovascular Outcomes in the SPS3 Trial (Secondary Prevention of Small Subcortical Strokes). *Stroke*. 2017;48(5):1337-43. Epub 2017/03/30.
368. Cresci S, Kelly RJ, Cappola TP, Diwan A, Dries D, Kardia SLR, et al. Clinical and Genetic Modifiers of Long-Term Survival in Heart Failure. 2009;54(5):432-44.
369. Lanfear DE, Jones PG, Marsh S, Cresci S, McLeod HL, Spertus JA.  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Genotype and Survival Among Patients Receiving  $\beta$ -Blocker Therapy After an Acute Coronary Syndrome. *JAMA*. 2005;294(12):1526-33.
370. Thomas CD, Johnson JA. Pharmacogenetic factors affecting  $\beta$ -blocker metabolism and response. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2020:null-null.
371. Small KM, Forbes SL, Rahman FF, Bridges KM, Liggett SB. A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human alpha 2C-adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(30):23059-64. Epub 2000/05/10.
372. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 1999;402(6758):181-4. Epub 2000/01/26.
373. Neumeister A, Charney DS, Belfer I, Geraci M, Holmes C, Sharabi Y, et al. Sympathoneural and adrenomedullary functional effects of alpha2C-adrenoreceptor gene polymorphism in healthy humans. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(3):143-9. Epub 2005/04/30.
374. Metra M, Zani C, Covolo L, Nodari S, Pezzali N, Gelatti U, et al. Role of beta1- and alpha2c-adrenergic receptor polymorphisms and their combination in heart failure: a case-control study. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(2):131-5. Epub 2005/09/29.
375. Regitz-Zagrosek V, Hocher B, Bettmann M, Brede M, Hadamek K, Gerstner C, et al.  $\alpha$ 2C-Adrenoceptor polymorphism is associated with improved event-free survival in patients with dilated cardiomyopathy. *European heart journal*. 2005;27(4):454-9.
376. Bristow MR, Murphy GA, Krause-Steinrauf H, Anderson JL, Carlquist JF, Thaneemit-Chen S, et al. An alpha2C-adrenergic receptor polymorphism alters the norepinephrine-lowering effects and therapeutic response of the beta-blocker bucindolol in chronic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2010;3(1):21-8. Epub 2009/11/03.

377. Aleong RG, Sauer WH, Robertson AD, Liggett SB, Bristow MR. Adrenergic Receptor Polymorphisms and Prevention of Ventricular Arrhythmias With Bucindolol in Patients With Chronic Heart Failure. 2013;6(1):137-43.
378. Parikh KS, Fiuzat M, Davis G, Neely M, Blain-Nelson P, Whellan DJ, et al. Dose Response of  $\beta_2$ -Blockers in Adrenergic Receptor Polymorphism Genotypes. 2018;11(8):e002210.
379. Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, Jobin J, Desgagnes P, Poirier P, et al. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. Clin Pharmacol Ther. 2000;67(5):466-77.
380. Jin SK, Chung HJ, Chung MW, Kim JI, Kang JH, Woo SW, et al. Influence of CYP2D6\*10 on the pharmacokinetics of metoprolol in healthy Korean volunteers. J Clin Pharm Ther. 2008;33(5):567-73. Epub 2008/10/07.
381. Batty JA, Hall AS, White HL, Wikstrand J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, et al. An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. Clin Pharmacol Ther. 2014;95(3):321-30.
382. Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, et al. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. Clin Pharmacol Ther. 2009;85(1):45-50.
383. Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M, et al. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. Clin Pharmacol Ther. 2009;85(3):269-72.
384. Anstensrud AK, Molden E, Haug HJ, Qazi R, Muriq H, Fosshaug LE, et al. Impact of genotype-predicted CYP2D6 metabolism on clinical effects and tolerability of metoprolol in patients after myocardial infarction – a prospective observational study. European Journal of Clinical Pharmacology. 2020.
385. Fux R, Morike K, Prohmer AM, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E, et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. Clin Pharmacol Ther. 2005;78(4):378-87.
386. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. Pharmacogenetics. 2002;12(6):465-72. Epub 2002/08/13.
387. Terra SG, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, Schofield RS, et al. beta-Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. Clin Pharmacol Ther. 2005;77(3):127-37.
388. Luzum JA, Sweet KM, Binkley PF, Schmidlen TJ, Jarvis JP, Christman MF, et al. CYP2D6 Genetic Variation and Beta-Blocker Maintenance Dose in Patients with Heart Failure. Pharm Res. 2017. Epub 2017/02/10.



389. Sharp CF, Gardiner SJ, Jensen BP, Roberts RL, Troughton RW, Lainchbury JG, et al. CYP2D6 genotype and its relationship with metoprolol dose, concentrations and effect in patients with systolic heart failure. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(3):175-84.
390. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(6):536-44.
391. Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Bohm M, Weil J, et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(4):429-37.
392. Fedorinov DS, Mirzaev KB, Mustafina VR, Sychev DA, Maximova NR, Chertovskikh JV, et al. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers G1846A (CYP2D6\*4) and C100T (CYP2D6\*10) of the CYP2D6 gene in coronary heart disease patients taking beta beta -blockers in the Republic of Sakha (YAKUTIA). *Drug Metabolism and Personalized Therapy.* 2018.
393. Chan SW, Chu TTW, Ho CS, Kong APS, Tomlinson B, Zeng W. Influence of CYP2D6 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bisoprolol in Hypertensive Chinese Patients. 2021;8(1529).
394. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 2001;53(1):1-24. Epub 2001/02/15.
395. Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(2):91-6. Epub 2001/02/13.
396. Leineweber K, Rohe P, Beilfuß A, Wolf C, Sporkmann H, Bruck H, et al. G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: Effects of  $\beta$ -adrenoceptor blockade. *Cardiovascular Research.* 2005;66(3):512-9.
397. Neve KA. Novel Features of G Protein-Coupled Receptor Kinase 4. 2006;69(3):673-6.
398. Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Molecular Pharmacology.* 2003;63(1):9.
399. Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, Schork NJ, Richard E, Salem RM, et al. G-Protein-Coupled Receptor Kinase 4 Polymorphisms and Blood Pressure Response to Metoprolol Among African Americans: Sex-Specificity and Interactions. *American Journal of Hypertension.* 2009;22(3):332-8.
400. Vandell AG, Lobmeyer MT, Gawronski BE, Langae TY, Gong Y, Gums JG, et al. G protein receptor kinase 4 polymorphisms. 2012;60(4):957-64.
401. Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, et al. A GRK5 polymorphism that inhibits  $\beta$ -adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nature Medicine.* 2008;14(5):510-7.

402. Kang S, Hong X, Ruan C-w, Yu P, Yu S-s, Chen M, et al. Effects of GRK5 and ADRB1 polymorphisms influence on systolic heart failure. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):44.
403. Thomas CD, Johnson JA. Pharmacogenetic factors affecting  $\beta$ -blocker metabolism and response. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2020;16(10):953-64.
404. Singh S, El Rouby N, McDonough CW, Gong Y, Bailey KR, Boerwinkle E, et al. Genomic Association Analysis Reveals Variants Associated With Blood Pressure Response to Beta-Blockers in European Americans. *Clin Transl Sci*. 2019;12(5):497-504. Epub 2019/04/30.
405. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, Mifsud B, Pazoki R, Gao H, et al. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits. *Nat Genet*. 2018;50(10):1412-25. Epub 2018/09/19.
406. Ehret GB, Ferreira T, Chasman DI, Jackson AU, Schmidt EM, Johnson T, et al. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. *Nat Genet*. 2016;48(10):1171-84. Epub 2016/09/13.
407. Gong Y, Wang Z, Beitelshes AL, McDonough CW, Langaee TY, Hall K, et al. Pharmacogenomic Genome-Wide Meta-Analysis of Blood Pressure Response to  $\beta$ -Blockers in Hypertensive African Americans. 2016;67(3):556-63.
408. Shahin Mohamed H, Conrado Daniela J, Gonzalez D, Gong Y, Lobmeyer Maximilian T, Beitelshes Amber L, et al. Genome-Wide Association Approach Identified Novel Genetic Predictors of Heart Rate Response to  $\beta$ -Blockers. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(5):e006463.
409. Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:537-68. Epub 2008/01/11.
410. Zaccolo M. cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. 2009;158(1):50-60.
411. Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76(4):302-12.
412. Yuan H, Huang Z, Yang G, Lv H, Sang H, Yao Y. Effects of polymorphism of the beta(1) adrenoreceptor and CYP2D6 on the therapeutic effects of metoprolol. *J Int Med Res*. 2008;36(6):1354-62. Epub 2008/12/20.
413. Wan X, Wang W, Liu J, Tong T. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. *BMC Medical Research Methodology*. 2014;14(1):135.
414. Effect Sizes Based on Means. *Introduction to Meta-Analysis*2009. p. 21-32.

415. IntHout J, Ioannidis JP, Borm GFJBMRM. The Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman method for random effects meta-analysis is straightforward and considerably outperforms the standard DerSimonian-Laird method. 2014;14(1):25.
416. Röver C, Knapp G, Friede T. Hartung-Knapp-Sidik-Jonkman approach and its modification for random-effects meta-analysis with few studies. BMC medical research methodology. 2015;15:99-.
417. Flannery G, Gehrig-Mills R, Billah B, Krum H. Analysis of Randomized Controlled Trials on the Effect of Magnitude of Heart Rate Reduction on Clinical Outcomes in Patients With Systolic Chronic Heart Failure Receiving Beta-Blockers. Am J Cardiol. 2008;101(6):865-9.
418. Cucherat M. Quantitative relationship between resting heart rate reduction and magnitude of clinical benefits in post-myocardial infarction: a meta-regression of randomized clinical trials. European heart journal. 2007;28(24):3012-9. Epub 2007/11/06.
419. McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA, Leung AA, Armstrong PW. Meta-analysis: B-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. Annals of Internal Medicine. 2009;150(11):784-94.
420. Takahama H, Yokoyama H, Kada A, Sekiguchi K, Fujino M, Funada A, et al. The extent of heart rate reduction during hospitalization using beta-blockers, not the achieved heart rate itself at discharge, predicts the clinical outcome in patients with acute heart failure syndromes. Journal of Cardiology. 2013;61(1):58-64.
421. Gullestad L, Wikstrand J, Deedwania P, Hjalmarsen Å, Egstrup K, Elkayam U, et al. What resting heart rate should one aim for when treating patients with heart failure with a beta-blocker?: Experiences from the Metoprolol Controlled Release/Extended Release Randomized Intervention Trial in Chronic Heart Failure (MERIT-HF). Journal of the American College of Cardiology. 2005;45(2):252-9.
422. Dobre D, Zannad F, Keteyian SJ, Stevens SR, Rossignol P, Kitzman DW, et al. Association between resting heart rate, chronotropic index, and long-term outcomes in patients with heart failure receiving  $\beta$ -blocker therapy: data from the HF-ACTION trial. European heart journal. 2013;34(29):2271-80.
423. Gaedigk A, Turner A, Everts RE, Scott SA, Aggarwal P, Broeckel U, et al. Characterization of Reference Materials for Genetic Testing of CYP2D6 Alleles: A GeT-RM Collaborative Project. J Mol Diagn. 2019;21(6):1034-52. Epub 2019/08/12.
424. Wahlund G, Nerme V, Abrahamsson T, Sjöquist P-O. The  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2-adrenoceptor affinity and  $\beta$ 1-blocking potency of S- and R-metoprolol. British journal of pharmacology. 1990;99(3):592-6.
425. Sharma A, Pibarot P, Pilote S, Dumesnil JG, Arsenault M, Belanger PM, et al. Modulation of metoprolol pharmacokinetics and hemodynamics by diphenhydramine coadministration during exercise testing in healthy premenopausal women. J Pharmacol Exp Ther. 2005;313(3):1172-81.

426. Pujos E, Cren-Olivé C, Paisse O, Flament-Waton MM, Grenier-Loustalot MF. Comparison of the analysis of  $\beta$ -blockers by different techniques. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(31):4007-14.
427. David V, Moldoveanu SC, Galaon T. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(1):e5008.
428. Barclay VK, Tyrefors NL, Johansson IM, Pettersson CE. Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1269:208-17. Epub 2012/10/24.
429. Sharma P, Contractor P, Guttikar S, Patel DP, Shrivastav PS. Development of a sensitive and rapid method for quantitation of (S)-(-)- and (R)-(+)-metoprolol in human plasma by chiral LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014;4(1):63-79.
430. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003;75(13):3019-30.
431. Ismaiel OA, Zhang T, Jenkins RG, Karnes HT. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(31):3303-16. Epub 2010/11/09.
432. Alpendurada MF. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2000;889(1-2):3-14.
433. Shen JX, Motyka RJ, Roach JP, Hayes RN. Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *J Pharm Biomed Anal*. 2005;37(2):359-67. Epub 2005/02/15.
434. Xue Y-J, Akinsanya JB, Liu J, Unger SE. A simplified protein precipitation/mixed-mode cation-exchange solid-phase extraction, followed by high-speed liquid chromatography/mass spectrometry, for the determination of a basic drug in human plasma. 2006;20(18):2660-8.
435. Wojnicz A, Belmonte C, Koller D, Ruiz-Nuño A, Román M, Ochoa D, et al. Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: Application to human pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;151:116-25. Epub 2018/01/13.
436. Koller D, Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Abad-Santos F, Wojnicz A. Simultaneous determination of six antipsychotics, two of their metabolites and caffeine in human plasma by LC-MS/MS using a phospholipid-removal microelution-solid phase extraction method for sample preparation. *Talanta*. 2019;198:159-68.

437. Ali I, Al-Othman ZA, Hussain A, Saleem K, Aboul-Enein HY. Chiral Separation of  $\beta$ -Adrenergic Blockers in Human Plasma by SPE-HPLC. *Chromatographia*. 2011;73(3):251-6.
438. Brown S, Carmical J. Phospholipid Depletion Techniques in LC-MS Bioanalysis. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis 2019*. p. 52-67.
439. Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43(2):701-7.
440. Ilisz I, Berkecz R, Péter A. Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;47(1):1-15. Epub 2008/02/05.
441. Baranowska I, Adolf W, Magiera S. Enantioselective determination of metoprolol and its metabolites in human urine high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) and tandem mass spectrometry (MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015;1004:79-84. Epub 2015/10/10.
442. Mistry B, Leslie JL, Eddington ND. Enantiomeric separation of metoprolol and alpha-hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;758(2):153-61. Epub 2001/08/07.
443. Cerqueira PM, Cesarino EJ, Bertucci C, Bonato PS, Lanchote VL. Stereoselective metabolism of metoprolol: Enantioselectivity of  $\alpha$ -hydroxymetoprolol in plasma and urine. 2003;15(6):542-9.
444. Murthy SS, Shetty HU, Nelson WL, Jackson pR, Lennard MS. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. *Biochemical Pharmacology*. 1990;40(7):1637-44.
445. Ahmed H, Wahbi A-A, Elmongy H, Amini A, Koyi H, Branden E, et al. Determination and Pharmacokinetics of Omeprazole Enantiomers in Human Plasma and Oral Fluid Utilizing Microextraction by Packed Sorbent and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2021;2021:8845139.
446. de Sousa CEM, Bedor NCTC, Sousa GD, de Oliveira GHO, Leal LB, Bedor DCG, et al. Selective LC-MS/MS determination of citalopram enantiomers and application to a pharmacokinetic evaluation of generic and reference formulations. 2022;36(1):e5237.
447. Dean L. Esomeprazole Therapy and CYP2C19 Genotype. Dans: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, et al., rédacteurs. *Medical Genetics Summaries*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
448. Brouwer JMJJ, Nijenhuis M, Soree B, Guchelaar H-J, Swen JJ, van Schaik RHN, et al. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene-drug interaction between CYP2C19 and CYP2D6 and SSRIs. *European Journal of Human Genetics*. 2021.

449. DeGorter MK, Tirona RG, Schwarz UI, Choi YH, Dresser GK, Suskin N, et al. Clinical and pharmacogenetic predictors of circulating atorvastatin and rosuvastatin concentrations in routine clinical care. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(4):400-8. Epub 2013/07/24.
450. Turcot V, Brunet J, Daneault C, Tardif JC, Des Rosiers C, Lettre G. Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28(6):646-58.
451. Wojtczak A, Wojtczak M, Skretkiewicz J. The relationship between plasma concentration of metoprolol and CYP2D6 genotype in patients with ischemic heart disease. *Pharmacol Rep*. 2014;66(3):511-4. Epub 2014/06/07.
452. Thomas CD, Mosley SA, Kim S, Lingineni K, El Rouby N, Langaee TY, et al. Examination of Metoprolol Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Across CYP2D6 Genotype-Derived Activity Scores. 2020;9(12):678-85.
453. Andrade JG, Krahn AD, Skanes AC, Purdham D, Ciaccia A, Connors S. Values and Preferences of Physicians and Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation Who Receive Oral Anticoagulation Therapy for Stroke Prevention. *The Canadian journal of cardiology*. 2016;32(6):747-53. Epub 2016/01/18.
454. Sugrue A, Sanborn D, Amin M, Farwati M, Sridhar H, Ahmed A, et al. Inappropriate Dosing of Direct Oral Anticoagulants in Patients with Atrial Fibrillation. *Am J Cardiol*. 2021;144:52-9. Epub 2021/01/02.
455. Sigurdsson HP, Hefner G, Ben-Omar N, Kostlbacher A, Wenzel-Seifert K, Hiemke C, et al. Steady-state serum concentrations of venlafaxine in patients with late-life depression. Impact of age, sex and BMI. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015;122(5):721-9. Epub 2014/09/27.
456. Yubero-Lahoz S, Pardo R, Farre M, O'Mahony B, Torrens M, Mustata C, et al. Sex differences in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy)-induced cytochrome P450 2D6 inhibition in humans. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(5):319-29. Epub 2011/04/05.
457. Borobia AM, Novalbos J, Guerra-Lopez P, Lopez-Rodriguez R, Tabares B, Rodriguez V, et al. Influence of sex and CYP2D6 genotype on mirtazapine disposition, evaluated in Spanish healthy volunteers. *Pharmacol Res*. 2009;59(6):393-8. Epub 2009/05/12.
458. Soldin OP, Mattison DR. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(3):143-57. Epub 2009/04/24.
459. Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs*. 1995;50(2):222-39. Epub 1995/08/01.
460. Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Piccinni A, Carlini M, Vatteroni E, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. *CNS Spectr*. 2013;18(3):118-27. Epub 2013/02/05.

461. Rodenburg EM, Stricker BH, Visser LE. Sex differences in cardiovascular drug-induced adverse reactions causing hospital admissions. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(6):1045-52. Epub 2012/04/27.
462. Zopf Y, Rabe C, Neubert A, Gassmann KG, Rascher W, Hahn EG, et al. Women encounter ADRs more often than do men. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(10):999-1004. Epub 2008/07/08.
463. Pinsonneault J, Sadée W. Pharmacogenomics of multigenic diseases: Sex-specific differences in disease and treatment outcome. *AAPS PharmSci*. 2003;5(4):49-61.
464. Mezzalana S, Toffoli G. The effects of sex on pharmacogenetically guided drug treatment. ;0(0):null.
465. Cicali EJ, Smith DM, Duong BQ, Kovar LG, Cavallari LH, Johnson JA. A Scoping Review of the Evidence Behind Cytochrome P450 2D6 Isoenzyme Inhibitor Classifications. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. ;n/a(n/a).
466. Borges S, Desta Z, Jin Y, Faouzi A, Robarge JD, Philip S, et al. Composite Functional Genetic and Comedication CYP2D6 Activity Score in Predicting Tamoxifen Drug Exposure Among Breast Cancer Patients. 2010;50(4):450-8.
467. Gravel S, Chiasson J-L, Turgeon J, Grangeon A, Michaud V. Modulation of CYP450 Activities in Patients With Type 2 Diabetes. ;0(0).
468. Jukić MM, Smith RL, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Evaluation of the CYP2D6 Haplotype Activity Scores Based on Metabolic Ratios of 4,700 Patients Treated With Three Different CYP2D6 Substrates. 2021;110(3):750-8.
469. Fracowiak J, Huebner T, Heß S, Roethlein C, Langner D, Schneider U, et al. Evaluation of the EMPAR study population on the basis of metabolic phenotypes of selected pharmacogenes. *The Pharmacogenomics Journal*. 2022.
470. Reisberg S, Krebs K, Lepamets M, Kals M, Mägi R, Metsalu K, et al. Translating genotype data of 44,000 biobank participants into clinical pharmacogenetic recommendations: challenges and solutions. *Genetics in Medicine*. 2019;21(6):1345-54.
471. de Vries FM, Stingl JC, Breteler MMB. Polypharmacy, potentially inappropriate medication and pharmacogenomics drug exposure in the Rhineland Study. 2021;87(7):2732-56.
472. Luo S, Jiang R, Grzymski JJ, Lee W, Lu JT, Washington NL. Comprehensive Allele Genotyping in Critical Pharmacogenes Reduces Residual Clinical Risk in Diverse Populations. 2021;110(3):759-67.
473. McInnes G, Lavertu A, Sangkuhl K, Klein TE, Whirl-Carrillo M, Altman RB. Pharmacogenetics at Scale: An Analysis of the UK Biobank. 2021;109(6):1528-37.

