Variabilité pharmacocinétique de la névirapine et de l'éfavirenz et rôle du polymorphisme des enzymes et transporteurs dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH et traités par une association d'antirétroviraux comprenant névirapine ou éfavirenz

Monidarin Chou

▶ **To cite this version:**

Monidarin Chou. Variabilité pharmacocinétique de la névirapine et de l'éfavirenz et rôle du polymorphisme des enzymes et transporteurs dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH et traités par une association d'antirétroviraux comprenant névirapine ou éfavirenz. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114851 . tel-00660459

HAL Id: tel-00660459
https://theses.hal.science/tel-00660459

Submitted on 16 Jan 2012

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : PHARMACOLOGIE EXPÉRIMENTALE ET CLINIQUE

ANNÉE 2010 - 2011 SÉRIE DOCTORAT N° 1157

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 20/12/2011

par

Monidarin CHOU

Variabilité pharmacocinétique de la névirapine et de l'éfavirenz et rôle du polymorphisme des enzymes et transporteurs dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH et traités par une association d'antirétroviraux comprenant névirapine ou éfavirenz

Directeur de thèse : Anne-Marie TABURET PH (Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Bicêtre)

Composition du jury :

Rapporteurs :	Chantal LE GUELLEC	MCU-PH (Université de Tours)
	Hot BUN	MCU-PH (Université d'Aix-Marseille)
Examinateurs :	France MENTRE	PU-PH (Université Paris Diderot)
	Jean-François DELFRAISSY	PU-PH (Université Paris Sud)
	Jean-Michel MOLINA	PU-PH (Université Paris Diderot)
	Eric SINGLAS	PU-PH (Université de Caen)
	Céline VERSTUYFT	MCU-PH (Université Paris Sud)

Remerciements

Je tiens à remercier Madame le Dr Anne-Marie TABURET, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la direction de ma thèse. Son dynamisme, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils, ses connaissances scientifiques m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie vivement Madame le Dr Céline VERSTUYFT pour ses encouragements et ses précieux conseils dans le domaine de la pharmacogénétique.

Je remercie tout particulièrement Madame le Dr Chantal LE GUELLEC et Monsieur le Dr Hot BUN qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Madame le Pr France MENTRE et le Dr Julie BERTRAND pour leurs encouragements et leurs précieux conseils dans le domaine des statistiques et de la pharmacocinétique de population et avec lesquels j'ai la chance de collaborer dans le cadre de l'etude ANRS 12154 PECAN.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Pr Jean-François DELFRAISSY, Directeur de l'ANRS qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse et pour son soutien à la recherche clinique dans les pays du Sud et en particulier au Cambodge.

Je remercie le Pr Jean-Michel MOLINA et le Pr Eric SINGLAS qui me font l'honneur d'accepter de participer à ce jury.

Mes sincères remerciements à Madame le Pr TEA Sok Eng et Madame le Pr TEP Rainsy, Doyennes de la Faculté de Pharmacie, Monsieur le Pr OUM Sophal et Monsieur le Pr YOUK Sophanna, Recteurs de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge et au Pr Alain CARAYON pour leurs encouragements, sans lesquels je n'aurai pu réaliser ce travail.

Je remercie également l'ANRS pour la promotion de l'essai PECAN (ANRS 12154) ainsi que la Fondation Mérieux et ses représentants au Cambodge, François-Xavier BABIN et Nicolas STEENKESTE pour le soutien permanent du laboratoire Rodolphe Mérieux du Cambodge et pour m'avoir apporté toutes les facilités matérielles et financières qui m'ont permis de réaliser ce travail.

J’adresse mes profonds remerciements à toutes celles et ceux qui m’ont aidé et soutenu dans la réalisation de ce travail, en particulier les équipes de l’Institut Pasteur du Cambodge, les Dr Laurence BORAND et Eric NERRIENET, les équipes ESTHER de l’hôpital Calmette de Phnom Penh et du service de Médecine Interne de l’hôpital Bicêtre. Je remercie également les investigateurs de l’essai CAMELIA, les Dr François-Xavier BLANC, SOK Tim et Anne GOLDFELD qui m’ont fait confiance.

J’adresse également mes sincères remerciements à tout le personnel du service Pharmacie-laboratoire de toxicologie et du laboratoire de pharmacogénétique du CHU Bicêtre pour leur gentillesse, leur collaboration et leur soutien dans le cadre du travail réalisé pour l’essai ANRS-12154 PECAN, dont une partie des résultats est présentée ici.

Je tiens à dédier cette thèse à ma femme, qui m’a toujours prouvé son amour, a accepté mes longs séjours en France et m’a encouragé tout au long de ce travail. J’adresse mon amour à mes enfants qui m’ont permis de garder l’espoir par leur présence et leurs sourires.

Un grand merci à ma mère et à ma belle famille pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes travaux.

Production scientifique liée à la thèse

Article publié

Chou M, Bertrand J, Segeral O, Verstuyft C, Borand L, Comets E, Le Tiec C, Becquemont L, Ouk V, Mentre F, Taburet AM. *Population pharmacokinetic-pharmacogenetic study of nevirapine in HIV-infected Cambodian patients.* Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4432-9.

Articles en préparation

Julie Bertrand, Monidarin Chou, Danielle M Richardson, Céline Verstuyft, Paul D Leger, France Mentré, Anne-Marie Taburet, David W Haas, and ANRS 12154 study group. *Pharmacogenomics of Plasma Nevirapine Clearance among HIV-infected Cambodians*

Patty FAN-HAVARD, Zhongfa LIU, Monidarin CHOU, Yonghua LIN, Aurélie BARRAIL-TRAN, David W. HAAS, Anne-Marie TABURET and the ANRS12154 study group. *Pharmacokinetics of phase I nevirapine metabolites following a single dose and at steady state*

Article à écrire

Population pharmacokinetic-pharmacogenetic study of efavirenz in HIV- infected Cambodian patients included in the ANRS 1295- CIPRA KH001 study

Communications affichées

Patty Fan-Havard, Zhongfa Liu, Monidarin Chou, Yonghua Lin, Aurélie Barrail-Tran, David Haas, Anne-Marie Taburet, and ANRS 12154 Study group. *Different Nevirapine Metabolite Profiles with Single-dose and at Steady-state*. Accepté pour presentation 19th CROI, Seattle, 5-8 mars 2012, abstract # N-112

M Chou, C Verstuyft, O Segeral, J Bertrand, L Borand, E Comets, C Le Tiec, L Becquemont, V Ouk, F Mentré, AM Taburet and the ANRS 12154 study group. *Frequency of cytochrome P450 2B6, 3A5 and MDR1 allelic variants in the Cambodian Population*. Conference on Physiology, Pharmacology and Therapeutics, 2010 Bordeaux France, March 23-25, Poster # 1131

M Chou, J Bertrand, O Segeral, C Verstuyft, L Borand, E Comets, C Le Tiec, L Becquemont, V Ouk, F Mentré, AM Taburet and the ANRS 12154 study group. *Inter and intra patient variabilities in nevirapine plasma concentrations in HIV-infected Cambodian patients and effect of CYP2B6 genetic polymorphism (ANRS 12154 study)*. 2009, 16th CROI Montreal, February 8-11, abstract # 691

M Chou, L. Borand, D. Laureillard, C. Rekacewicz, A. Goldfeld, Sok T, FX. Blanc, AM. Taburet. *Efavirenz 600mg daily leads to therapeutic concentrations in a majority of patients when combined with rifampin: preliminary data from the CAMELIA clinical trial.* 17th international AIDS Conference 2008, Mexico City, August 3-8, Poster # A-072-0082-0651

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 2
INTRODUCTION 9
1 ÉTAT DES CONNAISSANCES 12
1.1 L'infection par le VIH 12
1.1.1 Rappels sur le VIH 12
1.1.2 Histoire naturelle de la maladie 14
1.1.3 Epidémiologie au Cambodge 15
1.2 Les médicaments antirétroviraux 16
1.2.1 Les principales classes des antirétroviraux 17
1.2.2 Stratégies thérapeutiques au Cambodge 24
1.2.3 Présentation des deux INNTI étudiés 31
1.3 Pharmacogénétique et métabolisme des médicaments 41
1.3.1 Généralités sur les enzymes et transporteurs 41
1.3.2 Variabilité interindividuelle 46
2 MATERIELS ET METHODES 56
2.1 Patients et protocoles 56
2.1.1 Patients traités par névirapine 56
2.1.2 Patients traités par éfavirenz 57
2.2 Méthodes analytiques 59
2.2.1 Principe des méthodes utilisées 59
2.2.2 Dosages plasmatiques de la névirapine 59
2.2.3 Dosages plasmatiques de Efavirenz 60
2.3 Identification des polymorphismes 61
2.3.1 Extraction des ADN 61
2.3.2 Génotypage 63
2.4 Calcul des paramètres pharmacocinétiques 65
2.4.1 Méthode non compartimentale 65
2.4.2 Méthode compartimentale, modèle dépendant 66
2.4.3 Pharmacocinétique de population 67
3 RESULTATS 70
3.1 Facteurs affectant la pharmacocinétique de la névirapine 70
3.1.1 Pharmacocinétique et pharmacogénétique de la névirapine chez les patients cambodgiens infectés par le VIH 70
3.1.2 Impact de divers polymorphismes génétiques sur la clairance de la névirapine 80
3.1.3 Pharmacocinétique des métabolites de la névirapine après dose unique ou administration répétée **..... 84**
3.2. Pharmacocinétique de l'éfavirenz 118
3.2.1 Concentrations plasmatiques d'éfavirenz 118
3.2.2 Pharmacogénétique de l'éfavirenz 123
3.2.3 Parametres pharmacocinétiques de l'efavirenz 124
4 CONCLUSION GENERALE 127
5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 131

6 ANNEXES.....138
6.1 Annexe 1 : Résumé de l'essai ANRS12154-PECAN.....138
6.2 Annexe 2 : Résumé de l'essai ANRS 1295-CIPRA KH001CAMELIA.....140
6.3 Annexe 3 : Fiche technique du dosage de la nevirapine dans le plasma par CLHP.....143
6.4 Annexe 4 : Fiche technique du dosage de l'efavirenz dans le plasma par CLHP.....147
6.5 Annexe 5 : Les amorces, les sondes et les kits utilises pour les genotypages 151
RESUME 152

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié du VIH 13

Figure 2 : Evolution de l'infection par le VIH 14

Figure 3 : Cycle de réplication du VIH 16

Figure 4 : Structure chimique de la Névirapine 32

Figure 5 : Biotransformation de la névirapine chez l'homme. 34

Figure 6 : cytochromes impliqués dans la formation des métabolites de la névirapine 35

Figure 7 : Structure chimique de l'efavirenz 37

Figure 8 : Biotransformation de l'efavirenz 39

Figure 9 : Valeur prédictive de la concentration d'efavirenz pour obtenir une charge virale indétectable (_____) ou les effets indésirables neurologiques (----). 41

Figure 10 : représentation schématique du métabolisme des médicaments et de l'effet de premier passage après administration orale 42

Figure 11 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques 43

Figure 12A : exemple de transporteurs impliqués au niveau de différents organes participant à l'absorption (entérocytes) ou à l'élimination des médicaments (hépatocytes et cellules tubulaires rénales) 44

Figure 12B : Différents transporteurs d'entrée ou de sortie de la cellule 44

Figure 13 : Technique de discrimination allélique TaqMan® 63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les INTI ayant une AMM en Europe 18

Tableau 2 : Les INTI disponibles au Cambodge 18

Tableau 3 : Formes combinées d'INTI 18

Tableau 4 : Posologie des INTI 19

Tableau 5 : Les INNTI disponibles en Europe 20

Tableau 6 : Les INNTI disponibles au Cambodge 21

Tableau 7 : Inhibiteurs de protéase ayant une AMM en Europe 21

Tableau 8 : Inhibiteurs de protéase disponibles au Cambodge 21

Tableau 9 : Classification de la maladie VIH chez l'adulte et l'adolescent 26

Tableau 10 : Traitement de 1ère ligne au Cambodge 27

Tableau 11 : Recommandations cambodgiennes pour le suivi biologique du patient VIH, avant et pendant le traitement antirétroviral 29

Tableau 12 : effets indésirables de la névirapine et marqueurs génétiques 35

Tableau 13 : Principaux transporteurs hépatiques et rénaux avec leur substrat type 44

Tableau 14 : Les substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP 450. .....

Tableau 15 : principaux SNP des transporteurs et leur fréquence dans différentes populations 54

Tableau 16 : Contrôle de qualité des séries de dosages de la névirapine 60

Tableau 17: Contrôle de qualité des séries de dosages d'éfavirenz 61

Tableau 18: Concentration en ADN des échantillons de patients traités par névirapine 62

Tableau 19 : Concentration en ADN des échantillons de patients traités par éfavirenz 63

Introduction

La prise en charge des patients infectés par le virus de l'immunodéficience acquise ou VIH dans les pays du Sud est difficile du fait des ressources limitées et du nombre important de patients à traiter. La mobilisation de la communauté internationale via les ressources du Fonds Mondial, les recommandations de l'OMS pour la prise en charge des patients et les programmes nationaux et la formation du personnel de santé sur le terrain, ont permis d'initier des programmes de prévention, en particulier pour limiter la transmission du virus de la mère à l'enfant et de proposer un traitement antirétroviral dit de première ligne, simple, gratuit et efficace pour les patients infectés et fortement immunodéprimés. Compte tenu du nombre de malades à traiter dans les pays d'Afrique sub-saharienne, les programmes mis en place ont fait l'objet de nombreuses publications. Dans les pays d'Asie du Sud-Est, les retours d'expérience sont plus limités, mais celui du Cambodge est exemplaire puisque la majorité des patients qui doivent recevoir un traitement sont traités. Depuis les années 2000, les organisations non gouvernementales (ONG) ont initié les premiers traitements [Ferradini et al. 2007], puis le National Center for HIV/AIDS, Dermatology and STD (NCHADS) a organisé le dépistage, la formation du personnel de santé et la dispensation des médicaments antirétroviraux pour que ceux-ci soient disponibles pour tous les patients. Le NCHADS publie également régulièrement les recommandations pour la prise en charge des patients à partir des recommandations de l'OMS. Un partenariat franco-cambodgien impliquant ESTHER (Ensemble pour une Solidarité THérapeutique En Réseau), l'ANRS (Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les hépatites) et bien sûr le NCHADS a permis de mettre en place des programmes d'évaluation des traitements et des essais cliniques thérapeutiques.

La névirapine ou l'éfavirenz, sont des antirétroviraux, inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH qui associés à deux analogues nucléos(t)idiques également inhibiteurs de la transcriptase inverse, mais par l'intermédiaire de leur métabolite triphosphorylé, sont les médicaments du traitement antirétroviral de première ligne recommandé par l'OMS. L'efficacité du traitement repose sur des concentrations au niveau du plasma et idéalement des réservoirs du virus, supérieures aux concentrations nécessaires pour inhiber la multiplication virale (concentration inhibitrice ou CI) et suffisante pour éviter la sélection de mutants viraux résistants. Ces concentrations dépendent d'une part de l'adhésion des patients à leur traitement et des caractéristiques pharmacocinétiques des antirétroviraux.

Névirapine et éfavirenz sont éliminés par biotransformations principalement hépatiques impliquant le cytochrome P-450 (CYP) de la famille 2B, le CYP2B6. L'activité de ce CYP est très variable, du fait de son inductibilité et de nombreux polymorphismes génétiques identifiés. Les transporteurs pouvant jouer un rôle dans la pharmacocinétique de ces médicaments sont moins bien connus.

L'objectif de notre travail de pharmacocinétique clinique, a donc été d'étudier la variabilité des concentrations de névirapine et d'éfavirenz et les facteurs environnementaux ou génétiques pouvant expliquer cette variabilité dans des populations de patients cambodgiens infectés par le VIH et traités par ces antirétroviraux de première ligne. Ce travail soumis à l'appel d'offres ANRS a été accepté et financé (essai ANRS 12154, PECAN). Cette étude ainsi que les amendements et études satellites ont été approuvés par le Comité d'Ethique du Cambodge. Les patients traités par névirapine faisaient partie de la cohorte de patients ambulatoires traités et suivis à l'hôpital Calmette de Phnom Penh (coordination par le Dr Ouk Vara) dans le cadre de la collaboration ESTHER entre l'hôpital Calmette et l'hôpital Bicêtre (Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, APHP). Les patients traités par l'éfavirenz étaient les patients inclus dans l'essai ANRS 1295 – CIPRA KH 001 CAMELIA (investigateurs principaux Dr François-Xavier Blanc, Dr Sok Tim, Dr Anne Goldfeld) dont l'objectif principal était d'évaluer la meilleure période d'introduction du traitement antirétroviral par rapport au traitement antituberculeux chez des patients coinfectés par le VIH et la tuberculose.

Après avoir présenté un état des connaissances sur la prise en charge thérapeutique du VIH au Cambodge, sur les caractéristiques pharmacologiques des principaux médicaments antirétroviraux et sur le polymorphisme génétique des enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme et l'élimination des médicaments, nous présenterons nos principaux résultats après avoir fait un rappel des méthodologies utilisées selon le plan suivant :

- la variabilité pharmacocinétique et génétique de la névirapine, qui a fait l'objet d'une publication dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy en 2010 [Chou *et al.* 2010]

- la mesure des concentrations des principaux métabolites de la névirapine fait l'objet d'une collaboration avec le Pr Patty Havard (Université de l'Ohio) et le Pr David Haas (Université de Vanderbilt) aux USA ; nous présenterons les premières données et le manuscrit en cours de validation par les auteurs,

- L'étude du polymorphisme du CYP2B6 et l'impact des différents variants et haplotypes sur la clairance de la névirapine fait l'objet d'une collaboration avec le Pr David Haas. Nous présenterons les résultats et le manuscrit en cours de validation par les auteurs.

- la variabilité pharmacocinétique de l'éfavirenz et l'impact des covariables tels que les caractéristiques démographiques et clinico-biologiques des patients, les traitements associés, en particulier la rifampicine aux propriétés fortement inductrices enzymatiques et les polymorphismes génétiques des enzymes et transporteurs ayant un rôle dans le devenir de ces médicaments dans l'organisme ont été étudiés. La partie expérimentale est terminée et nous présenterons les concentrations d'éfavirenz et la fréquence des principaux polymorphismes étudiés dans cette population de patients cambodgiens. Nous présentons nos premiers résultats de la pharmacocinétique de population de l'efavirenz. La publication devrait être rédigée dans le courant du 1er semestre 2012.

1 ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 L'infection par le VIH

1.1.1 Rappels sur le VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH est un virus qui appartient à la famille des rétrovirus. Ce virus est responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme. Actuellement, on distingue deux types de virus en fonction leur formule génétique : le VIH-1 a été isolé chez un patient atteint du SIDA en 1983 tandis que le VIH-2 a été isolé deux ans plus tard [Specter *et al.* 2008].

1.1.1.1 Structure du VIH :

Le VIH se présente sous forme de particules sphériques d'un diamètre de 80 à 100 nm. Ces particules sont constituées d'une enveloppe de double couche lipidique semblable aux membranes cellulaires et de deux types de glycoprotéine (figure 1). La glycoprotéine (gp 120) va interagir avec les récepteurs CD4 des lymphocytes, cellules hôtes et une glycoprotéine (gp 41) traverse les couches lipidiques. Cette dernière est particulièrement impliquée dans la pénétration de la capside virale dans la cellule hôte [Reil *et al.* 1998].

A l'intérieur de la membrane et contre la membrane intérieure, il y a une capside virale ou nucléocapside. Cette capside est constituée par une couche formée par les molécules de protéine p 17 et une autre couche plus profonde, la protéine p24. C'est la partie qui contient et protège le matériel génétique du virus. Elle entre dans la cellule de l'hôte lors de l'infection [Turner et Summers 1999].

Le matériel génétique du VIH se trouve dans le noyau constitué de deux brins d'ARN identiques et d'enzymes tels que :

- La transcriptase inverse, protéine p64, qui permet la transformation de l'ARN viral en ADN ; cette étape est indispensable, car c'est l'ADN viral qui s'intègre dans l'ADN de la cellule hôte.
- L'endonucléase, qui va permettre la pénétration de l'ADN viral dans le noyau du lymphocyte T4
- L'intégrase permet l'insertion de l'ADN viral dans l'ADN du lymphocyteT4.

- L'ADN polymérase, traduit l'ADN viral intégré en ARNm, puis cet ARNm va synthétiser les protéines virales.
- La protéase, permet la maturation des protéines virales et la production de virions infectieux.

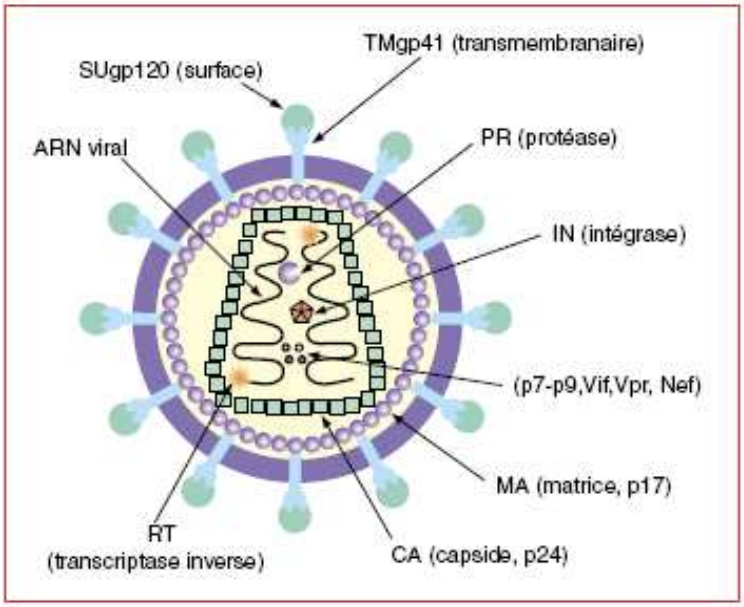


Figure 1 : Schéma simplifié du VIH [Pancera 2005]

1.1.1.2 Cycle de réplication des virus :

Le cycle de réplication de VIH présente plusieurs étapes. La première étape correspond à la fixation du virus sur la membrane cellulaire par fixation sur le récepteur CCR5 ou CXCR4 de la cellule CD4 [Mouscadet et Deprez 2003]. Cette étape nécessite la reconnaissance des molécules de surface cellulaire par l'enveloppe virale (gp 110/120). Ensuite le virus pénètre dans la cellule par fusion de son l'enveloppe avec la membrane de la cellule hôte grâce à la glycoprotéine transmembranaire (gp 41).

Dans le cytoplasme de la cellule, le génome viral sous forme de molécule d'ARN est transcrit en ADN par une enzyme, la transcriptase inverse puis il pénètre dans le noyau. A l'intérieur du noyau, l'ADN d'origine virale s'intègre dans l'ADN cellulaire grâce à l'intégrase virale. L'intégration peut avoir lieu en dehors de toute synthèse d'ADN par la cellule. Lorsque le lymphocyte est activé, la transcription de l'ADN viral en ARN commence. L'ARN produit va synthétiser d'une part les protéines virales et d'autre part, les protéines constitutives du génome, et ainsi produire de nouveaux virions.

1.1.2 Histoire naturelle de la maladie

L'infection par le VIH évolue en trois phases successives (figure 2) :

- La période de primo-infection : cette phase survient dans les 15 jours à 3 mois suivant la contamination. Le virus VIH se multiplie à l'intérieur des lymphocytes T CD4. Cette période est constituée de trois phases : la phase initiale, caractérisée par une réplication virale intense, permet l'établissement du réservoir, la seconde phase se traduit par la réponse CD8 cytotoxique, et la troisième phase correspondant à une phase de plateau où la charge virale est prédictive de l'évolution de la maladie.

- La période asymptomatique : cette phase peut s'étaler sur plusieurs années. Cependant, durant cette période, une dégradation progressive du système immunitaire est observée se manifestant plus particulièrement par une diminution du taux de cellules CD4 sans être accompagnée d'une augmentation des concentrations virales plasmatiques.

- La période symptomatique ou SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) : le virus continue à détruire les lymphocytes T CD4. Lorsque le niveau de destruction de ces cellules atteint un seuil critique, les manifestations liées à la déficience immunitaire apparaissent.

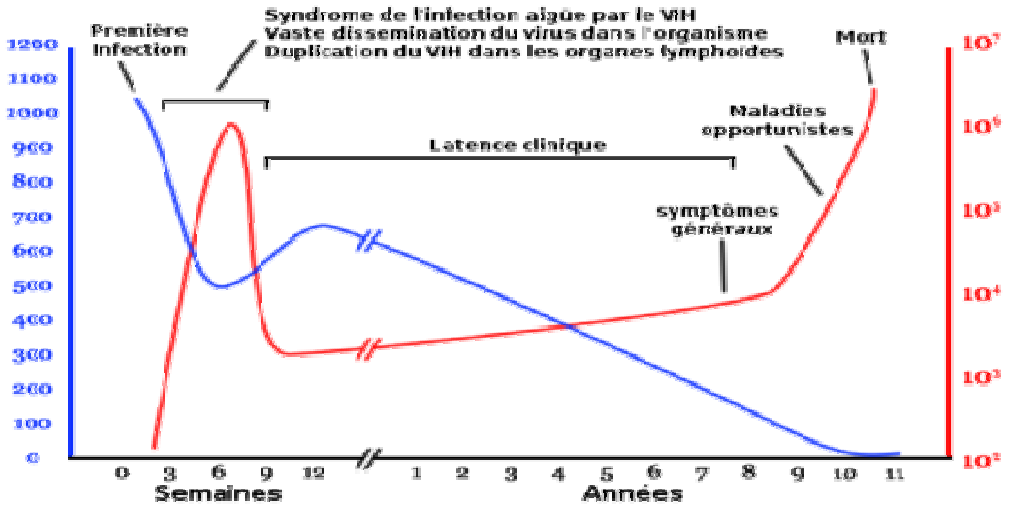


Figure 2 : Evolution de l'infection par le VIH

Nombre de lymphocytes T CD4 par mm^3 de plasma
Nombre de copies de l'ARN viral par mL de plasma
Selon le site internet Africaciel de l'Afirique en mouvement
http://www.africaciel.com/afrique/portail/index/VIH.html

En 1993, le Center for Disease Control (CDC) a proposé de classer l'infection par le VIH en 3 stades (catégories A, B et C) en fonction des pathologies opportunistes et du taux de CD4 [Castro *et al.* 1992]. Quand un patient a présenté une pathologie d'une catégorie, il est définitivement classé dans cette catégorie, sans retour à un stade antérieur. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a également défini une autre classification selon 4 stades cliniques [WHO 2007].

1.1.3 Epidémiologie au Cambodge

Le VIH a été détecté la première fois au Cambodge par dépistage sérologique en 1991. À la fin de 1993 et au début de 1994, les premiers cas de sida ont été diagnostiqués. En 1995-1998 les données de surveillance ont montré une propagation importante du VIH dans plusieurs populations, en particulier dans les provinces à la frontière du Cambodge et de la Thaïlande.

Selon le rapport du NCHADS de 2009, le taux de la prévalence de VIH a diminué de 1,2% en 2003 à 0,9% en 2006. En utilisant les résultats de l'enquête sur la prévalence en 2006, les modèles de l'épidémiologie en Asie du Sud-Est montrent que le taux de prévalence diminue et serait de 0,9% en 2006 et 0,7% à partir de 2007. En 2009 il y aurait 57 900 patients infectés par le VIH. D'après les estimations, il n' y aurait plus que 51 200 patients infectés en 2012 [NCHADS 2010].

Selon UNAIDS, le Cambodge est l'un des pays où l'incidence de l'infection par le VIH a diminué de plus de 25% en seulement quelques années [UNAIDS 2010].

En se basant sur le résultat du recensement de 2009 par le Ministère du Plan, la population totale du Cambodge est 13 614 706 habitants avec un nombre de femmes enceintes estimé à 348 536. Le NCHADS a estimé que le nombre de femmes enceintes VIH-positives est de 2 475. La prévalence est estimée à 0, 71% en 2010.

Au 4ème trimestre 2010, on estime que 42 799 patients infectés par le VIH (38 697 adultes et 4102 enfants) reçoivent le traitement antirétroviral. L'augmentation du seuil de CD4 à 350/mm^3 pour débuter le traitement antirétroviral, ferait passer le nombre de patients à traiter à 44 280 soit 96,7% des patients nécessitant un traitement.

1.2 *Les médicaments antirétroviraux*

Les antirétroviraux sont regroupés en cinq classes pharmacologiques. Ils agissent à différents niveaux du processus d'infection d'un lymphocyte CD4 par le VIH et du processus de réplication. Les différentes cibles sont illustrées par la figure 3 :

- les inhibiteurs d'entrée
- les inhibiteurs de la transcriptase inverse, nucléos(t)idiques ou non nucléosidiques
- les inhibiteurs de l'intégrase
- les inhibiteurs de la protéase

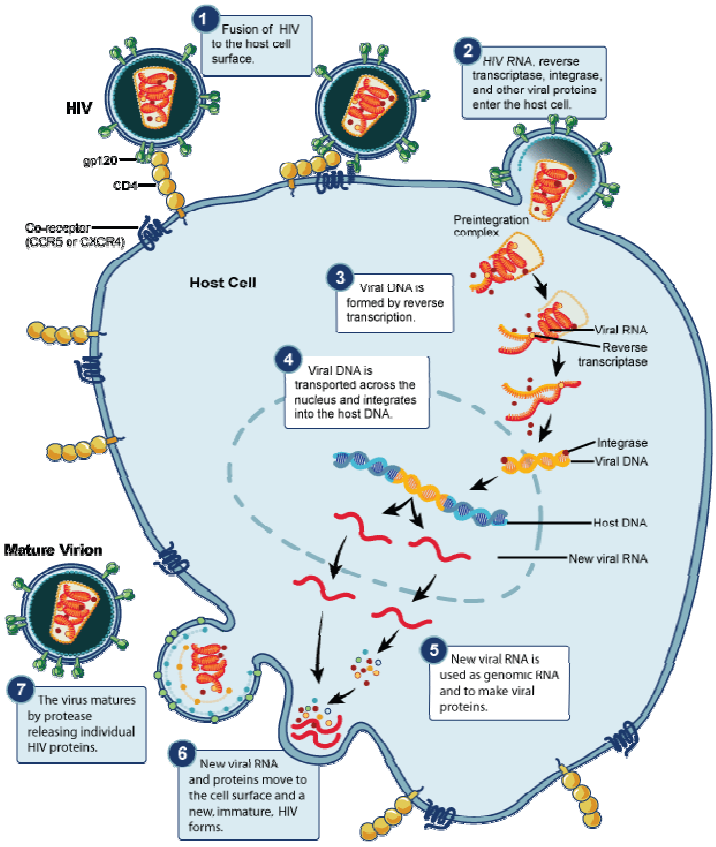


Figure 3 : Cycle de réplication du VIH

1-Fusion du VIH à la surface de la cellule hôte. 2-ARN, reverse transcriptase, intégrase et autres protéines virales entrent dans la celle hôte. 3- Formation ADN viral par la transcriptase inverse. 4-ADN viral est transporté à travers le noyau et s'intègre dans ADN de la cellule hôte. 5-Nouvel ARN viral utilisé pour la production de protéines virales. 6-ARN et protéines virales migrent à la surface cellulaire et forment un nouveau virus immature. 7- Un virus mature est formé par la libération des protéines du VIH grâce à l'action des protéases. D'après le site internet du NIH, Bethesda, USA : http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/pages/hivreplicationcycle.aspx

1.2.1 Les principales classes des antirétroviraux

1.2.1.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

L'inhibition de la transcriptase inverse va empêcher la transcription de l'ARN en ADN viral.

1.2.1.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :

Les inhibiteurs nucléosidiques (et nucléotidiques) de la transcriptase inverse sont actifs après trois étapes de phosphorylation dans la cellule pour les analogues nucléosidiques et deux étapes pour le ténofovir, analogue nucléotidique de la transcriptase inverse. La forme triphosphate, seule active, entre en compétition au niveau du site de fixation de l'enzyme avec le nucléoside naturel endogène correspondant lors de la formation de la chaîne d'ADN viral par la transcriptase inverse.

Les posologies sont regroupées dans le tableau 1. Les molécules ayant obtenu une AMM en Europe sont présentées dans le tableau 2 et les molécules disponibles au Cambodge (médicaments génériques) sont présentées dans le tableau 3.

Le premier médicament utilisé en clinique, la zidovudine (AZT ou ZDV), a été commercialisé en 1987. L'AZT est un analogue de la thymidine.

Les INTI ont généralement une bonne biodisponibilité. Ils sont peu fixés aux protéines plasmatiques et sont éliminés dans les urines sous forme inchangée, sauf la zidovudine et l'abacavir (ABC) qui sont en partie glucuronoconjugués et la didanosine (ddI) éliminée en partie en hypoxanthine. Du fait de la demi-vie intracellulaire prolongée des métabolites triphosphorylés, plusieurs INTI peuvent être administrés en une prise par jour sauf la zidovudine et la stavudine (d4T) [Yeni 2010].

Les principaux effets indésirables sont les réactions allergiques graves, une diminution du nombre de globules blancs, des nausées ou des vomissements, des maux de tête, un engourdissement, des fourmillements, ou des douleurs dans les membres ou les extrémités (pouvant être des symptômes de neuropathie périphérique), des douleurs articulaires ou musculaires, une altération du fonctionnement du foie ou des reins, une acidose lactique, une pancréatite.

Tableau 1 : Posologie des INTI en Europe et au Cambodge

Nom générique	Posologie
Zidovudine (AZT)	300 mg x 2/j
Lamivudine (3TC)	150 mg x 2/j ou 300mgx1/j
Emtricitabine (FTC)	200 mg x1/j
Didanosine (ddI)	≥ 60kg : 400mg x 1/j ; <60kg 250mg x 1/j à jeun
Stavudine (d4T)	30 mg x 2/j
Tenofovir (TDF)	300 mg x 1/j au cours d'un repas
Abacavir (ABC)	300 mg x 2/j ou 600 mgx1/j

Tableau 2 : Les INTI ayant une AMM en Europe

DCI	Spécialités	Formes pharmaceutiques disponibles pour le patient adulte
Inhibiteurs nucléosidiques		
Abacavir	Ziagen®	300mg
Emtricitabine	Emtriva®	200 mg
Didanosine	Videx®	250 mg et 400 mg
Lamivudine	Epivir®	150mg et 300mg
Stavudine	Zérit®	30mg
Zidovudine = azidothymidine	Rétrovir®	150 mg et 300mg
Inhibiteur nucléotidique		
Ténofovir	Viread®	300 mg

Tableau 3 : Les INTI disponibles au Cambodge

(Spécialités préqualifiées par OMS)

DCI	Nom commercial	Fabriquant
Zidovudine 300mg	Aviro-Z	Ranbaxy
Lamivudine 150 mg	Hetavir-150	Hetero
Didanosine 250 et 400 mg	Videx	Bristol-Myers-Squibb
Tenofovir 300 mg	Viread	Gilead
Abacavir 300 mg	Abacavir Sulfate	Aurobindo

Lors d'un traitement antirétroviral, afin d'éviter la sélection de virus mutants résistants, deux INTI dont les métabolites triphosphorylés, sont compétiteurs de différents nucléotides

endogènes sont associés et des formes combinées sont commercialisées aussi bien en Europe qu'au Cambodge (tableau 4).

Tableau 4 : Formes combinées d'INTI

Associations à dose fixe d'inhibiteurs nucléos(t)idiques	
Zidovudine + lamivudine	Combivir®
Zidovudine + lamivudine + abacavir	Trizivir®
Abacavir + lamivudine	Kivexa®
Emtricitabine + ténofovir	Truvada®
Associations disponibles au Cambodge	
Stavudine + lamivudine	Coviro-LS
Zidovudine + lamivudine	Duovir

Il y a peu d'interactions médicamenteuses pharmacocinétiques avec les INTI, puisqu'ils ne sont pas métabolisés par les cytochromes P-450. L'association de didanosine et tenofovir est la seule interaction pharmacocinétique décrite à ce jour entre les INTI ; en effet, elle entraine une augmentation des concentrations de didanosine par inhibition de la purine nucleoside phosphorylase et son efficacité virologique est non optimale [Yeni 2010]. Cette association est donc non conseillée en première ligne [Yeni 2010], en raison du défaut de puissance, de la toxicité cumulée et de la baisse de lymphocytes CD4, bien que dans certains cas, en charge virale contrôlée, la poursuite d'une telle multithérapie n'ait pas montré d'effet délétère [Girard *et al.* 2011]. Les interactions n'expliquent pas la moindre efficacité des trithérapies d'INTI par rapport aux trithérapies comportant 2 classes d'antirétroviraux (2 INTI + 1 INNTI ou 2 INTI + 1 IP/r), probablement due à une moindre puissance virologique.

1.2.1.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) sont des médicaments qui agissent au stade précoce, qui ont un effet inhibiteur direct sur la transcriptase inverse du VIH-1 en formant une liaison réversible et non compétitive avec l'enzyme. Ils ne sont actifs que sur le VIH-1. Tous les INNTI agissent au niveau du même site de la transcriptase inverse [Clercq 2000].

Actuellement, 3 INNTI ont l'AMM en Europe (tableau 5) et deux molécules sont utilisées au Cambodge dans le traitement de première ligne, la névirapine et l'éfavirenz (tableau 6).

Généralement, les INNTI ont une demi-vie d'élimination prolongée (> 30 h) permettant pour l'éfavirenz une administration quotidienne unique. Ils ont une bonne biodisponibilité. Leur métabolisme est généralement hépatique sous la dépendance des cytochromes P-450 (CYP 3A4 et 2B6). Leurs métabolites sont éliminés par voie urinaire. Ils sont de plus inducteurs enzymatiques et sont donc à l'origine d'interactions médicamenteuses. Compte tenu de l'auto-induction, la posologie de la névirapine doit être débutée à la dose diminuée de moitié (200 mg/j) pendant 14 jours, puis être augmentée à dose définitive (200 mg X2/j).

Les INNTI présentent une barrière génétique faible : une mutation unique du génome de la transcriptase inverse induit une résistance phénotypique importante, interdisant l'utilisation des INNTI en monothérapie. Les mutations de résistance aux INNTI portent sur les acides aminés au niveau de la poche du site de liaison sur la transcriptase inverse. Les patients en échec avec un seul INNTI ont souvent des mutations de résistance multiples. Il faut toujours intégrer les INNTI dans une thérapie antirétrovirale puissante afin de supprimer la réplication virale et éviter ainsi la sélection rapide de variants viraux résistants [Joly et Yeni 2000].

Les effets indésirables graves de la névirapine, survenant en général en début de traitement et nécessitant un changement de traitement sont une hépatotoxicité et la survenue de réaction d'hypersensibilité avec éruptions cutanées. Pour l'éfavirenz, les effets indésirables les plus fréquents sont les troubles du système nerveux central, principalement les vertiges ; l'éruption cutanée, généralement moins sévère, est également moins fréquente qu'avec la névirapine.

Tableau 5 : Les INNTI disponibles en Europe

DCI	Spécialités	Posologie
Névirapine	Viramune®	200mg x 1/j pendant 14 jours, puis 200mg x 2/j
Efavirenz	Sustiva®	600mg x 1/jour au coucher
Etravirine	Intelence®	200mg x 2/j

Tableau **6** : Les INNTI disponibles au Cambodge

DCI	Nom générique	Fabriquant	Posologie
Efavirenz Névirapine	Efavirenz comprimé Névirapine comprimé	Matrix Strides Acrolab	600 mg x 1/j 200mg x 1/j pendant 14 jours, puis 200mg x 2/j

1.2.1.2 Les inhibiteurs de protéase (IP)

Les inhibiteurs de protéase ont une action plus tardive en inhibant le cycle réplicatif du VIH, notamment la maturation des protéines virales.

Actuellement, les inhibiteurs de protéase disponibles en Europe sont présentés dans le tableau 7 et les molécules disponibles au Cambodge sont dans le tableau 8.

Tableau 7 : Inhibiteurs de protéase ayant une AMM en Europe

Dénomination commune internationale (DCI)	Spécialités	Posologie
Atazanavir (ATV)	Reyataz®	300mg x 1/j au cours des repas
Darunavir (DRV)	Prezista®	800 mg x 1/j ou 600 mg x 2/j
Fosamprénavir (fAPV)	Telzir®	700 mg x 2/j
Indinavir (IDV)	Crixivan®	400-600 mg x 2/j
Lopinavir/ritonavir (LPV/r)	Kaletra®	400/100 mg x 2/j
Nelfinavir (NFV)	Viracept®, arrêt de commercialisation	750 mg x 3/j ou 1250 mg x2/j
Ritonavir (RTV)	Norvir®	100-200 mg x 2/j en association avec un autre IP
Saquinavir (SQV)	Invirase®	1 000 mg x 2/j
Tipranavir (TPV)	Aptivus®	500 mg x 2/j

Tableau 8 : Inhibiteurs de protéase disponibles au Cambodge

Nom générique	Nom commercial	Fabriquant	Posologie
Lopinavir/Ritonavir	Aluvia®	Abbott	2x200/50 mg x 2/j
Saquinavir (SQV)	Invirase®	Roche	2x500 mg x 2/j (+ritonavir 100mgx2/j)
Ritonavir (RTV)*	Norvir®	Abbott	100 mg x 2/j

* associé à un autre inhibiteur de protéase

Les IP sont des molécules peptidomimétiques dont la structure s'apparente à celle des substrats naturels de la protéase aspartique du VIH. Ils bloquent ainsi le site actif de l'enzyme par encombrement. Les inhibiteurs de protéase agissent sur la phase tardive de la réplication virale. Par liaison à la protéase virale, ils bloquent le clivage des polypeptides précurseurs produits par les gènes gag et pol et empêchent ainsi la formation des enzymes virales et des protéines structurales de la nucléocapside. Les nouveaux virions sont immatures et donc inactifs et non infectieux. Leur action est dépendante de la concentration.

Ces molécules sont métabolisées par le CYP3A4 et sont des inhibiteurs très puissants, en particulier le ritonavir ; ils peuvent être inducteurs d'autres CYP tels que le CYP1A ou enzymes telles que les UGT ou transporteurs à des degrés divers. Ils présentent une biodisponibilité faible et une demi-vie courte. Ils sont donc associés au ritonavir à faible dose « boost » qui est un très puissant inhibiteur du CYP3A4 et permet d'augmenter leur exposition. Le lopinavir est associé au ritonavir dans la même formulation galénique (Kaletra ou Aluvia).

Tous les inhibiteurs de protéase peptidiques sont susceptibles d'interagir avec la pharmacocinétique des médicaments métabolisés par le CYP3A, telles que certaines statines. Leur métabolisme est induit par la rifampicine, cette association est donc déconseillée. Chez les patients co-infectés par la tuberculose et le VIH, la rifabutine peut remplacer la rifampicine, en diminuant la dose pour éviter une accumulation importante de la rifabutine et de son métabolite [Delfraissy et Goujard 1996].

Ils présentent une haute barrière génétique : la résistance apparaît de manière progressive par accumulation de mutations. Les mutations de résistance majeure sont généralement sélectionnées lors d'un premier échappement. Elles sont situées au niveau du site actif de

l'enzyme et diminuent la liaison des inhibiteurs de protéase à leur substrat enzymatique. Les mutations de résistance mineure apparaissent plus tardivement et renforcent la résistance par accumulation. Il existe des résistances croisées entre les inhibiteurs de protéase.

Les principaux effets indésirables du lopinavir sont des troubles digestifs à type de diarrhée, des nausées et rarement des vomissements, des dyslipidémies portant principalement sur les triglycéides et le cholestérol total. Sur le long terme, le lopinavir comme les autres inhibiteurs de protéase est un facteur favorisant du développement de lipohypertrophie centrale. Par rapport aux autres inhibiteurs de protéase, le saquinavir a un meilleur profil de tolérance en termes d'hypertriglycéridémie, d'hyperinsulinisme, ou de diabète. Les principaux effets secondaires de l'indinavir sont des troubles digestifs, les lithiases rénales par cristallisation urinaire des métabolites, des néphrites interstitielles, une anémie hémolytique ; ces effets indésirables peuvent être diminués en conseillant au patient de boire beaucoup. Cependant ils limitent l'intérêt actuel de cet IP, surtout dans les pays chauds. Le darunavir est globalement bien toléré avec une incidence faible d'arrêt du traitement pour effets indésirables. Les effets indésirables rapportés sont du même type que pour les autres inhibiteurs de protéase associés au ritonavir faible dose. La diarrhée est moins fréquente qu'avec le lopinavir. Les rashs sont plus fréquents que sous lopinavir où ils sont exceptionnels [Girard *et al.* 2011].

1.2.1.3 Les inhibiteurs de fusion

L'enfuvirtide ou T20 (Fuzéon®) est actuellement le seul représentant de cette classe. C'est un peptide, dégradé par les enzymes digestives, il est donc administré par voie sous cutanée, en deux injections par jour. Il inhibe la fusion entre le virus et la membrane cellulaire. Cet antirétroviral est prescrit chez les patients en échec de plusieurs lignes de traitement en association avec au moins un autre antirétroviral pour lequel le virus n'a pas développé de mutations de résistance. Il ne figure pas dans les recommandations cambodgiennes et n'est donc pas disponible au Cambodge.

1.2.1.4 Les inhibiteurs du CCR5

Le maraviroc inhibe le corécepteur du CCR5 du VIH et bloque l'entrée du virus dans la cellule. Il ne peut être utilisé que chez des patients dont le virus est à tropisme CCR5 majoritaire. Le maraviroc est métabolisé par le CYP3A4, sa posologie dépend des

antirétroviraux associés. Il ne figure pas dans les recommandations cambodgiennes et n'est donc pas disponible au Cambodge.

1.2.1.5 Les inhibiteurs de l'intégrase

Seul le raltégravir (Isentress®) a une AMM. Il inhibe l'intégrase, enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN viral au sein de l'ADN chromosomique des cellules hôtes. La posologie est de 400 mg deux fois par jour. Le raltégravir est métabolisé par glucuronoconjugaison impliquant l'UGT1A1, il y a donc moins d'interactions qu'avec les INNTI ou les inhibiteurs de protéase. Il ne figure pas dans les recommandations cambodgiennes et n'est donc pas disponible au Cambodge. L'éviltégravir est en cours d'essai clinique.

1.2.2 Stratégies thérapeutiques au Cambodge

L'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le Sida en restaurant un nombre de lymphocytes CD4 au-dessus du seuil de 500/mm^3 [Yeni 2010]. En pratique, cela est possible grâce à une réduction maximale de la réplication virale (charge virale plasmatique indétectable), qui permet la meilleure restauration immunitaire et limite au maximum le risque de sélection de virus résistants.

Le traitement antirétroviral des patients infectés par le VIH est devenu complexe et il implique la prise en compte de multiples facteurs, différents selon les patients. Ce traitement ne parvient pas à éliminer le VIH de l'organisme d'un patient, mais freine seulement sa réplication. Avec un traitement antirétroviral efficace, l'ARN-VIH plasmatique ou charge virale devient inférieur à la limite de détection par les techniques de routine et le nombre de lymphocytes T CD4 augmente, limitant ainsi l'apparition d'infections opportunistes. Dans les pays du Nord, des guides de recommandations sont publiés régulièrement [Yeni 2010]. L'OMS a publié des recommandations thérapeutiques pour la prise en charge des patients infectés par le VIH et l'utilisation des antirétroviraux chez les adultes et adolescents depuis 2002 et révisées en 2003, 2006 et 2010. Les objectifs de ces recommandations sont de fournir des recommandations basées sur des données factuelles donnant les grandes lignes d'une approche de santé publique qui garantit un traitement antirétroviral aux adultes et aux adolescents avec une attention privilégiée donnée aux pays

dont la capacité et les ressources des systèmes de santé sont limitées. Ainsi, ces recommandations [WHO 2010] :

- identifient les traitements puissants et efficaces disponibles dans les pays à ressources limitées ;
- élaborent des recommandations applicables au plus grand nombre de patients sur les points suivants : le moment optimal pour commencer un traitement antirétroviral, les schémas thérapeutiques antirétroviraux de première intention et de deuxième intention à privilégier, les meilleurs critères pour changer de traitement ;
- et introduisent le concept de schéma thérapeutique de troisième intention.

Ces recommandations sont ensuite adaptées par chaque pays.

Un guide national du traitement par les antirétroviraux a été mis en place par le Ministère de la Santé du Cambodge en mars 2007[NCHADS 2007]. Les objectifs du traitement par les antirétroviraux sont rappelés :

- Diminution de la réplication du VIH
- Restauration de la fonction immunitaire
- Augmentation de la qualité de vie
- Diminution du taux de morbidité et de mortalité lié au VIH
- Prévention de la résistance et de l'échec thérapeutique
- Prévention de la transmission de la mère au nouveau-né

Pour atteindre ces objectifs, il est recommandé d'associer 3 molécules antirétrovirales (traitement antirétroviral hautement actif).

Selon l'OMS, la classification en stades cliniques (tableau 9) est prévue pour les patients dont l'infection par le VIH a été confirmée par un test de recherche d'anticorps. Elle sert à guider pour décider du meilleur moment pour commencer une prophylaxie par le cotrimoxazole et sur le moment opportun pour commencer le traitement antirétroviral.
Le choix du début du traitement antirétroviral recommandé selon les critères cliniques de l'OMS est le suivant :

- Stades 1, 2 ou 3, le traitement par les ARV doit être débuté chez tout patient ayant un taux de CD4 inférieur ou égal à 350 /mm^3, ce traitement sera accompagné d'une prise en charge psycho sociale indispensable pour favoriser l'adhésion au traitement et éviter leur isolement. Pour les patients au stade 4, le traitement sera débuté sans attendre le résultat de la numération du taux de CD4.

Tableau 9 : Classification de la maladie VIH chez l'adulte et l'adolescent

(stades cliniques de l'OMS) [WHO 2010]

Stade clinique 1	**Stade clinique 2**	**Stade clinique 3**	**Stade clinique 4**
-Asymptomatique -Lymphadénopathie généralisée persistante	-Perte de poids modérée inexpliquée (< 10 % du poids du corps) -Infections récurrentes des voies respiratoires supérieures (sinusite, amygdalite, otite moyenne et pharyngite) -Zona -Chéilite angulaire -Ulcérations buccales récurrentes -Prurigo -Dermite séborrhéique -Infections fongiques de l'ongle	-Perte de poids sévère inexpliquée (> 10 % du poids du corps) -Diarrhée chronique inexpliquée plus d'un mois -Fièvre persistante inexpliquée (> 37,5℃, intermittente ou constante, plus d'un mois) -Candidose buccale persistante -Leucoplasie chevelue de la cavité buccale -Tuberculose pulmonaire (en cours) -Infections bactériennes graves (par exemple pneumonie, empyème, pyomyosite, infection ostéoarticulaire, méningite, bactériémie, ou infection génitale haute) -Stomatite, ou gingivite, ou parodontite aiguë nécrosante -Anémie (<8 g/dl), neutropénie (<0,5 x 10^9/L) et/ou thrombocytopénie chronique (<50 x 10^9/L) inexpliquées	-Syndrome cachectique dû au VIH -Pneumonie à *Pneumocystis* -Pneumonie bactérienne récurrente (cet épisode plus un ou plusieurs épisodes au cours des 6 derniers mois) -Infection herpétique chronique (bucco-labiale, génitale ou ano-rectale de durée supérieure à un mois, ou viscérale quel que soit le site ou la durée) -Candidose oesophagienne (ou candidose trachéale, bronchique ou pulmonaire) -Tuberculose extrapulmonaire -Sarcome de Kaposi -Infection à cytomégalovirus -Toxoplasmose cérébrale -Encéphalopathie à VIH -Cryptococcose extrapulmonaire (y compris la méningite) -Infection mycobactérienne non tuberculeuse disséminée -Leucoencéphalopathie multifocale progressive -Cryptosporidiose chronique -Isosporose chronique -Mycose disséminée (coccidioïdomycose ou histoplasmose) -Septicémie récurrente (y compris à -- Salmonella non typhoïdique) -Lymphome cérébral ou lymphome non hodgkinien à cellules B -Carcinome invasif du col de l'utérus -Leishmaniose atypique disséminée -Néphropathie symptomatique associée au VIH ou myocardiopathie symptomatique associée au VIH

Si le médecin et le patient décident de débuter le traitement antirétroviral, ils doivent choisir le traitement en fonction des situations comme résumé dans le tableau 10 ci-dessous. Le traitement de 1ère ligne comprend une association d'un INNTI et de deux INTI. En cas d'échec, un traitement de 2ème ligne comprenant un IP (lopinavir/ritonavir) et 2INTI sera débuté.