474. Lunenburg CATC, Thirstrup JP, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, Hougaard DM, Nordentoft M, et al. Pharmacogenetic genotype and phenotype frequencies in a large Danish population-based case-cohort sample. *Translational Psychiatry*. 2021;11(1):294.
475. Wendt FR, Koller D, Pathak GA, Jacoby D, Miller EJ, Polimanti R. Biobank Scale Pharmacogenomics Informs the Genetic Underpinnings of Simvastatin Use. 2021;110(3):777-85.
476. Koromina M, Koutsilieri S, Patrinos GP. Delineating significant genome-wide associations of variants with antipsychotic and antidepressant treatment response: implications for clinical pharmacogenomics. *Human Genomics*. 2020;14(1):4.
477. Islam F, Men X, Yoshida K, Zai CC, Müller DJ. Pharmacogenetics-Guided Advances in Antipsychotic Treatment. 2021;110(3):582-8.
478. Jukić MM, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Impact of CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure and Therapeutic Failure: A Retrospective Study Based on 2,087 Patients. *Am J Psychiatry*. 2018;175(5):463-70.
479. Jukic MM, Smith RL, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Effect of CYP2D6 genotype on exposure and efficacy of risperidone and aripiprazole: a retrospective, cohort study. *Lancet Psychiatry*. 2019;6(5):418-26. Epub 2019/04/20.
480. Pardiñas AF, Nalmpanti M, Pocklington AJ, Legge SE, Medway C, King A, et al. Pharmacogenomic Variants and Drug Interactions Identified Through the Genetic Analysis of Clozapine Metabolism. *Am J Psychiatry*. 2019;176(6):477-86. Epub 2019/03/30.
481. Fontana V, Turner RM, Francis B, Yin P, Pütz B, Hiltunen TP, et al. Chromosomal Region 11p14.1 is Associated with Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bisoprolol. *Pharmgenomics Pers Med*. 2022;15:249-60. Epub 2022/04/01.
482. Small AM, O'Donnell CJ, Damrauer SMJCCR. Large-Scale Genomic Biobanks and Cardiovascular Disease. 2018;20(4):22.
483. Tomita T, Yasui-Furukori N, Nakagami T, Tsuchimine S, Ishioka M, Kaneda A, et al. The influence of 5-HTTLPR genotype on the association between the plasma concentration and therapeutic effect of paroxetine in patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2014;9(5):e98099. Epub 2014/05/27.
484. Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P. Biobanking for better healthcare. 2008;2(3):213-22.
485. Gordon AS, Fulton RS, Qin X, Mardis ER, Nickerson DA, Scherer S. PGRNseq: a targeted capture sequencing panel for pharmacogenetic research and implementation. 2016;26(4):161-8.
486. Bush W, Crosslin D, Owusu-Obeng A, Wallace J, Almoguera B, Basford M, et al. Genetic variation among 82 pharmacogenes: The PGRNseq data from the eMERGE network. 2016;100(2):160-9.



487. Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Emerging strategies to bridge the gap between pharmacogenomic research and its clinical implementation. *npj Genomic Medicine*. 2020;5(1):9.
488. Ingelman-Sundberg M, Mkrтчian S, Zhou Y, Lauschke VM. Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. *Human Genomics*. 2018;12(1):26.
489. Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. How to Consider Rare Genetic Variants in Personalized Drug Therapy. 2018;103(5):745-8.
490. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome Medicine*. 2020;12(1):44.
491. Klarin D, Natarajan P. Clinical utility of polygenic risk scores for coronary artery disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2021.
492. Dennis JK, Sealock JM, Straub P, Lee YH, Hucks D, Actkins KE, et al. Clinical laboratory test-wide association scan of polygenic scores identifies biomarkers of complex disease. *Genome Medicine*. 2021;13(1):6.
493. Richardson TG, Sanderson E, Palmer TM, Ala-Korpela M, Ference BA, Davey Smith G, et al. Evaluating the relationship between circulating lipoprotein lipids and apolipoproteins with risk of coronary heart disease: A multivariable Mendelian randomisation analysis. *PLOS Medicine*. 2020;17(3):e1003062.
494. Johnson D, Wilke MA, Lyle SM, Kowalec K, Jorgensen A, Wright GE, et al. A systematic review and analysis of the use of polygenic scores in pharmacogenomics. ;n/a(n/a).
495. Huddart R, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein TE. Are Randomized Controlled Trials Necessary to Establish the Value of Implementing Pharmacogenomics in the Clinic? 2019;106(2):284-6.
496. Goisauf M, Martin G, Bentzen HB, Budin-Ljøsne I, Ursin L, Durnová A, et al. Data in question: A survey of European biobank professionals on ethical, legal and societal challenges of biobank research. *PLOS ONE*. 2019;14(9):e0221496.
497. Critchley C, Nicol D, McWhirter R. Identifying public expectations of genetic biobanks. 2017;26(6):671-87.
498. Sanderson SC, Brothers KB, Mercaldo ND, Clayton EW, Antommaria AHM, Aufox SA, et al. Public Attitudes toward Consent and Data Sharing in Biobank Research: A Large Multi-site Experimental Survey in the US. *The American Journal of Human Genetics*. 2017;100(3):414-27.
499. Joly Y, Dalpé G, So D, Birko S. Fair Shares and Sharing Fairly: A Survey of Public Views on Open Science, Informed Consent and Participatory Research in Biobanking. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0129893.

500. Clayton EW, Halverson CM, Sathe NA, Malin BA. A systematic literature review of individuals' perspectives on privacy and genetic information in the United States. *PLOS ONE*. 2018;13(10):e0204417.
501. Middleton A. Society and personal genome data. *Human Molecular Genetics*. 2018;27(R1):R8-R13.
502. Heeney C, Kerr SM. Balancing the local and the universal in maintaining ethical access to a genomics biobank. *BMC Medical Ethics*. 2017;18(1):80.
503. Garrison NA, Sathe NA, Antommaria AHM, Holm IA, Sanderson SC, Smith ME, et al. A systematic literature review of individuals' perspectives on broad consent and data sharing in the United States. *Genetics in Medicine*. 2016;18(7):663-71.
504. Teare HJ, Morrison M, Whitley EA, Kaye J. Towards 'Engagement 2.0': Insights from a study of dynamic consent with biobank participants. 2015;1:2055207615605644.
505. Mikkelsen RB, Gjerris M, Waldemar G, Sandøe P. Broad consent for biobanks is best – provided it is also deep. *BMC Medical Ethics*. 2019;20(1):71.
506. Prictor M, Teare HJA, Kaye J. Equitable Participation in Biobanks: The Risks and Benefits of a "Dynamic Consent" Approach. 2018;6.
507. Korol S, Hurlimann T, Godard B, de Denus S. Disclosure of individual pharmacogenomic results in research projects: when and what kind of information to return to research participants. *Pharmacogenomics*. 2013;14(6):675-88. Epub 2013/04/11.
508. Lemke AA, Hulick PJ, Wake DT, Wang C, Sereika AW, Yu KD, et al. Patient perspectives following pharmacogenomics results disclosure in an integrated health system. 2018;19(4):321-31.
509. Waldman L, Shuman C, Cohn I, Kaiser A, Chitayat D, Wasim S, et al. Perplexed by PGx? Exploring the impact of pharmacogenomic results on medical management, disclosures and patient behavior. 2019;20(5):319-29.
510. "Forward-Thinking" in U.S. Biobanking. 2017;21(3):148-54.
511. Meagher KM, Curtis SH, Borucki S, Beck A, Srinivasan T, Cheema A, et al. Communicating unexpected pharmacogenomic results to biobank contributors: A focus group study. *Patient Educ Couns*. 2021;104(2):242-9.
512. Hicks JK, Dunnenberger HM, Gumpfer KF, Haidar CE, Hoffman JM. Integrating pharmacogenomics into electronic health records with clinical decision support. *Am J Health Syst Pharm*. 2016;73(23):1967-76. Epub 2016/11/20.
513. Collins T, Power K, McCallie Jr D, Owings R. Finding a Place for Pharmacogenetics in the Electronic Health Record. 2019;106(2):295-7.

514. Bank P, Swen J, Guchelaar H-J. A nationwide survey of pharmacists' perception of pharmacogenetics in the context of a clinical decision support system containing pharmacogenetics dosing recommendations 2017.
515. Lessons learned from the eMERGE Network: balancing genomics in discovery and practice. *Human Genetics and Genomics Advances*. 2021;2(1):100018.
516. Jacobs G, Wolf A, Krawczak M, Lieb W. Biobanks in the Era of Digital Medicine. 2018;103(5):761-2.
517. McNeer E, Beck C, Weeks HL, Williams ML, James NT, Bejan CA, et al. Building longitudinal medication dose data using medication information extracted from clinical notes in electronic health records. *J Am Med Inform Assoc*. 2021;28(4):782-90.

## Annexe 1 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 1

Table S1. Online search strategy

<b>Search words for Ovid MEDLINE from 1946, and MEDLINE Epub Ahead-of-Print, In-Process &amp; Other Non-Indexed Citations</b>
1. metoprolol.mp. or Metoprolol/
2. Cytochrome P450 2D6.mp. or Cytochrome P-450 CYP2D6/
3. Genomics/ or Genes/
4. pharmacogenetics.mp. or Pharmacogenetics/
5. Polymorphism, Genetic/ or Polymorphism, Single-Stranded Conformational/ or Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis/ or Polymorphism, Single Nucleotide/ or Polymorphism, Restriction Fragment Length/ or polymorphism.mp.
6. genotype.mp. or Genotype/
7. Humans/
8. 1 and 2
9. 7 and 8
10. 3 or 4 or 5 or 6
11. 9 and 10

**Table S2. Raw data of reduction in heart rate ( $\Delta$ HR), systolic blood pressure ( $\Delta$ SBP), and diastolic blood pressure ( $\Delta$ DBP) for the meta-analyses**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Mean $\Delta$ HR (beats/min)	(SD) Mean $\Delta$ HR	Mean $\Delta$ SBP (mmHg)	(SD) Mean $\Delta$ SBP	Mean $\Delta$ DBP (mmHg)	(SD) Mean $\Delta$ DBP
<b>Batty (2014)</b>	EM	*1/*1	189	-16.4	12.1	-4.3	20.6	-2.8	11.0
	IM	*1/*4	112	-17.0	12.3	-4.2	17.5	-4.2	12.3
	PM	*4/*4	12	-19.7	13.9	-7.8	13.9	-5.7	7.7
<b>Fux (2005)</b>	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*2	5	1.0	15.0	-16.6	22.3	-16.6	18.0
	EM	*1/*3-*10, *1/*41	89	-10.0	12.0	-19.5	20.1	-11.4	14.2
	IM	*8-*10/*8-*10, *8-*10/*3-*8, *8-*10/*41	21	-12.0	17.0	-17.9	18.3	-12.0	11.3
	PM	*3-*8/*3-*8	4	-10.0	9.0	-24.5	17.1	-12.5	11.9
<b>Hamadeh (2014)</b>	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*10, *2xN/*2	8	-11.2	8.2	-9.4	5.1	-7.5	4.8
	EM	*1/*1-*6, *1/*10, *1/*17, *1/*41, *1/*4xN, *1/*10xN, *4/*17xN, *2/*2, *2/*4, *2/*4xN, *2/*5, *2/*10, *2/*17, *2/*41, *10/*17, *10xN/*41, *17/*17, *17/*41, *17/*41	184	-11.4	6.6	-7.1	9.8	-7.0	6.6
	IM	*3/*17, *4/*17, *4/*10, *4/*41, *5/*10, *5/*17	15	-18.6	5.1	-6.5	11.1	-8.3	7.5
	PM	*3-*4/*4-*6	11	-16.6	6.9	-9.4	9.0	-9.3	5.1
<b>Kirchheiner (2004)</b>	UM	*1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35	12	-12.0	8.0	N/A	N/A	N/A	N/A
	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41	13	-14.0	12.0	N/A	N/A	N/A	N/A
	PM	*3-*6/*3-*6	4	-17.0	15.0	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Koytchev (1998)</b>	EM	*1/*1	16	-4.1	2.2	0.8	3.2	-8.5	2.6
	IM	*1/*4	6	-11.7	5.8	-5.8	7.0	-12.2	4.7
<b>Rau (2009)</b>	Non-PM <sup>1</sup>	63 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*0 <sup>2</sup> , *1-*2/*10, *1-*2/*41 8 IM: *0/*10, *0/*41	63	-9.1	8.4	-8.5	13.6	-3.6	9.2
	PM	*0/*0	8	-14.9	9.2	-12.8	17.9	-10.3	8.6
<b>Yuan<sup>3</sup> (2008)</b>	EMA	*1-*2/*1-*2	40	N/A	N/A	-5.1	13.1	-4.4	5.7
	IMA	*1-*2/*5, *2/*5, *1-*2/*10	38	N/A	N/A	-12.9	16.0	-6.7	8.0
	PMA	*5/*5, *5/*10, *10/*10	43	N/A	N/A	-11.4	15.8	-8.9	10.5

<sup>1</sup> : Phenotypes termed Non-PM refer to the pooling of phenotypes by the authors. Genotypes were given for each phenotype, but the separate data were unavailable.

<sup>2</sup> : Alleles termed \*0 regroup all non-functional alleles genotyped (\*3-\*6); Notation used within this study and by the same authors in another publication (Rau *et al.* 2002).

<sup>3</sup> : The A subgroups of this study were allocated a fixed dose of 100 mg/day, while the B subgroups, regrouping different participants, were allocated ascending doses of 25, 50, and 100 mg/day for PM, IM, and EM, respectively. The data from the B subgroups were not considered, because the daily doses were leveled according to the subjects' phenotypes, which could confound the separate effects of dosage and genotype on heart rate reduction. Therefore, only the subgroups that had received equal metoprolol doses were selected for subsequent meta-analyses.  $\Delta$ HR was not assessed for these subgroups.

**Table S3. Extracted raw data of the frequency of all-type adverse events (AE) and bradycardia between phenotypes contributing to meta-analyses.**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Number of AE	Proportion of AE	Events of Bradycardia	Proportion of Bradycardia	OR <sup>4</sup> , Bradycardia	(CI95%) OR, Bradycardia
<b>Batty (2014)</b>	EM	*1/*1	189	N/A <sup>5</sup>	N/A	71	0.376	Ref <sup>6</sup>	Ref
	IM	*1/*4	112	N/A	N/A	57	0.509	1.72	1.07-2.76
	PM	*4/*4	12	N/A	N/A	7	0.583	2.33	0.71-7.61
<b>Bijl (2009)</b>	EM	*1/*1	451	N/A	N/A	N/A	N/A	3.86	1.68-8.86
	PM	*4/*4	34	N/A	N/A	N/A	N/A		
<b>Hamadeh (2014)</b>	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*10, *2xN/*2	8	2	0.250	1	0.110	N/A	N/A
	EM	*1/*1-*6, *1/*10, *1/*17, *1/*41, *1/*4xN, *1/*10xN, *4/*17xN, *2/*2, *2/*4, *2/*4xN, *2/*5, *2/*10, *2/*17, *2/*41, *10/*17, *10xN/*41, *17/*17, *17/*41, *17/*41	184	57	0.310	46	0.250	N/A	N/A
	IM	*3/*17, *4/*17, *4/*10, *4/*41, *5/*10, *5/*17	15	4	0.267	4	0.250	N/A	N/A
	PM	*3/*4, *4/*4, *4/*5, *4/*6	11	4	0.364	3	0.270	N/A	N/A
<b>Rau (2009)</b>	Non-PM	63 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*0 <sup>7</sup> , *1-*2/*10, *1-*2/*41 8 IM: *0/*10, *0/*41	71	10	0.140	6	0.080	N/A	N/A
	PM	*0/*0	17	4	0.240	10	0.590	N/A	N/A
<b>Wuttke (2002)</b>	Non-PM	8 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*41 7 IM: *1/*4, *1/*5, *2/*3, *2/*41, *41/*4	15	N/A	N/A	5	0.333	N/A	N/A
	PM	*3-5/*4-*6	9	N/A	N/A	7	0.778	N/A	N/A
<b>Zineh (2004)</b>	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *17, *29, *41, *45, *46	42	18	0.429	N/A	N/A	N/A	N/A
	IM	*3-*6/*9, *3-*6/*10, *3-*6/*17, *3-*6/*29, *3-*6/*41, *3-*6/*45, *3-*6/*46	4	2	0.500	N/A	N/A	N/A	N/A
	PM	*3-*6/*3-*6	4	3	0.750	N/A	N/A	N/A	N/A

<sup>4</sup> : Odds ratio

<sup>5</sup> : Not available

<sup>6</sup> : IM and PM phenotypes compared to the EM phenotype, considered the reference group.

<sup>7</sup> : \*0 terminology used to describe all null alleles genotyped (\*3-\*6); Notation used for both studies by Rau *et al.* (2002, 2009).

**Table S4. Estimated means and standard deviations for average daily doses using Wan *et al.*'s formulas.**

First author (Year)	Situation <sup>8</sup>	In-study phenotypes	Genotypes	n	Median dose (mg)	Min.	Max.	Q1	Q3	Estimated mean daily dose (mg)	z <sup>th</sup> percentile for qnorm	qnorm function value	Estimated SD, mean daily dose
Fux (2005)	C1	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*2	5	N/A	62	191	N/A	N/A	100	0.881	2.36	55
		EM	EM/EM: *1-*2/*1-*2 EM/IM: *1-*2/*9, *1-*2/*10, *1-*2/*41 EM/PM: *1-*2/*3-*8	51	N/A	48	200	N/A	N/A	100	0.988	4.50	34
				15	N/A	30	100	N/A	N/A	50	0.959	3.48	20
				25	N/A	50	193	N/A	N/A	100	0.975	3.93	36
		IM	IM/IM: *9-*10/*9-*10, *9-*10/*41, *41/*9-*10, *41/*41 IM/PM: *9/*3-*8, *10/*3-*8, *41/*3-*8	9	N/A	25	150	N/A	N/A	86	0.932	2.99	42
				12	N/A	25	210	N/A	N/A	71	0.949	3.27	57
PM	*3-*8/*3-*8	4	N/A	50	145	N/A	N/A	74	0.853	2.10	45		
Rau (2002)	C3	EM	EM/EM: *1-*2/*1-*2 EM/IM: *1-*2/*9, *1-*2/*41	31	48	N/A	N/A	24	71	48	0.740	1.29	37
				21	71	N/A	N/A	48	95	71	0.735	1.26	38
		IM	EM/PM: *1-*2/*0 <sup>9</sup> IM/IM: *41/*41 IM/PM: *9-*10/*0, *41/*0	21	95	N/A	N/A	71	119	48	0.735	1.26	38
				1	23.8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
				9	48	N/A	N/A	24	71	48	0.716	1.14	42
		PM	*0/*0	8	48	N/A	N/A	24	71	48	0.712	1.12	42
Sharp (2009)	C3	EM	*1/*1	27	95	N/A	N/A	48	95	79	0.739	1.28	37
		IM	*1/*4	22	48	N/A	N/A	24	143	71	0.736	1.26	94
		PM	*4/*4	3	48	N/A	N/A	48	95	63	0.654	0.79	60
Rau (2009)	C3	Non-PM	63 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*0, *1-*2/*10, *1-*2/*41 8 IM: *0/*10, *0/*41	71	48	N/A	N/A	27	65	38	0.746	1.32	29
		PM	*3-*6/*3-*6	17	48	N/A	N/A	41	95	54	0.732	1.24	44
Wuttke (2002)	C3	Non-PM	8 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*41 7 IM: *1/*4, *1/*5, *2/*3, *2/*41, *41/*4	15	48	N/A	N/A	29	66	36	0.730	1.22	30
		PM	*3-*5/*4-*6	9	48	N/A	N/A	39	56	18	0.716	1.14	16

<sup>8</sup> : Equations used from Wan *et al.* (2014) to estimate the mean and SD from each group, according to the parameters presented within the studies. Situation C1 refers to the formulas used if the median, minimum (Min.) and maximum (Max.) are presented, whereas C3 refers to the ones used when the median is presented along with interquartile values, Q1 and Q3.

<sup>9</sup> : Alleles \*3-\*8, \*12, \*14, and \*15 termed as \*0.

**Table S5. Summary of all extracted and estimated data contributing to the meta-analyses of the differences in titrated doses between phenotypes.**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Mean daily dose (mg)	SD, Mean daily dose
Batty (2014)	EM	*1/*1	189	147	62
	IM	*1/*4	112	146	61
	PM	*4/*4	12	175	50
Fux (2005)	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*2	5	100	55
	EM	EM/EM: *1-*2/*1-*2 EM/IM: *1-*2/*9, *1-*2/*10, *1-*2/*41 EM/PM: *1-*2/*3-*8	91	92	33
	IM	IM/IM: *9-*10/*9-*10, *9-*10/*41, *41/*9-*10, *41/*41 IM/PM: *9/*3-*8, *10/*3-*8, *41/*3-*8	21	89	43
	PM	*3-*8/*3-*8	4	74	45
Hamadeh (2014)	UM	*1/*1xN, *1xN/*2, *1/2*N, *2xN/*10, *2xN/*2	8	200	0
	EM	*1/*1-*6, *1/*10, *1/*17, *1/*41, *1/*4xN, *1/*10xN, *4/*17xN, *2/*2, *2/*4, *2/*4xN, *2/*5, *2/*10, *2/*17, *2/*41, *10/*17, *10xN/*41, *17/*17, *17/*41, *17/*41	184	195	11
	IM	*3/*17, *4/*17, *4/*10, *4/*41, *5/*10, *5/*17	15	194	13
	PM	*3/*4, *4/*4, *4/*5, *4/*6	11	200	0
Nozawa (2005)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*5, *1-*2/*10	30	67	23
	IM	*10/*10	8	71	25
Rau (2002)	EM	EM/EM: *1-*2/*1-*2 EM/IM: *1-*2/*9, *1-*2/*41	52	57	57
	IM	EM/PM: *1-*2/*0 IM/PM: *9-*10/*0, *41/*0	30	81	39
	PM	*0/*0	8	48	42
Rau (2009)	Non-PM	63 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*0, *1-*2/*10, *1-*2/*41 8 IM: *0/*10, *0/*41	71	47	29
	PM	*3-*6/*3-*6	17	61	44
Sharp (2009)	EM	*1/*1	27	79	37
	IM	*1/*4	22	71	94
	PM	*4/*4	3	63	60
Terra (2005)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*3, *1-*2/*4, *1-*2/*6, *1-*2/*9, *1-*2/*10, *1-*2/*17, *1-*2/*29, *1-*2/*41	27	106	69
	IM	Any combination of 2 reduced function alleles *9, *10, *17, *29, *41, or 1 reduced function allele with another null allele *3, *4, *6	8	100	75
	PM	*3-*4/*3-*4, *3-*4/*6, *6/*6	4	150	57
Wuttke (2002)	Non-PM	8 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*41 7 IM: *1/*4, *1/*5, *2/*3, *2/*41, *41/*4	15	48	30
	PM	*3-*5/*4-*6	9	48	16
Zineh (2004)	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *17, *29, *41, *45, and *46	42	113	64
	IM	*3-*6/*9, *3-*6/*10, *3-*6/*17, *3-*6/*29, *3-*6/*41, *3-*6/*45, *3-*6/*46	4	138	75
	PM	*3-*6/*3-*6	4	125	87



**Table S6. Rejected studies from the systematic review for clinical parameters and reasons of exclusion after full-text assessment.**

<b>First author</b>	<b>Year</b>	<b>PMID</b>	<b>Source</b>	<b>Reason of exclusion from systematic review</b>
<b>Ayyappadhas</b>	2015	26084127	Medline	Classification not according to genotypes
<b>Bae</b>	2014	16476126	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Bozkurt</b>	1996	9074895	Medline	Genotypes not determined
<b>Chen</b>	2018	29549925	Medline	Reviewed parameters not presented
<b>Damy</b>	2004	14748763	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Duricova</b>	2013	N/A	Medline	Reviewed parameters not presented
<b>Hemeryck</b>	2000	10741632	Reference lists	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Huang</b>	1999	10223777	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Ismail</b>	2006	16476126	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Jin</b>	2008	18834373	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Johnson</b>	1996	8820427	Reference lists	Genotypes not determined
<b>Laurent-Kenesi</b>	1993	12959269	Medline	Genotypes not determined
<b>Luzier</b>	1999	10613615	Reference lists	Genotypes not determined
<b>Neves</b>	2013	23927473	Medline	Genotypes not determined
<b>Parker</b>	2011	21923449	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Seeringer</b>	2008	18545991	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Sharma</b>	2010	19948945	Medline	Combination of 2 studies
<b>Somer</b>	2000	10848718	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Taguchi</b>	2003	12915955	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Wang</b>	2008	2485214	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Werner, D.</b>	2004	15541258	Reference lists	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Werner, U.</b>	2003	N/A	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Werner, U.</b>	2006	16995327	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only
<b>Wojtczak</b>	2014	24905532	Medline	Reviewed parameters not presented
<b>Wu</b>	2015	25823457	Medline	Reviewed parameters not presented
<b>Yoon</b>	2000	10824636	Medline	Presentation of pharmacokinetic parameters only

**Table S7. Sensitivity analyses of random-effects model adjustments.**

Parameter	Sources	Hartung-Knapp analyses results		Sensitivity analyses results	
		Effect size (95%CI)	Heterogeneity ( $I^2$ )	Effect size (95%CI)	Heterogeneity ( $I^2$ )
<b>Non-PM and PM phenotypes</b>					
<b>Average daily doses</b>	26, 29, 34, 35, 38, 42, 43, 47	All studies (titration only): MD -4.63 (-19.02 to 9.76)	28.3%	All studies (titration only): MD -4.63 (-22.12 to 12.86)	28.3%
<b><math>\Delta</math>HR</b>	26, 35, 38, 40, 48	<b>Titration-dose studies<sup>10</sup>:</b> <b>MD 3.11 (0.15 to 6.07)</b>  <b>All studies:</b> <b>MD 3.16 (0.94 to 5.37)</b>	0%	<b>Titration-dose studies:</b> <b>MD 3.11 (0.06 to 6.16)</b>  <b>All studies:</b> <b>MD 3.16 (0.16 to 6.15)</b>	0%
<b><math>\Delta</math>DBP</b>	26, 35, 36, 38, 48	<b>Titration-dose studies:</b> <b>MD 2.51 (0.72 to 4.23)</b>  <b>All studies:</b> <b>MD 2.93 (1.53 to 4.32)</b>	0%	<b>Titration-dose studies:</b> <b>MD 2.51 (0.11 to 4.91)</b>  <b>All studies:</b> <b>MD 2.93 (0.96 to 4.90)</b>	0%
<b><math>\Delta</math>SBP</b>	26, 35, 36, 38, 48	<b>Titration-dose studies:</b> <b>MD 2.66 (0.45 to 4.86)</b>  <b>All studies:</b> <b>MD 2.88 (1.47 to 4.29)</b>	0%	Titration-dose studies: MD 2.66 (-1.50 to 6.81)  All studies: MD 2.88 (-0.48 to 6.24)	0%

<sup>10</sup> : Bold text indicates statistical significance.

## **Annexe 2 – Analyses supplémentaires, Manuscrit n° 1**

### **Supplementary material; Pharmacokinetic parameters – Qualitative synthesis**

#### *Pharmacokinetic parameters*

Populations were restrained from 7 to 181 subjects. Given the many approaches of the included studies, every considered parameter differed regarding the amount of data presented. Durations lasted from as little as 4 hours to as long as 2 months.

AUC values were assessed in 14 studies. They individually regrouped 7 to 181 subjects, with a total pooled sample size of 383 subjects (1-14). For every article, the data reported significant changes across either 2, 3, or 4 inferred phenotypes that had been included in the statistical comparisons performed. Also, these significant differences all reflected a trend which indicated AUC values that were inversely proportional to the metabolic activity of the inferred phenotype.

Articles having reported C<sub>max</sub> measurements were also confined to small sample sizes, with a sum of 10 studies and follow-ups at the exact same time intervals as C<sub>l</sub>/F. They each contained between 7 and 40 subjects, and formed a total of 239 subjects (1, 2, 4-11, 15). Nine trials unequivocally demonstrated significant disparities between every inferred phenotype compared, with peak values that decreased as the metabolic activity increased.

The data for C<sub>l</sub>/F comprised smaller and less variable sample sizes, ranging from 16 to 91 participants, and gathering a total of 295 subjects from 9 studies (2, 4, 5, 7, 9-11, 14, 16). All were designed as pharmacokinetic assessments, with measurements having been made from blood and urine samples between 4 and 48 hours after drug administration. One study lasted considerably longer than the others, for a total of 2 months (4). Results showed statistically significant differences in 7 studies, gathering 214 subjects, and only one found no correlation between C<sub>l</sub>/F measurements and subjects. Again, for the studies that observed a significant implication between genotypes and metoprolol metabolism, the same logical trend was observed for every inferred phenotype, with C<sub>l</sub>/F values being increased from PM to UM.

As for t<sub>1/2</sub> values, populations ranged from 7 to 50 subjects per study for a total of 220 subjects (1, 2, 4-8, 10, 11, 14). Lasting anywhere from 12 hours to 2 months, all 10 articles showed

a trend indicating lower half-lives when the metabolic activity increased among inferred phenotypes.

By assessing these four major pharmacokinetic parameters, our review indicates a valid relation between their fluctuations and all the genotype-inferred phenotypes, regardless of the sample sizes and lengths of the studies.

## References

1. Bae SH, Lee JK, Cho DY, Bae SK. Simultaneous determination of metoprolol and its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and O-desmethylnmetoprolol, in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to the pharmacokinetics of metoprolol associated with CYP2D6 genotypes. *J Sep Sci.* 2014;37(11):1256-64.
2. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. *Bratislava Medical Journal.* 2013;114(04):206-12.
3. Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64(12):1163-73.
4. Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, Jobin J, Desgagnes P, Poirier P, et al. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67(5):466-77.
5. Huang J, Chuang SK, Cheng CL, Lai ML. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(4):402-7.
6. Jin SK, Chung HJ, Chung MW, Kim JI, Kang JH, Woo SW, et al. Influence of CYP2D6\*10 on the pharmacokinetics of metoprolol in healthy Korean volunteers. *J Clin Pharm Ther.* 2008;33(5):567-73.
7. Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(4):302-12.
8. Koytchev R, Alken RG, Vlahov V, Kirkov V, Kaneva R, Thyroff-Friesinger U, et al. Influence of the cytochrome P4502D6\*4 allele on the pharmacokinetics of controlled-release metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(6):469-74.
9. Seeringer A, Brockmoller J, Bauer S, Kirchheiner J. Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise-induced heart rate. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64(9):883-8.
10. Sharma A, Pibarot P, Pilote S, Dumesnil JG, Arsenault M, Belanger PM, et al. Modulation of metoprolol pharmacokinetics and hemodynamics by diphenhydramine coadministration during exercise testing in healthy premenopausal women. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1172-81.
11. Wang Y, Zhou L, Dutreix C, Leroy E, Yin Q, Sethuraman V, et al. Effects of imatinib (Glivec) on the pharmacokinetics of metoprolol, a CYP2D6 substrate, in Chinese patients with chronic myelogenous leukaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(6):885-92.
12. Werner D, Wuttke H, Fromm MF, Schaefer S, Eschenhagen T, Brune K, et al. Effect of amiodarone on the plasma levels of metoprolol. *Am J Cardiol.* 2004;94(10):1319-21.
13. Werner U, Werner D, Rau T, Fromm MF, Hinz B, Brune K. Celecoxib inhibits metabolism of cytochrome P450 2D6 substrate metoprolol in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2003;74(2):130-7.
14. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(6):536-44.

15. Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, Hashimoto Y, Igarashi N, Nonomura M, et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and beta-adrenergic inhibition during long-term treatment: a comparison with bisoprolol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(5):713-20.
16. Ismail R, Teh LK. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J Clin Pharm Ther.* 2006;31(1):99-109.

**Table 1. Summary of included studies evaluating the effects of CYP2D6 phenotypes on the pharmacokinetics (PK) of metoprolol.**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Bae et al. (2014)</b>	Prospective, non-randomized, open-label, PK study	7 healthy Korean volunteers	Blood samplings taken for up to 24 hours after metoprolol administration	3 EM: <i>*1/*1</i> 4 IM: <i>*10/*10</i>	100 mg single dose metoprolol IR	<ul style="list-style-type: none"> <li>IM showed increases in AUC, C<sub>max</sub>, and t<sub>1/2</sub> after dosing, compared to EM (all p&lt;0.05)</li> </ul>
<b>Damy et al. (2004)</b>	Mono-center, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study	49 healthy male subjects 44 included in PK evaluation	13 days	39 EM: <i>*1/*1</i> , <i>*1/*3-6</i> 5 PM: <i>*3-6/*3-6</i>  Only 11 EM subjects and 4 PM with baseline metoprolol measurements available	Fixed dose 200mg/day metoprolol CR/XL  800, 1200, or 1600mg/day dronedarone	<p><i>Measurements without dronedarone:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>All EM had seemingly lower C<sub>max</sub> values, as well as AUC<sub>0-24h</sub> measures compared to PM when taking metoprolol only, but statistical comparisons were not performed between genotype-inferred phenotypes</li> </ul>
<b>Duricova et al. (2013)</b>	Prospective, open-label, non-randomized study	49 patients with HT on routine metoprolol treatment 30 patients genotyped	Blood samples collected for 4 hours after metoprolol allocation	30 EM: <i>*1/*1</i> , <i>*1/*3</i> , <i>*1/*4</i> , <i>*1/*6</i>  Analyzed as homozygous and heterozygous EM	Routine metoprolol IR treatment between 100-200 mg/day  Stable dose allocation for ≥2 weeks before study  44 patients with additional antihypertensive drugs	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dose- and BW-normalized AUC values from 0 to 4 hours were increased 1.8-fold for heterozygous EM compared to homozygous EM (p&lt;0.05)</li> <li>Nonsignificant differences in Cl/F values between heterozygous and homozygous EM</li> </ul>
<b>Goryachkina et al. (2008a)</b>	Prospective, case-controlled study	34 patients, 17 treated with 17 depressed AMI patients taking metoprolol, and 17 non-depressed control patients treated with metoprolol	10 days  Blood samples collected for 12 hours after initial metoprolol dose	17 EM: <i>*1/*1</i> , <i>*1/*3</i> , <i>*1/*4</i>	75mg/day ± 39 mean metoprolol IR or CR/XL on day 1  Co-administration of 20mg/day paroxetine on days 2-8, or placebo  Use of concomitant drugs accepted	<p><i>Baseline measurements:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Prior to paroxetine treatment, homozygous <i>*1/*1</i> patients had lower but nonsignificant dose- and BW-normalized AUC values compared to heterozygous <i>*3</i> and <i>*4</i> patients (p=0.06)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Goryachkina et al. (2008b)</b>	Prospective, non-randomized study	187 Caucasians hospitalized after AMI occurrence  115 patients included for metoprolol PK analysis, including the 17 depressed AMI patients used for the previous study; Goryachkina et al. (2008a)	10 days	Patients kept for clinical parameter analyses: 5 UM: *1/*1xN 108 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4, *1/*4xN, *1/*4, *1/*10, *10/*4 2 PM: *4/*4  Patients kept for PK parameters analyses: 5 UM: *1/*1xN 103 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4 2 PM: *4/*4	75mg/day ± 38 mean metoprolol IR or CR/XL  Use of concomitant drugs accepted and considered, with multiple drug classes co-administered other than β-blockers	<ul style="list-style-type: none"> <li>Median dose- and BW-normalized metoprolol concentrations were significantly different between patients with 0, 1, 2, or 3 active alleles after metoprolol dosing (p=0.004) and at steady-state before dosing (p=0.002)</li> </ul>
<b>Hamelin et al. (2000)</b>	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-period crossover study	16 healthy male subjects	Blood and urine samplings collected 48 hours after metoprolol dose	10 EM: *1/*1, *1/*5 6 PM: *4/*4, *4/*5	100mg single dose metoprolol IR on day 3  Co-administration of 50mg/day diphenhydramine, or placebo for 5 days, for 2 periods	<p><i>Baseline measurements:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>AUC, Cmax, Cl/F, and t½ values for metoprolol were all higher for PM than for EM (all p&lt;0.0001)</li> </ul>
<b>Hemeryck et al. (2000)</b>	Prospective, non-randomized, open-label, 2-period crossover trial	8 healthy male volunteers	Blood and urine samplings collected for up to 24 hours after baseline metoprolol administration	8 EM: *1/*1, *1/*4-5	Single 100mg/day metoprolol IR dose  Co-administration of 20mg/day paroxetine for the 6 following days	<ul style="list-style-type: none"> <li>Only one phenotype included within the study (EM); no in-study comparisons possible for PK or clinical markers between multiple genotype-inferred phenotypes.</li> <li>Baseline metoprolol PK values extracted for analyses of AUC, Cmax, and t½</li> </ul>
<b>Huang et al. (1999)</b>	Prospective PK study	40 healthy Chinese Han subjects	Blood sampling performed for 24 hours; urine samples collected for 48 hours after single dose	18 EM: *1/*1, *1/*10 12 IM: *10/*10	100mg single dose metoprolol IR	<ul style="list-style-type: none"> <li>For both <i>S</i>- and <i>R</i>-metoprolol enantiomers, AUC, Cmax, t½, and Cl/F values were variable for heterozygous *10 compared to EM and homozygous *10, and the same observations were seen between homozygous *10 and EM (all p&lt;0.05). Cmax was not significantly changed between homozygous and heterozygous *10</li> <li>Homozygous *10 had significant decreases of CL/F compared to EM (p&lt;0.05)</li> </ul>