Tableau 10 : Traitement de 1ère ligne au Cambodge [NCHADS 2007]

Situation	Régime
Traitement antirétroviral standard de 1ère ligne	Stavudine + Lamivudine + Névirapine
Cas spéciale, traitements alternatifs	
Femme enceinte	Zidovudine + Lamivudine + Névirapine
Neuropathie	Zidovudine + Lamivudine + Efavirenz
Neuropathie + Anémie	Demander le conseil d'un expert
Traitement tuberculose par Rifampicine et sans Neuropathie	Stavudine + Lamivudine + Efavirenz
Traitement tuberculose par Rifampicine et avec Neuropathie	Zidovudine + Lamivudine + Efavirenz
Traitement tuberculose par Rifampicine chez la femme enceinte	Demander le conseil d'un expert
SGPT/ALAT > 5 fois la valeur normale	Stavudine + Lamivudine + Efavirenz
SGPT/ALAT > 5 fois à la valeur normale chez la femme enceinte	Demander le conseil d'un expert
Patient déjà traité par ARV	Demander le conseil d'un expert
Traitement antiretroviral standard de 2ème ligne	Didanosine + Lamivudine + Lopinavir/Ritonavir ou Ténofovir + Lamivudine + Lopinavir/Ritonavir

Afin de pouvoir traiter le maximum de patients au moindre coût, des médicaments génériques sont disponibles. Afin de garantir la qualité, l'OMS publie la liste des médicaments antirétroviraux « préqualifiés » [Calmy *et al.* 2006]. De plus, le Cambodge fait partie de la liste des pays qui bénéficient d'une aide financière par le Fonds Mondial (Global Fund).

La plupart des ARV recommandés au Cambodge sont disponibles sous forme de combinaisons entre deux ou plus ARV dans un comprimé ou dans une gélule pré-qualifié par l'OMS tels que :

- Zidovudine + lamivudine + névirapine (AZT + 3TC + NVP)
- Stavudine + lamivudine + névirapine (d4T + 3TC + NVP)

Pour favoriser la tolérance de la névirapine, le traitement est débuté pendant 15 jours avec une dose plus faible (200 mg/j). Pendant les deux première semaines il faut donc prescrire Stavudine + Lamivudine + Névirapine (d4T + 3TC + NVP), un comprimé par jour le matin ou le soir et un comprimé de Stavudine + Lamivudine (d4T + 3TC) par jour le soir ou le matin. Puis la dose de névirapine sera augmentée, le traitement sera alors : stavudine (d4T) 30 mg + lamivudine (3TC) 150 mg + névirapine (NVP) 200 mg 2 fois par jour.

Du fait de sa toxicité mitochondriale importante, la stavudine ne fait plus partie des antirétroviraux recommandés dans les pays occidentaux. Les alternatives sont la zidovudine, l'abacavir ou le ténofovir. Alors que l'Atripla, association à dose fixe d'efavirenz+tenofovir+emtricitabine, est désormais disponible dans les pays du Nord, le maintien de la stavudine dans les recommandations de l'OMS fait l'objet de débat. En effet, la toxicité aiguë et chronique de la stavudine, conduit à la survenue d'effets indésirables telles que l'acidose lactique, pouvant menacer le pronostic vital et à des modifications esthétiques en particulier du visage dues à une lipo-atrophie importante. Mais le faible coût de la stavudine, sa disponibilité, en particulier dans des associations à dose fixe qui facilitent l'adhésion des patients au traitement et le fait que ce médicament antirétroviral est une composante des schémas thérapeutiques de première intention dans de nombreux pays doivent être pris en compte. Le maintien de la stavudine dans les recommandations nationales est alors basé sur des facteurs tels que [WHO 2010] :

- le nombre de personnes devant commencer un traitement antirétroviral pour la période 2010-2015 ;
- le nombre de personnes commençant un traitement antirétroviral et présentant une co-infection VIH/tuberculose ou une co-infection VIH/hépatite B évolutive chronique ;
- l'anémie (causée par le paludisme, des parasites intestinaux, des grossesses multiples ou d'autres causes) ; en effet, la zidovudine qui pourrait remplacer la stavudine provoque des anémies et ne peut donc pas être utilisée chez ces patients ;
- les femmes enceintes ou en âge de procréer ;
- la disponibilité des associations de médicaments en doses fixes ;
- le coût des schémas thérapeutiques alternatifs ;
- la présence de structures et laboratoires pour permettre le suivi des toxicités ;
- les besoins de formation en vue de l'introduction et de la gestion de ces schémas thérapeutiques ;

- enfin, l'OMS propose un recours à la modélisation pour déterminer le rapport cout-efficacité pour une population à traiter et ainsi aider les pays à la prise de décision de la meilleure stratégie thérapeutique.

Durant le traitement par les antirétroviraux, une surveillance régulière clinique, biologique et des effets indésirables est recommandé. Un effet indésirable sévère ou interférant avec le confort du patient doit conduire si possible à changer de traitement.

Les recommandations pour le suivi biologique du traitement sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Recommandations cambodgiennes pour le suivi biologique du patient VIH, avant et pendant le traitement antirétroviral [NCHADS 2007]

analyse	Avant traitement ARV	Pendant traitement ARV
Anticorps VIH	Essentielle pour tous (dépistage)	Non recommandé
Nombre CD4	Essentielle pour tous	Essentiel tous les 6 mois
Charge Virale	Non recommandée	Optionnelle si suspicion échec thérapeutique
Hémoglobine	Essentielle si traitement par AZT	Recommandé à 1, 2, 3, mois puis tous les 3 mois si traitement par AZT
ALAT	Recommandé si traitement par NVP ou EFV	Recommandé après les 1er, 2ème, et 3ème mois de traitement par NVP ou EFV puis tous les 3 à 6 mois
Test de grossesse	Essentielle si traitement par EFV	Essentiel si traitement par EFV et suspicion de grossesse
Numération et formule sanguine	Recommander pour tous	Optionnel tous les 3 à 6 mois
Radio pulmonaire	Recommandée pour tous	indiquée si suspicion clinique de tuberculose
Créatinine	Optionnelle pour tous Essentielle si traitement par IDV ou TDF	tous les 3 à 6 mois
Phosphate	Optionnel si traitement par TDF	Optionnel tous les 3 à 6 mois si traité par TDF
Amylase	Si indiquée par signes cliniques	Si indiquée par signes cliniques
Lipides	Optionnel si traitement par stavudine ou IP	Optionnel tous les 12 mois si traitement par stavudine ou IP
Sérologie de l'hépatite B/C	Optionnel	Non recommandée

Le changement du traitement se fait pour les patients qui présentent un effet indésirable grave ou dans le cas d'échec thérapeutique. Dans ce cas, le NCHADS recommande si possible de changer tous les médicaments antirétroviraux.

L'échec thérapeutique est possible à cause des facteurs suivants :

- Échec clinique : patient qui présente de nouveaux signes cliniques ou des maladies opportunistes après traitement pendant au moins 3 mois.
- Échec immunologique : absence d'augmentation des lymphocytes CD4 de 20 à 25 cellules/mm^3 pendant 12 mois de traitement par ARV. On parle également d'échec immunologique chez des patients qui avaient une restauration immunitaire sous traitement et chez lesquels les CD4 chutent de plus de 50 % sans maladie opportuniste.
- Échec virologique : persistance d'une réplication virale sous traitement ou d'une augmentation de la charge virale qui était devenu indétectable sous traitement.

En cas d'échec thérapeutique, il faut comprendre les raisons de l'échec, mauvaise adhésion au traitement, effets indésirables importants. S'il s'agit d'une mauvaise adhésion, le renforcement de l'éducation thérapeutique peut amener le patient en succès thérapeutique. Si l'un des médicaments est mal toléré, un changement de l'une des molécules de la trithérapie peut améliorer la qualité de vie et l'adhésion. En cas d'échec thérapeutique avéré, il est nécessaire de passer du traitement de $1^{ère}$ ligne au traitement de $2^{ème}$ ligne qui associe un inhibiteur de protéase, le lopinavir associé au ritonavir et deux analogues nucléosidiques, la didanosine (ou le ténofovir) et la lamivudine.

1.2.3 Présentation des deux INNTI étudiés

1.2.3.1 Névirapine

La névirapine est un puissant inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1. Elle a été la première INNTI mise sur le marché.

En France, elle a bénéficié d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte à partir du 22 septembre 1997 et a obtenu en février 1998 l'AMM européenne selon une procédure centralisée.

Comme vu précédemment, au Cambodge, la névirapine est utilisée en première intention dans le traitement des infections par le VIH en association avec deux inhibiteurs nucléosidiques.

1.2.3.1.1 Propriétés physico-chimiques

Le nom chimique de la névirapine est 11-cyclopropyl-5, 11-dihydro-4 méthyl-6H-dipyrido (1, 4) diazépin-6-one, avec une formule brute de $C_{15}H_{14}N_4O$ avec un poids moléculaire de 266,302. Elle appartient à la famille chimique des dipyridodiazépinones.

La névirapine est une poudre presque blanche. Elle est pratiquement insoluble dans l'eau et légèrement soluble dans le dichlorométhane et le méthanol.

La formule développée de la névirapine est présentée sur la figure 4.

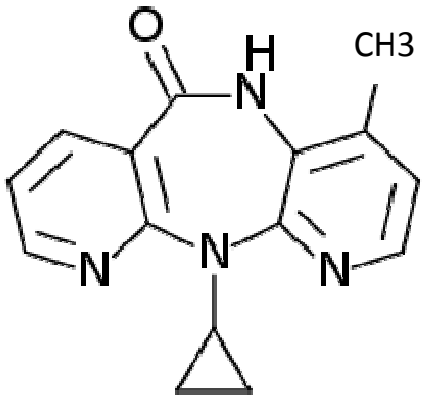


Figure 4 : Structure chimique de la Névirapine

1.2.3.1.2 Posologie et modes d'administration

La névirapine est disponible sous forme de comprimé à 200 mg. Elle est administrée par voie orale. La posologie est de 1 comprimé une fois par jour pendant les 14 premiers jours puis de 1 comprimé deux fois par jour. Cette augmentation progressive de la posologie permet d'éviter les concentrations élevées en début de traitement, avant que l'auto-induction ne diminue les concentrations ce qui limite l'apparition d'effets indésirables en début de traitement. La névirapine ne doit pas être administrée en monothérapie pour éviter la sélection de souches virales résistantes.

1.2.3.1.3 Caractéristiques pharmacologiques

Comme déjà signalé, la névirapine se lie directement à la transcriptase inverse et bloque les activités ADN-polymérase dépendantes de l'ARN et de l'ADN en perturbant le site catalytique de l'enzyme. Elle n'inhibe pas la transcriptase inverse du VIH-2 et les ADN-polymérases des eucaryotes (par exemple les ADN-polymérases humaines alpha, bêta, gamma ou delta) (http://www.drugbank.ca/drugs/DB00238).

La névirapine est bien absorbée après administration orale (> 90%) chez les volontaires sains et les adultes infectés par le VIH-1. Son absorption n'est pas modifiée par la prise de nourriture, les traitements antiacides ou les médicaments contenant un tampon alcalin (par exemple la didanosine).

La névirapine est lipophile et est essentiellement sous forme non ionisée au pH physiologique. Elle est liée aux protéines plasmatiques à 60% pour des concentrations plasmatiques comprises entre 1 à 10 µg/mL retrouvées à la posologie utilisée en thérapeutique et diffuse dans tous les tissus y compris le système nerveux central. La concentration dans le liquide céphalorachidien humain est égale à 45 ± 5% de la concentration plasmatique.

Elle traverse facilement la barrière placentaire et est excrétée dans le lait maternel.

L'élimination de la névirapine se fait principalement par voie urinaire (> 80 % de la dose administrée) principalement sous forme de métabolites glucuronoconjugués et sous forme inchangée (< 5 % de la dose administrée). Environ 10 % d'une dose de névirapine sont éliminés par voie fécale. L'étude de [Riska *et al.* 1999] montre que la névirapine est éliminée principalement par métabolisme avec formation de métabolites hydroxylés, les 2-hydroxy, 3-hydroxy, 4-hydroxy, 8-hydroxy et 12-hydroxy névirapine qui sont par la suite glucuronoconjugués et éliminés dans les urines (figure 5). Ces métabolites représentent plus de 80% de la dose administrée.

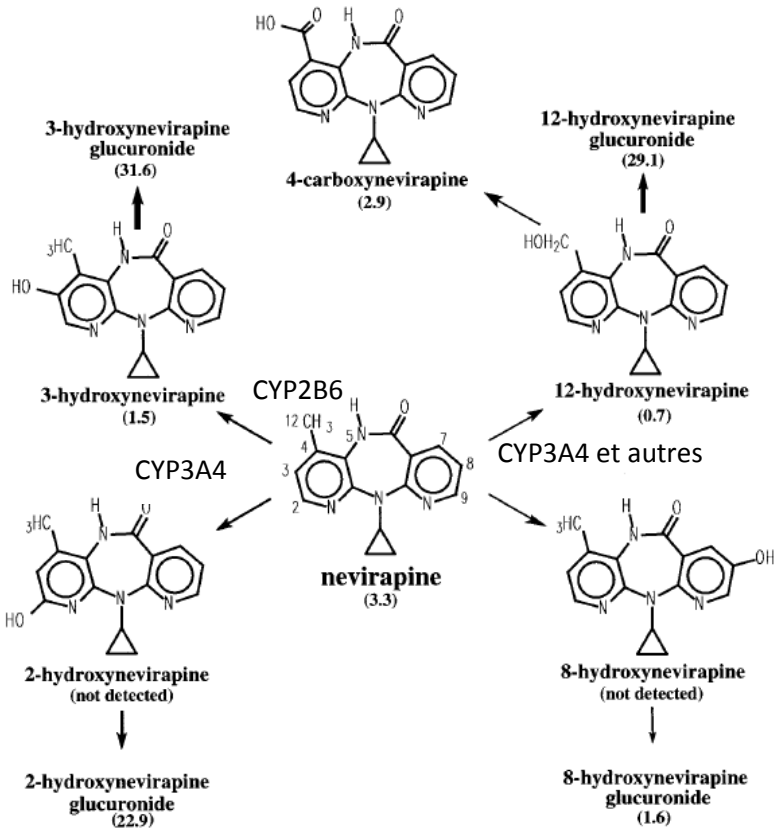


Figure 5 : Biotransformation de la névirapine chez l'homme.

Les métabolites sont largement excrétés dans l'urine, sous forme de 2-hydroxynevirapine glucuronide (22,9 %), 3-hydroxynevirapine glucuronide (31,6 %),12-hydroxynevirapine glucuronide (29,1 %) et 4-carboxy névirapine (2,9 %) d'après [Riska *et al.* 1999]

Il existe peu de données sur les enzymes qui participent à la formation de ces métabolites. Les CYP 3A4 et CYP2B6 participeraient respectivement à la formation des 2- et 3-hydroxy névirapine, tandis que le CYP 3A4 jouerait un rôle dans la formation du métabolite 12-hydroxy névirapine. Les CYP2D6 ou CYP2C9 pourraient également jouer un rôle (figure 6) [Erickson *et al.* 1999]. Une étude récente montre que la 2-hydroxy névirapine ou un métabolite intermédiaire serait inhibiteur du CYP3A4 [Wen *et al.* 2009]. A des doses supérieures à la dose thérapeutique, la névirapine pourrait inhiber l'activité du CYP 3A4.

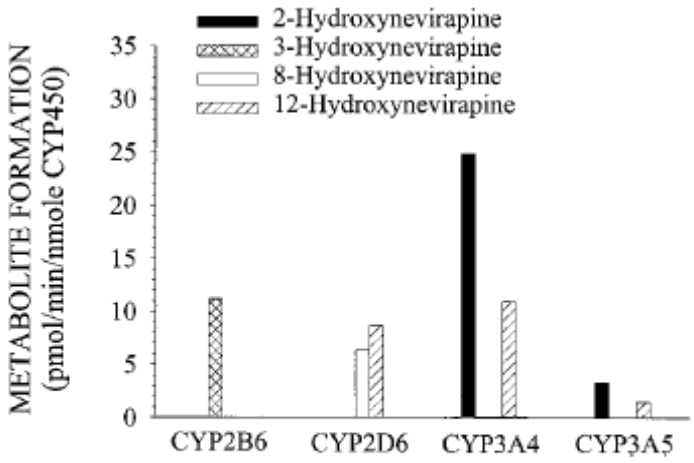


FIG. 2. *In vitro biotransformation of 50 μM NVP (except CYP3A5, where 100 μM NVP was used) by microsomes from human B-lymphoblastoid cells expressing specific human CYPs.*

Figure 6 : cytochromes impliqués dans la formation des métabolites de la névirapine d'après Erickson et al. 1999

La névirapine est un inducteur des enzymes du cytochrome P450 hépatique. Cet effet inducteur entraîne d'une part un phénomène d'auto-induction, d'autre part des interactions avec d'autres médicaments métabolisés par la même voie qui peuvent entraîner une diminution des concentrations et de l'activité de ces médicaments en cas de co-administrations. Du fait du phénomène d'auto-induction, les caractéristiques pharmacocinétiques sont différentes après administration d'une dose unique et à l'état d'équilibre après administrations répétées [Lamson *et al.* 1999; Zhou *et al.* 1999; Sabo *et al.* 2000; de Maat *et al.* 2002; Dailly *et al.* 2004; Marier *et al.* 2007; Molto *et al.* 2008].

La demi-vie de la névirapine est longue et est à l'équilibre de 25 à 30 heures.

La zone de concentration plasmatique résiduelle de la névirapine, habituellement efficace sur les virus sensibles est située entre 3000 à 8000 ng/ml. Ce sont les concentrations rencontrées à la posologie recommandée chez les patients adhérents à leur traitement [Yeni 2010].

1.2.3.1.4 Effets indésirables

Les principaux effets indésirables de la névirapine sont les rashs cutanés et les hépatites qui surviennent essentiellement dans les 6 premières semaines et qui sont potentiellement sévères. Le risque de réaction d'hypersensibilité à la nevirapine (hépatite sévère et/ou rash

sévère) semble plus élevé chez les patients ayant l'haplotype HLA-DRB1*0101 [Haas *et al.* 2005]. Une étude récente [Yuan *et al.* 2011] réalisée chez plus de 800 patients nord-américains, d'origine géographique différente montre que plusieurs polymorphismes sont impliqués (tableau 12) et donc qu'aucune recommandation en particulier de dépistage pharmacogénétique ne peut être faite à l'heure actuelle pour éviter la survenue de ces effets indésirables.

Tableau 12 : Effets indésirables de la névirapine et marqueurs génétiques [Yuan et al. 2011]

Adverse event	Genotype markers	Patient race	Odds Ratio
Hepatic	*HLA-DRB1*01*	White	3.02 (1.66-5.49)
Rash	*HLA-Cw*04*	White, Black,	
		Asian	2.52 (1.73-3.62) in total
	*HLA-B*35*	Asian	3.47 (1.58-7.61)
	CYP2B6 polymorphisms	White, Black,	
		Asian	1.66 in total
Rash	*HLA-B*35* and *HLA-Cw*04*	Asian (Thai)	18.34 (5.10-65.99) in Asian
	CYP2B6 516TT and *HLA-Cw*04*	White, Black, Asian	6.31 (2.53-15.73) in total 18.90 (3.07-116.21) in Black

1.2.3.2 Efavirenz

L'efavirenz est un inhibiteur non nucléosidique de la réverse transcriptase du VIH 1. Il est approuvé aux Etats Unis depuis 1998 pour le traitement de l'infection VIH en association avec deux INTI comme déjà mentionné. En France, il a obtenu l'AMM en mai 1999.

Au Cambodge, ce médicament est conseillé pour le traitement de 1ère intension chez les patients coinfectés par le VIH et la tuberculose, puisqu'il est plus onéreux que la névirapine, mais que l'interaction avec la rifampicine est modérée et ne nécessite pas d'augmenter la posologie [NCHADS 2007]. Les résultats de l'essai ANRS-CIPRA CAMELIA montrent l'efficacité de cette association[Blanc *et al.* 2011]

1.2.3.2.1 Propriétés physico-chimiques

Le nom chimique est (S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1-4-dihydro-(trifluoromethyl)-2-dihydro-3,1-benzoxazin-2-one. Sa formule brute est $C_{14}H_9F_3ClNO_2$ et sa formule développée est la suivante (Figure 7) :

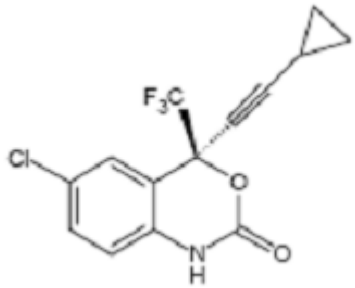


Figure 7 : Structure chimique de l'efavirenz

L'efavirenz se présente sous forme d'une poudre blanche légèrement cristalline rose, elle a un poids moléculaire de 315,68 g/mol. Elle a une propriété basique et est peu soluble dans l'eau (9 mg/L), sa constante de dissociation pKa est de 10,15.

1.2.3.2.2 Posologie et modes d'administration

L'efavirenz est commercialisée sous le nom de Sustiva® ou Stocrin® en Europe et aux Etats Unis. Il existe sous différentes formes, comme les gélules à 50, 100, 200 mg, une solution buvable à 30 mg/mL dans un flacon de 180 mL et une forme comprimé de 600 mg. Il existe aussi une forme de comprimé combiné d'efavirenz 600 mg + 200 mg emtricabine + 300 mg de ténofovir fumarate, son nom commercial est Atripla.
La posologie recommandée est de un comprimé de 600 mg en une seule prise par jour au coucher sans alimentation pour les adultes en association avec 2INTI.

1.2.3.2.3 Caractéristiques pharmacologiques

L'efavirenz est un inhibiteur sélectif non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1. Il se lie directement à la transcriptase inverse du VIH-1 et n'inhibe pas de manière significative la transcriptase inverse du VIH-2, ni les ADN polymérases alpha, bêta, gamma ou delta cellulaires. L'efavirenz se lie directement à la transcriptase inverse et inhibe la transformation de l'ARN viral en ADN. Bien que le mécanisme de résistance ou la diminution de susceptibilité à l'efavirenz n'ait pas été déterminée pleinement, le principal mécanisme de résistance semble être lié à la mutation de la transcriptase inverse du VIH [Rakhmanina et van den Ankerb 2010].

La concentration maximale de l'efavirenz survient environ 5 h après la prise et est comprise entre 0,51 et 2,9 mg/L après administration d'une dose unique de 100 à 1600 mg chez le volontaire sain. L'absorption est un peu augmentée si l'efavirenz est administré avec le repas surtout si le repas est riche en lipide. Le délai nécessaire pour obtenir la concentration plasmatique maximale est de 3 à 5 heures après une prise et reste inchangé après des doses multiples. Les concentrations plasmatiques atteignent l'état d'équilibre au bout de 6 à 7 jours.

L'efavirenz est fortement lié aux protéines plasmatiques humaines (de 99,5 à 99,75 % environ), et surtout à l'albumine. Il traverse la barrière hémato encéphalique, ce qui explique les effets indésirables de type neurologiques [Adkins et Noble 1998]. La concentration de l'efavirenz dans le système nerveux central est faible par rapport à la concentration plasmatique totale, mais est trois fois plus élevée que l'efavirenz libre dans le plasma. Le groupe CHARTER a d'ailleurs récemment montré la bonne efficacité de l'éfavirenz [Best *et al.* 2011]. De même, il a été démontré récemment que les concentrations d'éfavirenz non lié aux protéines étaient très proches dans le liquide séminal et le plasma, avec une médiane du rapport de ces concentrations libres de 1,21, ce qui fait dire aux auteurs que le liquide séminal n'est pas un sanctuaire au regard de l'éfavirenz [Avery *et al.* 2011; Bristol-Myers Squibb 2011].

L'efavirenz est métabolisé dans le foie, principalement par le cytochrome P450. Le métabolisme par les isoenzymes CYP 3A4 et surtout 2B6 donne des métabolites hydroxylés dont l'activité antirétrovirale est faible. Le polymorphisme génétique des isoformes du CYP2B6 explique une partie de la variabilité interindividuelle des concentrations de l'éfavirenz (Figure 8). Le principal métabolite est le 8-hydroxy-éfavirenz qui est transformé en 8, 14-dihydroxy-éfavirenz. La formation de ces métabolites est catalysée par le CYP 2B6 [Ward *et al.* 2003]. La contribution de la 7-hydroxylation à la clairance de l'éfavirenz est faible. Une étude réalisée par di Iulio et al. a montré que le CYP2A6 est responsable de la 7-hydroxylation [di Iulio *et al.* 2009]. L'effet du polymorphisme du CYP2B6 sur la pharmacocinétique et les concentrations plasmatiques de l'éfavirenz a fait l'objet de plusieurs études surtout dans des populations caucasiennes ou africaines. Dès 2004, Haas et al. ont montré que la présence de l'allèle T du CYP2B6 516G>T est fortement associé à la concentration plasmatique élevée de l'efavirenz, et à l'augmentation de la toxicité de

l'efavirenz [Haas *et al.* 2004]. Cette mutation a été aussi associée à une demi-vie d'élimination prolongée et une augmentation du risque de développement de résistance du virus lors de l'arrêt d'un traitement antirétroviral comprenant de l'efavirenz [Ribaudo *et al.* 2006]. L'importance du polymorphisme du CYP2A6 chez les patients métaboliseurs lents pour le CYP2B6 a été démontrée par plusieurs équipes [di Iulio *et al.* 2009; [Kwara *et al.* 2009]. Les métabolites de l'efavirenz subissent ensuite une réaction de conjugaison (principalement glucuronoconjugaison) et sont ensuite excrétés par voie biliaire et urinaire [Ward *et al.* 2003].

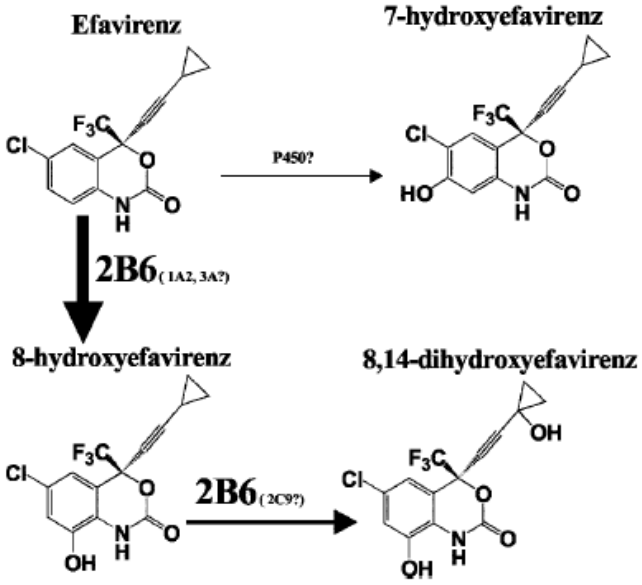


Figure 8 : Biotransformation de l'efavirenz d'après [Ward et al. 2003]

La concentration intracellulaire de l'éfavirenz et le génotype du CYP2B6 sont les prédicteurs de toxicité neuropsychologique de l'éfavirenz [Rotger *et al.* 2005].