**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Ismail et al. (2006)</b>	Prospective PK study	91 patients with cardiovascular diseases (IHD, HT) treated with metoprolol for $\geq 6$ months	3 months	3 UM: $*1/*1xN$ , $*1/*10xz$ 58 EM: $*1/*1$ , $*1/*10$ 29 IM: $*10/*10$ , $*10/*9$ , $*1/*4$ , $*1/*5$ , $*4/*10$ , $*5/*10$ 1 PM: $*4/*4$	Half of patient prescribed 100mg/day metoprolol IR. And either 50 or 200mg/day for the other half Dosing regimens based on clinical grounds	<ul style="list-style-type: none"> <li>Subjects with only 1 functional allele than subject with 2 had higher mean AUC (<math>p=0.017</math>)</li> <li>Cl/F value differences nonsignificant between the 3 phenotypes (<math>p&gt;0.05</math>)</li> <li>The only PM had the lowest value for Cl/F, compared to the 2 other phenotype groups</li> </ul>
<b>Jin et al. (2008)</b>	Prospective, PK evaluation study	107 healthy Koreans 18 selected for metoprolol PK	Blood sampling performed for 24 hours after dosing	13 EM: $*1/*1$ , $*1/*10$ 5 IM: $*10/*10$	100mg single dose metoprolol IR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cmax and AUC significantly higher for metoprolol for IM than for EM (all <math>p&lt;0.001</math>)</li> <li>Metoprolol <math>t_{1/2}</math> for IM was significantly longer than homozygous and heterozygous EM (<math>p=0.006</math>)</li> </ul>
<b>Kirchheiner et al. (2004)</b>	Prospective, non-randomized, controlled trial	29 healthy volunteers	Blood samples collected for 24 hours after single dose; urine samples collected for 12 hours	12 UM: $*1-*2/*2x1$ , $*1-*2/*2x2$ , $*1-*2/*2x35$ , $*9-*10/*2x1$ , $*9-*10/*2x2$ , $*9-*10/*2x35$ , $*35/*2x1$ , $*35/*2x2$ , $*35/*2x35$ , $*41/*2x1$ , $*41/*2x2$ , $*41/*2x35$ 13 EM: 2 Any combination of alleles $*1$ , $*2$ , $*9$ , $*10$ , $*35$ , and $*41$ 4 PM: $*3-*6/*3-*6$	100mg single dose metoprolol IR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metoprolol Cmax, AUC, and CL/F differed significantly depending on <i>CYP2D6</i> phenotype (all <math>p&lt;0.001</math>), and <math>t_{1/2}</math> (<math>p=0.011</math>)</li> <li>AUC for time-response curves showed significant implications for PM vs EM (<math>p=0.027</math>), and for PM vs UM (<math>p=0.017</math>)</li> </ul>
<b>Koytchev et al. (1998)</b>	Prospective, randomized, 3-period cross-over, bioequivalence study	36 healthy Caucasians 22 evaluated for metoprolol PK	Total 15 days	16 EM: $*1/*1$ 6 IM: $*1/*4$	200mg/day metoprolol CR/XL	<ul style="list-style-type: none"> <li>IM had AUC and <math>t_{1/2}</math> increased compared to EM (all <math>p&lt;0.05</math>)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Nozawa et al. (2005)</b>	Prospective, non-randomized, comparative study	72 patients with various cardiovascular disease (AF, IHD, HT, hypertrophic cardiomyopathy) on routine treatment with metoprolol or bisoprolol for $\geq 2$ weeks 38 patients treated with metoprolol	Baseline values taken 3 and 4 hours after dosing	30 EM: *1/*1, *1/*10 8 IM: *10/*10  Homozygous and heterozygous EM analyzed separately	Patients taking metoprolol IR:  EM *1/*1: 61.5mg/day EM *1/*10: 71.5mg/day IM: 71.3mg/day  Dosing regimens not specifically mentioned	<i>Baseline measurements for patients taking metoprolol:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosing regimen differences nonsignificant between all 3 groups</li> <li>• Cmax values higher for homozygous IM than for homozygous EM (p&lt;0.01) and heterozygous EM (p&lt;0.05)</li> </ul>
<b>Parker et al. (2011)</b>	Prospective, randomized, open-label, 3-period crossover study	15 healthy volunteers	Blood samples collected for 24 hours after initial metoprolol dose	15 EM: *1/*1, *1/*2, *1/*4, *1/*5, *1/*10, *1/*17	Phase 200mg/day metoprolol IR for Phase 1, ER for Phases 2 and 3  Co-administration of 20mg/day paroxetine for days 2 to 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Only one phenotype included within the study; no in-study comparisons possible for PK or clinical markers between multiple genotype-inferred phenotypes</li> <li>• Baseline metoprolol IR PK values extracted for ANOVA models of AUC, Cmax, and t<sub>1/2</sub> for S- and R-metoprolol</li> </ul>
<b>Seeringer et al. (2008)</b>	Prospective, non-randomized, controlled trial	29 healthy subjects  Same cohort as Kirchheiner et al. (2004)	Blood samples collected for 24 hours after single dose; urine samples collected for 12 hours	12 UM: *1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35  13 EM: 2 Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41  4 PM: *3-*6/*3-*6	100mg single racemic metoprolol IR dose	Enantiomeric S-/R-metoprolol measurements added to racemic metoprolol measures from Kirchheiner et al. (2004): <ul style="list-style-type: none"> <li>• AUC and the Cmax were increased from UM to PM significantly for S- and R-metoprolol <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S-metoprolol</i>: AUC, p=0.003; Cmax, p=0.018</li> <li>- <i>R-metoprolol</i>: AUC, p=0.004; Cmax, p=0.017</li> </ul> </li> <li>• Same trend observed inversely for Cl/F, increasing from PM to UM for S- and R-metoprolol (all p=0.003)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Sharma et al. (2005)</b>	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-period crossover study	20 healthy premenopausal women	2 months	16 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4, *1/*5 4 PM: *4/*4, *4/*5	100mg single dose metoprolol IR on day 3  Co-administration of 50mg/day diphenhydramine, or placebo for 5 days, for 2 periods	<i>Baseline measurements:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Both racemic metoprolol AUC and Cmax were significantly higher for PM than EM (all p&lt;0.05)</li> <li>Oral and non-renal clearances were lower for PM than for EM (p&lt;0.05)</li> <li>t<sub>1/2</sub> was significantly longer for PM than EM (p&lt;0.0001), yet renal clearance was unchanged (p&gt;0.05)</li> <li>The exposure to both enantiomers was significantly lower for EM compared with PM. PM had a greater <i>R</i>- and <i>S</i>-metoprolol Cmax (p&lt;0.05), a greater <i>R</i>-metoprolol AUC (P&lt;0.05), and a greater <i>S</i>-metoprolol AUC (P&lt;0.05). Cl/F values were also higher for EM than for PM, for both enantiomers (p&lt;0.05)</li> </ul>
<b>Sharma et al. (2010)</b>	Retrospective analysis of 2 combined studies, Hamelin et al. (2000) and Sharma et al. (2005)	16 healthy male subjects and 20 healthy premenopausal women  <b>Combined cohorts of Hamelin et al. (2000) and Sharma et al. (2005)</b>	Blood samplings performed for up to 48 hours after metoprolol administration	26 EM: *1/*1, *1/*3, *1/*4, *1/*5 10 PM: *4/*4, *4/*5	100mg single dose metoprolol IR on day 3  Co-administration of 50mg/day diphenhydramine, or placebo for 5 days, for 2 periods	<ul style="list-style-type: none"> <li>Although not analyzed, the combined values of the groups from the 2 studies showed increases in AUC, Cmax, and t<sub>1/2</sub>, as well as decreases in Cl/F, from PM to EM for both enantiomers.</li> <li>Additional baseline measurements for enantiomeric metoprolol values of Hamelin et al. (2000). Statistical tests not performed between <i>R</i>- and <i>S</i>-metoprolol PK values.</li> <li>Enantiomeric measurements extracted for analyses between <i>R</i>- and <i>S</i>-metoprolol PK parameters.</li> </ul>
<b>Sharp et al. (2009)</b>	Multi-center, prospective trial	52 patients with systolic HF (NYHA II-IV, LVEF ≤45%)	Blood sampling performed at least 2 weeks after maximum tolerated dose achieved (specific duration not mentioned)	27 EM: *1/*1 22 IM: *1/*4 3 PM: *4/*4	23.75mg/day median initial metoprolol CR/XL, doubled every 2- to 4-week intervals Titration occurred until MTD of 190 mg/day was achieved (median MTD 95mg/day)  Other treatments permitted during the study	<ul style="list-style-type: none"> <li>Median dose-adjusted <i>S</i>-metoprolol concentrations varied inversely to the number of functional alleles between all groups (p=0.002), and between EM and PM (p=0.016), IM and PM (p=0.027), and EM and IM (p=0.006)</li> <li>Median dose-adjusted <i>R</i>-metoprolol concentrations varied inversely to the number of functional alleles between all groups (p=0.0006), and between EM and PM (p=0.013), IM and PM (p=0.014), and EM and IM (p=0.003)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
<b>Somer et al. (2000)</b>	Randomized, double-blind, 2-period cross-over study	7 healthy male volunteers	Blood samplings performed for up to 24 hours after metoprolol administration	7 EM: *1/*1, *1/*4  6 homozygous and one heterozygous EM analyzed separately (pooled for quantitative analyses)	100 mg single dose metoprolol  400mg hydroxychloroquine or placebo for 8 days Wash-out interval of 4 months between periods	<i>Baseline measurements:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Only 1 heterozygous *1/*4 EM present in the cohort, with increases for mean values of AUC, Cmax, and t½ between 2- to 5-fold compared to all homozygous *1 EM</li> </ul>
<b>Taguchi et al. (2003)</b>	Prospective PK study	34 Japanese patients on routine metoprolol treatment	Blood samples collected between 2 and 4.5 hours of metoprolol administration	EM: *1/*1, *1/*2, *1/*10, *2/*10 IM: *10/*10  All genotypes analyzed as 5 separate groups	Between 40mg/day and 120mg/day metoprolol CR/XL	<ul style="list-style-type: none"> <li>BW-normalized Cl/F changes nonsignificant between *1/*1 (Group 1a) and *1/*2 (Group 1b), and between *1/*10 (Group 2a) and *2/*10 (Group 2b).</li> <li>When compared to IM (Group 3), BW-normalized Cl/F values were increased by 60.4% in Group 1, and by 52.0% in Group 2 (all p&lt;0.05)</li> </ul>
<b>Terra et al. (2005)</b>	Multi-center, prospective, randomized, double-blind trial	61 naïve β-blocker users, with ischemic or non-ischemic HF (NYHA II-III, LVEF ≤40%) 51 patients genotyped	10 weeks	37 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*3, *1-*2/*4, *1-*2/*6, *1-*2/*9, *1-*2/*10, *1-*2/*17, *1-*2/*29, *1-*2/*41  10 IM: Any combination of 2 reduced function alleles *9, *10, *17, *29, *41, or 1 reduced function allele with another null allele *3, *4, *6  4 PM: *3-*4/*3-*4, *3-*4/*6, *6/*6	25mg/day for patients NYHA II, and 12.5mg/day metoprolol CR/XL for patients NYHA III as starting dose. Titration biweekly until 200mg dose achieved, or MTD Other co-medications allowed during the study	<ul style="list-style-type: none"> <li>Including all 3 phenotypes, significant differences were observed for median S-metoprolol concentrations at 25, 50, 100, and 200mg/day, respectively (p=0.005; p=0.01; p=0.03; p=0.02).</li> </ul>
<b>Werner U. et al. (2006)</b>	Open-label, randomized, 3-period crossover PK study	15 healthy male volunteers	Blood samples taken for up to 24 hours after metoprolol dose	12 EM: *1-*2/*1-*2, *1-*2/*4, *1-*2/*5, *1-*2/*41  3 PM: *4-5/*4-5	50mg/day metoprolol IR for Period 1; co-administration of 20mg/day valdecoxib or 25mg/day rofecoxib during periods 2 and 3	<i>Baseline measurements:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline values for metoprolol PK were higher for PM than for EM, specifically regarding AUC, Cmax, and t½, and were lower for Cl/F (statistical analyses not shown)</li> </ul>

**Table 1. (cont.)**

Authors (Year)	Study design	Population and Diseases	Follow-up	Genotype-inferred phenotypes	Medication and Dosing regimens	Results of reviewed markers
Zineh et al. (2004)	Prospective, clinical and PK evaluation study	50 patients with uncomplicated HT	4 weeks Blood samples taken for 12 hours after metoprolol administration	42 EM: Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *17, *29, *41, *45, and *46  4 IM: *3-*/6/*9, *3-*/6/*10, *3-*/6/*17, *3-*/6/*29, *3-*/6/*41, *3-*/6/*45, *3-*/6/*46  4 PM: *3-*/6/*3-*/6  EM patients initially divided into subgroups (High EM, Medium EM, Low EM), but subsequently regrouped to create a common general phenotype for quantitative analyses.	Start 100mg/day metoprolol, titration doubled doses weekly until one of the following criteria was achieved: clinical DBP was reduced to $\leq 90$ mmHg or till patient had side effects that precluded upward titration of drug, or 400mg/day achieved  Treatment for 4 weeks after meeting criteria  Other co-medications allowed during study, including CYP2D6 inhibitors  Metoprolol formulation not mentioned	<ul style="list-style-type: none"> <li>All 5 groups had significant differences in <math>t_{1/2}</math> (<math>p &lt; 0.0001</math>), <i>S</i>-metoprolol AUC (<math>p = 0.007</math>), Cl/F (<math>p = 0.007</math>), and enantiomeric <i>S</i>-/<i>R</i>-metoprolol ratio (<math>p = 0.006</math>)</li> <li>The 3 EM subgroups significantly expressed increased <i>S</i>-metoprolol dose-normalized AUC, from High EM to Low EM (<math>p = 0.032</math>). The same observations were noted when removing patients taking CYP2D6 inhibitors (<math>p = 0.017</math>)</li> </ul>

ADR, adverse drug reactions; AF, atrial fibrillation; AUC, area under the concentration-time curve; AMI, acute myocardial infarction; BW, body weight; CAD, Coronary artery diseases; CHF, chronic heart failure; Cl/F, oral clearance; Cmax, maximum plasma concentrations; CR/XL, Controlled-release/Extended-release metoprolol formulation; DBP, diastolic blood pressure; DPWG, Dutch Pharmacogenomics Working Group; EM, extensive metabolizers; HF, heart failure; HR, heart rate; HT, hypertension IHD, ischemic heart diseases; IM, intermediate metabolizers; IR, Immediate-release metoprolol formulation; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, Myocardial infarction; MTD, maximum tolerated dose; NYHA, New York Heart Association; PK, pharmacokinetics; PM, poor metabolizers; UM, ultra-rapid metabolizers;  $t_{1/2}$ , half-life.

**Table 2. Extracted data for racemic metoprolol pharmacokinetics.**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Mean AUC/Dose (ng·ml/h·mg)	SD, AUC/Dose	Mean Cmax/Dose (ng·ml/mg)	SD, Cmax/Dose	Mean CI/F (L/h)	SD, CI/F	Mean t <sub>1/2</sub> (hours)	SD, t <sub>1/2</sub> (hours)
<b>Bae (2014)</b>	EM	*1/*1	4	5.56	1.73	1.78	0.45	N/A	N/A	2.5	0.5
	IM	*10/*10	3	35.0	17.0	5.07	1.55	N/A	N/A	5.9	0.7
<b>Hamelin (2000)</b>	EM	*1/*1, *1/*5	10	9.40	4.03	2.39	0.89	127	56	2.8	0.5
	PM	*4/*4, *4/*5	6	39.6	9.35	4.43	1.15	27	9	7.1	0.5
<b>Jin (2008)</b>	EM	*1/*1, *1/*10	13	7.41	2.72	1.70	0.58	N/A	N/A	3.0	1.1
	IM	*10/*10	5	25.5	6.32	3.49	1.18	N/A	N/A	5.0	1.1
<b>Kirchheiner<sup>11</sup> (2004)</b>	UM	*1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35	12	3.11	1.22	0.80	0.33	395	148	4.3	1.2
	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41	13	6.68	3.11	1.43	0.66	217	112	4.9	1.6
	PM	*3-*6/*3-*6	4	32.2	2.25	2.73	0.25	31	2	8.4	1.7
<b>Sharma (2005)</b>	EM	*1/*1, *1/*3-*5	16	10.83	5.75	2.38	1.12	111	90	2.9	0.8
	PM	*4/*4, *4/*5	4	45.9	6.63	4.65	0.83	17	3	7.4	0.8
<b>Somer (2000)</b>	EM	*1/*1	6	6.08	3.08	2.57	1.26	N/A	N/A	3.3	0.2
<b>Wang (2008)</b>	EM	*1/*2, *1/*10, *1/*41, *2/*5, *2/*10	13	6.60	3.37	1.31	0.49	175	59	3.6	1.0
	IM	*10/*10, *36/*41	6	11.9	3.65	1.77	0.56	95	44	4.8	0.5
<b>Werner U. (2003)</b>	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*4, *1-*2/*5, *1-*2/*41	12	5.42	2.62	1.06	0.44	266	248	4.4	1.5
<b>Werner U. (2006)</b>	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*4, *1-*2/*5, *1-*2/*41	12	6.46	6.66	1.20	0.78	284	216	4.4	2.1
	PM	*4/*4, *4/*5, *5/*5	3	22.5	4.66	2.22	0.49	46	10	6.8	0.8

<sup>11</sup> : Values calculated using Wan *et al.*'s formulas (Situation C1).

**Table 3. Extracted data inputted into meta-analyses and ANOVA models for (S)-metoprolol pharmacokinetics.**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Mean S-AUC/Dose (ng·ml/h·mg)	SD, S-AUC/Dose	Mean S-Cmax/Dose (ng·ml/mg)	SD, S-Cmax/Dose	Mean S-CI/F (L/h)	SD, S-CI/F	Mean S-t <sub>1/2</sub> (hours)	SD, S-t <sub>1/2</sub> (hours)
Hemeryck (2000)	EM	*1/*1, *1/*4-*5	8	2.79	2.37	0.76	0.57	N/A	N/A	2.8	1.5
Huang (1999)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*10	28	4.33	1.19	0.76	0.24	100	27	3.7	0.6
	IM	*10/*10	12	9.59	4.03	1.24	0.36	48	21	5.2	1.3
Parker (2011)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*4, *1-*2/*5, *1-*2/*10, *1-*2/*17	15	4.64	3.28	0.85	0.54	N/A	N/A	3.5	1.3
Seeringer <sup>12</sup> (2008)	UM	*1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35	12	1.90	0.99	0.47	0.24	380	N/A	N/A	N/A
	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41	13	3.66	1.58	0.81	0.40	131	N/A	N/A	N/A
	PM	*3-*6/*3-*6	4	18.0	3.00	1.53	0.14	11	N/A	N/A	N/A
Sharma (2005)	EM	*1/*1, *1/*3-*5	16	6.52	3.34	1.36	0.62	89	68	3.0	0.9
	PM	*4/*4, *4/*5	4	23.2	3.48	2.41	0.20	17	2.5	7.1	1.0
Sharma (2010)	EM	*1/*1, *1/*3-*5	10	4.04	1.36	1.04	0.35	112	44	3.4	0.8
	PM	*4/*4, *4/*5	6	14.6	3.82	1.76	0.48	29	10	6.6	0.7

<sup>12</sup> : Cohort from Kirchheiner *et al.* (2004)

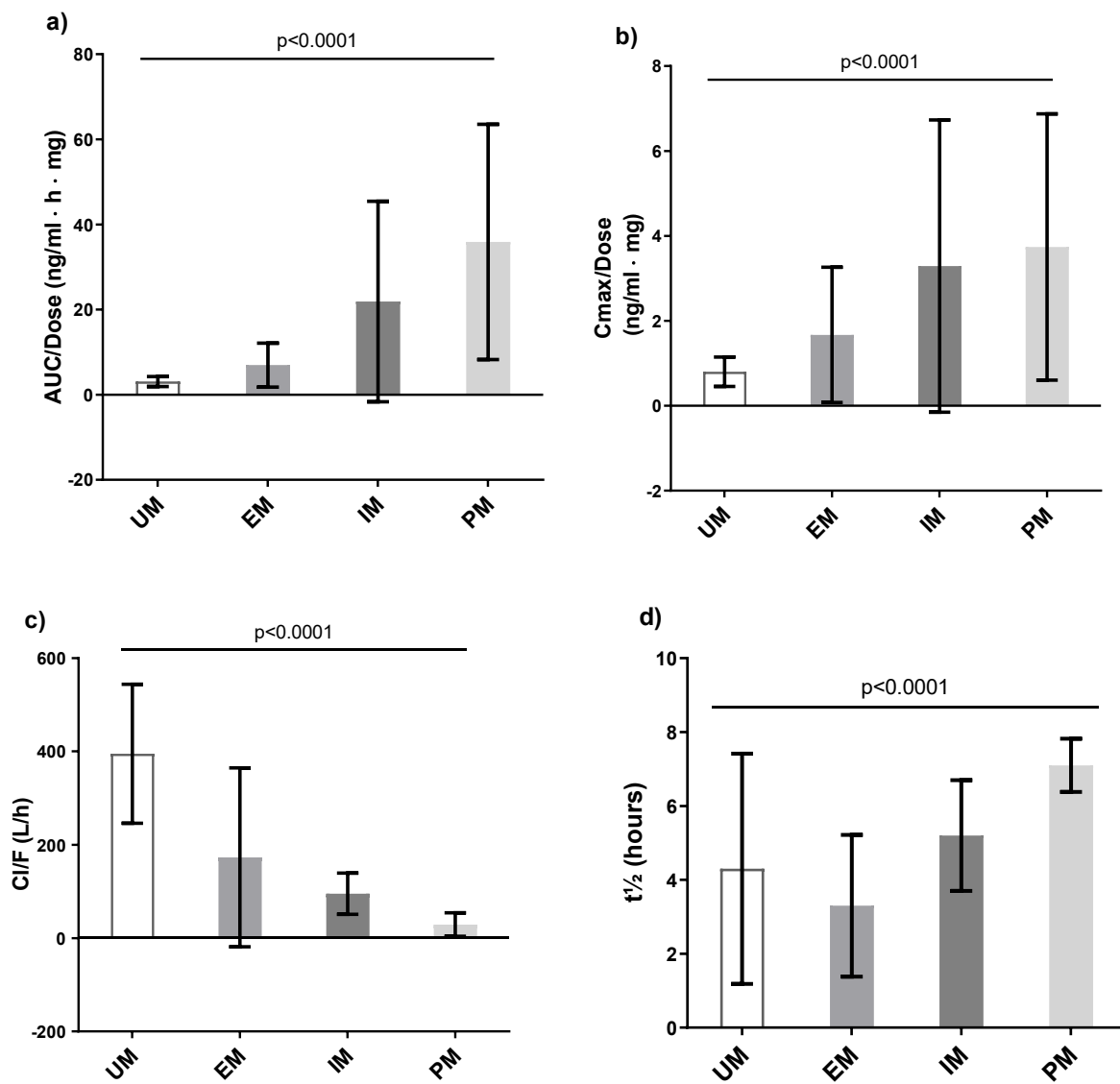
**Table 4. Extracted data inputted into meta-analyses and ANOVA models for (R)-metoprolol pharmacokinetics.**

First author (Year)	In-study phenotypes	Genotypes	n	Mean R-AUC/Dose (ng·ml/h·mg)	SD, R-AUC/Dose	Mean R-Cmax/Dose (ng·ml/mg)	SD, R-Cmax/Dose	Mean R-CI/F (L/h)	SD, R-CI/F	Mean R-t <sub>1/2</sub> (hours)	SD, R-t <sub>1/2</sub> (hours)
Hemeryck (2000)	EM	*1/*1, *1/*4-*5	8	1.69	1.55	0.52	0.49	N/A	N/A	2.4	1.1
Huang (1999)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*10	28	2.87	0.91	0.56	0.22	158	60	3.5	0.8
	IM	*10/*10	12	7.62	3.65	1.09	0.36	61	26	4.6	1.2
Parker (2011)	EM	*1-*2/*1-*2, *1-*2/*4, *1-*2/*5, *1-*2/*10, *1-*2/*17	15	3.54	2.65	0.70	0.53	N/A	N/A	3.4	1.2
Seeringer <sup>13</sup> (2008)	UM	*1-*2/*2x1, *1-*2/*2x2, *1-*2/*2x35, *9-*10/*2x1, *9-*10/*2x2, *9-*10/*2x35, *35/*2x1, *35/*2x2, *35/*2x35, *41/*2x1, *41/*2x2, *41/*2x35	12	1.27	0.72	0.32	0.14	547	N/A	N/A	N/A
	EM	Any combination of alleles *1, *2, *9, *10, *35, and *41	13	2.61	1.26	0.55	0.28	234	N/A	N/A	N/A
	PM	*3-*6/*3-*6	4	17.5	3.19	1.45	0.25	13	N/A	N/A	N/A
Sharma (2005)	EM	*1/*1, *1/*3-*5	16	4.36	2.46	1.02	0.54	147	124	2.7	1.0
	PM	*4/*4, *4/*5	4	22.7	3.48	2.25	0.40	18	3	8.0	1.1
Sharma (2010) <sup>14</sup>	EM	*1/*1, *1/*3-*5	10	3.64	1.74	0.83	0.35	138	75	3.2	0.9
	PM	*4/*4, *4/*5	6	16.3	3.82	1.71	0.43	25	8	7.4	0.4

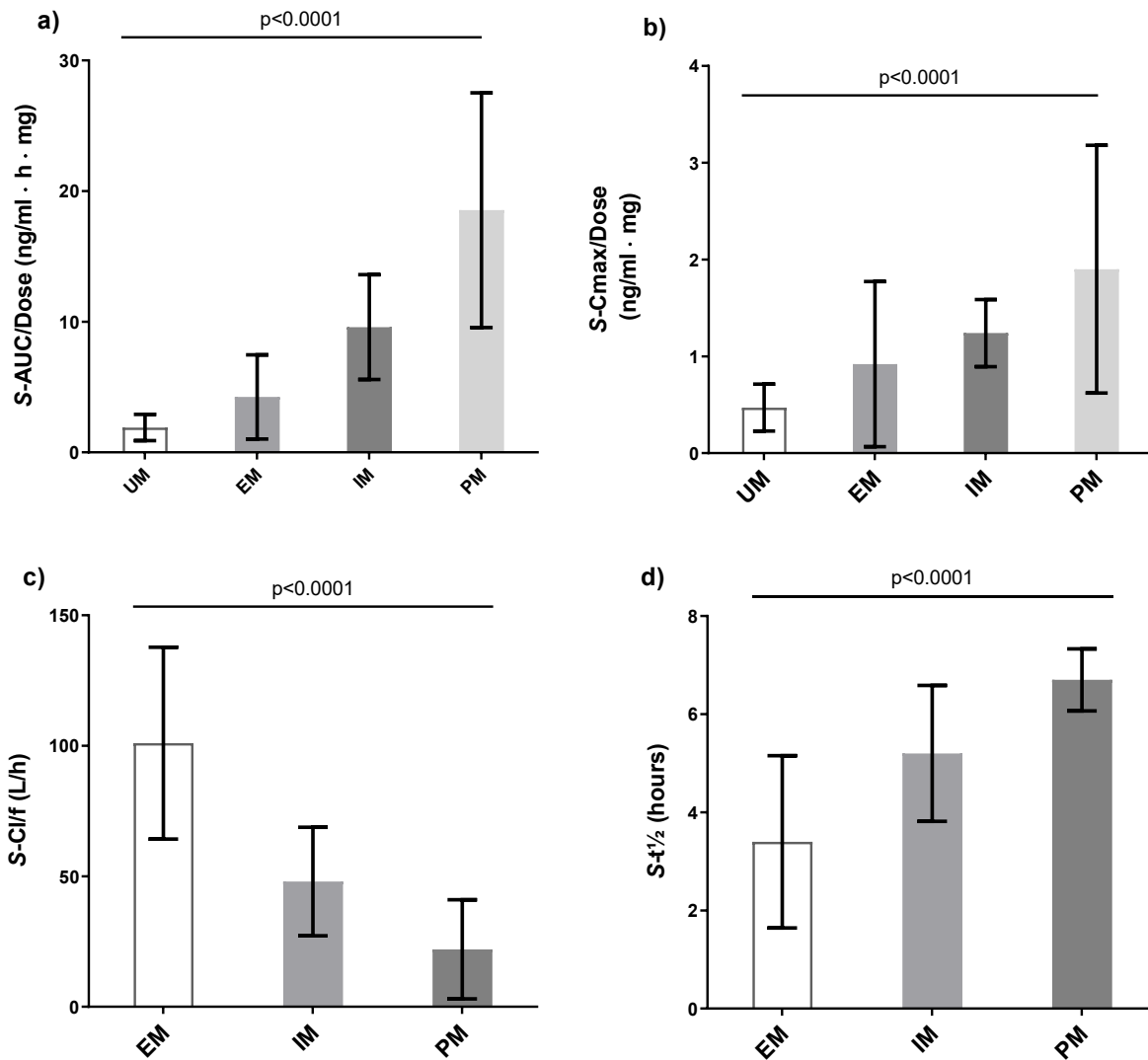
<sup>13</sup> : Cohort from Kirchheiner *et al.* (2004)

<sup>14</sup> : Cohort from Hamelin *et al.* (2000)

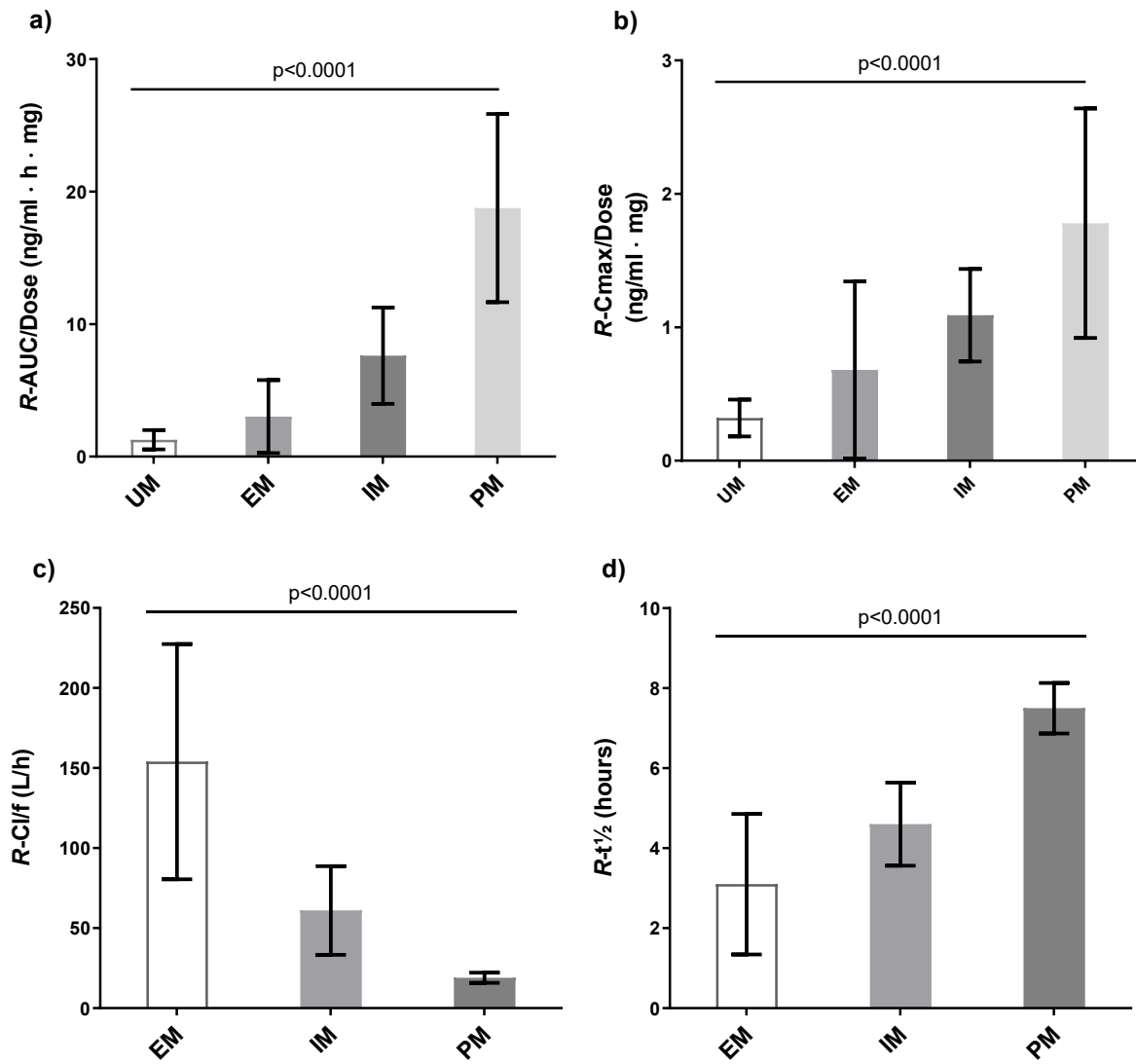




**Figure 1** Pharmacogenetic effect of CYP2D6 genotype-inferred phenotypes on racemic metoprolol mean PK parameter values, including a) dose-normalized AUC, b) dose-normalized  $C_{max}$ , c) Cl/F, and d)  $t_{1/2}$ . Error bars indicate standard deviations (SD). EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.



**Figure 2** Pharmacogenetic effect of CYP2D6 genotype-inferred phenotypes on (S)-metoprolol mean PK parameter values, including a) dose-normalized AUC, b) dose-normalized  $C_{max}$ , c) CI/F, and d)  $t_{1/2}$ . Error bars indicate standard deviations (SD). EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.



**Figure 3** Pharmacogenetic effect of CYP2D6 genotype-inferred phenotypes on (R)-metoprolol mean PK parameter values, including a) dose-normalized AUC, b) dose-normalized  $C_{max}$ , c) Cl/F, and d)  $t_{1/2}$ . Error bars indicate standard deviations (SD). EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.

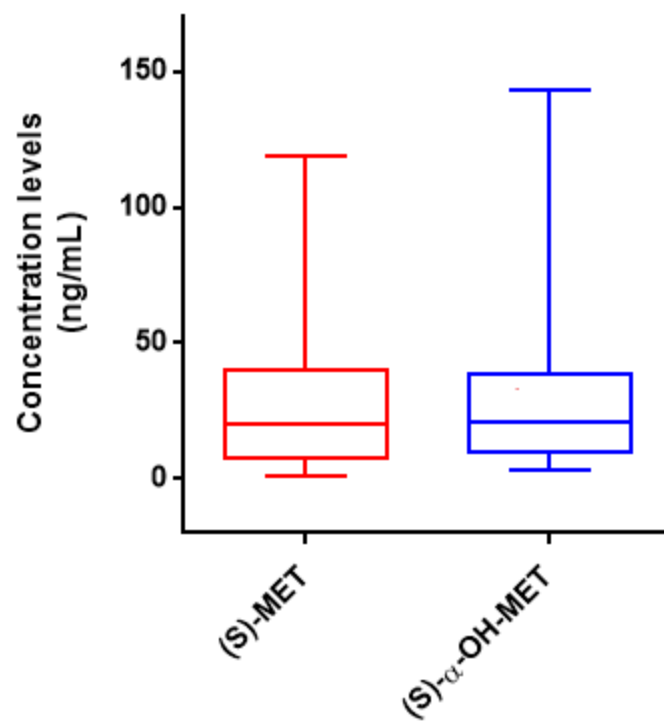
## Annexe 3 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 2

### Supplementary Material

Table S1. Summary of LC-MS/MS conditions.

HPLC conditions					
Stationary phase	Phenyl-hexyl (100mm x 3mm, 100Å, 2.6µm)				
Mobile phase A	Milli-Q water 5mM ammonium formate, 0.1% formic acid				
Mobile phase B	Methanol/Milli-Q water (96:4 v/v), 0.2% formic acid				
Elution gradient	0-8 min	52-65% B			
	8-10 min	65-98% B			
	10-12 min	98% B			
	12-15 min	98-52% B			
Flow rate	750 µL/min				
Column temperature	45°C				
Autosampler temperature	5°C				
Injection volume	5 µL				
Elution time	(S)-MET	8.24 min			
	(S)-MET-d7	8.13 min			
	(S)-α-OH-MET	4.13 min			
	(S)-α-OH-MET-d5	4.05 min			
Mass spectrometry (MS/MS) conditions					
Mass detector	4000 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer				
Ion source	Positive electrospray ionization source (ESI+)				
Scan type	Multiple reaction monitoring				
Gas temperature	625°C				
Nebulizer gas	50 psi				
Heater gas	60 psi				
Curtain gas	25 psi				
Capillary source voltage	5,500 V				
Dwell time	260 millisecc				
Analytes	Transitions ( <i>m/z</i> )	EP (V)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
(S)-metoprolol	415→268	10	80	27	7
(S)-metoprolol-d7	431→284				
(S)-α-OH-MET	422→275				
(S)-α-OH-MET-d5	436→289				

CE: Collision energy; CXP: Collision cell exit potential; DP : Declustering potential; EP: Entrance potential.



**Figure S1** Plasma concentrations of (S)-MET and (S)-α-OH-MET in patients' samples. The median, minimum, maximum, and 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles are represented.

## Annexe 4 – Documentation supplémentaire, Manuscrit n° 3

Table S1. Frequency of diplotypes observed.

Diotypes	All	Males	Females
*1/*2 (*36,*4N)	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*3 (*36,*4N)	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*4 (*36,*4N)	3 (0.30%)	3 (0.41%)	0 (0.00%)
*1/*1 DUP (*36,*4N)	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*4 DUP (*36,*4N)	3 (0.30%)	3 (0.41%)	0 (0.00%)
*1/*1 DUP	25 (2.50%)	15 (2.05%)	10 (3.72%)
*1/*10 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*17 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*2 DUP	19 (1.90%)	10 (1.37%)	9 (3.35%)
*1/*3 DUP	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*1/*4 DUP	11 (1.10%)	10 (1.37%)	1 (0.37%)
*1/*41 DUP	5 (0.50%)	4 (0.55%)	1 (0.37%)
*1/*9 DUP	4 (0.40%)	4 (0.55%)	0 (0.00%)
*1/*1	138 (13.81%)	106 (14.52%)	32 (11.90%)
*1/*10	8 (0.80%)	8 (1.10%)	0 (0.00%)
*1/*17	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*1/*2	181 (18.12%)	125 (17.12%)	56 (20.82%)
*1/*3	11 (1.10%)	8 (1.10%)	3 (1.12%)
*1/*4	119 (11.91%)	87 (11.92%)	32 (11.90%)
*1/*41	59 (5.91%)	47 (6.44%)	12 (4.46%)
*1/*5	21 (2.10%)	11 (1.51%)	10 (3.72%)
*1/*6	5 (0.50%)	2 (0.27%)	3 (1.12%)
*1/*69	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*1/*9	22 (2.20%)	14 (1.92%)	8 (2.97%)
*10/*2 DUP (*36,*4N)	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*10/*2 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*10/*2	8 (0.80%)	6 (0.82%)	2 (0.74%)

<b>Diotypes</b>	<b>All</b>	<b>Males</b>	<b>Females</b>
*10/*3	2 (0.20%)	1 (0.14%)	1 (0.37%)
*10/*4	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*10/*6	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*15/*41/*41 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*17/*2	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*2/*2 DUP	8 (0.80%)	5 (0.68%)	3 (1.12%)
*2/*4 DUP	7 (0.70%)	6 (0.82%)	1 (0.37%)
*2/*41 DUP	4 (0.40%)	1 (0.14%)	3 (1.12%)
*2/*9 DUP	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*2/*2	48 (4.80%)	36 (4.93%)	12 (4.46%)
*2/*2/*15	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*2/*29	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*2/*3	4 (0.40%)	1 (0.14%)	3 (1.12%)
*2/*4	71 (7.11%)	53 (7.26%)	18 (6.69%)
*2/*41	39 (3.90%)	25 (3.42%)	14 (5.20%)
*2/*5	16 (1.60%)	10 (1.37%)	6 (2.23%)
*2/*6	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*2/*9	9 (0.90%)	5 (0.68%)	4 (1.49%)
*29/*29	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*3/*4	5 (0.50%)	4 (0.55%)	1 (0.37%)
*3/*4/*21	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*3/*41	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*3/*5	2 (0.20%)	0 (0.00%)	2 (0.74%)
*3/*9	5 (0.50%)	4 (0.55%)	1 (0.37%)
*4/*41 DUP (*36,*4N)	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*4/*41 DUP	1 (0.10%)	0 (0.00%)	1 (0.37%)
*4/*7 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*4/*4	22 (2.20%)	16 (2.19%)	6 (2.23%)
*4/*41	28 (2.80%)	25 (3.42%)	3 (1.12%)
*4/*5	9 (0.90%)	8 (1.10%)	1 (0.37%)

<b>Diotypes</b>	<b>All</b>	<b>Males</b>	<b>Females</b>
*4/*6	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*4/*7	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*4/*9	11 (1.10%)	8 (1.10%)	3 (1.12%)
*41/*9 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*41/*41	12 (1.20%)	9 (1.23%)	3 (1.12%)
*41/*5	5 (0.50%)	4 (0.55%)	1 (0.37%)
*41/*6	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*41/*7	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*41/*9	5 (0.50%)	5 (0.68%)	0 (0.00%)
*5/*5	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*5/*9	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)
*6/*6	1 (0.10%)	0 (0.00%)	1 (0.37%)
*6/*9	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*9/*9 DUP	1 (0.10%)	1 (0.14%)	0 (0.00%)
*9/*9	2 (0.20%)	2 (0.27%)	0 (0.00%)

DUP denotes gene duplication  
(\*36,\*4N) denotes hybrid status.



**Table S2. Association between CYP2D6 genotype-inferred phenotype and mean resting heart rate.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5		Model 6		Model 7	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>CYP2D6 inferred phenotype</b>	0.029 (0.008)	0.0002	0.028 (0.008)	0.0003	0.028 (0.008)	0.0003	0.028 (0.008)	0.0003	0.028 (0.008)	0.0003	0.028 (0.008)	0.0003	0.0286 (0.0078)	0.00024
<b>Age</b>	-	-	-0.002 (0.001)	0.0009	-0.002 (0.001)	0.0008	-0.002 (0.001)	0.0064	-0.002 (0.001)	0.0052	-0.002 (0.001)	0.0063	-0.0017 (0.0006)	0.00625
<b>Female sex</b>	-	-	0.026 (0.012)	0.0270	0.026 (0.012)	0.0258	0.036 (0.012)	0.0037	0.035 (0.012)	0.0049	0.036 (0.012)	0.0042	0.0351 (0.0124)	0.00473
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	-0.0001 (0.0001)	0.6735	-0.0001 (0.0001)	0.4573	-0.0001 (0.0001)	0.4958	-0.0001 (0.0001)	0.5651	-0.0001 (0.0001)	0.57474
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	0.001 (0.0003)	0.0129	0.001 (0.0003)	0.0156	0.001 (0.0003)	0.0172	0.0008 (0.0003)	0.01682
<b>Atrial flutter or atrial fibrillation</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006 (0.011)	0.6044	0.009 (0.011)	0.4081	0.0098 (0.0115)	0.39594
<b>Heart rate-lowering drugs</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.018 (0.016)	0.2715	-0.0181 (0.0162)	0.26469
<b>CYP2D6 inhibitors</b>													0.0135 (0.0150)	0.37137

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight and history of atrial flutter or atrial fibrillation; Model 6: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight, history of atrial flutter or atrial fibrillation and heart rate-lowering drugs, Model 7: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight, history of atrial flutter or atrial fibrillation, heart rate-lowering drugs and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 4.094, Model 2: 4.247, Model 3: 4.251, Model 4: 4.168, Model 5: 4.171, Model 6: 4.169; Model 7: 4.133. SE: standard error.

**Table S3. Association between metoprolol concentrations and rs3892097.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>rs3892097</b>	0.458 (0.081)	2.1×10 <sup>-8</sup>	0.482 (0.080)	2.4×10 <sup>-9</sup>	0.567 (0.068)	1.7×10 <sup>-16</sup>	0.566 (0.067)	1.3×10 <sup>-16</sup>	0.5634 (0.0668)	1.1×10 <sup>-16</sup>
<b>Age</b>	-	-	0.018 (0.005)	0.0002	0.017 (0.004)	3.5×10 <sup>-5</sup>	0.014 (0.004)	0.0009	0.0138 (0.0041)	0.00088
<b>Female sex</b>	-	-	0.404 (0.095)	2.4×10 <sup>-5</sup>	0.394 (0.080)	1.1×10 <sup>-6</sup>	0.304 (0.084)	0.0003	0.2919 (0.0836)	0.00050
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	0.013 (0.001)	2.5×10 <sup>-75</sup>	0.013 (0.001)	1.3×10 <sup>-77</sup>	0.0128 (0.0006)	6.8×10 <sup>-79</sup>
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	-0.008 (0.002)	0.0008	-0.0075 (0.0022)	0.00082
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3996 (0.1016)	0.00009

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 3.841, Model 2: 2.533, Model 3: 1.519, Model 4: 2.369, Model 5: 2.339. SE: standard error.