Bien que des études *in vitro* aient montré que l'éfavirenz inhibe les isoenzymes 2C9, 2C19 et 3A4, *in vivo* c'est l'effet inducteur de l'éfavirenz qui semble prédominer. Par précaution, l'éfavirenz ne doit pas être administré simultanément avec des médicaments métabolisés par ces isoenzymes et à marge thérapeutique étroite tels que l'astémizole, le cisapride (qui n'est plus commercialisé en France), le midazolam, triazolam, pimozide, bépridil, ou les alcaloïdes de l'ergot de seigle. Une interaction entre l'éfavirenz et les inhibiteurs de l' hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase (ou statines) tels que l'atorvastatine, ou la simvastatine qui sont métabolisées par CYP3A4 a été démontrée [Maggiolo 2009]. Ces interactions sont moins importantes qu'avec les inhibiteurs de la

protéase, fortement inhibiteurs du CYP3A. Les médicaments qui induisent l'activité du CYP2B6 augmenteront la clairance de l'éfavirenz avec pour conséquence une diminution de la concentration plasmatique de l'efavirenz.

1.2.3.2.4 Effets indésirables

L'administration de l'éfavirenz avec de la nourriture peut augmenter l'exposition à l'éfavirenz et peut entraîner une augmentation de la fréquence des effets indésirables. L'éfavirenz est contre indiqué pendant les 3 premiers mois de la grossesse, car potentiellement tératogène pour le foetus. Les effets indésirables les plus courants lors de l'utilisation de l'efavirenz sont des réactions allergiques et des troubles neurologiques tels que des étourdissements, une difficulté à s'endormir ou à se concentrer, une somnolence pendant la journée. Moins fréquemment surviennent des rêves intenses (peuvent être agréables ou désagréables) ou des hallucinations. Ces effets neurologiques se produisent chez au moins la moitié des patients qui utilisent l'éfavirenz et ce dès le premier ou le deuxième jour du traitement, mais s'atténuent souvent après un ou deux mois de traitement [Bristol-Myers Squibb 2011]. L'éfavirenz est susceptible de provoquer des éruptions cutanées chez certains patients. Celles-ci surviennent habituellement pendant la deuxième semaine du traitement. En général, les éruptions cutanées causées par l'éfavirenz ne sont pas graves et disparaissent après environ deux semaines sans qu'un traitement spécial soit nécessaire. Dans de rares cas, l'éruption peut s'aggraver considérablement. L'éfavirenz peut également augmenter le taux des enzymes hépatiques. L'éfavirenz est également associé à une augmentation du taux de cholestérol sanguin et des triglycérides. [Rakhmanina et van den Ankerb 2010]

1.2.3.2.5 Relations entre pharmacocinétique/pharmacogénétique et pharmacodynamie

L'étude de Marzolini et al en 2001 a montré que la variabilité inter individuelle des concentrations d'éfavirenz était grande mais la variabilité intra individuelle faible. Cinquante pour cent des patients ayant une concentration d'efavirenz inférieure à 1000 ng/mL ont présenté un échec virologique. Certains patients ayant une concentration supérieure à 4000 ng/mL ont présenté une toxicité du système nerveux central. L'intervalle thérapeutique optimal de la concentration d'éfavirenz proposé est compris entre 1000 ng/mL et 4000 ng/mL, comme le montre la figure 9 [Marzolini *et al.* 2001].

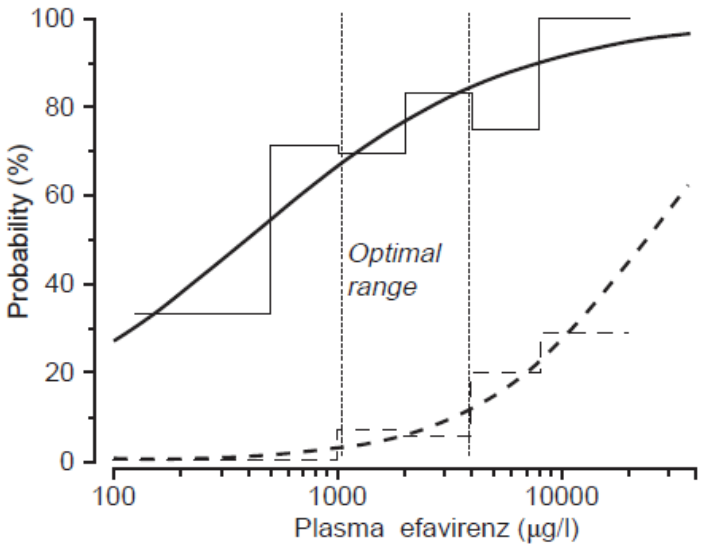


Figure 9 : Valeur prédictive de la concentration d'efavirenz pour obtenir une charge virale indétectable (_____) ou les effets indésirables neurologiques (----). *Les fréquences observées sont les lignes en « escalier » et les régressions logistiques sont les courbes. Une zone thérapeutique optimale est proposée entre 1000 et 4000 µg/L.* D'après Marzolini et al. 2001

L'étude de Rotger et al. (2005) a montré que la concentration intracellulaire de l'efavirenz et le génotype du *CYP2B6* sont prédictifs de la toxicité neuropsychologique de l'efavirenz [Rotger *et al.* 2005]. L'étude de Haas et al. (2005) a montré que parmi les patients traités par l'efavirenz, le variant génotypique *MDR1 3435 TT* est associé avec une diminution de l'échec virologique de l'éfavirenz et une diminution de la résistance du virus à l'éfavirenz sans relation avec l'exposition (ou les concentrations) plasmatiques de l'éfavirenz [Haas *et al.* 2005].

1.3 Pharmacogénétique et métabolisme des médicaments

1.3.1 Généralités sur les enzymes et transporteurs

Après administration, les médicaments administrés per os doivent être absorbés puis ils doivent pénétrer dans le compartiment vasculaire pour atteindre leur cible. Lorsqu'ils franchissent la barrière intestinale, au niveau de laquelle il existe des transporteurs destinés à les expulser (protéine de phase 3 représentée par exemple par la P-glycoprotéine ou P-gp), codés par le gène *MDR1* (ou *ABCB1*) et des enzymes qui dans certains cas débutent le processus de métabolisme, c'est l'effet de premier passage (figure 10).

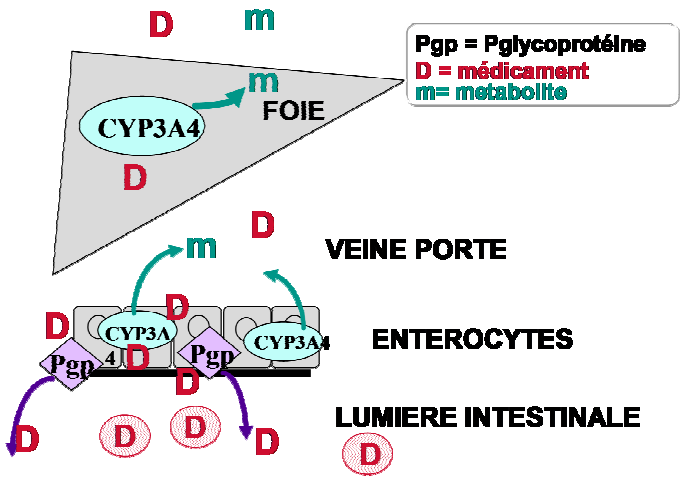


Figure 10 : représentation schématique du métabolisme des médicaments et de l'effet de premier passage après administration orale

Ces médicaments sont ensuite métabolisés essentiellement au niveau hépatique. Pour pénétrer dans les cellules, il existe des transporteurs d'entrée, les « solute carrier transporters » codés par les gènes dénommés SLC.

Il existe 2 groupes d'enzymes qui participent à la biotransformation des médicaments (figure 11):

- Les protéines de phase 1 sont des enzymes de fonctionnalisation qui catalysent les réactions d'oxygénation, d'oxydoréduction ou d'hydrolyse. Les cytochromes P450 (CYP450 ou CYP) participent en majorité aux réactions phase 1. Ce sont ceux dont nous développerons les caractéristiques dans la suite de ce chapitre. Il existe plusieurs familles, nommés CYP1, CYP2…en fonction de l'homologie de la structure protéique. Le tableau 14 présenté page 49 liste les principales familles et leurs substrats.

- Les protéines de phase 2 sont des transférases qui catalysent les réactions de conjugaison par greffage d'un radical acétyl, sulfate, glucuronate, méthyl, ou encore glutathion.

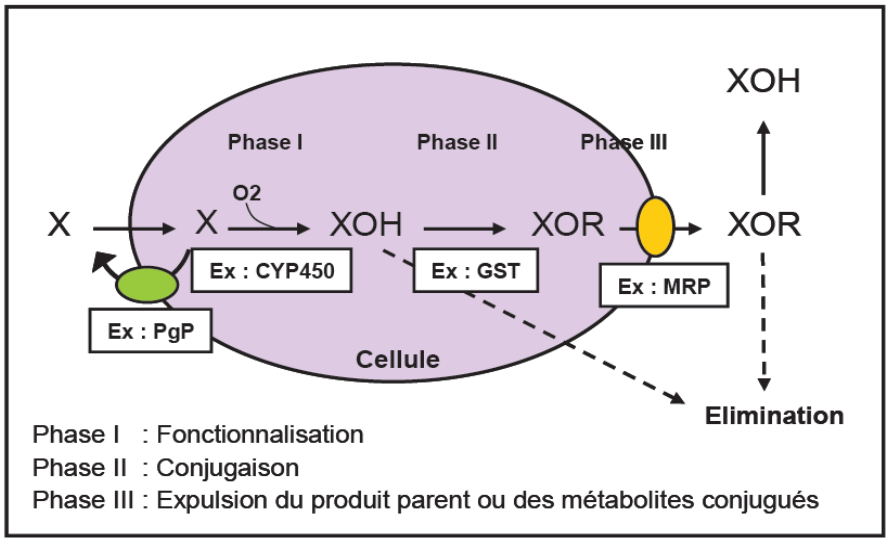


Figure 11 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques.
PgP : P-glycoprotéine ; CYP450 : cytochromes P450 ; GST : Glutathion S-transférases ; MRP : Multi Drug Resistance Proteins ; X : Xénobiotique hydrophobe ; XOH et XOR : métabolites plus polaires du xénobiotique [Allorge et Loriot 2004]

Pour sortir de la cellule, les médicaments ou les métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane cellulaire par des transporteurs d'efflux tels que les protéines MRP qui appartiennent, comme la P-glycoprotéine, aux transporteurs ATP dépendants [Allorge et Loriot 2004] ou transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ces transporteurs peuvent également transporter les médicaments non métabolisés au niveau de barrières cellulaires comme la barrière intestinale, la barrière hémato encéphalique, comme le montrent la figure 12A ou au niveau de cellules tels que les lymphocytes (figure 12B). Il existe également des transporteurs qui facilitent l'entrée des médicaments dans la cellule ou transporteurs d'influx, tels que les transporteurs OAT, OATP ou OCT selon qu'ils facilitent l'entrée des anions ou des cations. Ces transporteurs sont codés par les gènes SLC. donc deux groupes de transporteurs, les transporteurs d'entrée ou d'influx codés par les gènes SLC et les transporteurs facilitant la sortie ou efflux des xénobiotiques des cellules et qui nécessitent de l'ATP, codés par les gènes ABC pour « ATP binding cassette ».

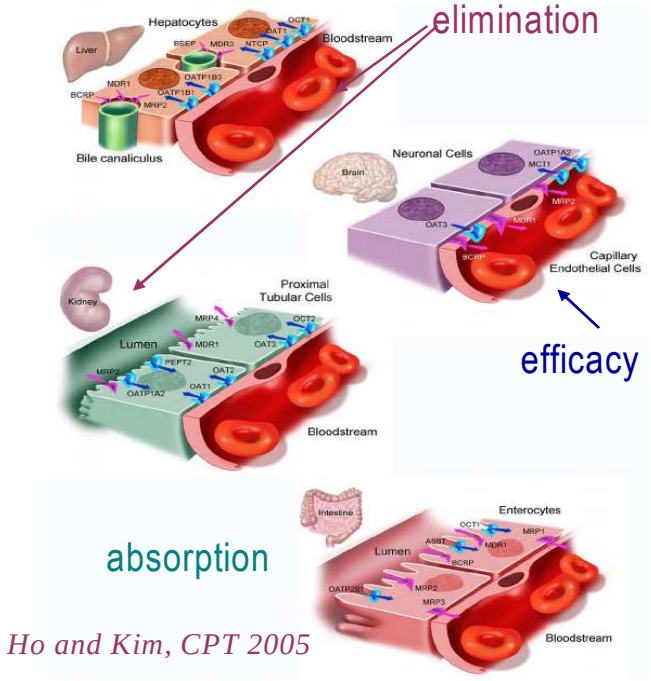


Figure 12A : exemple de transporteurs impliqués au niveau de différents organes participant à l'absorption (entérocytes) ou à l'élimination des médicaments (hépatocytes et cellules tubulaires rénales) voire expliquant l'efficacité/toxicité au niveau de la barrière hémato-meningée d'après [Ho et Kim 2005].

La figure 12B montre que les médicaments antirétroviraux, principalement les INTI et les IP sont des substrats de ces transporteurs.

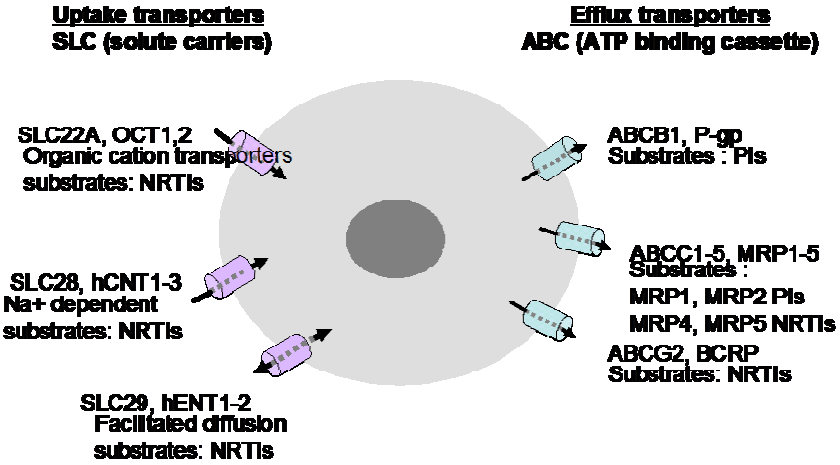


Figure 12B : Différents transporteurs d'entrée ou de sortie de la cellule d'après [Bazzoli *et al.* 2010].

Le tableau 13 ci-dessous résume les principales familles de transporteurs identifiées et leurs principaux substrats.

Tableau 1 : Principaux transporteurs hépatiques et rénaux avec leur substrat type [Cropp *et al.* 2008]

Gene symbol	Protein name	Full protein name	Representative substrates
Influx transporters			
SLC22A1	OCT1	Organic cation transporter 1	Metformin, oxaliplatin
SLC22A2	OCT2	Organic cation transporter 2	Metformin, amantidine
SLC22A4	OCTN1	Novel organic cation transporter 1	Gabapentin
SLC22A5	OCTN2	Novel organic cation transporter 2	Carnitine
SLC22A6	OAT1	Organic anion transporter 1	Adefovir, tenofovir
SLC22A7	OAT2	Organic anion transporter 2	Ganciclovir, allopurinol
SLC22A8	OAT3	Organic anion transporter 3	Cimetidine, cefotaxime
SLC22A11	OAT4	Organic anion transporter 4	Bumetanide, ketoprofen
SLC22A12	URAT1	Urate anion exchanger 1	Uric acid, oxypurinol
SLCO1A2	OATP1A2	Organic anion transporting polypeptide A	Methotrexate, fexofenadine
SLCO1B1	OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide C	Pravastatin, repaglinide
SLCO1B3	OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 8	Digoxin, paclitaxel
SLCO2B1	OATP2B1	Organic anion transporting polypeptide B	Atorvastatin, benzylpenicillin
SLC47A1	MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1	Cimetidine, metformin
SLC47A2	MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion 2	Cimetidine, metformin
Efflux transporters			
ABCB1	P-gp	P-glycoprotein	Etoposide, imantinib
ABCB11	BSEP	Bile salt export pump	Paclitaxel
ABCC1	MRP1	Multidrug resistance–associated protein 1	Methotrexate
ABCC2	MRP2	Multidrug resistance–associated protein 2	Doxorubicin, cisplatin
ABCC3	MRP3	Multidrug resistance–associated protein 3	Etoposide, methotrexate
ABCC4	MRP4	Multidrug resistance–associated protein 4	Methotrexate
ABCC6	MRP6	Multidrug resistance–associated protein 6	Anthracyclines
ABCG2	BCRP	Breast cancer resistance protein	Mitoxantrone, doxorubicin

ABC, adenosine triphosphate–binding cassette; SLC, solute carrier.

Le résultat final est une biotransformation de la grande majorité des médicaments lipophiles avec la production de métabolites généralement non toxiques et éliminés dans la bile et les urines. Les enzymes qui catalysent ces réactions ont des propriétés en commun : ce sont des superfamilles d'enzymes comprenant de nombreuses isoformes ; ces isoformes ont une spécificité relative et chevauchante et sont donc redondantes ; ces enzymes sont peu efficaces ; leur expression est très variable en fonction de facteurs génétiques et environnementaux [Beaune 2007]. Outre ces biotransformations, le passage des médicaments au travers des membrannes est facilité par des transporteurs d'entrée (codés par les gènes de la famille SLC) ou de sortie, d'efflux (codés par les gènes de la famille ABC). Les études en particulier pharmacogénétiques sur les CYP sont nombreuses, celles sur les

transporteurs sont plus récentes. Elles permettent d'expliquer une partie de la variabilité de la pharmacocinétique des médicaments.

En fonction des sites d'expression, les enzymes et transporteurs jouent un rôle plus ou moins important dans le niveau d'exposition des médicaments antirétroviraux tant au niveau systémique (biotransformations et effet de premier passage, entrée et sortie des cellules qui participent à l'absorption ou l'élimination des molécules, telles que entérocytes, cellules tubulaires du néphron ou hépatocytes), qu'au niveau des réservoirs anatomiques du VIH (expression des transporteurs d'entrée et de sortie au niveau de la barrière hémato encéphalique, des cellules du liquide séminale ou du tractus génital de la femme). Le rôle des transporteurs dans la thérapie antirétrovirale a été résumé par Kis et al 2009. Ainsi, les INTI sont des substrats de nombreux transporteurs, par exemple la zidovudine est substrat de OAT1, OAT2, MRP4 et BCRP. Le ténofovir est substrat de la P-glycoprotéine ou MDR1, premier transporteur d 'efflux identifié, de BCRP, MRP4 et de OAT1 et OAT3. La balance « influx-efflux » est fonction de divers facteurs entre autres de la quantité de transporteurs exprimée et de l'affinité des substrats. Ainsi, le passage des INTI au niveau cérébral pourrait être lié entre autres à leur affinité pour les transporteurs SLC. A l'inverse les transporteurs ABC limite le passage de nombreux médicaments tels que les IP. Certaines de ces protéines de transport peuvent être inhibées ou induite, ainsi la P-glycoprotéine est inhibée par le ritonavir et induite par l'éfavirenz.

1.3.2 Variabilité interindividuelle

Les activités de chaque CYP sont très variables d'un individu à l'autre. Ces variations sont liées à plusieurs facteurs tels que les facteurs environnementaux (alimentation…), les facteurs physiopathologiques et les interactions médicamenteuses dues à une induction ou une inhibition de l'activité du CYP. Par conséquent ces phénomènes peuvent influencer l'efficacité thérapeutique ou provoquer des effets indésirables. Parmi ces facteurs, nous décrirons ceux qui sont à l'heure actuelle les mieux étudiés, les phénomènes d'induction ou d'inhibition, sources de nombreuses interactions médicamenteuses, en particulier avec certains médicaments antirétroviraux et le polymorphisme génétique.

1.3.2.1 Induction et inhibition enzymatique

Une induction des CYP entraîne une accélération du métabolisme des médicaments par l'augmentation de la synthèse des protéines enzymatiques. Plusieurs facteurs peuvent déterminer l'importance de l'induction enzymatique, y compris la demi-vie des médicaments et le « turn-over » de l'enzyme, conduisant à un délai avant que l'activité enzymatique augmente [Wilkinson 2005]. Il est maintenant largement admis que l'induction enzymatique est liée à la fixation des xénobiotiques à des récepteurs nucléaires. Le complexe récepteur-ligand nucléaire se lie à l'ADN et régule l'expression des gènes adjacents [Handschin et Meyer 2003]. La famille CYP1 est induite par l'activation de la voie AhR (Aryl-hydrocarbone), tandis que les familles CYP2, CYP3 et CYP4 sont induites par l'activation de PXR (pregnane X receptor), CAR (Constitutive Androstane Receptor) ou les récepteurs GR (glucocorticoid receptors), VDR (vitamin D receptor) ou PPAR α (peroxysome proliferating activated receptor α) [Tirona et Kim 2005].

L'inducteur en se fixant sur un récepteur nucléaire stimule la transcription de l'ADN en ARNm du gène codant pour un cytochrome ou un transporteur suivi par la translation de l'ARNm et l'augmentation de la biosynthèse de la protéine enzymatique. Ainsi par exemple, le récepteur pregnane X (PXR) est activé par la rifampicine et induit principalement le CYP3A, et le récepteur androstane (CAR) est activé par le phénobarbital et induit les CYP2B, mais la sélectivité de l'induction est faible [Wang et LeCluyse 2003]. Sur le plan pharmacocinétique, l'induction va se traduire par, soit une diminution de l'efficacité si les métabolites sont inactifs, soit une efficacité peu modifiée si les métabolites sont actifs ou une augmentation de la toxicité si les métabolites sont réactifs. Les familles des CYP1A, CYP2B CYP2C, et CYP3A (tableau 14) sont potentiellement inductibles par les xénobiotiques [Handschin et Meyer 2003]. L'effet d'un inducteur est maximal au bout de 10 à 15 jours, temps nécessaire pour la synthèse protéique. La rifampicine, médicament largement utilisé comme antituberculeux est un des plus puissants inducteurs enzymatiques connus.

Une inhibition de l'activité d'un cytochrome P-450 par certains médicaments ou certaines substances exogènes dits inhibiteurs enzymatiques conduit à un ralentissement des biotansformations de certains médicaments co-administrés. L'inhibiteur enzymatique potentialise l'effet pharmacologique du médicament co-administré. L'inhibition enzymatique peut être réversible (compétitive ou non compétitive) ou irréversible, dans ce cas le substrat

ou un de ses métabolites inactive la protéine enzymatique [Jana et Paliwal 2007]. Un tel mécanisme a été démontré pour un des métabolites de la névirapine [Wen *et al.* 2009].

L'effet d'un inhibiteur sur le métabolisme des médicaments dépend de nombreux facteurs tels que la dose et la capacité de l'inhibiteur à se lier à l'enzyme (affinité). Un médicament peut être métabolisé et être inhibiteur de la même enzyme ou il peut inhiber certaines enzymes indépendamment d'être un substrat de cette enzyme. L'effet d'un inhibiteur est immédiat et entraîne une diminution de clairance et une augmentation des concentrations du médicament associé. Les médicaments inhibiteurs sont nombreux (cf tableau 14). Le ritonavir est un des plus puissants inhibiteurs du CYP3A, associé à dessein à certains inhibiteurs de la protéase du VIH pour inhiber leur métabolisme et améliorer leur biodisponibilité et diminuer leur clairance, augmentant ainsi l'exposition et l'efficacité de ces puissants inhibiteurs de la protéase du VIH [Kaplan et Hicks 2005]. Des travaux récents ont montré que le ritonavir se fixe sur le site protéique du CYP3A et se fixe de façon irréversible sur le fer de l'hème, empêchant toute réaction d'oxydation ultérieure [Sevrioukova et Poulos 2010]. Le tableau 14 présente les principaux substrats, inducteurs enzymatiques ou inhibiteurs des CYP 450.

Tableau 2 : Les substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP 450. D'après le site internet de Faculté de Medecine, Université Indiana, Indianapolis, USA (http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp)

1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4,5,7
Substrats amitriptyline caffeine clomipramine estradiol haloperidol imipramine N-DeMe acetaminophen→NAPQI propranolol verapamil (R)warfarin	**Substrats** bupropion cyclophosphamide efavirenz ifosphamide methadone sorafenib	**Substrats** amodiaquine cerivastatin paclitaxel repaglinide sorafenib torsemide	**Substrats** diclofenac piroxicam glipizide losartan, irbesartan glibenclamide tolbutamide amitriptyline, fluoxetine, tamoxifen,	**Substrats** lansoprazole omeprazole diazepam→Nor phenobarbitone amitriptyline chloramphenicol clopidogrel cyclophosphamide imipramine N-DeME, nelfinavir progesterone propranolol R-warfarin→8-OH	**Substrats** Tamoxifen carvedilol amitriptyline, fluoxetine, imipramine, haloperidol alprenolol, amphetamine chlorpheniramine chlorpromazine codeine (→O-desMe) metoclopramide, promethazine, propranolol,	**Substrats** enflurane halothane isoflurane methoxyflurane sevoflurane acetaminophen→NAPQI aniline, benzene, ethanol N,N-dimethylformamide theophylline→8-OH	**Substrats** clarithromycin, erythromycin (non 3A5) quinidine→3-OH (not 3A5) alprazolam,diazepam→3OH,midazolam cyclosporine, tacrolimus (FK506) indinavir, nelfinavir, ritonavir,saquinavir cisapride astemizole, chlorpheniramine, terfenadine amlodipine, diltiazem,felodipine, nifedipine, atorvastatin, cerivastatin, lovastatin, estradiol, hydrocortisone, progesterone alfentanil, aprepitant, caffeine→TMU cocaine, codeine-N-demethylation dapsone, dexamethasone, domperidone fentanyl, haloperidol, irinotecan lidocaine, methadone, propranolol, quinine sirolimus, tamoxifen, taxol, terfenadine trazodone, vincristine, ziprasidone, zolpidem
Inhibiteur fluvoxamine ciprofloxacin cimetidine amiodarone fluoroquinolones furafylline1 interferon methoxsalen mibefradil	**Inhibiteur** thiotepa ticlopidine	**Inhibiteur** gemfibrozil trimethoprim glitazones montelukast quercetin	**Inhibiteur** fluconazole amiodarone fenofibrate isoniazid lovastatin phenylbutazone sertraline sulfamethoxazole teniposide voriconazole	**Inhibiteur** lansoprazole omeprazole pantoprazole rabeprazole chloramphenicol cimetidine felbamate fluoxetine fluvoxamine indomethacin ketoconazole probenicid	**Inhibiteur** bupropion,cinacalcet fluoxetine,paroxetine quinidine, duloxetine sertraline, terbinafine amiodarone, cimetidine celecoxib, clemastine clomipramine, cocaine doxorubicin, escitalopram halofantrine, histamine H1 receptor levomepromazine methadone, midodrine moclobemide reduced-haloperidol ritonavir	**Inhibiteur** diethyl-dithiocarbamate disulfiram	**Inhibiteur** indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir clarithromycin, itraconazole, ketoconazole nefazodone, telithromycin aprepitant, erythromycin, fluconazole, jus de raisin, verapamil, diltiazem, cimetidine amiodarone, chloramphenicol,ciprofloxacin delaviridine, diethyl-dithiocarbamate fluvoxamine, norfloxacin, carambole, voriconazole
Inducteur broccoli, brussel sprouts charcoal-grilled meat, insulin methylcholanthrene, modafinil, nafcillin, beta-naphthoflavone, omeprazole, tobacco	**Inducteur** phenobarbital phenytoin rifampin	**Inducteur** rifampin	**Inducteur** rifampin, secobarbital	**Inducteur** carbamazepine norethindrone prednisone rifampicin	**Inducteur** dexamethasone rifampin	**Inducteur** Ethanol, isoniazide	**Inducteur** efavirenz, nevirapine barbiturates, carbamazepine glucocorticoids, modafinil oxcarbazepine,phenobarbital phenytoin, pioglitazone rifabutin, rifampin St. John's wort, troglitazone

1.3.2.2 Le polymorphisme génétique

1.3.2.2.1 Généralités

La plupart des gènes (codant pour des protéines intervenant dans le métabolisme, le transport, les récepteurs, la transduction du signal) sont susceptibles d'avoir un rôle déterminant dans la réponse aux médicaments. Mais les polymorphismes génétiques peuvent être responsables de variations d'expression ou d'activité de ces protéines codées. La variation d'expression ou d'activité d'enzyme du métabolisme du médicament s'exprime dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques, définissant généralement deux groupes d'individus : les métaboliseurs lents (ML) (déficit d'activité enzymatique) et les métaboliseurs rapides (MR) (activité normale). L'existence de métaboliseurs ultrarapides (MUR) (activité augmentée) ou intermédiaires (MI) (activité réduite) est possible pour certaines enzymes [Loriot et Beaune 2004]. Ainsi la pharmacogénétique pourra expliquer la variabilité de la pharmacocinétique de certains médicaments. La présence d'un variant allélique qui code pour un transporteur ou une enzyme dont l'activité est modifiée chez un individu peut entraîner une modification de la concentration du médicament substrat et donc une réponse thérapeutique perturbée [Schaik 2008]; [Benz et Le Guellec 2008] .

Les études de pharmacogénétique consistent à rechercher la relation entre la variation génétique des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, des transporteurs, des récepteurs ou des cibles des médicaments et la réponse thérapeutique ou la toxicité [Benz et Le Guellec 2008]. Les gènes présentent des mutations (anomalie de séquence) qui sont soit des mutations ponctuelles ou SNP (single nucleotide polymorphisme), des délétions partielles ou totales d'un ou plusieurs nucléotides voire d'un gène entier. A l'opposé il peut y avoir un grand nombre de répétition de nucléotides (Copy Number Variation ou CNV), voire des duplications de certains gènes ou des amplifications. Les SNP sont parfois des marqueurs haplotypiques. Dans ce cas, ils ne sont pas responsables individuellement des variations fonctionnelles mais sont associés par déséquilibre de liaison à d'autres SNP qui, eux, peuvent l'être. Ces différentes versions du même gène définissent des allèles, chaque individu possédant deux versions alléliques d'un même gène identique ou différent, ce qui détermine le génotype [Lhermitte *et al.* 2006].

En pharmacogénétique, la recherche de polymorphismes consiste à étudier les variants les plus fréquemment retrouvés dans le génome de différentes populations (> 1% de la population). Le terme de «mutation» est réservé à des évènements génétiques dont la survenue dans la population générale est rare (fréquence inférieure à 1 %) [Weinshilboum et Wang 2004]. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que la plupart des SNPs n'entraînent pas de modification fonctionnelle (le niveau d'expression du gène d'intérêt ou la composition de la protéine demeurant inchangés ou une modification de la séquence d'acide aminé n'entraîne pas de variation de son activité).

Environ 40 % du métabolisme des médicaments humains cytochrome P450-dépendant est effectuée par des enzymes polymorphes, qui peuvent l'altérer quantitativement, ou qualitativement ou l'améliorer [Ingelman-Sundberg *et al.* 1999].

Ainsi, deux approches méthodologiques complémentaires sont utilisées pour déterminer la capacité métabolique d'un individu vis-à-vis d'une enzyme donnée : les méthodes de phénotypage et les méthodes de génotypage [Daly 2004].

Le phénotypage peut être réalisé en utilisant des techniques validées lors d'étude d'association ayant prouvé une relation significative entre le polymorphisme génétique et la mesure [Fuhr *et al.* 2007]. Le plus souvent les techniques de phénotypage utilisent une molécule qui a pour particularité d'être principalement métabolisée par une seule voie métabolique spécifique. Ainsi par exemple pour le CYP3A4 on utilise le midazolam ou pour le CYP2D6 on utilise la débrisoquine ou le dextrometorphan [Funck-Brentano *et al.* 2005; Wilkinson 2005]. Les techniques de phénotypage sont complexes, et peuvent présenter certains inconvénients. En effet, elles nécessitent une prise d'une «substance test» présentant toutes les qualités requises (spécificité et absence d' innocuité et de contre-indications) [Fuhr *et al.* 2007].

Le génotypage permet de classer les individus en métaboliseurs lents ou rapides si les anomalies génétiques à l'origine de modification d'expression ou d'activité de l'enzyme étudiée ont été identifiées [Lhermitte *et al.* 2006]. De nombreuses techniques sont utilisées pour identifier les polymorphismes, comme le séquençage, la détection utilisant les propriétés d'enzyme de restriction (*restriction fragment lengh polymorphism* ou RFLP), ou la chromatographie liquide

haute performance dénaturée (D-HPLC). Toutes ces techniques nécessitent du temps après l'étape de PCR. De nouvelles techniques de génotypage évitant l'étape de post-PCR ont été récemment développées permettant une détection rapide de différents SNPs. La technique de discrimination allèlique Taq Man [Livak 1999] fait appel à l'utilisation de deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle sauvage soit de l'allèle muté. Chaque sonde possède à son extrémité 5' un fluorochrome (VIC ou FAM) et un chélateur de fluorescence (ou « quencher MGB») non fluorescent à l'extrémité 3'. Pendant l'étape d'extension de la PCR, la Taq Polymerase, possédant par ailleurs une activité exonucléasique, coupe uniquement la sonde parfaitement hybridée à la séquence cible. Le clivage de la sonde permet l'éloignement de l'extrémité 5' et 3', permettant ainsi au fluorochrome situé en 5' d'émettre une fluorescence. Le type de signal fluorescent (VIC ou FAM) est lu en fin de PCR et est spécifique de la séquence présente dans l'échantillon. Cependant avant d'introduire cette nouvelle méthode de génotypage en routine, la détection de chaque SNP doit être validée en comparant cette nouvelle technique de PCR fluorescente aux techniques de référence déjà existantes.

Grâce aux progrès récents de la biologie moléculaire et du séquençage du génome humain en 2000, les altérations génétiques sont maintenant bien décrites, validées et en accès « libre » pour la plupart des gènes sur de nombreuses bases de données telles que NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) ou PharmGKB (Pharmacogenomic Knowledge Base : http://www.pharmgkb.org/). Cette discipline s'étend aux gènes codant pour les cibles des médicaments (récepteurs, canaux, etc…) ainsi qu'aux protéines assurant la transduction du signal (protéines G, kinases, phosphatases, etc…).

1.3.2.2.2 Pharmacogénétique des cytochromes P450

Les isozymes CYP3A représentent la plus grande partie des CYP hépatiques et des CYP intestinales et ils sont impliqués dans le métabolisme de 45 à 60 % des médicaments utilisés à l'heure actuelle. Le CYP 3A4 est la principale forme, mais le CYP3A5 peut contribuer à l'activité lorsqu'il est exprimé chez certaines personnes, tandis que le CYP3A7 est principalement présent chez le fœtus [Burk et Wojnowski 2004]. Il y a 4 gènes du *CYP3A* qui tous sont adjacents les uns aux autres sur la bande chromosomique 7q21-q22.1 et au moins 70 % de leur séquence est

identifiée [Finta et Zaphiropoulos 2000]. Le gène du CYP3A4 est peu polymorphe, un seul variant a été identifié (*CYP3A4*1B*). Le gène du *CYP3A5* comporte un important SNP (A6986G) dans l'intron 3, dont les allèles A et G sont désignés respectivement *CYP3A5 *1* et *CYP3A5 *3*. Le *CYP3A5*3* transcrit un ARNm qui a un excès de 131 bases entre les exons 3 et 4 et la protéine traduite est incomplète et inactive [Hustert *et al.* 2001; Kuehl *et al.* 2001]. Environ 10 % à 20 % des Caucasiens, mais jusqu'à plus de 50 % des Africains sont porteurs de l'allèle sauvage (AA), leur permettant ainsi d'exprimer un CYP3A5 actif. Cependant, l'impact du polymorphisme du CYP3A5 semble assez limité pour les médicaments antirétroviraux [Daly 2006; Telenti et Zanger 2008]. L'étude de Haas et al. en 2004 chez les patients traités par différents inhibiteurs de protéase tels que nelfinavir, saquinavir, indinavir et NNRTIs (névirapine et éfavirenz), a montré que seuls les *CYP3A4*1B* et *CYP3A5*3* étaient associés faiblement aux concentrations plasmatiques de l'éfavirenz [Haas *et al.* 2004]. Aucun impact de la pharmacogénétique du CYP3A sur les concentrations plasmatiques du nelfinavir n'a été trouvé [Haas *et al.* 2005]. Le génotype *CYP3A5*1* a été associée à une augmentation modérée de la clairance orale du saquinavir chez des patients VIH [Fröhlich *et al.* 2004]. Cette absence de relation pourrait être due à l'inhibition de manière irréversible de ces enzymes par presque tous les inhibiteur de protéases, entre autre le ritonavir [Ernest *et al.* 2005].

L'expression hépatique du CYP2B6 est très inférieure à celle du CYP3A, mais elle joue un rôle majeur dans le métabolisme de certains médicaments utilisés en clinique (méthadone, névirapine, éfavirenz). Comme le CYP3A4, il peut être induit par de nombreux médicaments, produits chimiques ou substances de l'environnement ce qui va contribuer à l'expression variable. Contrairement au *CYP3A4*, le gène du *CYP2B6* est très polymorphe, avec de nombreux SNP identifiés dans l'intron, l'exon, et les régions promoteurs avec déséquilibre de liaison étendue responsable des structures haplotypiques complexes [Lang *et al.* 2001]. À ce jour, au moins 28 variants alléliques et quelques sous-variants du *CYP2B6 (*1B à *29)* ont été décrits et certains d'entre eux se sont avérés avoir d'importantes répercussions fonctionnelles sur la clairance et la réponse aux médicaments [Mo *et al.* 2009]. L'allèle le plus fréquent dans toutes les populations étudiées est le *CYP2B6 * 6*, qui est défini par la modification de deux acides aminés, Q172H (c.516G>T) et K262R (c.785A>G). La fréquence du polymorphisme du *CYP2B6* de G à T à la position 516 est significativement plus élevé en Afrique sub-saharienne et chez les

Afro-Américains par rapport aux Hispaniques, aux populations européennes et asiatiques [Rakhmanina et van den Anker 2010]. Comme nous le verrons ce polymorphisme joue un rôle dans la variabilité des paramètres pharmacocinétiques de la névirapine et de l'éfavirenz.

1.3.2.2.3 Pharmacogénétique des Transporteurs

Les principaux SNP identifiés et leur fréquence dans différentes populations sont regroupés dans le tableau 15.

De nombreux polymorphismes ont été identifiés pour les transporteurs participant à l'élimination des médicaments [Geick *et al.* 2001]. Les conséquences en termes de variabilité des paramètres pharmacocinétiques et de tolérance commencent à être bien connues. Ainsi par exemple une étude a relié le polymorphisme du gène *SLCO1B1* et l'augmentation du risque de survenue de myopathie chez les patients traités par statines [Hagenbuch, 2010], démontrant par là le rôle important du transport des statines par OATP1B1 de l'hépatocyte. Dans le domaine des médicaments antirétroviraux, il a été démontré que le polymorphisme de *ABCC2 1249 G>A* (MRP2) est associé avec un risque majoré de tubulopathie rénale chez les patients traités par ténofovir. Le polymorphisme de *ABCC4* qui code pour MRP4 entraine une augmentation des concentrations intracellulaires de zidovudine et lamivudine triphosphorylés [Telenti et Zanger, 2008].

Tableau 3 : principales variations des acides aminés des protéines des transporteurs et leur fréquence dans différentes populations [Cropp *et al.* 2008]

Protein name	African Americans (%)	European Americans (%)	Asians (%)
Influx transporters			
OCT1	Val408Met (26.5)	Val408Met (40.2)	Val408Met (23.8)
OCT2	Ala270Ser (11)	Ala270Ser (15.8)	Ala270Ser (8.6)
OCTN1	Thr306Ile (26.9)	Leu503Phe (41.2)	Ile306Thr (35.8)
OCTN2	Pro549Ser (10.0)	Val481Phe (0.6)	Phe17Leu (1.7)
OAT1[a]	Arg50His (3.2)	Ile226Thr (0.6)	
OAT2[a]	Thr110Ile (2.3)	Arg227His (0.8)	
OAT3	Val281Ala (6.0)	Val448Ile (1.3)	Ile305Phe (3.5)
OAT4[a]	Arg121Cys (2.3)	Arg48STOP (2.2)	
URAT1[b]	Thr542LysfsX13 (1.5)		Arg342His (0.8)
OATP1A2[c]	Leu572Phe (23.7)	Glu170Asp (1.9)	Leu573Val (37.5)
		Ile353Val (1.9)	
OATP1B1	Asp130Asn (27.2)	Asn130Asp (44.1)	Asp130Asn (20.0)
OATP1B3[d]	Ala112Ser (41.0)	Ser112Ala (19.0)	Met233Ile (23.0)
	Ile233Met (41.0)		
OATP2B1[d]	Phe486Ser (41.7)	Gln312Arg (10.8)	Gln312Arg (38.9)
MATE1[b]	Val338Ile (5.1)		Val480Met (0.8)
MATE2-K[a]	Arg162Gln (5.6)	Arg393STOP (0.9)	Gln312Arg (38.9)
Efflux transporters			
P-gp	Met89Thr (30.0)	Ala893Ser (43.8)	Ala893Ser (45.0)
BSEP	Ala444Val (47.0)	Ala444Val (42.9)	AIa444Val (33.3)
MRP1	Cys1047Ser (4.5)	Val353Met (0.5)	Ala989Thr (0.5)
MRP2	Cys1515Tyr (19.6)	Val417Ile (17.0)	Val417Ile (11.7)
MRP3	Pro920Ser (11.3)	Ser346Phe (2.5)	Gly11Asp (0.8)
MRP4	Lys304Asn (18.1)	Lys304Asn (8.7)	Lys304Asn (22.5)
MRP6	Val614Ala (41.2)	Val614Ala (41.9)	Val614Ala (14.2)
BCRP	Val12Met (7.7)	Gln141Lys (8.1)	Gln141Lys (40.8)

BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; MATE, multidrug and toxin extrusion; MRP, multidrug resistance–associated protein; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; OCTN, novel organic cation transporter; P-gp, P-glycoprotein; URAT1, urate anion exchanger 1.

[a]No nonsynonymous variants in Asians. [b]No nonsynonymous variants in European Americans. [c]Variant positions were determined relative to the ATG start site and were based on the reference complementary DNA sequence of OATP1A2 (accession number NM–005075). [d]Allele frequency obtained from dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/).

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Patients et protocoles

Les patients inclus dans nos études sont des patients cambodgiens infectés par le VIH et traités par les antirétroviraux de première ligne.

Les patients étudiés, traités par une trithérapie antirétrovirale comprenant de la névirapine ou de l'éfavirenz en association avec stavudine (ou zidovudine) et lamivudine proviennent de deux cohortes de patients :

- Les patients traités par la névirapine font partie de la cohorte de patients ESTHER, suivis à l'hôpital Calmette de Phnom Penh.
- Les patients traités par l'éfavirenz sont les patients inclus dans l'essai ANRS 1295 – CIPRA KH 001, CAMELIA. Les résumés des protocoles ANRS 12154-PECAN et ANRS1295-CAMELIA figurent en annexes 1 et 2.

2.1.1 Patients traités par névirapine

Depuis 2003, le service de médecine interne de l'hôpital Bicêtre dans le cadre du programme ESTHER (Ensemble pour une Solidarité Thérapeutique Hospitalière en Réseau) a créé avec les médecins de l'hôpital Calmette un centre de prise en charge des patients VIH à l'hôpital Calmette de Phnom Penh.

Durant la première année, environ 300 patients infectés par le VIH ont été inclus dans cette cohorte, la plupart d'entre eux sont traités conformément aux recommandations de NCHADS avec l'association générique névirapine-lamivudine-stavudine à dose fixe.

Les posologies sont les suivantes : 200 mg de névirapine une fois par jour pendant les 2 premières semaines et 200 mg deux fois par jour par la suite, en plus de 30 mg deux fois par jour stavudine et 150 mg de lamivudine deux fois par jour. Après 18 mois de traitement, la stavudine du fait de sa toxicité mitochondriale a été changé pour 300 mg de zidovudine chez la plupart des patients. Les patients doivent revenir tous les mois pour la consultation médicale et pour compléter leurs médicaments. Les patients doivent participer au moins trois fois à une consultation spécifique par un infirmier formé afin de renforcer l'adhésion au traitement.

Tous les patients ont été régulièrement contrôlés tous les 6 mois pour les tests hépatiques standards, les tests de la fonction rénale et la numération des lymphocytes CD4 dans le sang.

Dans le cadre des visites d'évaluation de l'efficacité du traitement à 18 mois (M18) et 3 ans (M36), en plus des tests de laboratoire standards, la charge virale VIH (ARN du VIH) et la concentration résiduelle plasmatique de la névirapine avant la prise du médicament le matin ont été mesurés. Les échantillons pour le dosage plasmatique de la névirapine sont prélevés le matin, à 12 ± 2 h après la prise du médicament du soir. L'adhésion au traitement antirétroviral a été contrôlée en utilisant une échelle visuelle analogique validée. Certains patients ont été testés pour l'hépatite C (VHC) et l'hépatite B (VHB). Toutes les données concernant les caractéristiques démographiques et clinico-biologiques des patients sont recueillies dans la base de données de la cohorte ESTHER et ont été transmises au centre de méthodologie et de gestion de l'essai PECAN (Pr France Mentré, hôpital Bichat, APHP, Paris).

L'étude supplémentaire de pharmacocinétique et pharmacogénétique a été approuvée par le Comité National d'Éthique du Cambodge. Tous les patients ont signé un formulaire de consentement qui a été expliqué par le médecin, en présence d'un témoin pour les personnes incapables de lire. Pour être inclus dans l'étude, les patients ont fourni un échantillon de sang supplémentaire pour l'extraction de l'ADN et l'étude pharmacogénétique.

Dix patients ont participé à une étude pharmacocinétique complète de la névirapine. Les patients ont été hospitalisés durant 8 h et les prélèvements réalisés dans l'heure qui précède la prise des médicaments puis 1, 2, 4, et 8 heures après la prise du traitement comprenant un comprimé de névirapine 200 mg et les analogues nucléosidiques.

2.1.2 Patients traités par éfavirenz

L'étude ANRS1295-CIPRA KH001, CAMELIA (Cambodian Early versus Late Introduction of Antiretroviral drugs) a débuté le recrutement de patients Cambodgiens co- infecté par le VIH et tuberculose en 2006. Il s'agit d'un essai clinique comparatif, multicentrique, randomisé en ouvert sans placebo, mené dans 5 hôpitaux du Cambodge. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'efficacité clinique d'une initiation précoce d'un traitement antirétroviral comprenant

l'éfavirenz, chez des patients adultes infectés par le VIH et ayant débuté un traitement antituberculeux pour une tuberculose confirmée bactériologiquement. Les patients inclus dans l'étude CAMELIA sont randomisés en deux bras pour comparer la survie des patients après l'initiation précoce des ARV soit 2 semaines après le début des antituberculeux (bras « Early ») versus initiation tardive à 8 semaines (conformément aux recommandations de l'époque) après le début des antituberculeux (bras « Late »). Le traitement antirétroviral comprend lamivudine 150 mg deux fois par jour, stavudine 30 mg deux fois par jour sous forme combinée, il s'agit d'un médicament générique. Il est associé à l'éfavirenz 600 mg une fois par jour le soir. Le traitement antituberculeux comprend l'isoniazide 4 à 5 mg/kg/j, l'éthambutol 15 à 20 mg/kg/j, le pyrazinamide 20 à 30 mg/kg/j et la rifampicine 10 mg/kg/j jusqu'à la semaine 8 pour la phase d'attaque puis la rifampicine et l'isoniazide sont poursuivis jusqu'à la semaine 26.

Dans le cadre de l'étude CAMELIA, quatre prélèvements sanguins ont été réalisés pour chaque patient durant la visite aux semaines 4, 8, 22 et 50 pour les patients randomisés dans le bras « Early » et aux semaines 10, 14, 22 et 50 pour les patients randomisés dans le bras « Late ».

Trois cent patients de l'étude CAMELIA ont participé à l'étude PECAN, en acceptant de participer à l'étude pharmacogénétique et en signant le formulaire de consentement. De plus, après la visite de la semaine 50, 10 patients ont accepté de participer à une étude pharmacocinétique complète de l'éfavirenz. Les patients ont été hospitalisés pendant environ 20 h. Ils sont venus à hôpital à 18 h du soir avec leurs médicaments, sans avoir pris ses médicaments puis ils ont été hospitalisés pendant la nuit et sont sortis le lendemain. Un prélèvement sanguin a été réalisé avant la prise des médicaments puis 1, 2, 4, 12 et 18 heures après la prise du traitement comprenant un comprimé d' éfavirenz, un comprimé combiné de stavudine/lamivudine ou un comprimé de zidovudine/lamivudine (en fonction de leur traitement actuel).

Les caractéristiques des patients inclus dans l'essai PECAN ont été obtenues par transfert de la base de données CAMELIA au centre de méthodologie et de gestion de l'essai PECAN (Pr France Mentré, hôpital Bichat, APHP, Paris).

2.2 Méthodes analytiques

2.2.1 Principe des méthodes utilisées

Les deux médicaments ont été dosés dans le plasma par des méthodes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) validées conformément aux règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire, à la norme GBEA et d'après les procédures d'assurance qualité du laboratoire de l'université des Sciences de la Santé au Cambodge. Les critères de validation des techniques analytiques sont les suivants : la spécificité, la linéarité, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaires), le seuil de quantification, l'exactitude et la stabilité de la substance à analyser. Le laboratoire a participé au programme de contrôle de qualité français des dosages antirétroviraux Asqualab. Toutes les séries de dosage ont été validées par un pharmacien.

2.2.2 Dosages plasmatiques de la névirapine

Le dosage plasmatique de la névirapine a été réalisé à l'hôpital Bicêtre, France pour l'étude d'évaluation M18 et à l'Université des Sciences de la Santé, Phnom Penh, Cambodge pour l'étude d'évaluation M36. Une technique chromatographique CLHP adapté de celle de [Titier *et al.* 2002] a été utilisée.

Après ajout de l'étalon interne, le bromazepam, à l'échantillon de plasma et précipitation des protéines plasmatiques par le méthanol, la névirapine et l'étalon interne sont séparés et quantifiés par une méthode CLHP en phase inverse avec une colonne RP 8 (250 x 4 mm ; 5 µm) et détection par spectrophotométrie UV à 240 nm. La concentration de la névirapine est calculée par le rapport de l'aire du pic de la névirapine et celle de l'étalon interne, qui est ensuite comparé à une gamme d'étalonnage analysée avec chaque série de dosage. La limite de quantification de la méthode est de 50 ng/mL et la linéarité a été vérifiée jusqu'à 10 000 ng/mL. Trois contrôles de qualité interne de concentrations différentes sont insérés dans chaque série et permettent la validation analytique de chaque série. Les contrôles doivent avoir une concentration comprise dans la zone +/- 15 % par rapport à la cible. Les moyennes, écart-types et coefficients de variation des contrôles de qualité utilisés pour valider les séries de dosages

plasmatiques de la névirapine dans le plasma des patients cambodgiens sont colligés dans le tableau 16. La déviation par rapport à la cible n'excède jamais 8 %.

Tableau 4 **:** Contrôle de qualité des séries de dosages de la névirapine

Controle de qualité	**C1**	**AR1**	**AR2**
Nombre de séries	14	14	14
Valeur cible (ng/mL)	200	2730	3940
Moyenne (ng/mL)	195,0	2679,0	3999,0
Ecart type (ng/mL)	15,2	195,3	260,2
Coefficient de variation %	7,8	7,3	6,5
Erreur relative %	-2,7	-1,9	1,5

2.2.3 Dosages plasmatiques de Efavirenz

Le dosage plasmatique de l'efavirenz a été réalisé au laboratoire de l'Université des Science de la Santé à Phnom Penh Cambodge par une technique CLHP transfert du laboratoire de toxico-pharmacologie de l'hôpital Bicêtre.

Après extraction liquide-liquide par le ter butyl methyl ether (TBME) en milieu ammoniacal, l'efavirenz et son étalon interne (quinoxaline) sont analysés selon les conditions suivantes : une colonne à phase inverse Lichrocart® 250-4, phase Lichrospher® 100 RP-18 end-capped (5 µm) munie par pré-colonne de même type. La phase mobile est un mélange de tampon phosphate à pH 5,6 et d'acétonitrile en proportion de 48/52 (V/V) et la détection s'effectue dans l'UV à 248 nm. La concentration de l'éfavirenz est calculée par le rapport de la hauteur du pic de l'efavirenz et celle de l'étalon interne, rapport ensuite comparé à une gamme d'étalonnage calculée pour chaque série de dosage. La limite de quantification de la méthode est de 50 ng/mL et la linéarité vérifiée jusqu'à 10 000 ng/mL. Trois contrôles de qualité (un contrôle de qualité interne et 2 contrôles de qualité Asqualab, qui sont différents compte tenu de la durée de l'étude) sont insérés dans chaque série de dosage. La variabilité inter et intra-jour des contrôles de qualité est inférieure à 11%. Les résultats des contrôles de qualité sont résumés ci-après (tableau 17).