**Table S4. Association between  $\alpha$ -OH-metoprolol concentrations and rs3892097.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>rs3892097</b>	-1.030 (0.067)	$1.6 \times 10^{-48}$	-1.017 (0.066)	$4.2 \times 10^{-48}$	-0.948 (0.057)	$1.7 \times 10^{-55}$	-0.948 (0.057)	$1.1 \times 10^{-55}$	-0.9447 (0.0588)	$1.4 \times 10^{-56}$
<b>Age</b>	-	-	0.015 (0.004)	0.0001	0.014 (0.003)	$2.7 \times 10^{-05}$	0.013 (0.003)	0.0003	0.0128 (0.0034)	0.00023
<b>Female sex</b>	-	-	0.203 (0.078)	0.0099	0.194 (0.067)	0.0040	0.146 (0.071)	0.0388	0.1600 (0.0699)	0.02235
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	0.010 (0.001)	$3.8 \times 10^{-69}$	0.010 (0.001)	$4.8 \times 10^{-70}$	0.0101 (0.0005)	$4.7 \times 10^{-71}$
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	-0.004 (0.002)	0.0337	-0.0041 (0.0019)	0.02785
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.4366 (0.0850)	$3.4 \times 10^{-07}$

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight and CYP2D6 inhibitors. Intercepts for Model 1: 3.710, Model 2: 2.630, Model 3: 1.834, Model 4: 2.285; Model 5: 2.318. SE: standard error.

**Table S5. Association between rs3892097 and metoprolol daily dosing.**

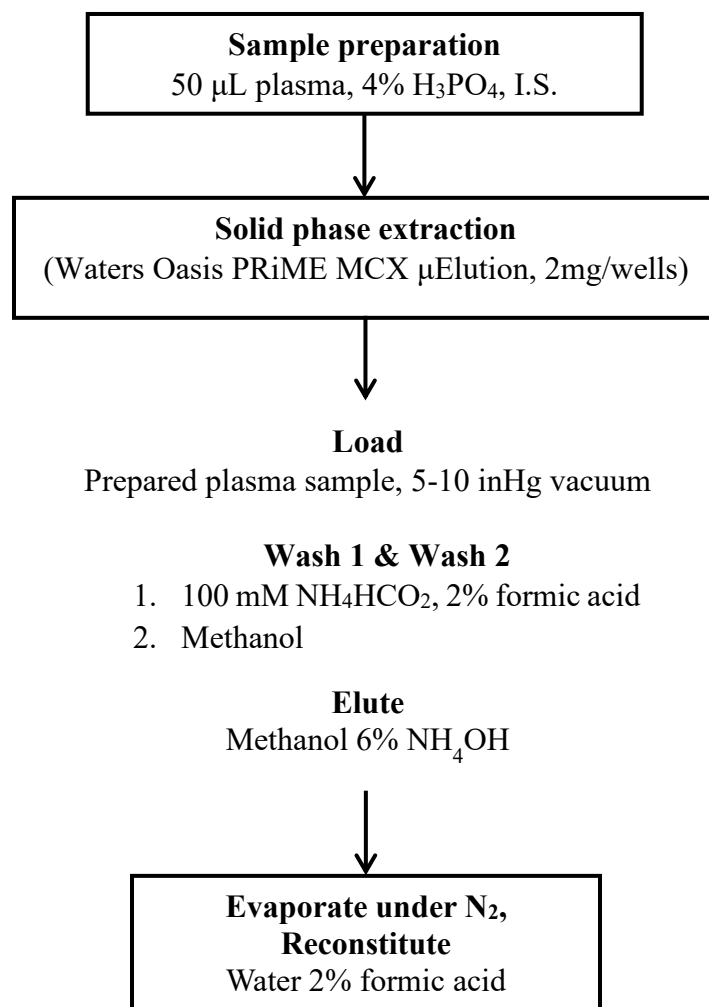
Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>rs3892097</b>	-0.100 (0.040)	0.0116	-0.099 (0.040)	0.0132	-0.097 (0.039)	0.0142	-0.0965 (0.0394)	0.01457
<b>Age</b>	-	-	0.001 (0.002)	0.5384	0.004 (0.002)	0.1118	0.0039 (0.0024)	0.11166
<b>Female sex</b>	-	-	0.026 (0.047)	0.5794	0.095 (0.049)	0.0541	0.0963 (0.0494)	0.05158
<b>Weight</b>	-	-	-	-	0.006 (0.001)	$8.3 \times 10^{-6}$	0.0059 (0.0013)	0.00001
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-0.0361 (0.0602)	0.54872

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex, and weight; Model 4: model adjusted for age, sex, and weight. Intercepts for Model 1: 4.261, Model 2: 4.155, Model 3: 3.479, Model 4: 3.482. SE: standard error.

**Table S6. Association between rs3892097 and mean resting heart rate.**

Effect	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4		Model 5		Model 6		Model 7	
	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value	Estimate (SE)	P-value
<b>rs3892097</b>	-0.035 (0.010)	0.0004	-0.035 (0.010)	0.0005	-0.034 (0.010)	0.0005	-0.034 (0.010)	0.0005	-0.034 (0.010)	0.0006	-0.035 (0.010)	0.0005	-0.0347 (0.0099)	0.00047
<b>Age</b>	-	-	-0.002 (0.001)	0.0006	-0.002 (0.001)	0.0005	-0.002 (0.001)	0.0042	-0.002 (0.001)	0.0034	-0.002 (0.001)	0.0040	-0.0018 (0.0006)	0.00400
<b>Female sex</b>	-	-	0.025 (0.012)	0.0308	0.026 (0.012)	0.0289	0.035 (0.012)	0.0045	0.034 (0.012)	0.0058	0.035 (0.012)	0.0051	0.0344 (0.0124)	0.00570
<b>Metoprolol dose</b>	-	-	-	-	-0.0001 (0.0001)	0.7758	-0.0001 (0.0001)	0.5499	-0.0001 (0.0001)	0.5930	-0.0001 (0.0001)	0.6681	3.87x10 <sup>-05</sup> (9.34x10 <sup>-05</sup> )	0.67885
<b>Weight</b>	-	-	-	-	-	-	0.001 (0.0003)	0.0152	0.001 (0.0003)	0.0183	0.001 (0.0003)	0.0201	0.0008 (0.0003)	0.01970
<b>Atrial flutter or atrial fibrillation</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006 (0.011)	0.5537	0.010 (0.011)	0.3738	0.0105 (0.0115)	0.36246
<b>Heart rate-lowering drugs</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.017 (0.016)	0.2846	-0.0176 (0.0163)	0.27795
<b>CYP2D6 inhibitors</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0130 (0.0151)	0.38665

Model 1: crude model; Model 2: model adjusted for age and sex; Model 3: model adjusted for age, sex and metoprolol dose; Model 4: model adjusted for age, sex, metoprolol dose and weight; Model 5: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight and history of atrial flutter or atrial fibrillation; Model 6: model adjusted for age, sex, metoprolol dose, weight, history of atrial flutter or atrial fibrillation and heart rate-lowering drugs; Intercepts for Model 1: 4.153, Model 2: 4.308, Model 3: 4.312, Model 4: 4.231, Model 5: 4.233, Model 6: 4.233; Model 7: 4.197. SE: standard error.



**Figure S1** Sample preparation method for metoprolol and  $\alpha$ -OH-metoprolol quantification in human plasma. I.S., internal standards.

## **Annexe 5 – Article supplémentaire**

Manuscrit n° 4 (publié dans *Pharmacogenomics*. 2020;21(4):235-45)

### **Opinion, Experience and Educational Preferences Concerning Pharmacogenomics: An Exploratory Study of Quebec Pharmacists**

**Short running title: Pharmacists' attitudes concerning pharmacogenomics**

Maxime Meloche<sup>1,2</sup>, Hyuk Jin Kwon<sup>1</sup>, Nathalie Letarte<sup>1,3</sup>, Jean-François Bussières<sup>1,4</sup>, Barbara Vadnais<sup>1,5</sup>, Thierry Hurlimann<sup>6</sup>, Annie Lavoie<sup>4</sup>, Marie-France Beauchesne<sup>1,7,8</sup>, & Simon de Denus<sup>1,2\*</sup>

Author affiliations:

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Montreal Heart Institute, Montreal, Canada

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>4</sup> Sainte-Justine University Hospital Center, Montreal, Canada

<sup>5</sup> Department of Pharmacy, Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada

<sup>6</sup> Faculty of Medicine, Depart of Social & Preventive Medicine, Bioethics Programs, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>7</sup> Sainte-Justine University Hospital Center, Montreal, Canada

<sup>8</sup> Research Center, Centre int egr e universitaire de santé et de services sociaux de l'Estrie-Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, Installations Hôtel-Dieu et Fleurimont, Sherbrooke, Canada

\*Author for correspondence: (please note only one author can be listed as corresponding author and should be indicated in the author list with an “\*”).

Simon de Denus, B.Pharm, MSc, PhD  
Montreal Heart Institute  
5000 Belanger Street  
Montreal, Quebec  
H1T 1C8  
Phone: (514) 376-3330 ext. 2881  
Fax : (514) 593-2575  
E-mail : [simon.dedenus@icm-mhi.org](mailto:simon.dedenus@icm-mhi.org)

Author Contributions:

MM wrote part of the study protocol, created the online survey, performed the statistical tests and the descriptive analyses, created the figures, and helped in the revision of the manuscript.

HJK has written parts of the manuscript, analyzed parts of the data, and helped in the creation of figures.

BV, TH, AL, NL, JFB, and MFB contributed to the development of the survey, the revision of the manuscript and its criticism.

SdeD developed the idea of the survey, contributed to the development of the survey, wrote part of the study protocol, supervised the work of MM and HJK, interpreted the data, and reviewed the manuscript.

Acknowledgements: None

Financial disclosure: This study was supported by Genome Quebec.

Maxime Meloche has received studentships from the Université de Montréal Faculty of Pharmacy and Faculty of Higher Education and Post-doctoral Studies.

Simon de Denus was supported through grants from Pfizer, AstraZeneca, Roche Molecular Science, DalCor and Novartis. Simon de Denus holds the Université de Montréal Beaulieu-Saucier Chair in Pharmacogenomics.

Information pertaining to writing assistance: None

Ethical disclosure: The authors state that the protocol was approved by the Montreal Heart Institute Scientific and Ethics Committee. The study was entirely voluntary and anonymous, with minimal risk for participants.

Data sharing statement: N/A

Word count: 3174

Figure number: 4

Table number: 1

# Opinion, Clinical Experience and Educational Needs of Pharmacists in Pharmacogenomics.

## Abstract

**Aim:** To evaluate the current opinion, experience, and educational needs of pharmacists in Quebec concerning pharmacogenomics. **Method:** A web-based survey containing 25 questions was sent to all Quebec pharmacists. **Results:** Most pharmacists were willing to advise patients (81%) and physicians (84%) on treatment choices based on pharmacogenomic test results after proper training. Only 31% had been previously exposed to pharmacogenomic test results, and 91% were favorable to pharmacogenomics training that would meet their preferences. Hospital pharmacists were more often exposed to pharmacogenomic tests ( $p < 0.0001$ ) and more frequently advised patients on treatment choices ( $p < 0.001$ ) than community pharmacists. **Conclusion:** Pharmacists remain enthusiastic towards pharmacogenomics, but its use in clinical practice stays limited. Educational initiatives are required to bridge a persistent knowledge gap.

## Keywords

Pharmacists; Clinical practice; Educational Needs; Opinion; Pharmacogenomic testing; Pharmacogenomics.



## **Introduction**

Pharmacogenomics (PGx) studies the relationship between genes and the different responses patients can have to the same medication (1). These differences include differences in the dosing requirements, the efficacy and the tolerability of drugs. The inter-individual variability in response to a medication can be influenced by genetic polymorphisms affecting drug metabolizing enzymes, transporters and targets (2). PGx is quickly emerging as a field that can guide personalized drug treatment choices according to a patient's genetic information (3, 4). The increasing number of guidelines provided by the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) and other groups, as well as the enthusiasm from patients and healthcare professionals are key factors in the implementation of PGx into clinical practice (5-8). To apply these PGx guidelines in practice, it is essential to understand the impact of genetic variations on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a drug. Thus, the expertise of pharmacists in pharmacology and pharmacotherapy may allow them to play a crucial role and have a fundamental responsibility in ensuring optimal use of PGx (9).

In previous work, we conducted a web-based survey to describe the opinions and expectations of pharmacists towards PGx in Quebec, Canada, and their willingness to integrate this knowledge in their clinical practice (10). Since our previous study, the field of PGx has greatly expanded. In addition, the importance of pharmacists playing a role in PGx implementation has been increasingly emphasized, justifying the need to reassess their perception towards this field, as well as to identify their needs to better integrate it (9, 11). We developed a new survey that included elements of our first survey and incorporated questions related to pharmacists' experience in PGx. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the opinion, experience, and educational preferences of pharmacists concerning PGx.

## Methods

### Study design and participants

This cross-sectional study consisted of completing a web-based survey using the online website SurveyMonkey. All pharmacists in the province of Quebec, Canada, including both community and hospital pharmacists, were invited to participate in this survey. The invitations were sent through the newsletter of the *Ordre des Pharmaciens du Québec* (Quebec's college of pharmacists) which is distributed to all Quebec pharmacists. Invitations through e-mails were also sent to pharmacists who are associated clinicians (preceptors on clinical rotations) of the Faculty of pharmacy of Université de Montréal. Finally, an invitation was sent through a closed Facebook group of Quebec pharmacists. Each invitation included the link to our survey. A reminder was also sent after each invitation. Responders completed the survey between January and June 2018.

### Survey questionnaire

The survey questionnaire was only available in French. An English version can be found in the Supplementary Material. A brief introduction preceding the questions explained to the participants the objectives of the survey. They were informed that their answers were strictly confidential and that they could skip a question if they did not feel comfortable responding. The terms *pharmacogenomics* and *pharmacogenomic test* were also defined (12).

The survey included 25 questions. Some of the questions were follow-up questions that were presented only to participants that had answered a specific answer to one of the main questions. The first 4 questions were related to the demographics and characteristics of the study population. Questions 5 to 9 were related to the opinion of pharmacists on pharmacogenomic testing. Questions 10 to 18 were related to the experience of pharmacists with PGx in their clinical practice. Questions 19 to 25 were concerning the previous training pharmacists had in PGx as well as their preferred educational opportunities. These questions were based on previous surveys by our group and others (10, 13-15).

## **Statistical analyses**

The survey responses were automatically collected and entered in a tabular form by SurveyMonkey. Categorical variables are presented as frequencies (%). As appropriate, a chi-squared test was used for pairwise comparisons between hospital-based and community-based pharmacists. In certain cases, we combined answers to questions with multiple choices to create dichotomic variables. For example, participants who responded either “Not hopeful” and “Slightly hopeful” were grouped together. Those not having a precise opinion on specific questions and who answered “I don’t want to answer” or “I don’t know” were excluded from our analyses. Data were analyzed using SPSS 25 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25; Armonk, NY, USA). *P*-values <0.05 were considered statistically significant. Graphic representations of the results were made using PRISM 6.01 (GraphPad Software, CA, USA).

## **Ethics**

The study protocol was approved by the Montreal Heart Institute Scientific and Ethics Committee. The questionnaire’s responses were entirely voluntary and anonymous, with minimal risk for participants.

## **Results**

Out of the 9465 practising pharmacists in Quebec, 200 accessed the survey. The completion rate was 91%. The characteristics of the study population are presented in Table 1. The completion rate for the main questions varied from 96 % to 99.5%. One of the respondents did not answer to most of the questions, including those regarding demographics, and was not included in most of the following questions. Of the remaining 199 participants, 67.8% were female, with the most common age groups being 31-40 years old (41.4%), 41-50 years old (25.3%), and the 20-30 years old (18.2%). Respondents to the survey questionnaire were mainly practicing in a community pharmacy (47.7%) or in a hospital setting (46.2%). A master’s degree was the highest obtained diploma for 42.6% of the participants, followed by a bachelor’s degree for 37.6%, and a Pharm.D. degree for 12.7% of them, respectively. Younger pharmacists reported more often to hold a Pharm.D. rather than a B.Pharm. degree ( $p < 0.0001$ ). This reflects that the two universities offering a pharmacy program in Quebec, Université de Montréal and Université Laval, implemented their Entry-to-Practice Pharm.D. program in 2007 and 2011. Moreover, community-based pharmacists

mostly had a B.Pharm. or a Pharm.D. degree, whereas hospital pharmacists additionally had a postgraduate master's degree ( $p < 0.0001$ ), a reflection of the fact that a master's degree is generally required to practice in Quebec hospitals.

### **Opinion of pharmacists on PGx**

Participants were asked a series of questions about their opinion on PGx in their clinical practice (Figure 1). Over 82% of pharmacists indicated they would feel comfortable recommending to their patients to undergo a PGx test to examine their genes if this test could identify an effective drug. Likewise, a majority of pharmacists (81%) indicated they would accept to receive the results of a patient's PGx tests, interpret them and advise their patients on the choice of therapy, yet only after having received proper training. A large fraction of them (84%) were also confident to advise a physician on the choice of therapy according to PGx test results, but not without future PGx training. In both cases, 14% of pharmacists currently felt comfortable to receive PGx test results and advise a patient or a physician right away and without further training.

In general, pharmacists were optimistic that PGx could determine either which drug or dosing could be more efficacious for a given patient (Figure 2). All pharmacists felt at least a little hopeful about such a possibility, which included a total of 75% who felt very hopeful. Nonetheless, they issued concerns about the confidentiality of PGx results. As such, more than half (52%) of the pharmacists were strongly worried about health insurance companies accessing information about genetic predispositions of a patient.

### **Experience of pharmacists in PGx**

The pharmacist's experience in PGx in their clinical practice was also evaluated (Figure 3). Despite their positive attitude towards PGx, most pharmacists only had limited experience in PGx. Only 20% of pharmacists had previously been asked questions on PGx by a patient. Of those, 89% reported being asked such questions only a few times per year. Moreover, 31% of pharmacists had been exposed to PGx test results in their practice. When exposed, 55% of pharmacists answered that the test results were accessed through the patient's medical files. Like the low percentage of pharmacists asked about PGx, only 17% of them discussed about PGx test results with a patient, and mainly did so only a few times per year (73%). Less than one out of five

pharmacists (19%) had recommended a PGx test to a patient, which also occurred mostly at frequency of a few times per year (76%).

Participants were also asked about their use of PGx-related references. Out of the choices available in our survey, pharmacists most often accessed the Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB<sup>®</sup>) (9.0%), the Génome Québec website (8.5%), the Health Canada website (8.0%) and the CPIC website (8.0%). Two thirds (66%) of pharmacists had not used any of the resources enumerated or other.

### **Educational preferences**

A series of questions assessed pharmacists' previous education on PGx and their preferred learning method. Only 26% of pharmacists had received prior training in the field of PGx in the last 5 years. However, 91% expressed interest in participating in a future PGx training program. The most popular learning method was by e-learning through interactive video sessions (69%), followed by e-learning through lectures (45%), intensive training with professors (38%), and training spread over several weeks (11%) (Figure 4). As for the expectations of duration of the learning sessions, 59% would like PGx training to last between 1 and 3 hours, whereas 30% would prefer 7 to 8 hours of training. Only 3% felt the need to have a training session of 14 to 15 hours, and 8% wanted to receive training for less than hour. For 64% of respondents, the optimal timing for these learning sessions was on weekdays, during the evening. Out of the possible topics of training, comprehensive interpretations of PGx tests, information on PGx tests currently available, as well as the current, common and future applications of PGx testing were the three most popular.

### **Differences between community and hospital pharmacists**

When comparing the opinion and experience between community and hospital pharmacists, several differences were noted. Pharmacists working in a hospital environment were significantly more prone to accept and receive a PGx test, interpret it and advise a patient ( $p < 0.001$ ) and a physician ( $p = 0.002$ ) after proper training. In their clinical practice, pharmacists working in a hospital were also more likely to be exposed to PGx test results as opposed to those working in community pharmacies ( $p < 0.0001$ ). Hospital pharmacists suggested PGx tests to patients significantly more often compared to community-based pharmacists ( $p = 0.021$ ) and were also able

to access PGx test results more frequently through medical files ( $p=0.0002$ ). Hospital pharmacists were more inclined to participate in PGx training as well ( $p=0.028$ ).

## **Discussion**

This survey investigated the opinion, experience and educational preferences of pharmacists in Quebec regarding PGx. This study builds on previous ones regarding the opinion of healthcare professionals on the field of PGx. Our study has three major findings. First, the results of our survey support that pharmacists remain optimistic towards PGx and would be willing to integrate PGx in their clinical practice after receiving proper training. Second, Quebec pharmacists are highly interested in having educational opportunities on PGx and would prefer self-education through e-learning interactive videos, as opposed to other pedagogical means. Finally, pharmacists from both hospital and community settings are interested in expanding their scope of practice in PGx, but hospital pharmacists appear to be already more experienced with PGx and therefore seem much more readily prepared to integrate PGx within their work environment. Issues concerning proper education and training will need to be addressed before an optimal implementation of PGx into clinical practice can be foreseen.

When we compared these results to those of our previous study, the willingness of Quebec pharmacists to interpret and advise a patient after receiving a patient's PGx test results after proper training was similar (86% in 2011 and 81% in 2018). Within the two studies, pharmacists were strongly hopeful that PGx would allow to identification of a drug and a recommend dose that would lead to increased efficacy for a specific patient (83% in 2011 and 75% in 2018) (10). These comparisons show that throughout the years, pharmacists have stayed optimistic about PGx and its clinical applications. Other studies show a somewhat widespread enthusiasm among pharmacists, other healthcare professionals and patients towards PGx (5, 7, 12, 16-18). A study by Bank et al. of 667 Dutch pharmacists indicates that 84.9% of pharmacists were strongly hopeful PGx could detect a drug and a dose that would be more efficacious for their patient (5). Tuteja et al. reported that 87% of 580 community pharmacists in the USA agreed that PGx testing will help to optimize drug dosing, while 57% agreed that counseling patients regarding PGx should be part of a pharmacist's role (17). This consistent interest indicates that PGx remains undoubtedly a field that pharmacists and other healthcare providers would welcome, if it improves patient care.

Even though Quebec pharmacists are favorable to implement PGx in their clinical practice, a very small portion of pharmacists currently feel comfortable to advise a patient after interpreting their PGx test results without further training (8% in 2013 versus 14% in 2018) (10). Results from Tuteja et al. also indicate that less than 20% of pharmacists felt competent to discuss PGx information with other healthcare providers (17). This is a much lower proportion than Bank et al. reported, with 48.4% of the pharmacists surveyed who felt comfortable recommending a PGx test to predict drug efficacy, and 27.0% who also felt qualified to receive and interpret PGx test results to advise a patient (5). The reasons for this discrepancy are uncertain, but could reflect the longstanding work by the Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) created by the Royal Dutch Pharmacists Association (19). Other studies confirm that pharmacists (20-23) and other healthcare professionals have limited confidence to interpret PGx test results and advise their patients (7, 16, 18, 24, 25). Thus, although PGx is a field allowing patients to benefit from personalized medicine, an important knowledge gap remains among healthcare providers. To palliate to this need, further training in PGx through continuing education opportunities would be of considerable benefit.

Indeed, in our study, 91% would like to participate in PGx training. This is consistent with the study by Bank et al. where 88.8% of pharmacists in the Netherlands would like to receive additional training (5). Data from the United States, more precisely in North Carolina, indicate that 90.5% of pharmacists were interested in learning more about PGx testing (23). The slow implementation of this field into clinical practice could partially be explained by the lack of proper training, resulting in less confidence in managing the various aspects related to PGx testing. As the recommendations from advising bodies, such as CPIC, are becoming more widely available, healthcare providers might already be more aware of PGx information than they were at the time when these studies had been conducted. Initiatives focused on pharmacists and pharmacy students are increasing, which allow to inform on the improved availability to more common PGx tests. These initiatives range from PGx certificates and continuing education programs for currently practicing pharmacists, to teaching PGx in pharmacy schools and accrediting post-graduate residency programs in PGx (26, 27). Certificate programs are being brought forward as another way for pharmacists willing to implement PGx (28, 29). The online Pharmacogenomics Certificate launched by the American Society of Health-System Pharmacists (ASHP) also addresses the need to educate pharmacists on how to integrate PGx in clinical practice (30). In our study, pharmacists

identified e-learning interactive video sessions for around 1 to 3 hours to be the optimal training preference. Given the complexity of PGx, as well as the knowledge and competence that need to be integrated to apply it in clinical practice, it seems uncertain whether such condensed training would be enough to allow for adequate training. In comparison, the length of the course offered by the ASHP is 18.25 hours. In a short time frame, it would also likely not be possible to have an in-depth training regarding all potential ethical and legal considerations for the patients undergoing PGx testing. Consequently, clinical competencies regarding PGx might not meet professional standards previously stated by the American Association of Colleges of Pharmacy (31), and are also unlikely to meet those issued by the National Human Genome Research Institute's Genetics and Genomics Competency Center (32). For example, incidental findings or genetic results identifying a marked predisposition to specific diseases may require more extensive discussion with patients. In such cases, it will thus be critical that pharmacists can collaborate with genetic counselors so that patients can receive and benefit from appropriate genetic counseling and education. Such collaborative efforts have been brought forward in recent years (33). Currently, many educational opportunities offer training that is more extensive than what is anticipated by pharmacists in our study, such as training integrating institution-specific resources, or education with clinical decision support (34). Thus, current educational offers in PGx and expectations of pharmacists appear to be unaligned. Further investigation on how to manage this expectation gap for practicing pharmacists is required. This also supports the need to educate pharmacy students during their studies, and various ways of integrating PGx into PharmD curricula have been documented (35, 36).

Compared to our previous study, the current survey added questions related to the experience of pharmacists with PGx. Very few pharmacists were exposed to PGx test results in their practice (31%) and only 19% had suggested a PGx test to a patient at least once in their practice. The study by Bank et al. shows that only 14.7% of pharmacists had recommended a PGx test in the previous 6 months (5). During an equal timeframe, Amara et al. reported that 29.4% of physicians had ordered or recommended a PGx test (24). Thus, the clinical experience of pharmacists and physicians in PGx remains limited. Our results indicate that hospital pharmacists were significantly more experienced with PGx. In fact, pharmacists working in a hospital environment were more disposed to interpret PGx test results and advise a patient or a physician. This could reflect that some clinical areas have already included PGx testing as part of standard



practice are primarily found in hospital settings, such as oncology and HIV treatment (37, 38). Thus, pharmacists that are part of these healthcare teams are more comfortable using and discussing such PGx tests (39, 40).

Thus, there is a significant gap between the enthusiasm of healthcare professionals and patients towards PGx and the current implementation of this field in clinical practice. The reasons for this is uncertain. Yet, the fact that PGx uptake appears higher with hospital pharmacists, possibly as a result of its implementation in fields where their use is supported by evidence from randomized control trials and have been incorporated in clinical guidelines, hints towards the fact that uptake is likely to remain limited until the clinical utility of such an approach is confirmed through prospective trials (38, 41). This hypothesis requires confirmation, but would be consistent with a survey of physicians, in which adoption and use was much higher in oncologists than cardiologists, a field in which clinical utility of PGx is supported by significantly less data (18).

Our study contains some limitations. The low number of responses (slightly more than 2% of Quebec pharmacists) may not be representative of the opinions, attitudes and experiences of all Quebec pharmacists. However, the percentage of respondents compared to other surveys made for pharmacists is similar, including our previous study (5, 10, 17, 23). Also, there is a risk of bias with this type of survey, as participants with few to no experience in PGx may tend to answer less. Nonetheless, given the overall level of comfort in PGx being low in the submitted responses, our study illustrates well the need for further education. Finally, since our study was conducted on Quebec pharmacists only, their perceptions and expectations on clinical PGx might not be generalizable to other regions.

## **Conclusion**

Over the last decade, pharmacists have remained favorable to incorporate PGx in their clinical practice and hopeful about its usefulness in optimizing patient care. Yet their current level of comfort of using this new discipline in patient care appears to stay limited. Although educational initiatives are increasing, the proportion of pharmacists that require PGx training remains significant. Identifying their educational preferences may help in the development of educational programs to help pharmacist integrate PGx in their clinical practice.

## **Summary Points**

### **Background**

- Pharmacogenomics is a quickly developing field that will benefit patients through personalized medicine, and the expertise of pharmacists can allow them to play an important part in the implementation of this field in clinical practice.
- The objectives of this study were to evaluate the opinion, experience, and educational preferences of pharmacists concerning pharmacogenomics.

### **Methods**

- A web-based survey with 25 questions was conducted on pharmacists in Quebec, Canada.

### **Results**

- A total of 200 pharmacists responded to the survey.
- Pharmacists are in favor of implementing pharmacogenomics in their clinical practice.
- 82% of pharmacists felt comfortable to recommend their patients to undergo a PGx test if this test could identify an effective drug.
- 81% of pharmacists would interpret pharmacogenomic test results and advise their patients on the choice of therapy after proper training.
- 84% of pharmacists would interpret pharmacogenomic test results and advise a physician on the choice of therapy after proper training.
- Hospital pharmacists were a lot more favorable about implementing pharmacogenomics in their clinical practice than community pharmacists.
- Pharmacists generally lack experience in their clinical practice
- Only 20% of pharmacists had been asked a question on pharmacogenomics.
- 69% of pharmacists had never been exposed to pharmacogenomic test results.
- Hospital pharmacists were more experienced in pharmacogenomic testing than community pharmacists and were therefore more comfortable when exposed to this topic.
- Pharmacists would like more training on pharmacogenomics.
- E-learning interactive video sessions over 1 to 3 hours on weekday evenings seemed like the optimal training method for our participants.

## **Conclusion**

- As the field of pharmacogenomics develops, pharmacists remain optimistic on the prospects of integrating pharmacogenomics into their practice, but a lack of training persists.
- For pharmacists to fully interpret this discipline, personalized training initiatives are required.

## References

1. Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinical genetics*. 1999;56(4):247-58.
2. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2:9-39.
3. Kim K, Magness JW, Nelson R, Baron V, Brixner DI. Clinical Utility of Pharmacogenetic Testing and a Clinical Decision Support Tool to Enhance the Identification of Drug Therapy Problems Through Medication Therapy Management in Polypharmacy Patients. *Journal of managed care & specialty pharmacy*. 2018;24(12):1250-9.
4. McCarthy JJ, McLeod HL, Ginsburg GS. Genomic medicine: a decade of successes, challenges, and opportunities. *Science translational medicine*. 2013;5(189):189sr4.
5. Bank PC, Swen JJ, Guchelaar HJ. A nationwide survey of pharmacists' perception of pharmacogenetics in the context of a clinical decision support system containing pharmacogenetics dosing recommendations. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):215-25.
6. Gibson ML, Hohmeier KC, Smith CT. Pharmacogenomics testing in a community pharmacy: patient perceptions and willingness-to-pay. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):227-33.
7. Owusu Obeng A, Fei K, Levy KD, Elsey AR, Pollin TI, Ramirez AH, et al. Physician-Reported Benefits and Barriers to Clinical Implementation of Genomic Medicine: A Multi-Site IGNITE-Network Survey. *Journal of personalized medicine*. 2018;8(3).
8. Consortium. CPI. CPIC Guidelines [Available from: <https://cpicpgx.org/guidelines/>].
9. ASHP statement on the pharmacist's role in clinical pharmacogenomics. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2015;72(7):579-81.
10. de Denus S, Letarte N, Hurlimann T, Lambert JP, Lavoie A, Robb L, et al. An evaluation of pharmacists' expectations towards pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2013;14(2):165-75.
11. Cohn I, Cohn RD, Ito S. Professional opportunity for pharmacists to integrate pharmacogenomics in medication therapy. *Can Pharm J (Ott)*. 2018;151(3):167-9.
12. Fargher EA, Eddy C, Newman W, Qasim F, Tricker K, Elliott RA, et al. Patients' and healthcare professionals' views on pharmacogenetic testing and its future delivery in the NHS. *Pharmacogenomics*. 2007;8(11):1511-9.
13. Finegold P, Mathieson K, Holmes L, Boon M, Cottle M, Donnai D, et al. Is the UK public ready for genetic medicine? *Personalized medicine*. 2008;5(1):65-76.
14. Lachance K, Korol S, O'Meara E, Ducharme A, Racine N, Liszkowski M, et al. Opinions, hopes and concerns regarding pharmacogenomics: a comparison of healthy individuals, heart failure patients and heart transplant recipients. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(1):13-9.
15. Rogausch A, Prause D, Schallenberg A, Brockmoller J, Himmel W. Patients' and physicians' perspectives on pharmacogenetic testing. *Pharmacogenomics*. 2006;7(1):49-59.
16. Dodson C. Knowledge and attitudes concerning pharmacogenomics among healthcare professionals. *Personalized medicine*. 2011;8(4):421-8.
17. Tuteja S, Haynes K, Zayac C, Sprague JE, Bernhardt B, Pyeritz R. Community pharmacists' attitudes towards clinical utility and ethical implications of pharmacogenetic testing. *Personalized medicine*. 2013;10(8):793-800.
18. Bonter K, Desjardins C, Currier N, Pun J, Ashbury FD. Personalised medicine in Canada: a survey of adoption and practice in oncology, cardiology and family medicine. *BMJ open*. 2011;1(1):e000110.

19. (KNMP) RDPA. Pharmacogenetics [Available from: <https://www.knmp.nl/patientenzorg/medicatiebewaking/farmacogenetica/pharmacogenetics-1/pharmacogenetics>.
20. McCullough KB, Formea CM, Berg KD, Burzynski JA, Cunningham JL, Ou NN, et al. Assessment of the pharmacogenomics educational needs of pharmacists. *Am J Pharm Educ*. 2011;75(3):51-.
21. Schwartz EJ, Issa AM. The role of hospital pharmacists in the adoption and use of pharmacogenomics and precision medicine. *Personalized medicine*. 2017;14(1):27-35.
22. Sansgiry SS, Kulkarni AS. The Human Genome Project: Assessing Confidence in Knowledge and Training Requirements for Community Pharmacists. *Am J Pharm Educ*. 2003;67(2):39.
23. Roederer MW, Van Riper M, Valgus J, Knafl G, McLeod H. Knowledge, attitudes and education of pharmacists regarding pharmacogenetic testing. *Personalized medicine*. 2012;9(1):19-27.
24. Amara N, Blouin-Bougie J, Bouthillier D, Simard J. On the readiness of physicians for pharmacogenomics testing: an empirical assessment. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(2):308-18.
25. Stanek EJ, Sanders CL, Taber KA, Khalid M, Patel A, Verbrugge RR, et al. Adoption of pharmacogenomic testing by US physicians: results of a nationwide survey. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;91(3):450-8.
26. Romagnoli KM, Boyce RD, Empey PE, Ning Y, Adams S, Hochheiser H. Design and evaluation of a pharmacogenomics information resource for pharmacists. *Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA*. 2017;24(4):822-31.
27. Haidar CE, Hoffman JM, Gammal RS, Relling MV, Crews KR. Development of a postgraduate year 2 pharmacy residency in clinical pharmacogenetics. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2017;74(6):409-15.
28. B Haga S, Moaddeb J. Proposal for a pharmacogenetics certificate program for pharmacists2016.
29. Kisor DF, Bright DR, Chen J, Smith TR. Academic and professional pharmacy education: a pharmacogenomics certificate training program. *Personalized medicine*. 2015;12(6):563-73.
30. American Society of Health-System Pharmacists. Pharmacogenomics Certificate 2019 [Available from: <http://elearning.ashp.org/products/6673/pharmacogenomics-certificate-program>.
31. Roederer MW, Kuo GM, Kisor DF, Frye RF, Hoffman JM, Jenkins J, et al. Pharmacogenomics competencies in pharmacy practice: A blueprint for change. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2017;57(1):120-5.
32. Calzone KA, Jerome-D'Emilia B, Jenkins J, Goldgar C, Rackover M, Jackson J, et al. Establishment of the genetic/genomic competency center for education. *Journal of nursing scholarship : an official publication of Sigma Theta Tau International Honor Society of Nursing*. 2011;43(4):351-8.
33. Mills R, Haga SB. Clinical delivery of pharmacogenetic testing services: a proposed partnership between genetic counselors and pharmacists. *Pharmacogenomics*. 2013;14(8):957-68.
34. Weitzel KW, Aquilante CL, Johnson S, Kisor DF, Empey PE. Educational strategies to enable expansion of pharmacogenomics-based care. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2016;73(23):1986-98.

35. Adams SM, Anderson KB, Coons JC, Smith RB, Meyer SM, Parker LS, et al. Advancing Pharmacogenomics Education in the Core PharmD Curriculum through Student Personal Genomic Testing. *Am J Pharm Educ.* 2016;80(1):3-.
36. Rao PS, Endicott R, Mullins R, Rao US. A 6-week laboratory research rotation in pharmacogenomics: a model for preparing pharmacy students to practice precision medicine. *The Pharmacogenomics Journal.* 2018;18(4):601-8.
37. Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S, Mates M, Freedman OC, Dent SF, et al. Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline. *Curr Oncol.* 2015;22(Suppl 1):S67-S81.
38. Günthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, Gallant JE, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA.* 2016;316(2):191-210.
39. Tseng A, Foisy M, Hughes CA, Kelly D, Chan S, Dayneka N, et al. Role of the Pharmacist in Caring for Patients with HIV/AIDS: Clinical Practice Guidelines. 2012. 2012;65(2).
40. Walko C, Kiel PJ, Kolesar J. Precision medicine in oncology: New practice models and roles for oncology pharmacists. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists.* 2016;73(23):1935-42.
41. Martin MA, Kroetz DL. Abacavir pharmacogenetics--from initial reports to standard of care. *Pharmacotherapy.* 2013;33(7):765-75.

## Figure legends

**Figure 1.** Attitudes of pharmacists towards the use of pharmacogenomic testing in clinical practice.

**Figure 2.** Hopes and worries of pharmacists towards pharmacogenomics and pharmacogenomic testing.

**Figure 3.** Experience of pharmacists related to pharmacogenomics in clinical practice.

**Figure 4.** Pharmacists' preferences for receiving pharmacogenomic training.

## Table legend

**Table 1.** Characteristics and demographics of pharmacists who completed the online questionnaire.

**Reference annotations:** authors should highlight 6–8 references that are of particular significance to the subject under discussion as “\* of interest” or “\*\* of considerable interest” and provide a brief (1–2 line) synopsis.

5) Bank\*\* Survey on 667 Dutch pharmacists to assess their knowledge, experience, attitudes towards pharmacogenomics and awareness of the Dutch Pharmacogenetics Working Group guidelines.

9) ASHP\* Position statement released by the American Society of Health-System Pharmacists supporting the importance of implementing pharmacogenomics and the key role of pharmacists.

10) de Denus\*\* Our previous survey on 284 pharmacists practicing in Quebec to assess their opinion, expectations, and concerns towards pharmacogenomics.

16) Dodson\* Review explaining the attitudes and knowledge of healthcare professionals concerning pharmacogenetic testing.

17) Tuteja\* Survey on 580 community pharmacists in the USA to explore their attitudes regarding pharmacogenomics.

34) Weitzel\* Review exploring educational standards, competencies, and resources for pharmacists to support the implementation of pharmacogenomics.

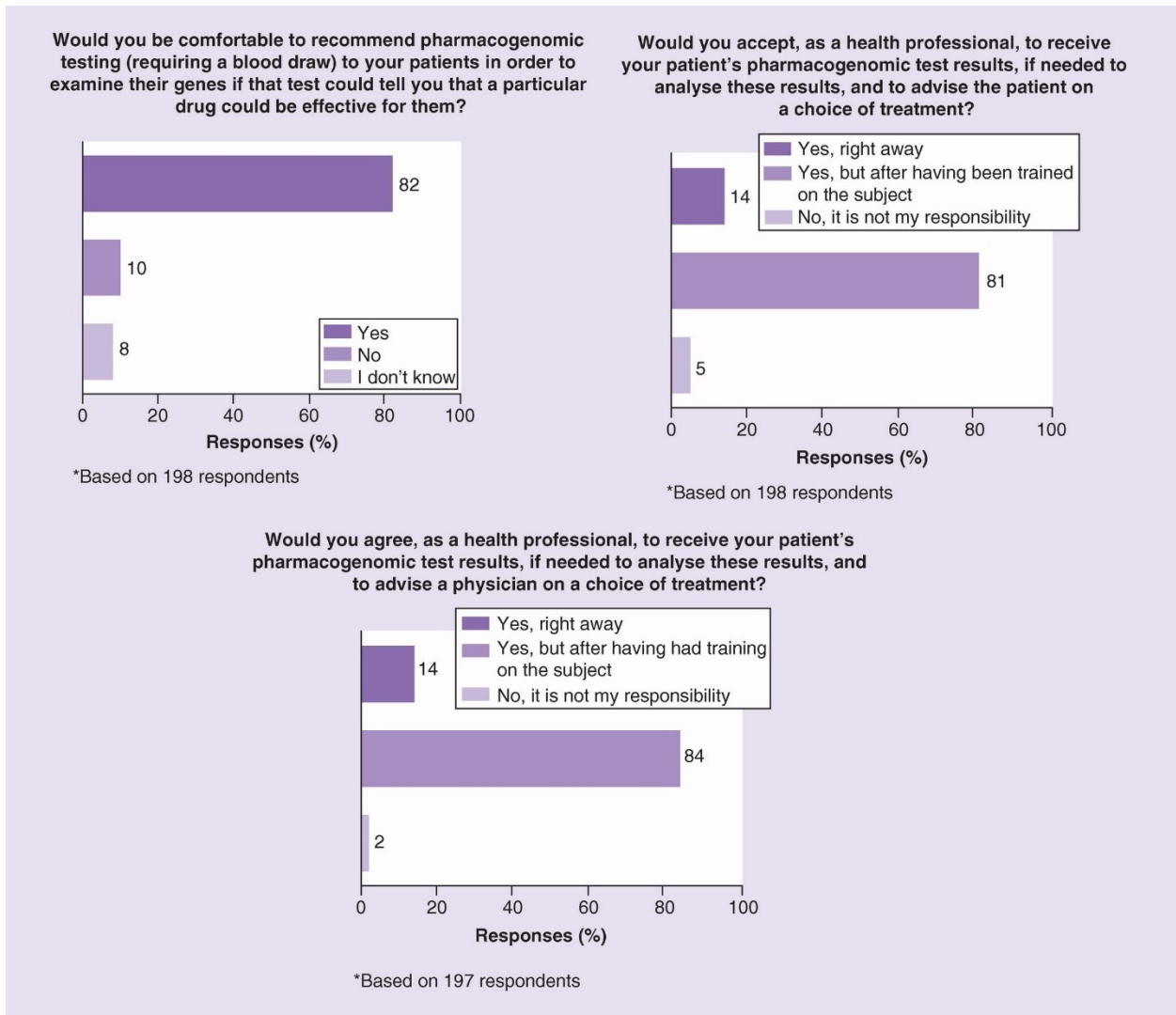
**Table 1. Characteristics and demographics of pharmacists who completed the online questionnaire.**

<b>Characteristics</b>	<b>Total pharmacists<sup>‡</sup></b>		
	<b>Total (n=199)</b>	<b>Hospital (n=92)</b>	<b>Community (n=95)</b>
<b>Gender, n (%)</b>			
Men	64 (32.2)	25 (27.2)	36 (37.9)
Women	135 (67.8)	67 (72.8)	59 (62.1)
<b>Age group, n (%)</b>	<b>Total (n=199)</b>	<b>Hospital (n=91)</b>	<b>Community (n=95)</b>
20-30	36 (18.2)	19 (20.9)	35 (36.8)
31-40	82 (41.4)	32 (35.2)	77 (81.1)
41-50	50 (25.3)	26 (28.6)	49 (52.1)
51-60	21 (10.6)	11 (12.1)	18 (18.9)
61-70	9 (4.5)	3 (3.3)	7 (7.4)
<b>Main practice environment, n (%)</b>	<b>Total (n=199)</b>		
Community pharmacy	95 (47.7)		
Hospital	92 (46.2)		
Pharmaceutical industry	2 (1.0)		
Academia	4 (2.0)		
Government	3 (1.5)		
Other	3 (1.5)		
<b>Highest diploma, n (%)</b>	<b>Total (n=199)</b>	<b>Hospital (n=90)</b>	<b>Community (n=95)</b>
Bachelor's degree (B.Pharm.) <sup>‡</sup>	74 (37.6)	7 (7.8)	64 (71.1)
Master's degree	84 (42.6)	72 (80.0)	7 (7.8)
Pharm.D.	25 (12.7)	6 (6.7)	18 (20.0)
Ph.D. / D.Phil.	10 (5.0)	2 (2.2)	2 (2.2)
Other	4 (2.0)	2 (2.2)	2 (2.2)

<sup>‡</sup>: Not all pharmacists answered every question from the survey.