Tableau 5**:** Contrôle de qualité des séries de dosages d'éfavirenz

Controle de qualité	C1	C1Bis	AR1	AR2	R21	P21	AR3	AR4
n	56	41	35	35	31	31	47	47
Valeur cible (ng/mL)	200	230	1730	4870	1680	2660	1730	6250
Moyenne (ng/mL)	201	245	1657	4699	1794	2718	1793	6684
Ecart type	21,6	12,9	84,9	265,9	82,2	132,2	107,2	377,5
CV%	10,7	5,3	5,1	5,7	4,6	4,9	6,0	5,6
ER%	0,7	6,7	-4,2	-3,5	6,8	2,2	3,6	7,0

2.3 Identification des polymorphismes

2.3.1 Extraction des ADN

L'extraction des ADNs a été réalisée au laboratoire Rodolphe Mérieux de l'Université des Sciences de la Santé au Cambodge par deux méthodes suivantes :

L'ADN des patient traités par la névirapine a été extrait du culot globulaire du sang après avoir transféré le plasma en utilisant le réactif « QIAamp DNA minikit » selon le protocole fournit par le fabriquant (Qiagen®). Tout d'abord les composants cellulaires du sang sont lysés. Les protéines associées à l'ADN sont digérées par une enzyme dite Protéine Kinase K. Ensuite, l'ADN est séparé grâce à une colonne contenant une membrane de gel de silice qui fixe seulement l'ADN. Les débris cellulaires sont éliminés par lavage de la colonne avec une série de tampons puis centrifugation. Les ADNs sont élués de la colonne à l'aide d'un tampon puis une centrifugation.

L'ADN des patients traités par l'efavirenz a été extrait du buffy coat (couche leucocytaire obtenue du sang total après centrifugation) en utilisant un Gentra Puregene Blood Kit selon le protocole du fabricant (Qiagen®). Ce protocole est basé sur le principe d'extraction liquide-liquide.

L'absorbance de tous les extraits d'ADN a été mesurée par un spectrophotomètre pour permettre de caractériser la qualité et la quantité de l'ADN. Le rendement en ADN pur est indiqué par le rapport entre l'absorbance de l'ADN à 260 nm sur l'absorbance de l'ARN à 280

nm (A260/A280). Un rapport compris entre 1,7 et 1,9 indique que l'extrait d'ADN est pur. Si le rapport est supérieur à 1,9 ou inférieur à 1,7, l'extrait d'ADN n'est pas pur et il peut subsister des traces de protéines. La quantité d'ADN extraite des échantillons des patients traités par la névirapine (tableau 18) est légèrement inférieure à ce qui était quand on compare aux extractions fréquemment réalisés au laboratoire sur du sang total. De même, la qualité de l'ADN indiquée par le rapport A260/A280 qui est légèrement inférieur la limite n'est pas optimale. Cette qualité non optimale de l'ADN a cependant permis un test d'amplification des échantillons en temps réel parfaitement correct puisque plus de 98 % des ADNs ont été amplifiés. Elle pourrait être due au contenu insuffisant en cellules des culots globulaires.

Tableau 6 : Concentration en ADN des échantillons de patients traités par névirapine

	Concentration ADN (ng/µL)	Rapport A_{260}/A_{280}
n	170	170
Moyenne	16,15	1,63
Ecart-type	11,68	0,53
Mediane	13	1,53
Min	5	1,01
Max	97	4,82

La quantité et la qualité de l'ADN provenant des échantillons de patients traités par l'efavirenz (tableau 19) sont meilleures, probablement du fait du recueil d'un volume plus important de culot globulaire.

Tableau 7 **:** Concentration en ADN des échantillons de patients traités par éfavirenz

	Concentration ADN (µg/mL)	Ratio A260/A280
n	312	312
Moyenne	185,6	1,8
Ecart-type	160,1	0,9
Médiane	145,0	1,8
Min	4,0	1,0
Max	1126,0	2,5

2.3.2 Génotypage

La méthode de génotypage par discrimination allélique TaqMan est basée sur l'émission de fluorescence par des sondes spécifiques des allèles recherchés. Cela nécessite donc deux amorces, de 18 à 25 bases, spécifiques de la région à amplifier ainsi que deux oligonucléotides de synthèse de 13 à 20 bases qui diffèrent uniquement par un nucléotide ; une des sondes est complémentaire de l'allèle sauvage, la seconde de l'allèle muté. Ils expriment tous les deux un fluorochrome de couleur différente à l'extrémité 5' (VIC ou FAM) et un chélateur de fluorescence à l'extrémité 3' (figure 13).

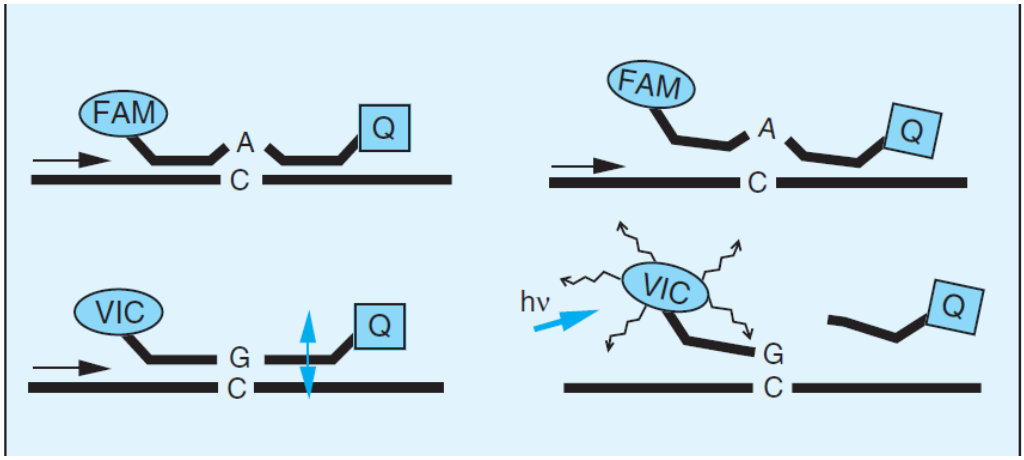


Figure 13 : Technique de discrimination allélique TaqMan® d'après [Verstuyft *et al.* 2003]

La figure 13 illustre une technique de discrimination allélique TaqMan® Applied Biosystem avec une sonde non complémentaire de la séquence (partie supérieure de la figure) et une sonde parfaitement complémentaire de la séquence (partie inférieure).

Le type de signal fluorescent (VIC ou FAM) est lu en fin de PCR et est spécifique de la séquence présente dans l'échantillon. La sonde imparfaitement hybridée va être décrochée sans subir de clivage, n'entraînant ainsi pas de fluorescence.

Les génotypages des polymorphimes génétiques du CYP3A5 6986A>G, CYP3A4*1B, CYP2B6 1459C>T, CYP2B6 516G>T, CYP2A6*9B 1636G>T, OATPC 521T>C et PXR 7635A>G ont été réalisés à Bicêtre en utilisant les tests PCR en temps réel avec discrimination allélique TaqMan (ABI Prism 7000; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le numéro rs est une nomenclature internationale de la base de données des polymorphismes d'un seul nucléotide ou SNP pour « Single Nucleotide Polymorphisme ».

La détection du SNP de CYP3A5 6986A>G (rs776746) a utilisé des amorces et des sondes selon la technique décrite par Quteineh et al, 2008. Le génotype de ABCB1 3435C>T exon 26 (rs1045642) a été réalisé en utilisant les amorces et les sondes selon la procédure de [Anglicheau *et al.* 2003] (annexe 5).

Le génotypage des SNP suivants : CYP3A4*1B A>G (rs 4646437), CYP2B6 1459C>T (rs3211371), CYP2B6 516G>T (rs3745274), CYP2A6 1836G>T (rs 8192726), OATPC 521T>C (rs4149056) et PXR 7635A>G (rs6785049) ont été réalisés avec l'utilisation de tests TaqMan SNP validés (annexe 5)

Le PCR est réalisé selon la procédure décrite précédemment [Quteineh *et al.* 2008]. La réaction de PCR a été réalisée en utilisant 2 µL d'ADN à 10 ng/µL auxquels ont été ajoutés 7,5 µL de « Master Mix Universel TaqMan 2X » (Applied Biosystem), 1,2 µl des amorces à 11,25 µM, 0,6 µl des sondes et de l'eau pour PCR pour obtenir un volume final de 15 µL par réaction. La condition des PCR est programmée comme suit : 2 minutes à température de 50°C puis 95°C pendant 10 minutes suivies de 35 cycles à 90°C pendant 15 Secondes et puis 60°C pendant 1 minute.

La fluorescence émise a été lue en fin de PCR sur un ABI 7000 Sequence Detector System Software version 1.2.3 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

2.4 Calcul des paramètres pharmacocinétiques

2.4.1 Méthode non compartimentale

Cette méthode a été utilisée pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques de la névirapine et de ses métabolites chez les patients de la cohorte ESTHER. Elle permet de calculer facilement des paramètres pharmacocinétiques dits « physiologiques », tels que clairance et volume de distribution, de chaque individu à partir des données expérimentales de l'évolution des concentrations en fonction du temps, sans modélisation. Pour que les paramètres soient définis avec précision, les données doivent être « riches ». Clairance et volume de distribution sont calculés à partir de l'AUC et de la demi-vie d'élimination. Les concentrations maximales et minimales sont les concentrations observées.

Après administration d'une dose unique, l'AUC est calculée par la méthode des trapèzes ou méthode log-trapézoidale jusqu'à la dernière concentration mesurable, puis extrapolée à l'infini ($\mathbf{AUC_{0\text{-}inf}}$) selon la formule Ct/$\lambda$**z**. A partir de l'AUC, la clairance apparente (Cl/F) peut être déduite selon la formule suivante :

$$\mathbf{Cl/F = Dose / AUC_{0\text{-}inf}}$$

La constante d'élimination de la dernière phase de décroissance monoexponentielle des concentrations (λ**z**) peut se déterminer graphiquement par régression linéaire sur le logarithme des concentrations de la phase terminale d'élimination. La demi-vie d'élimination (t1/2) est la suivante :

$$\mathbf{t_{1/2} = ln2 / \lambda z}$$

Le volume apparent de distribution (V/F) se déduit selon l'équation suivante :

$$\mathbf{V/F = Cl/F / \lambda z}$$

La concentration maximale est déterminée graphiquement ainsi que le Tmax correspondant.

A l'équilibre, après administrations répétées, l'AUC (AUCτ) dans l'intervalle de temps entre deux doses τ est calculé par la méthode des trapèzes, comme ci-dessus. Si la pharmacocinétique est

linéaire, $AUC_{0\text{-}inf}$ = AUCτ. Une AUCτ > à $AUC_{0\text{-}inf}$ signifie qu'il y a auto inhibition et si AUCτ est < $AUC_{0\text{-}inf}$, il y a un phénomène d'auto induction. La Cl/F peut donc être calculée selon la formule suivante :

Cl/F = Dose / AUCτ

Cette méthode nécessite d'avoir des données « riches » pour que les paramètres soient déterminés avec précision. Par contre des paramètres peuvent être calculés quelque soit l'allure de la courbe des concentrations en fonction du temps. Le nombre de sujets à inclure n'est pas forcément très important et dépend des hypothèses formulées au moment de la rédaction du protocole. Elle permet de déterminer la variabilité des paramètres au sein de la population de sujets étudiés.

Tous les paramètres pharmacocinétiques de la névirapine et de ses métabolites ont été calculés à partir d'une feuille de calcul écrite sur Excel (et reprenant les formules définies ci-dessus) ou du logiciel WinNonLin v6.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA).

2.4.2 Méthode compartimentale, modèle dépendant

Dans cette méthode, le devenir du médicament dans l'organisme se décrit à l'aide d'un modèle composé de compartiments dans lesquels le médicament se distribue. Chaque compartiment se caractérise par un volume et les échanges entre les compartiments sont caractérisés par des vitesses de transfert. Selon la rapidité de l'équilibration des concentrations d'un produit entre le sang et les tissus, la cinétique peut être modélisée par un modèle à un ou plusieurs compartiments. Avec cette notion de modèle, l'évolution des concentrations au cours du temps peut être décrite par des équations mathématiques de type mono ou pluri exponentielles.

Pour chaque individu, la résolution des équations mathématiques décrivant l'évolution des concentrations au cours du temps permettra de calculer les paramètres pharmacocinétiques. Comme la méthode précédente, elle nécessite d'avoir des données riches, ce d'autant que la modélisation ne décrira correctement la courbe des concentrations en fonction du temps que si le nombre de points expérimentaux est suffisant.

2.4.3 Pharmacocinétique de population

Cette méthode a été utilisée pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques de la névirapine et de l'éfavirenz dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH.

La pharmacocinétique de population a pour but d'estimer la distribution statistique des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament donné dans une population de patients, afin de quantifier la variabilité inter et intra-individuelle de la cinétique et d'identifier les sources de cette variabilité. En effet, l'administration d'une dose identique d'un médicament à des patients peut conduire à des concentrations plasmatiques très variables et à des effets d'intensité ou de durée très différents. Les facteurs démographiques (âge, poids, sexe), génétiques, environnementaux, physiopathologiques et médicamenteux constituent les principales sources de la variabilité interindividuelle observée sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments. Cette méthode peut être utilisée avec des données éparses.

Pour la névirapine, un modèle à un compartiment a été évalué représenté par le schéma suivant. Soit F la biodisponibilité, Ka la constante d'absorption vers le compartiment de volume apparent V/F et Cl/F la clairance apparente d'élimination.

Le modèle de pharmacocinétique de population de la névirapine a été construit à l'aide du logiciel MONOLIX software, version 2.4 (http://software.monolix.org/).

Le modèle statistique des concentrations observées Cij pour un patient i à un temps tij est donné par l'équation suivante :

$$\mathbf{Cij = f(tij,\theta i) + \varepsilon ij}$$

où θi est le vecteur des paramètres identifiables du patient i : θ = (ka, Cl/F, V/F), εij l'erreur résiduelle représentant la différence entre les concentrations mesurées et les concentrations prédites par le modèle et f le modèle pharmacocinétique exprimant la concentration plasmatique prédite.

Un modèle d'erreur aléatoire exponentiel a été choisi pour décrire la variabilité interindividuelle (différence entre la valeur du paramètre pharmacocinétique d'un individu et la valeur typique de ce paramètre pour la population) :

$$\theta i = \theta \exp(\eta i)$$

où θ est le vecteur moyen des paramètres pharmacocinétiques de population et ηi représente le vecteur des effets aléatoires.

L'hypothèse formulée est que les effets aléatoires suivent une loi normale de moyenne nulle et Ω la matrice de variance supposée diagonale. La variabilité résiduelle est modélisée selon un modèle d'erreur proportionnel à coefficient de variation constant. La méthode d'estimation utilisée est celle de premier ordre (FO).

Les graphes des concentrations observées versus concentrations prédites par le modèle de population et la distribution des résidus pondérés en fonction du temps ont été analysés pour chaque modèle.

Après détermination du modèle de base, les covariables testées sont : âge, poids corporel, sexe, plasma créatinine, clairance de la créatinine, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT), gamma glutamyl transpeptidase, ARN virale, nombre de CD4, adhérence thérapeutique (mesuré par une échelle visuelle analogique), co-traitement avec d4T ou AZT, charge virale supérieure à 400 copies/mL, coinfections par les hépatites B et /ou C, et polymorphismes génétiques des *CYP3A5 6986A>G, CYP2B6 516G>T, CYP2B6 1459C>T, et ABCB1 3435C>T*.

Les variables continues sont centrées sur leur médiane. Les effets de chaque covariable sont testés sur chaque paramètre individuel par un test de corrélation pour les variables continues et par une ANOVA pour les variables discontinues en utilisant les logiciels statistiques R version 2.9.1 (http://cran.r-project.org/) et Statgraphics version 5.1 (Manugistics, Inc. Rockville, Maryland, USA). Les covariables qui ont un effet significatif ($p<0,05$) sont ensuite évaluées dans l'analyse de population. L'effet d'une covariable est testé par la méthode du test de rapport de vraisemblance (likelihood ratio test, LRT). Dans la procédure d'inclusion des covariables, une covariable est retenue dans le modèle si elle est à l'origine d'une diminution supérieure à 3,84

de la fonction objective ($p<0,05$, 1 ddl) et s'il y a une diminution de la variabilité interindividuelle du paramètre pharmacocinétique associé.

A partir du meilleur modèle incluant les covariables, une procédure d'élimination est utilisée pour déterminer si les covariables inclues doivent rester dans le modèle. Quand la suppression d'une covariable d'un modèle entraîne une augmentation significative de la fonction objective ($>3,84$; $p = 0,05$), cette covariable est gardée dans le modèle.

Selon le même principe, le modèle pharmacocinétique de population de l'éfavirenz est en cours de développement.

3 Résultats

3.1 Facteurs affectant la pharmacocinétique de la névirapine

3.1.1 Pharmacocinétique et pharmacogénétique de la névirapine chez les patients cambodgiens infectés par le VIH

Le résumé de ce travail figure ci-dessous et la publication CHOU et al., dans Antimicrob Agents and Chemother (2010) est reproduite dans les pages suivantes.

Objectif : Cette étude clinique ouverte (ANRS-12154), monocentrique, a pour objectif d'une part l'estimation des paramètres pharmacocinétiques de la névirapine à l'état d'équilibre chez une population de patients cambodgiens infectés par le VIH et d'autre part, l'identification des facteurs environnementaux et génétiques (*CYP2B6, CYP3A5 et ABCB1-MDR1*) permettant d'expliquer leur variabilité.

Méthode : 170 patients cambodgiens infectés par le VIH ont été inclus. Les concentrations résiduelles de la névirapine ont été mesurées après 18 et 36 mois du traitement antirétroviral et les prélèvements ont été réalisés pendant un intervalle de dose de 12 h chez 10 patients. Toutes les données ont été analysées par une modélisation non linéaire mixte. L'effet des covariables a été étudié en utilisant le modèle pharmacocinétique de population.

Résultat : Les patients porteurs homozygotes des allèles non fonctionnelles *CYP3A5 6986A>G, CYP2B6 516G>T, CYP2B6 1459C>T,* et *ABCB1 3435C>T* représentent respectivement 42,4 %, 9,2 %, 0 %, et 18 % de la population étudiée. La médiane (écarts) des concentrations résiduelles de la névirapine ne présente pas de différence après 18 mois, 5705 ng/mL (<50 à 13871 ng/mL) et 36 mois, 5709 ng/mL (<50 à 15422 ng/mL) de traitement. La variabilité inter et intra individuelle de la clairance apparente de la névirapine sont de 28 % et 17 % respectivement. Seuls les polymorphismes du *CYP2B6 516G>T* et la clairance créatinine modifient de manière significative la clairance apparente de la névirapine. Ainsi la clairance apparente estimée de la névirapine est de 2,95 L/h, 2,62 L/h, et 1,86 L/h respectivement pour les génotypes *CYP2B6 516GG, CYP2B6 516GT*, et *CYP2B6 516TT*. L'impact de la clairance de la créatinine est très faible.

Conclusion : Cette étude démontre que 95% des patients traités par la névirapine ont des concentrations résiduelles bien au-dessus de seuil thérapeutique de 3000 ng/mL. La clairance de la névirapine dépend du polymorphisme génétique du *CYP2B6 516G> T* et de la clairance de la créatinine, bien que cela n'explique qu'une partie de la variabilité inter individuelle, qui est faible comparée à celui d'autres médicaments antirétroviraux.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2010, p. 4432–4439 Vol. 54, No. 10
0066-4804/10/$12.00 doi:10.1128/AAC.00512-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Population Pharmacokinetic-Pharmacogenetic Study of Nevirapine in HIV-Infected Cambodian Patients[▽]

Monidarin Chou,[1] Julie Bertrand,[2] Olivier Segeral,[3] Céline Verstuyft,[4] Laurence Borand,[5] Emmanuelle Comets,[2] Clotilde Le Tiec,[6] Laurent Becquemont,[4] Vara Ouk,[7] France Mentre,[2] and Anne-Marie Taburet[6]*

Rodolphe Mérieux Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Health Sciences, Phnom Penh, Cambodia[1]; INSERM UMR 738 and Paris Diderot University, Paris, France[2]; Internal Medicine Department, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Paris, France[3]; Departments of Molecular Genetics, Pharmacogenetic, and Hormonology, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Paris, France, and Univ Paris-Sud, EA2706, France[4]; Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur, Phnom Penh, Cambodia[5]; Clinical Pharmacy Department, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Paris, France[6]; and Hospital Calmette, Phnom Penh, Cambodia[7]

Received 15 April 2010/Returned for modification 22 June 2010/Accepted 29 July 2010

The aims of this ANRS12154 open-label, single-center, multiple-dose pharmacokinetic study were to characterize nevirapine pharmacokinetics in a Cambodian population of HIV-infected patients and to identify environmental and genetic factors of variability, focusing on the *CYP2B6*, *CYP3A5*, and *ABCB1* (*MDR1*) genes. A total of 170 Cambodian HIV-infected patients were included. Nevirapine trough concentrations were measured after 18 and 36 months of starting antiretroviral treatment and in samples drawn during a dosing interval in a subset of 10 patients. All data were analyzed by nonlinear mixed-effects modeling. The effect of covariates was investigated using the population pharmacokinetic model. Patients carrying homozygous loss-of-function alleles *CYP3A5 6986A>G*, *CYP2B6 516G>T*, *CYP2B6 1459C>T*, and *ABCB1 3435C>T* represent 42.4%, 9.2%, 0%, and 18% of the population, respectively. The median nevirapine trough concentrations did not differ after 18 and 36 months of treatment (5,705 ng/ml [range, ≤50 to 13,871] and 5,709 ng/ml [range, ≤50 to 15,422], respectively). Interpatient and intrapatient variabilities of nevirapine apparent clearance were 28% and 17%, respectively. *CYP2B6 516G>T* and creatinine clearance were found to significantly affect nevirapine apparent clearance. The estimated nevirapine apparent clearances were 2.95 liters/h, 2.62 liters/h, and 1.86 liters/h for *CYP2B6 516GG*, *CYP2B6 516GT*, and *CYP2B6 516TT* genotypes, respectively. The impact of creatinine clearance was small. This study demonstrates that 95% of the patients had sustained nevirapine exposure well above the 3,000-ng/ml threshold. Nevirapine clearance was shown to be affected by *CYP2B6 516G>T* genetic polymorphism and creatinine clearance, although this explained only part of the interpatient variability, which remains low compared to that for other antiretroviral drugs.

In resource-limited settings, nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) are the WHO-recommended backbone of first-line antiretroviral therapy. At the time of the study, nevirapine in combination with two nucleoside analog inhibitors of reverse transcriptase such as stavudine and zidovudine, in addition to lamivudine, was the recommended antiretroviral regimen in treatment-naïve patients, mainly because of the availability of WHO-prequalified low-cost generic fixed-dose combinations (7, 27). In Cambodia, the prevalence of HIV infection among the general population aged between 15 and 49 years peaked at 2% in 1998 and declined to 0.9% in 2006. This decrease has been attributed to many deaths among people infected during the early years of the epidemic before implementation of the continuum of care and the scaling-up of HIV prevention, care, and treatment programs. At the end of 2009, it is estimated that about 37,000 patients were on antiretroviral drug regimens and 69.5% were on a nevirapine backbone regimen (National Center for HIV/AIDS, Dermatology and STD [NCHADS]; http://www.nchads.org/).

Therefore, worldwide, most patients living with AIDS who need antiretroviral treatment are on a nevirapine-based antiretroviral regimen. However, data on factors influencing nevirapine's pharmacokinetics and exposure in different populations are lacking. Nevirapine pharmacokinetics is characterized by a long half-life, 60% binding to plasma proteins, and elimination mainly through oxidative metabolism involving CYP3A and CYP2B6 (14). Both CYP3A4 and CYP3A5 share substrates, and their role in nevirapine metabolism is not clearly defined. The importance of *CYP2B6* genetic polymorphism in efavirenz metabolism is now well-established, but its influence on nevirapine metabolism is less clear (21). One study suggests that nevirapine could be a weak substrate of the P-glycoprotein efflux transporter (1). *CYP3A5*, *CYP2B6*, and *ABCB1* (*MDR1*) (which codes for P glycoprotein) are known to be highly polymorphic (http://www.cypalleles.ki.se/) (46). The following genetic polymorphisms were therefore studied. The *CYP3A5*3* allele (G at position 6986) creates a cryptic splice site, creating aberrant mRNA, with a premature stop codon. Individuals with at least one A allele (*CYP3A5*1*) produce high levels of full-length CYP3A5 mRNA and express an active CYP3A5 enzyme, while those

* Corresponding author. Mailing address: Clinical Pharmacy Department, University Hospital Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94270 Kremlin Bicêtre, France. Phone: 33 1 45 21 29 57. Fax: 33 1 45 21 28 60. E-mail: anne-marie.taburet@bct.aphp.fr.

▽ Published ahead of print on 9 August 2010.

carrying the *CYP3A5 6986GG* (*CYP3A5*3*) genotype have very low or even undetectable hepatic CYP3A5 protein content. The two most relevant single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CYP2B6* (*G516T* and *C1459T*) were demonstrated to result in a significant decrease in protein expression. *ABCB1 3435C>T* was associated with decreased transport function. Consequently, homozygous *CYP3A5 6986GG*, *CYP2B6 516TT* or *CYP2B6 1459TT*, and *ABCB1 3435TT* alleles are associated with loss-of-function proteins.

The aims of this ANRS12154 descriptive study were to characterize nevirapine pharmacokinetic parameters in a large Cambodian population of HIV-infected patients by using a population approach and to identify environmental and genetic factors of variability, focusing on the *CYP3A5*, *CYP2B6*, and *ABCB1* (*MDR1*) genes. Mixed-effects models were used due to their flexibility in handling balanced and unbalanced data in a unified framework (37).

(The data in this study were presented in part at the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Quebec, Canada, 2009 [9a].)

MATERIALS AND METHODS

Patients and study design. The patients enrolled in this open-label, single-center, multiple-dose pharmacokinetic study were HIV-infected Cambodians. They have been included in the Ensemble pour une Solidarité Thérapeutique Hospitalière en Réseau (ESTHER) cohort at the Calmette Hospital (Phnom Penh, Cambodia) since 2003, where treatment and care have been provided to patients living with AIDS in Cambodia. This additional pharmacokinetic/pharmacogenetic study was approved by the National Ethics Committee of Cambodia. All patients signed an informed consent form which was explained orally in the presence of a witness for those unable to read. To be included in the study, patients consented to have an additional blood sample drawn at the 3-year evaluation for pharmacogenetics. During the first year, about 300 HIV-infected patients were included in this cohort, most of them treated with a nevirapine-lamivudine-stavudine generic fixed-dose combination. Patients were treated with 200 mg nevirapine daily for the first 2 weeks and 200 mg twice a day (b.i.d.) thereafter in addition to 30 mg stavudine b.i.d. and 150 mg lamivudine b.i.d. After 18 months of treatment, stavudine was switched to 300 mg zidovudine b.i.d. in most patients. Patients came to the clinic monthly for medical consultation and drug refills. They had to participate in at least three specific adherence consultations by a trained nurse. All patients were routinely monitored every 6 months for standard liver and renal function tests and CD4 cell count (Cyflow; Partec, Munster, Germany) in blood. As part of the 18-month (M18) and 3-year (M36) visits for evaluation of treatment efficacy, in addition to standard laboratory tests, plasma HIV RNA (41) and nevirapine plasma trough concentration before morning drug intake were measured. Samples drawn 12 ± 2 h after evening drug intake were kept for pharmacokinetic analysis. Adherence to antiretroviral therapy was monitored using a validated visual analog scale (2). Some of the patients were tested for hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV). In addition to the M18 and M36 sampling, 10 patients agreed to participate in an extensive pharmacokinetic substudy. They fasted under a steady-state regimen before antiretroviral drug administration, and blood samples were collected at predose and 1 h, 2 h, 4 h, and 8 h after the nevirapine morning intake.

Genotyping. DNA was extracted from patient blood by using a QIAamp DNA minikit according to the protocol of the manufacturer (Qiagen). Genotyping for *CYP3A5 6986A>G* (international nomenclature for database single-nucleotide polymorhism: rs776746), *CYP2B6 516G>T* (rs3745274), *CYP2B6 1459C>T* (rs3211371), and *ABCB1 3435C>T* exon 26 (rs1045642) was performed using the TaqMan allelic discrimination assay (ABI Prism 7000; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers and probes used for *ABCB1* and *CYP3A5* SNP detection have been described previously (10, 39). *CYP2B6* genotyping was performed with the use of TaqMan validated SNP assays (C___7817765_60 and C__30634242_40) with a 7000HT sequence detection system (Applied Biosystems). Reactions were carried out as described previously (10, 39).

For each polymorphism, departure from Hardy-Weinberg proportions was tested using a χ^2 test with degrees of freedom equal to the number of observed genotypes minus 1.

Assay of nevirapine in plasma. Plasma nevirapine concentrations were assayed in France (M18) or Cambodia (M36) by liquid chromatography with diode array detection at 240 nm according to previously validated assays (48). The lower limit of quantification was 50 ng/ml. Standard curves were linear up to 10,000 ng/ml. The within-day and day-to-day precisions of quality control samples included in each analytical run were below 9%. Both laboratories participate in the French program of external quality controls (Asqualab).

Population pharmacokinetic analysis. Population pharmacokinetic modeling was performed using MONOLIX software, version 2.4 (http://software.monolix.org/). A one-compartment model at steady state, with first-order absorption (rate k_a) and elimination parameterized in apparent volume of distribution (V/F) and clearance (CL/F), was used to describe the nevirapine concentrations. Data below the limit of quantification (50 ng/ml) were discarded from the analysis. Given the expected concentration levels, a patient with a concentration below this limit might be assumed not to have taken his pills.

In a first step, the interpatient variance matrix and the residual error model were determined using data from the 10 patients of the extended pharmacokinetic study plus the M36 nevirapine trough concentrations. The Bayesian information criterion (BIC) was used to select the residual error model (combined, proportional, or constant) and the non-null interpatient variances (6). In a second step, the concentrations collected at the M18 evaluation were added to the previous data set and intrapatient (e.g., interoccasion) variances (γ^2) were added to parameters with non-null interpatient variances (ω^2). To model interpatient and intrapatient variabilities, we used an exponential model with Gaussian random effects.

In order to assess to what extent a model parameter is likely to be under the influence of genetic polymorphisms, the genetic component of variability, R_{GC}, was computed as described by Ozdemir et al. (35): $R_{GC} = 1 - (\gamma^2/\omega^2)$, which gets closer to 1 as the parameter is likely to be influenced by genetic polymorphisms.

The continuous covariates investigated for the *CYP3A5 6986A>G*, *CYP2B6 516G>T*, *CYP2B6 1459C>T*, and *ABCB1 3435C>T* polymorphisms were age, weight, alanine aminotransferase (ALAT), plasma creatinine, creatinine clearance, plasma HIV RNA, CD4 count, and adherence (assessed using a visual analog scale) along with sex, cotreatment (stavudine or zidovudine), plasma HIV RNA above 400 copies/ml, HCV coinfection, HBV coinfection, and genotype.

Covariate model building was performed using an ascendant approach based on Wald tests on the effect of coefficient estimates of the population analysis. Screening of individual empirical Bayes estimates was not performed, as shrinkage is important with such a sparse design (5). For the univariate analyses, no imputation of the missing covariates was performed and a 0.1 significance level was used. For final model building, the significance level was set to 0.05 and missing covariates, with the exception of genotypes, were imputed to the value obtained at the closest evaluation or to the median. A permutation approach was then performed to assess the P values associated with the covariates remaining in the final model. Permutation tests correct for the Wald test type I error inflation that has been shown to occur in such designs (5). One thousand permutations were performed to ensure the nominal level of 0.05.

The average nevirapine clearance for each patient was computed as the mean over the empirical estimates at the different occasions. Simulations based on the final pharmacokinetic estimates were performed with R software, version 2.9.1 (http://cran.r-project.org/), using 250 data sets to calculate the predicted 90% interval and median, which were overlaid on the observed data on a visual predictive check plot. These simulations were also used to compute normalized prediction discrepancies, using the R package (http://www.npde.biostat.fr/), to be plotted versus time.

RESULTS

Characteristics of the study population. A total of 170 patients of the ESTHER cohort who were on nevirapine therapy and signed the informed consent form were included in this study. The median age of the population was 36.5 years (range, 21 to 64), and the median weight was 55 kg (range, 36 to 82). One hundred forty-five patients participated in the M18 evaluation, 161 in the M36 evaluation, and 139 in both the M18 and M36 evaluations in addition to the pharmacogenetic study. In addition, 10 patients (5 men) participated in the extensive pharmacokinetic substudy and only 3 did not participate in the M18 or M36 evaluation. The patients' demographic and laboratory data are listed in Table 1. An undetectable viral load

TABLE 1. Characteristics of patients at 18 months and 36 months of evaluation

Characteristic (unit)	M18 (n = 145)	Total no. of patients	M36 (n = 161)	Total no. of patients
Median (range)				
Age (yr)	36.0 (19.0–56.0)	145	37.0 (21.0–64.0)	161
Wt (kg)	53.5 (25.0–79.0)	142	55.0 (36.0–82.0)	158
ALAT (IU/ml)	27.5 (7–291)	134	29.0 (11.0–212.0)	161
Bilirubin (μmol/ml)	7.0 (5.0–32.0)	129	7.0 (5.0–37.0)	160
Creatinine (μmol/liter)	72.0 (42.0–108.0)	131	81.0 (44.0–136.0)	159
Creatinine clearance (ml/min)	89.6 (36.0–168.5)	130	82.0 (44.0–144.2)	156
CD4 (cells/ml)	207.0 (27.0–2,306.0)	145	299.0 (14.0–1,054.0)	161
Plasma HIV RNA (copies/ml)	20.0 (20.0–251,188.6)	140	400.0 (400.0–190,530.0)	156
No. (%) of patients				
Female/male	65 (45)/80 (55)	145	72 (45)/89 (55)	161
Stavudine/zidovudine	119 (90)/13 (10)	132	8 (5)/153 (95)	161
Adherence ≥ 8	128 (98)	130	154 (99)	156
HIV RNA ≤ 400 copies/ml	128 (81.0)	140	147 (94.0)	156
HCV coinfection	10 (8.0)	125	11 (8.0)	138
HBV coinfection	18 (14.0)	127	20 (14.0)	139
HCV and HBV coinfection	2 (98.0)	125	2 (1.0)	138

(HIV RNA, <250 copies/ml) was achieved in 81% of the patients at M18 and in 94% of patients at M36. Patients with undetectable plasma viral load or lack of a resistance mutation in the case of increased viral load at M18 stayed on nevirapine, and 91% of them still had undetectable plasma HIV RNA at the M36 evaluation. Adherence was high in this population as 98% and 99% of the patients reported a visual analog scale of ≥8 at the M18 and M36 evaluations, respectively.

Frequency of genetic polymorphism. Loss-of-function alleles *CYP3A5 6986A>G*, *CYP2B6 516G>T*, *CYP2B6 1459C>T*, and *ABCB1 3435C>T* represent 65%, 35%, 1%, and 38% of the population, respectively. The test for Hardy-Weinberg proportions was nonsignificant for all four polymorphisms.

Nevirapine exposure. Four patients had concentrations measured at M18 and M36 and in the extensive pharmacokinetic substudy, 136 patients had concentrations measured at both M18 and M36, and 29 patients had concentrations measured at only one of these evaluations. At M18, one patient was excluded from the analysis as the only concentration was below the limit of quantification (LOQ); three other concentrations were below the LOQ, two at M18 and one at M36. Figure 1 represents the nevirapine concentrations observed at each occasion. The median nevirapine trough concentrations were 5,705 ng/ml (range, ≤50 to 13,871 ng/ml) and 5,709 ng/ml (range, ≤50 to 15,422 ng/ml) at M18 and M36, respectively. Note that 3.4% and 5.6% of the patients had nevirapine trough concentrations below 3,000 ng/ml at M18 and M36, respectively.

Population pharmacokinetics of nevirapine. Nevirapine concentrations were adequately described by a one-compartment model with first-order absorption and elimination. With the basic model, the apparent clearance of nevirapine was estimated to be 2.67 liters/h, with an interpatient variability of 28% and an intrapatient variability of 17%. The absorption constant and the apparent volume of distribution were 1.64/h and 213 liters (on average 3.9 liters/kg), respectively. Adding interpatient variabilities to these parameters did not improve the model. A constant residual error model with an estimated standard deviation of 519 ng/ml was selected. The estimates from the basic model as well as their relative estimation errors are given in Table 2.

The genetic component of variability, R_{GC}, for nevirapine clearance was 63.1%. After the first step of univariate covariate selection, *CYP2B6 516G>T* polymorphism (P = 0.02 and 3.10^{-10} for the GT and TT genotypes, respectively, compared with GG), creatinine clearance (P = 0.07), and HCV-coinfected status (P = 0.04) were significantly associated with the nevirapine apparent clearance (at the 0.1 level). Interestingly, in liver function tests, ALAT was not found to be a significant covariate.

Following the ascendant procedure based on the Wald test, only the effect of the *CYP2B6 516G>T* genetic polymorphism and the creatinine clearance remained in the model, so the apparent clearance of subject i at occasion k was predicted as follows: $CL_{ik} = CL \times e^{\beta_i} \times [CLCR_{ik}/\text{median}(CLCR)]^{0.23}$, where β_i equals 0, −0.12, or −0.46 if patient i has the GG, GT, or TT genotype for the *CYP2B6 516G>T* genetic polymorphism and $CLCR_{ik}$ is the patient's creatinine clearance at occasion k.

P values of the permutation test were 0.01 for GT versus GG, 0.001 for TT versus GG, and 0.007 for creatinine clearance. Estimates from the final model and their 95% confidence intervals derived from the standard errors are given in Table 2. The population mean clearances were estimated to be 2.95 liters/h, 2.62 liters/h, and 1.86 liters/h for patients carrying GG, GT, and TT genotypes, respectively, for the *CYP2B6 516G>T* polymorphism, which corresponds to 11% and 37% decreases in clearance from GG to the GT and TT genotypes, respectively. The lowest value of creatinine clearance was associated with a 14% decrease in CL/F, whereas the highest value of creatinine clearance was associated with a 16% increase in CL/F. The addition of the polymorphism and the creatinine clearance to the model lowered the interpatient variability by 3.1% and 0.3%, respectively.

Figure 2 represents the effect of the *CYP2B6 516G>T* polymorphism and of creatinine clearance on individual nevirapine apparent clearances. Evaluation graphs, sorted by genotype for the *CYP2B6 516G>T* polymorphism, with the visual predictive

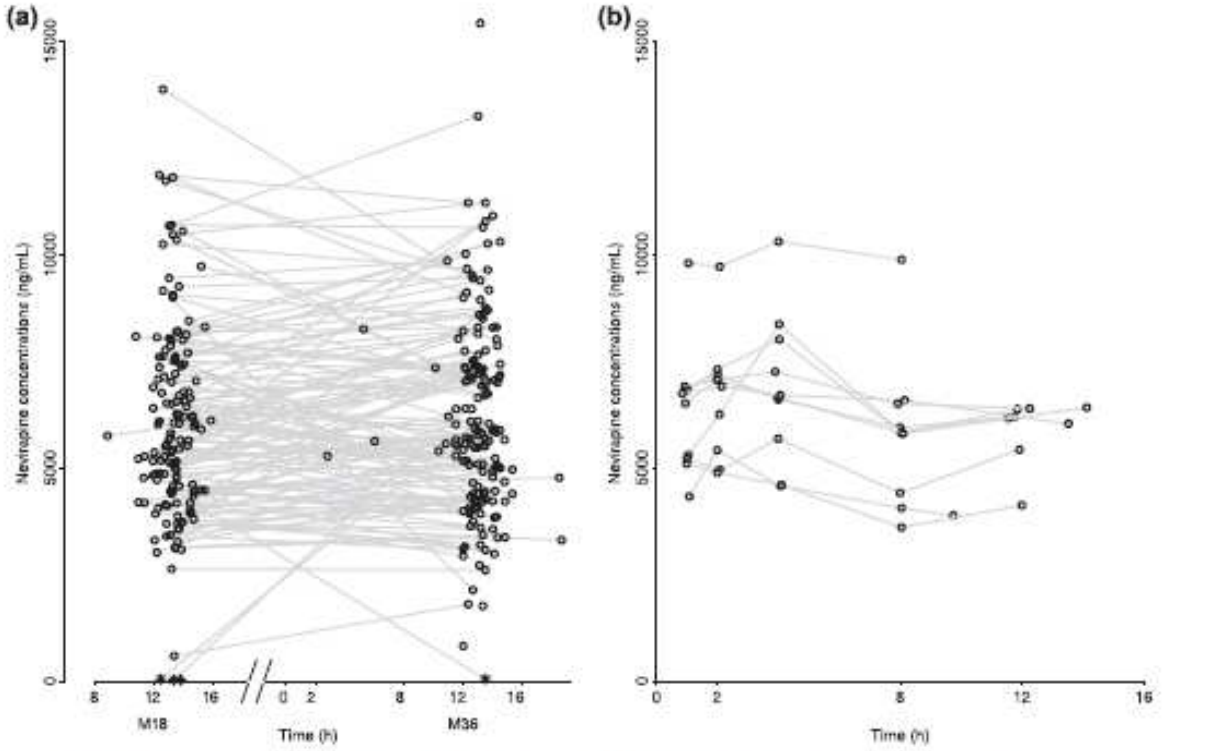


FIG. 1. Plasma nevirapine concentrations versus time in 170 Cambodian HIV patients at M18 and M36 (a) and in the extensive pharmacokinetic substudy (b). Values below the LOQ are represented by the asterisk at 0 on the *y* axis.

check plot and the normalized prediction discrepancies versus the time plot are shown in Fig. 3. The predictions from the model adequately describe the observations within each genotype.

DISCUSSION

These are the first results on frequencies of genetic polymorphisms of major drug-metabolizing enzymes and transporters reported to be involved in NNRTI disposition in a large Cambodian population. Most Caucasians expressed the *CYP3A5 6986GG* genotype associated with a small amount of translated CYP3A5 protein, with a G allele frequency ranging from 0.87 to 0.94 in various Caucasian populations (22, 29). In contrast, in various Asian populations, G allele frequencies were lower, ranging from 0.59 in Indians to 0.65 in Cambodians, as demonstrated in this study, 0.67 in a Vietnamese population, and 0.74 to 0.78 in Japanese, Chinese, and Korean populations (23, 29). The frequency is even lower in patients of African descent (0.36) (22). Higher expression of the CYP3A5 protein will lead to an increase in clearance of CYP3A substrate drugs, such as HIV-1 protease inhibitors. Lower saquinavir, atazanavir, or

TABLE 2. Parameter estimates and their 95% confidence intervals for the basic model and the final model with covariates

Parameter[c] (unit)	Basic model (n = 169)		Final model (n = 152)		
	Estimate	95% CI[a]	Estimate	95% CI	P value[b]
k_a (h^{-1})	1.64	0.35 to 7.75	1.58	0.24 to 10.15	
V/F (liters)	213	120 to 377	223	111 to 446	
CL/F (liters/h)	2.67	2.51 to 2.84	2.95	2.70 to 3.22	
$\beta_{CYP2B6\ 516GT}$			−0.12	−0.22 to −0.02	0.01
$\beta_{CYP2B6\ 516TT}$			−0.46	−0.62 to −0.30	9.9×10^{-4}
β_{CLCR}			0.23	0.06 to 0.40	6.9×10^{-3}
$\omega_{CL/F}$ (%)	28	24 to 32	24	0.20 to 0.28	
$\gamma_{CL/F}$ (%)	17	15 to 19	17	0.14 to 0.20	
σ (ng/ml)	519	408 to 630	580	454 to 716	

[a] CI, confidence interval.
[b] Permutation test of covariate effect.
[c] $\beta_{CYP2B6\ 516GT}$, $\beta_{CYP2B6\ 516TT}$, and β_{CLCR} are the factors associated with the two *CYP2B6* genotypes and the creatinine clearance on nevirapine CL/F, $\omega_{CL/F}$ is the interpatient variability for CL/F, $\gamma_{CL/F}$ is the interoccasion (or intrapatient) variability for CL/F, and σ is the residual error.

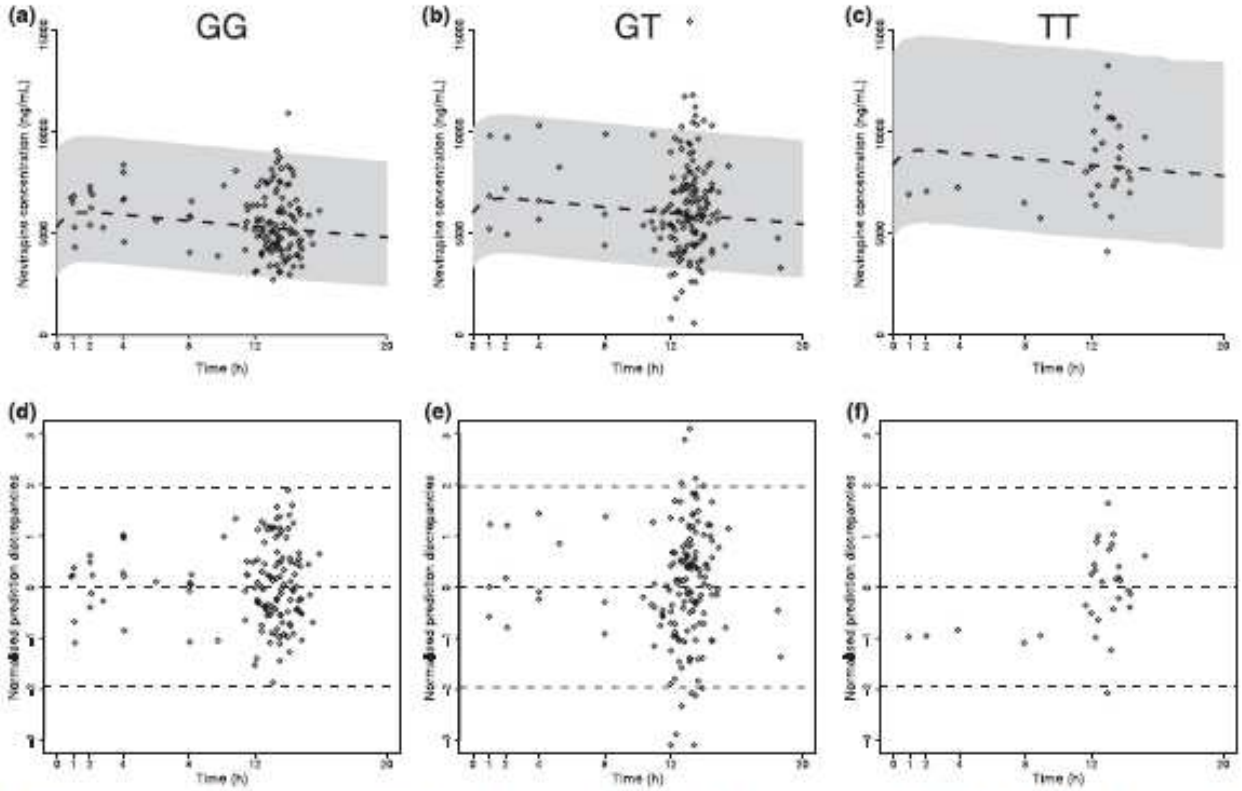


FIG. 2. Nevirapine concentrations versus time overlaid to the 90th interval and the median predicted from the final model (a to c) and normalized prediction discrepancies versus time (d to f) at all evaluations sorted by genotype for the *CYP2B6 516G>T* polymorphism.

indinavir concentrations (3, 24, 44) were demonstrated in patients who express CYP3A5, although disposition of lopinavir combined with ritonavir, which inhibits both CYP3A4 and CYP3A5, remained unaffected (15). This is of importance as lopinavir-ritonavir is the antiretroviral drug combination recommended by WHO for patients for whom a first-line NNRTI regimen fails.

The frequencies of the *CYP2B6 516G>T* mutant allele associated with loss of catalytic activity vary greatly according to the study population, with the following average values: 0.14 to 0.18 in Korean and Japanese populations (18, 23, 25), 0.21 in a Han Chinese population (20), 0.22 to 0.25 in Caucasians (22, 25), 0.27 in a Vietnamese population (49), 0.32 in a Thai population (9, 38), 0.28 to 0.38 in African-Americans (22, 25), 0.42 in West Africans, and up to 0.62 in Papua New Guineans (32). Not surprisingly, the frequency of 0.35 in our Cambodian population is close to that reported for people living in border countries, such as Thailand and Vietnam. The T allele frequency of *CYP2B6 1459C>T* is very low in our Cambodian population, as described for other East Asian populations (25, 49). The importance of the P glycoprotein, an efflux transporter, in drug disposition has been reviewed (46). The T allele frequency of *ABCB1 3435C>T* in the Cambodian population is close to what was reported for the Vietnamese population (49) but is lower than that for other Asian populations (4) or European Americans (46). All these data indicate marked differences in SNP frequencies between Cambodian and other Asian populations, such as Han Chinese, or Caucasian and African populations. They are in agreement with genomewide association studies, which show the genetic substructure between different East Asian groups and a low level of differentiation between Cambodian and Vietnamese populations (47).

The population pharmacokinetics of nevirapine was studied in a Cambodian HIV-infected population after long-term administration of nevirapine as backbone antiretroviral first-line therapy. The impressive efficacy of this antiretroviral drug regimen is in keeping with previous studies (7, 27). Such a positive virological outcome has already been pointed out in another Cambodian cohort with an efavirenz-based regimen (16) and was related to high adherence to combined antiretroviral therapy (cART), as noted by Spire et al. (45). In the present study, most patients (99%) reported an adherence greater than or equal to 8 on a 10-point visual analog scale. It should be stressed that in both cohorts, antiretroviral therapy was provided free through Global Funds and NCHADS programs and that educational programs were implemented on a regular basis.

Although nevirapine is the antiretroviral drug of choice in low-income countries, little is known of between- and within-patient variabilities. Our data show that after more than 1 year, under steady-state conditions, intraindividual variability in trough nevirapine concentrations is quite low, in agreement with previous data as Nettles et al. indicated a within-patient variability of 25% in one patient who received nevirapine,

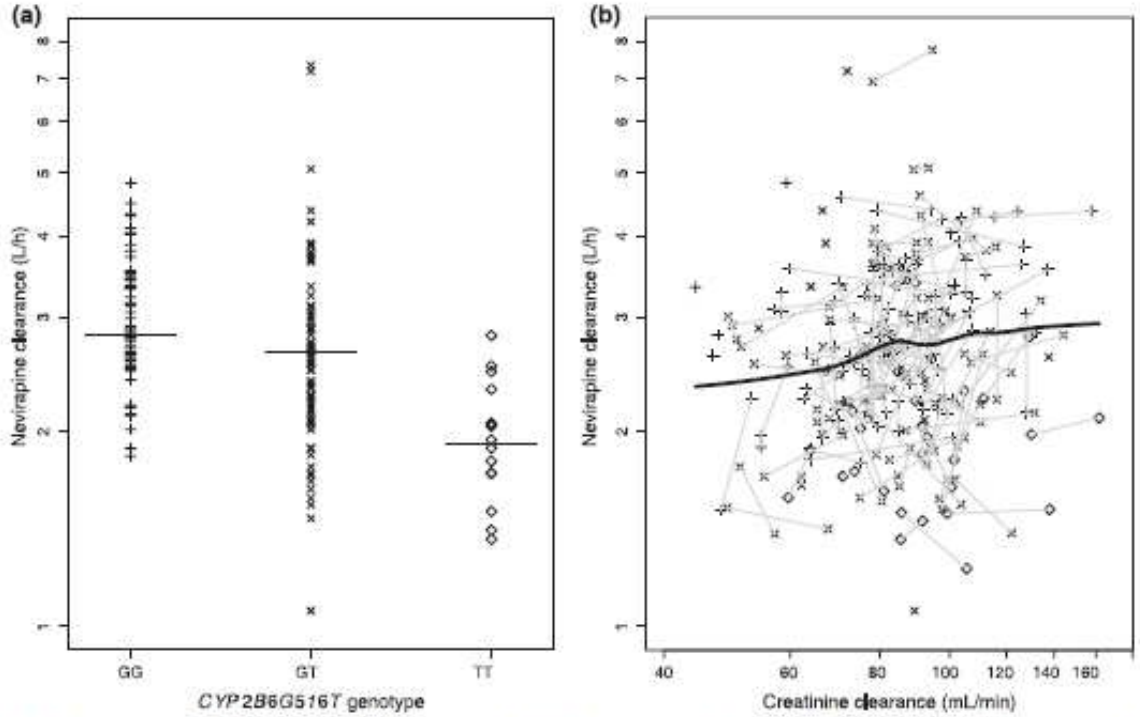


FIG. 3. (a) Mean over the individual nevirapine clearance at the different occasions (M18, M36, and the extensive pharmacokinetic substudy) for each of the 152 patients with an informed *CYP2B6 516G>T* genotype, sorted by genotype with the corresponding median (on a log scale). (b) Individual nevirapine clearance estimated at each occasion plotted versus the corresponding creatinine clearance observation. Data from each patient are connected by a segment. The solid line represents a regression spline (with *y* and *x* axes on a logarithmic scale). Patients with genotypes GG, GT, and TT for the *CYP2B6 516G>T* polymorphism are represented with the symbols +, × and ◇, respectively.

which is well below what has been reported for HIV protease inhibitors (19, 34). This is in keeping with nevirapine pharmacokinetic properties, with absolute bioavailability reported to be 90% after single-dose administration (26). The half-life at steady state is longer than the dosing interval in most patients despite autoinducing properties, which means that delaying drug intake or missing a dose will have little influence on steady-state concentrations. Interpatient variability is also quite low, most likely because absorption variability can be ruled out. Interestingly, Manosuthi et al. (30) recently reported that interpatient variability in the efavirenz group was 2.3-fold greater than in the nevirapine group, although these patients received concomitant use of rifampin, which could alter variability.