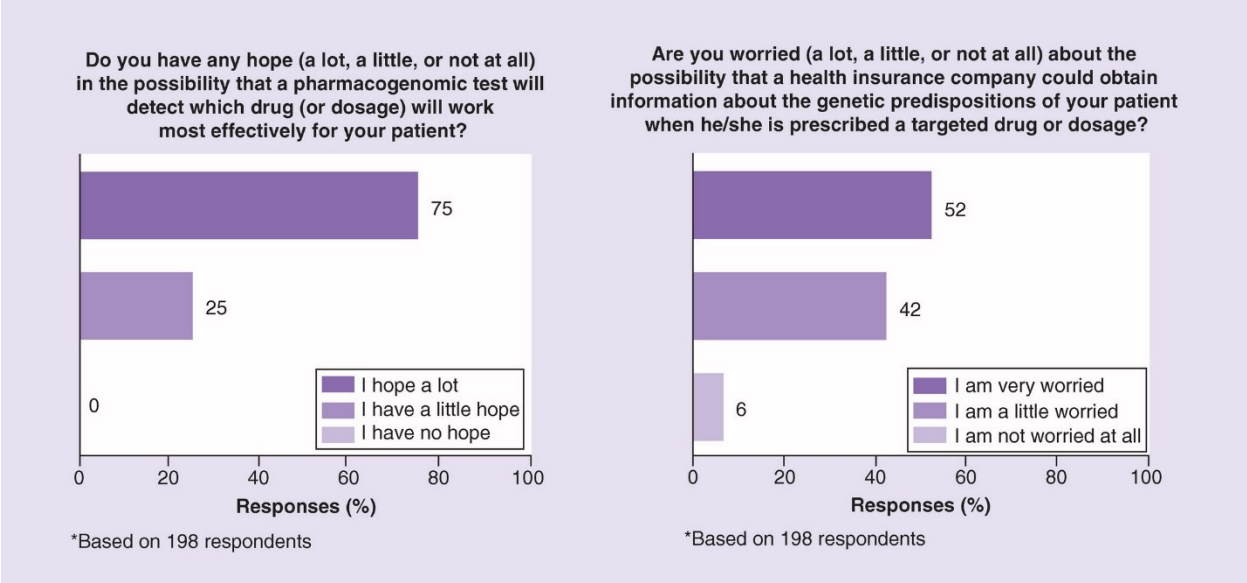
<sup>‡</sup>: In Québec, the B.Pharm degree was subsequently replaced by Pharm.D. and are equivalent.





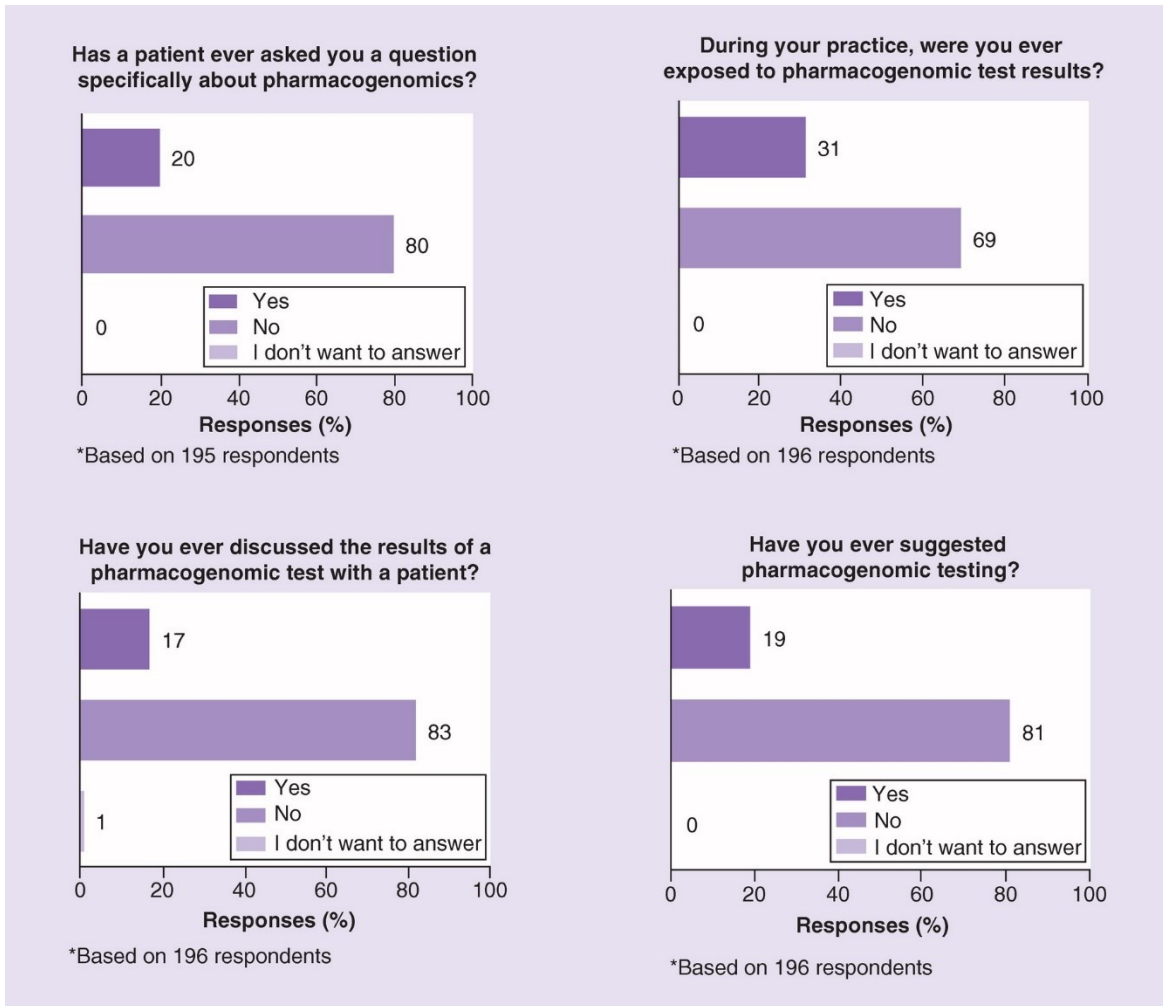
**Figure 1 Attitudes of pharmacists toward the use of pharmacogenomic testing in clinical practice.**

Republished with permission of Future Medicine LTD, from *Opinion, experience and educational preferences concerning pharmacogenomics: an exploratory study of Quebec pharmacists*. Meloche M. et al., Vol.21 No.4. 2020; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.



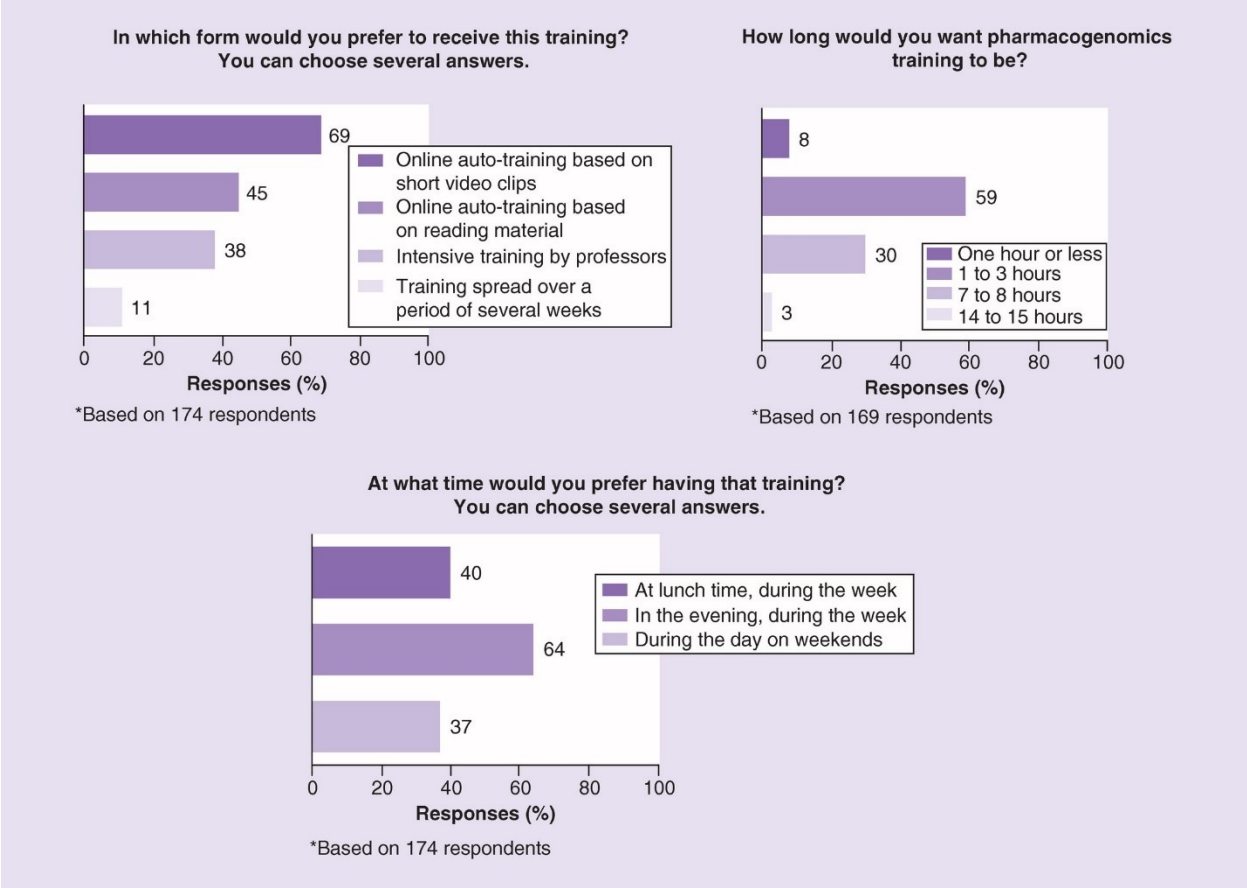
**Figure 2 Hopes and worries of pharmacists toward pharmacogenomics and pharmacogenomic testing.**

Republished with permission of Future Medicine LTD, from *Opinion, experience and educational preferences concerning pharmacogenomics: an exploratory study of Quebec pharmacists*. Meloche M. et al., Vol.21 No.4. 2020; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc



**Figure 3 Experience of pharmacists related to pharmacogenomics in clinical practice.**

Republished with permission of Future Medicine LTD, from *Opinion, experience and educational preferences concerning pharmacogenomics: an exploratory study of Quebec pharmacists*. Meloche M. et al., Vol.21 No.4. 2020; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc



**Figure 4 Pharmacists’ preferences for receiving pharmacogenomic training.**

Republished with permission of Future Medicine LTD, from *Opinion, experience and educational preferences concerning pharmacogenomics: an exploratory study of Quebec pharmacists*. Meloche M. et al., Vol.21 No.4. 2020; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc

## Supplementary Material

### Exploratory Study about the Experience and the Educational Needs in Pharmacogenomics of the Québec Pharmacists: GAPP-2 Study.

#### Instructions concerning the questionnaire:

With this questionnaire we wish to have your opinion about important questions involving pharmacogenomics testing. It is part of a research study financed by *Génome Québec* whose objectives are to gain a better idea of your experience in pharmacogenomics as a pharmacist, as well as what are your expectations regarding the possible implementation of a training program adapted to your needs.

You are entirely free to decide whether or not to participate in this survey. Thus, completing the survey means you are accepting to participate. If so, please complete the survey only once and answer as honestly as possible. All your answers will be strictly anonymous. If, for any reason, you are uncomfortable with a question, you may refuse to answer it.

#### Key definitions:

- ***“Pharmacogenomics:*** *pharmacogenomics is the study of how the genetic profile (DNA) of an individual can influence his/her response to a medication. That response could include positive or negative effects.”*
- ***“Pharmacogenomic Testing:*** *a test (e.g.: blood test) to analyse the genetic profile (DNA) of an individual in order to determine if a drug will cause him/her side effects (adverse reactions) or benefits, or if it will be necessary to change the dosage. This information can help the health professional to choose the right medication.”*

In order to better understand those definitions, here is an example of the potential use of pharmacogenomics in the treatment of hypertension. A pharmacogenomic test would allow, for instance, predicting the efficacy (positive effect) of the medication to lower the blood pressure. The results would help identify the patients most liable to lower their blood pressure with the intake of this medication. Thus, the health professionals could personalize their treatments of hypertension by prescribing that drug only to the patients who will mostly benefit from it.

---

## Questions:

*The first four questions will allow us to define the population who answered the survey. The subsequent questions will specifically relate to pharmacogenomics.*

1. You are...
  - a. A man
  - b. A woman
  
2. What is your age group?
  - a. 20-30 y. o.
  - b. 31-40 y. o.
  - c. 41-50 y. o.
  - d. 51-60 y. o.
  - e. 61-70 y. o.
  - f. 71-80 y. o.
  
3. What is your main practice environment?
  - a. Pharmacy/community
  - b. Hospital
  - c. Pharmaceutical industry
  - d. Academics
  - e. Government
  - f. Other
  
4. Your highest diploma corresponds to:
  - a. Bachelor's degree
  - b. D. Ph.
  - c. Master's degree
  - d. Pharm. D.
  - e. Ph.D.
  - f. Other

*The next 5 questions concern your opinion about pharmacogenomics.*

5. Would you be comfortable to recommend pharmacogenomic testing (requiring a blood draw) to your patients in order to examine their genes if that test could tell you that a particular drug could be effective for them?
  - a. Yes
  - b. No
  - c. I don't know

6. Would you accept, as a health professional, to receive your patient's pharmacogenomic test results, if needed to analyse these results, and to advise the patient on a choice of treatment?
  - a. Yes, right away
  - b. Yes, but after having been trained on the subject
  - c. No, it is not my responsibility
  
7. Would you agree, as a health professional, to receive your patient's pharmacogenomic test results, if needed to analyse these results, and to advise **a physician** on a choice of treatment?
  - a. Yes, right away
  - b. Yes, but after having been trained on the subject
  - c. No, it is not my responsibility
  
8. Do you have any hope (a lot, a little, or not at all) in the possibility that a pharmacogenomic test will detect which drug (or dosage) will work most effectively for your patient?
  - a. I hope a lot
  - b. I have a little hope
  - d. I have no hope
  
9. Are you worried (a lot, a little, or not at all) about the possibility that a health insurance company could obtain information about the genetic predispositions of your patient when he/she is prescribed a targeted drug or dosage?
  - a. I am very worried
  - b. I am a little worried
  - c. I am not worried at all

*The next questions concern your experience with pharmacogenomics.*

10. Has a patient ever asked you a question specifically about pharmacogenomics?
  - a. Yes
  - b. No
  - c. I don't want to answerIf Yes, go to question 11. If No, or if you choose not to answer, go to question 12.
  
11. How often does a patient ask you a question specifically about pharmacogenomics?
  - a. At least once a day
  - b. At least once a week
  - c. At least once a month
  - d. A few times a year

- 12.** During your practice, were you ever exposed to pharmacogenomic test results?
- a. Yes
  - b. No
  - c. I don't want to answer
- If Yes, go to question 13. If No, or if you choose not to answer, go to question 14.

- 13.** Who gave you the pharmacogenomic test results?
- a. Results were available in the medical file
  - b. Genetic council/geneticist
  - c. Physician
  - d. Other

- 14.** Have you ever discussed the results of a pharmacogenomic test with a patient?
- a. Yes
  - b. No
  - c. I don't want to answer
- If Yes, go to question 15. If No, or if you choose not to answer, go to question 16.

- 15.** How often do you discuss pharmacogenomic test results with a patient?
- a. At least once a day
  - b. At least once a week
  - c. At least once a month
  - d. A few times a year

- 16.** Have you ever suggested pharmacogenomic testing?
- a. Yes
  - b. No
  - c. I don't want to answer
- If Yes, go to question 17. If No, or if you choose not to answer, go to question 18.

- 17.** How often do you suggest pharmacogenomic tests?
- a. At least once a day
  - b. At least once a week
  - c. At least once a month
  - d. A few times a year



**18.** Amongst the following resources, which ones have you ever accessed to find more information on pharmacogenomics in general or on its practical applications? (choose as many answers as you wish)

- a. Health Canada Web site
- b. FDA Web site (Food and Drug Administration, the counterpart of Health Canada in the USA)
- c. Web site of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortia (CPIC)
- d. Web site of the Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB)
- e. Web site of *Génome Québec*
- f. None
- g. Others

*The next questions relate to your training in pharmacogenomics.*

**19.** Have you had any training in pharmacogenomics during the last 5 years? (at university, at a convention or through internal facilities)

- a. Yes
- b. No

**20.** Would you like training in pharmacogenomics?

- a. Yes
- b. No
- c. I don't want to answer

If Yes, go to question 21. If No, the survey is finished.

**21.** How long would you want that training to be?

- a. 1 hour or less
- b. 1 to 3 hours
- c. 7 to 8 hours
- d. 14 to 15 hours

**22.** In which form would you prefer to receive this training? You can choose several answers.

- a. Online auto-training based on short video clips
- b. Online auto-training based on reading material
- c. Intensive training by professors
- d. Training spread over a period of several weeks

**23.** At what time would you prefer having that training? You can choose several answers.

- a. At lunch time, during the week
- b. In the evening, during the week
- c. During the day on weekends

24. What subjects would you like to be treated during this training? (choose as many as wanted) Please indicate your degree of interest (0 = none at all; 5 = very interesting).
- a. Introduction to genomics
  - b. Tests currently available
  - c. Specific pathologies
    - i. Cardiology
    - ii. Infectiology
    - iii. Cancer
  - d. Test interpretation
  - e. Pharmacokinetics
  - f. Cytochromes P450 and carriers
  - g. Usual applications, current and future
  - h. Ethics
  - i. Communication with the patient
  - j. Other: \_\_\_\_\_
25. Which of the following certifications would encourage you to complete a continuing education activity related to pharmacogenomics? You can check several choices.
- a. Continuing education credits from the *Ordre des pharmaciens*
  - b. University credits
  - c. A certificate from *Génome Québec*

**The survey is now finished.**

**We thank you for having answered this questionnaire on pharmacogenomics.**