The estimation of nevirapine CL/F calculated at steady state in our population is in the range, albeit somewhat lower, of values in previous studies including different populations (2.95 to 3.35 liters/h) (11–13, 17, 33, 42, 50) and is roughly twice the apparent clearance reported after single-dose administration (21, 31), which clearly shows the importance of the autoinducing effect on either first-pass effect and bioavailability or total clearance. The 95% confidence interval for the apparent volume of distribution is large (111 to 446 liter), as the estimation error of this parameter is high. Therefore, comparison with other studies reporting somewhat lower values is difficult (21, 31). Interpatient variability in V/F and k_a could also not be estimated. This and the large standard error in V/F are related to the study design, since in most patients only one trough concentration was measured at each evaluation, giving mostly information on apparent clearance. This is one of the few studies demonstrating that *CYP2B6 516G>T* genetic polymorphism and creatinine clearance affect nevirapine clearance but explains only 3.1% and 0.3% of the interpatient variabilities, respectively. Apparent clearance is decreased by 37% in homozygous patients carrying the loss-of-function allele compared with that in patients carrying the homozygous wild-type allele, which leads to increased half-lives estimated to be 52 h (range, 28 to 96 h) for patients with the GG genotype, 59 h (29 to 120 h) for those with the GT genotype, and 83 h (38 to 178 h) for those with the TT genotype. In 126 children, Saitoh et al. demonstrated a 30% decrease in nevirapine clearance in children with the TT genotype compared to that in children with the GG genotype (43). Similarly, higher nevirapine concentrations have been reported in patients with the *CYP2B6 516TT* genotype (28, 36, 40), although the relationship is unclear after single-dose administration (9, 21). Such a discrepancy could be related to the autoinduction of CYP2B6 by repeated administration of nevirapine. Interestingly, genetic polymorphism was not found to affect the volume, ruling out a large inducing effect on bioavailability and first-pass effect. A relationship between nevirapine clearance and creatinine clearance was unexpected as nevirapine is eliminated mostly by biotransformations. Such a relationship was noted by Gandhi et al. (17) in a cohort of HIV-infected women, and they sug-

gested that the effect of uremic toxins on relevant hepatic transporters and metabolizing enzymes may explain the influence of renal insufficiency on nevirapine clearance. However, the clinical relevance of this phenomenon is small as the major changes were less than 20% from the mean. In agreement with others, no relationship between nevirapine clearance and weight was evidenced (11, 22).

No modification in nevirapine pharmacokinetics was seen in patients with liver disease (8, 11), and no relationship between ALAT and nevirapine concentrations was found in the present study.

This study has a number of limitations. First, plasma HIV RNA was not measured at inclusion in the cohort, as this parameter was not available in Cambodia when the ESTHER cohort was initiated. Therefore, no relationship between plasma HIV RNA decline and nevirapine exposure could be established. Treatment failure was seen only in a few antiretroviral-naïve patients at the first evaluation, which would have made such a relationship difficult to demonstrate. Second, patients who developed rashes and liver toxicity early after initiation of treatment were switched to efavirenz, so it cannot be shown whether the frequency of occurrence of these adverse events is dependent on the *ABCB1*, *CYP3A5*, or *CYP2B6* loss-of-function allele. Third, it remains to be seen whether other infrequent variants contribute to the variability in nevirapine clearance.

Despite such limitations, this study demonstrates that 95% of the patients had sustained nevirapine exposure well above the 3,000-ng/ml threshold. Nevirapine clearance was shown to be affected by *CYP2B6 516G>T* genetic polymorphism and creatinine clearance, although this explained only part of the interpatient variability, which remains low compared to that for other antiretroviral drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all Cambodian health care providers who take care of the patients included in the ESTHER cohort. Our thanks also go to ESTHER and ANRS for their support and to F. X. Babin and the Fondation Mérieux for supporting the Rodolphe Mérieux Laboratory located in the Faculty of Pharmacy, University of Health Sciences, Phnom Penh, Cambodia. The HIV/hepatitis laboratory of the Pasteur Institute of Phnom Penh (E. Nerrienet) kindly provided the HIV RNA viral load results.

None of the authors have conflicts of interest related to the present study.

REFERENCES

1. **Almond, L. M., D. Edirisinghe, M. Dalton, A. Bonington, D. J. Back, and S. H. Khoo.** 2005. Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus-infected individuals. Clin. Pharmacol. Ther. **78**:132–142.
2. **Amico, K. R., W. A. Fisher, D. H. Cornman, P. A. Shuper, C. G. Redding, D. J. Konkle-Parker, W. Barta, and J. D. Fisher.** 2006. Visual analog scale of ART adherence: association with 3-day self-report and adherence barriers. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **42**:455–459.
3. **Anderson, P. L., C. L. Aquilante, E. M. Gardner, J. Predhomme, P. McDaneld, L. R. Bushman, J. H. Zheng, M. Ray, and S. MaWhinney.** 2009. Atazanavir pharmacokinetics in genetically determined CYP3A5 expressors versus non-expressors. J. Antimicrob. Chemother. **64**:1071–1079.
4. **Balram, C., A. Sharma, C. Sivathasan, and E. J. Lee.** 2003. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. Br. J. Clin. Pharmacol. **56**:78–83.
5. **Bertrand, J., E. Comets, C. M. Laffont, M. Chenel, and F. Mentre.** 2009. Pharmacogenetics and population pharmacokinetics: impact of the design on three tests using the SAEM algorithm. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. **36**:317–339.
6. **Bertrand, J., E. Comets, and F. Mentre.** 2008. Comparison of model-based tests and selection strategies to detect genetic polymorphisms influencing pharmacokinetic parameters. J. Biopharm. Stat. **18**:1084–1102.
7. **Calmy, A., L. Pinoges, E. Szumilin, R. Zachariah, N. Ford, and L. Ferradini.** 2006. Generic fixed-dose combination antiretroviral treatment in resource-poor settings: multicentric observational cohort. AIDS **20**:1163–1169.
8. **Cammett, A. M., T. R. MacGregor, J. M. Wruck, F. Felizarta, P. Miailhes, J. Mallolas, and P. J. Piliero.** 2009. Pharmacokinetic assessment of nevirapine and metabolites in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with hepatic fibrosis. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:4147–4152.
9. **Chantarangsu, S., T. R. Cressey, S. Mahasirimongkol, E. Capparelli, Y. Tawon, N. Ngo-Giang-Huong, G. Jourdain, M. Lallemant, and W. Chantratita.** 2009. Influence of CYP2B6 polymorphisms on the persistence of plasma nevirapine concentrations following a single intra-partum dose for the prevention of mother to child transmission in HIV-infected Thai women. J. Antimicrob. Chemother. **64**:1265–1273.
9a. **Chou, M., J. Bertrand, O. Segeral, C. Verstuyft, L. Borand, E. Comets, L. Becquemont, V. Ouk, F. Mentré, Anne-Marie Taburet, and the ANRS 12154 Study Group.** 2009. Inter- and intra-patient variability in nevirapine plasma concentrations in HIV-infected Cambodian patients and the effect of CYP2B6 genetic polymorphism: ANRS 12154 study, abstr. 691. 16th Conf. Retrovir. Opportunistic Infect., Montreal, Quebec, Canada, 8 to 11 February 2009.
10. **Coulbault, L., M. Beaussier, C. Verstuyft, H. Weickmans, L. Dubert, D. Tregouet, C. Descot, Y. Parc, A. Lienhart, P. Jaillon, and L. Becquemont.** 2006. Environmental and genetic factors associated with morphine response in the postoperative period. Clin. Pharmacol. Ther. **79**:316–324.
11. **Dailly, E., E. Billaud, V. Reliquet, S. Breurec, P. Perre, S. Leautez, P. Jolliet, M. Bourin, and F. Raffi.** 2004. No relationship between high nevirapine plasma concentration and hepatotoxicity in HIV-1-infected patients naive of antiretroviral treatment or switched from protease inhibitors. Eur. J. Clin. Pharmacol. **60**:343–348.
12. **de Maat, M. M., A. D. Huitema, J. W. Mulder, P. L. Meenhorst, E. C. van Gorp, and J. H. Beijnen.** 2002. Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals. Br. J. Clin. Pharmacol. **54**:378–385.
13. **Elsherbiny, D., K. Cohen, B. Jansson, P. Smith, H. McIlleron, and U. S. Simonsson.** 2009. Population pharmacokinetics of nevirapine in combination with rifampicin-based short course chemotherapy in HIV- and tuberculosis-infected South African patients. Eur. J. Clin. Pharmacol. **65**:71–80.
14. **Erickson, D. A., G. Mather, W. F. Trager, R. H. Levy, and J. J. Keirns.** 1999. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. Drug Metab. Dispos. **27**:1488–1495.
15. **Estrela, R. C., A. B. Santoro, P. F. Barroso, M. Tuyama, and G. Suarez-Kurtz.** 2008. CYP3A5 genotype has no impact on plasma trough concentrations of lopinavir and ritonavir in HIV-infected subjects. Clin. Pharmacol. Ther. **84**:205–207.
16. **Ferradini, L., D. Laureillard, N. Prak, C. Ngeth, M. Fernandez, L. Pinoges, G. Puertas, A. M. Taburet, N. Ly, C. Rouzioux, S. Balkan, C. Quillet, and J. F. Delfraissy.** 2007. Positive outcomes of HAART at 24 months in HIV-infected patients in Cambodia. AIDS **21**:2293–2301.
17. **Gandhi, M., L. Z. Benet, P. Bacchetti, A. Kalinowski, K. Anastos, A. R. Wolfe, M. Young, M. Cohen, H. Minkoff, S. J. Gange, and R. M. Greenblatt.** 2009. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor pharmacokinetics in a large unselected cohort of HIV-infected women. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **50**:482–491.
18. **Gatanaga, H., T. Hayashida, K. Tsuchiya, M. Yoshino, T. Kuwahara, H. Tsukada, K. Fujimoto, I. Sato, M. Ueda, M. Horiba, M. Hamaguchi, M. Yamamoto, N. Takata, A. Kimura, T. Koike, F. Gejyo, S. Matsushita, T. Shirasaka, S. Kimura, and S. Oka.** 2007. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. Clin. Infect. Dis. **45**:1230–1237.
19. **Goujard, C., M. Legrand, X. Panhard, B. Diquet, X. Duval, G. Peytavin, I. Vincent, C. Katlama, C. Leport, B. Bonnet, D. Salmon-Ceron, F. Mentre, and A. M. Taburet.** 2005. High variability of indinavir and nelfinavir pharmacokinetics in HIV-infected patients with a sustained virological response on highly active antiretroviral therapy. Clin. Pharmacokinet. **44**:1267–1278.
20. **Guan, S., M. Huang, X. Li, X. Chen, E. Chan, and S. F. Zhou.** 2006. Intra- and inter-ethnic differences in the allele frequencies of cytochrome P450 2B6 gene in Chinese. Pharm. Res. **23**:1983–1990.
21. **Haas, D. W., T. Gebretsadik, G. Mayo, U. N. Menon, E. P. Acosta, A. Shintani, M. Floyd, C. M. Stein, and G. R. Wilkinson.** 2009. Associations between CYP2B6 polymorphisms and pharmacokinetics after a single dose of nevirapine or efavirenz in African Americans. J. Infect. Dis. **199**:872–880.
22. **Haas, D. W., H. J. Ribaudo, R. B. Kim, C. Tierney, G. R. Wilkinson, R. M. Gulick, D. B. Clifford, T. Hulgan, C. Marzolini, and E. P. Acosta.** 2004. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. AIDS **18**:2391–2400.
23. **Hiratsuka, M., Y. Takekuma, N. Endo, K. Narahara, S. I. Hamdy, Y. Kishikawa, M. Matsuura, Y. Agatsuma, T. Inoue, and M. Mizugaki.** 2002. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. Eur. J. Clin. Pharmacol. **58**:417–421.

24. **Josephson, F., A. Allqvist, M. Janabi, J. Sayi, E. Aklillu, M. Jande, M. Mahindi, J. Burhenne, Y. Bottiger, L. L. Gustafsson, W. E. Haefeli, and L. Bertilsson.** 2007. CYP3A5 genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir. Clin. Pharmacol. Ther. **81:**708–712.
25. **Klein, K., T. Lang, T. Saussele, E. Barbosa-Sicard, W. H. Schunck, M. Eichelbaum, M. Schwab, and U. M. Zanger.** 2005. Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. Pharmacogenet. Genomics **15:**861–873.
26. **Lamson, M. J., J. P. Sabo, T. R. MacGregor, J. W. Pav, L. Rowland, A. Hawi, M. Cappola, and P. Robinson.** 1999. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers. Biopharm. Drug Dispos. **20:**285–291.
27. **Laurent, C., C. Kouanfack, S. Koulla-Shiro, N. Nkoue, A. Bourgeois, A. Calmy, B. Lactuock, V. Nzeusseu, R. Mougnutou, G. Peytavin, F. Liegeois, E. Nerrienet, M. Tardy, M. Peeters, I. Andrieux-Meyer, L. Zekeng, M. Kazatchkine, E. Mpoudi-Ngole, and E. Delaporte.** 2004. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. Lancet **364:**29–34.
28. **Mahungu, T., C. Smith, F. Turner, D. Egan, M. Youle, M. Johnson, S. Khoo, D. Back, and A. Owen.** 2009. Cytochrome P450 2B6 516G→T is associated with plasma concentrations of nevirapine at both 200 mg twice daily and 400 mg once daily in an ethnically diverse population. HIV Med. **10:**310–317.
29. **Makeeva, O., V. Stepanov, V. Puzyrev, D. B. Goldstein, and I. Grossman.** 2008. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes. Pharmacogenomics **9:**847–868.
30. **Manosuthi, W., S. Sungkanuparph, P. Tantanathip, A. Lueangniyomkul, W. Mankatitham, W. Prasithsirskul, S. Buraputarawong, S. Thongyen, S. Likanonsakul, U. Thawornwa, V. Prommool, and K. Ruxrungtham.** 2009. A randomized trial comparing plasma drug concentrations and efficacies between 2 nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based regimens in HIV-infected patients receiving rifampicin: the N2R study. Clin. Infect. Dis. **48:**1752–1759.
31. **Marier, J. F., M. Dimaren, R. Guilhaud, C. Dodard, G. Morelli, S. K. Tippabhotla, A. K. Singla, N. R. Thudi, and T. Monif.** 2007. Pharmacokinetics of lamivudine, zidovudine, and nevirapine administered as a fixed-dose combination formulation versus coadministration of the individual products. J. Clin. Pharmacol. **47:**1381–1389.
32. **Mehlotra, R. K., M. N. Ziats, M. J. Bockarie, and P. A. Zimmerman.** 2006. Prevalence of CYP2B6 alleles in malaria-endemic populations of West Africa and Papua New Guinea. Eur. J. Clin. Pharmacol. **62:**267–275.
33. **Molto, J., M. Valle, C. Miranda, S. Cedeno, J. Miranda, J. R. Santos, E. Negredo, J. Vilaro, J. Costa, and B. Clotet.** 2008. Once- or twice-daily dosing of nevirapine in HIV-infected adults: a population pharmacokinetics approach. J. Antimicrob. Chemother. **62:**784–792.
34. **Nettles, R. E., T. L. Kieffer, T. Parsons, J. Johnson, J. Cofrancesco, Jr., J. E. Gallant, K. A. Carson, R. F. Siliciano, and C. Flexner.** 2006. Marked intra-individual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility of therapeutic drug monitoring. Clin. Infect. Dis. **42:**1189–1196.
35. **Ozdemir, V., W. Kalow, B. K. Tang, A. D. Paterson, S. E. Walker, L. Endrenyi, and A. D. Kashuba.** 2000. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. Pharmacogenetics **10:**373–388.
36. **Penzak, S. R., G. Kabuye, P. Mugyenyi, F. Mbamanya, V. Natarajan, R. M. Alfaro, C. Kityo, E. Formentini, and H. Masur.** 2007. Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) G516T influences nevirapine plasma concentrations in HIV-infected patients in Uganda. HIV Med. **8:**86–91.
37. **Pinheiro, J. C., and D. M. Bates.** 2000. Mixed-effects models in S and S-PLUS, 1st ed. Springer-Verlag, New York, NY.
38. **Puthanakit, T., P. Tanpaiboon, L. Aurpibul, T. R. Cressey, and V. Sirisanthana.** 2009. Plasma efavirenz concentrations and the association with CYP2B6-516G>T polymorphism in HIV-infected Thai children. Antivir. Ther. **14:**315–320.
39. **Quteineh, L., C. Verstuyft, V. Furlan, A. Durrbach, A. Letierce, S. Ferlicot, A. M. Taburet, B. Charpentier, and L. Becquemont.** 2008. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. **103:**546–552.
40. **Rotger, M., S. Colombo, H. Furrer, G. Bleiber, T. Buclin, B. L. Lee, O. Keiser, J. Biollaz, L. Decosterd, and A. Telenti.** 2005. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. Pharmacogenet. Genomics **15:**1–5.
41. **Rouet, F., M. L. Chaix, E. Nerrienet, N. Ngo-Giang-Huong, J. C. Plantier, M. Burgard, M. Peeters, F. Damond, D. K. Ekouevi, P. Msellati, L. Ferradini, S. Rukobo, V. Marechal, N. Schvachsa, L. Wakrim, C. Rafalimanana, B. Rakotoambinina, J. P. Viard, J. M. Seigneurin, and C. Rouzioux.** 2007. Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **45:**380–388.
42. **Sabo, J. P., M. J. Lamson, G. Leitz, C. L. Yong, and T. R. MacGregor.** 2000. Pharmacokinetics of nevirapine and lamivudine in patients with HIV-1 infection. AAPS PharmSci. **2:**E1.
43. **Saitoh, A., E. Sarles, E. Capparelli, F. Aweeka, A. Kovacs, S. K. Burchett, A. Wiznia, S. Nachman, T. Fenton, and S. A. Spector.** 2007. CYP2B6 genetic variants are associated with nevirapine pharmacokinetics and clinical response in HIV-1-infected children. AIDS **21:**2191–2199.
44. **Solas, C., N. Simon, M. P. Drogoul, S. Quaranta, V. Frixon-Marin, V. Bourgarel-Rey, C. Brunet, J. A. Gastaut, A. Durand, B. Lacarelle, and I. Poizot-Martin.** 2007. Minimal effect of MDR1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of indinavir in HIV-infected patients. Br. J. Clin. Pharmacol. **64:**353–362.
45. **Spire, B., P. Carrieri, P. Sopha, C. Protopopescu, N. Prak, C. Quillet, C. Ngeth, L. Ferradini, J. F. Delfraissy, and D. Laureillard.** 2008. Adherence to antiretroviral therapy in patients enrolled in a comprehensive care program in Cambodia: a 24-month follow-up assessment. Antivir. Ther. **13:**697–703.
46. **Telenti, A., and U. M. Zanger.** 2008. Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **48:**227–256.
47. **Tian, C., R. Kosoy, A. Lee, M. Ransom, J. W. Belmont, P. K. Gregersen, and M. F. Seldin.** 2008. Analysis of East Asia genetic substructure using genome-wide SNP arrays. PLoS One **3:**e3862.
48. **Titier, K., F. Lagrange, F. Pehourcq, L. Edno-Mcheik, N. Moore, and M. Molimard.** 2002. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the six HIV-protease inhibitors and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma. Ther. Drug Monit. **24:**417–424.
49. **Veiga, M. I., S. Asimus, P. E. Ferreira, J. P. Martins, I. Cavaco, V. Ribeiro, T. N. Hai, M. G. Petzold, A. Bjorkman, M. Ashton, and J. P. Gil.** 2009. Pharmacogenomics of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 in Vietnam. Eur. J. Clin. Pharmacol. **65:**355–363.
50. **Zhou, X.-J., L. B. Sheiner, R. T. D'Aquila, M. D. Hughes, M. S. Hirsch, M. A. Fischl, V. A. Johnson, M. Myers, J.-P. Sommadossi, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators.** 1999. Population pharmacokinetics of nevirapine, zidovudine, and didanosine in human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**121–128.

3.1.2 Impact de divers polymorphismes génétiques sur la clairance de la névirapine

Le résumé de cette étude réalisée en collaboration avec le Pr David Haas (Vanderbilt University, USA) figure ci après. Un article que nous souhaitons soumettre à Pharmacogenetics and genomics est en cours d'écriture et de validation par les auteurs, le résumé est présenté. Les analyses ont été réalisées par le Dr Julie Bertand (Pr Mentré) et le Pr D Haas.

Objectif : cette étude complète celle réalisée dans le cadre de l'étude ANRS12154. Après avis favorable du Comité d'éthique Cambodgien, les ADN des patients ayant participé à l'étude névirapine ont été envoyé au Pr D Haas (Vanderbilt AIDS Clinical Trials Center, Vanderbilt University, Nashville TN, USA) pour une exploration complète des polymorphismes des *CYP2B6*, *CYP3A4* et *3A5*, *MDR* et *PXR*.

Méthodes : Les analyses sont réalisées sur les échantillons d'ADN des patients cambodgiens inclus dans la cohorte Esther qui ont signé le consentement pour participer à l'étude pharmacogénétique. Le génotypage a été réalisé par technique Mass ARRAY iPLEX Gold en collaboration avec Pr David Haas. Les analyses sont réalisées en collaboration avec le Dr. Julie Bertrand et le Pr France Mentré. Les tests d'association ont été réalisés en utilisant la CL/F individuelle moyenne entre les périodes (évaluation M18 ou M36) comme phénotype. L'analyse d'association a été réalisée par régression linéaire multivariée du phénotype sur le nombre d'allèles ou d'haplotypes mineurs (i.e. modèle génétique additif) avec une correction du taux de faux positifs ou False discovery rate (FDR) pour les tests multiples. Les blocs haplotypiques ont été définis avec la méthode des intervalles de confiance autour de l'estimateur du déséquilibre de liaison (D') mise en œuvre dans le logiciel HaploView. Les phases haplotypiques ont été allouées par un algorithme probabiliste « espérance-maximisation » mis en œuvre dans le logiciel Plink qui a été utilisé pour l'ensemble de ces analyses.

Résultat : Dans cette étude, les génotypes de 129 patients ont été recueillis et l'estimation de la CL/F médiane de la névirapine de 2,63 L/h avec des écarts de 1,06 à 7,81 L/h. Sur les 196 loci explorés, 126 sont polymorphiques et les fréquences des allèles mineurs des polymorphismes

CYP2B6 G516T et *CYP3A5 A6986G* (variants liés à une perte de fonction enzymatique) sont respectivement 0,34 et 0,37. Après conditionnement sur le polymorphisme *CYP2B6 G516T*, les *CYP2B6 rs7251950, CYP2B6 rs2279343*, and *CYP3A4 rs2687116* ont été associés à la CL/F de la névirapine. En éliminant de l'analyse un patient avec une très forte clairance (7,81L/h), aucune relation avce le *CYP3A4 rs2687116* n'a été mise en évidence. Ainsi plusieurs SNPs sur le CYP2B6 explique une partie de la clairance de la névirapine.

Conclusion : Chez ces patients cambodgiens, plusieurs polymorphismes du *CYP2B6* influencent significativement la CL/F de la névirapine.

Multiple Genetic Variants Predict Steady-State Nevirapine Clearance in HIV-infected Cambodians

Julie Bertrand[a,b], Monidarin Chou[c], Danielle M Richardson[d], Céline Verstuyft[e], Paul D Leger[d], France Mentré[a], Anne-Marie Taburet [e], David W Haas[d], and ANRS 12154 study group

[a] UMR738 INSERM Paris Diderot University, Paris, France;
[b] Institute of Genetics, University College of London, London, England;
[c] Phnom Penh University, Phnom Penh, Cambodia;
[d] Vanderbilt University, Nashville, TN, United States;
[e] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Le Kremlin Bicêtre, France, F-94275, Univ Paris-Sud, EA4123, Le Kremlin-Bicêtre, F-94275, France

Correspondence to Julie Bertrand PhD, UCL Genetics Institute (UGI)
Darwin Building, 2d Floor Room 212, Gower Street
WC1E 6BT, London, United Kingdom
Tel: +44 (0)20 7679 2212
e-mail: j.bertrand@ucl.ac.uk

During this work Julie Bertrand was funded by an ANRS grant.
- Other grants

Short title: **Nevirapine Pharmacogenomics in Cambodia (**no more than 45 characters and spaces)

Acknowledgements:

This work was supported by a grant from ANRS (JB) and NIH grants AI077505, AI54999 (DWH)

Abstract

Objective

In a previous analysis involving HIV-infected participants from the ESTHER cohort in Phnom Penh, Cambodia, interindividual variability in steady-state nevirapine clearance was partially explained by *CYP2B6* 516G→T (*CYP2B6*6*). Herein we examine whether additional genetic variants predict nevirapine clearance in this cohort.

Methods Analyses included a subset of ESTHER cohort participants who had consented for genetic testing, were successfully genotyped, and had evaluable pharmacokinetic data. All were receiving nevirapine plus two nucleoside analogues. Mean individual nevirapine clearance estimates were derived from a population model developed on nevirapine concentrations at 18 and 36 months of therapy. Polymorphisms were assayed in *ABCB1, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5 and NR1I2*.

Results Of 197 loci assayed, 130 were polymorphic. Among 129 individuals with evaluable genetic data, nevirapine clearance ranged from 1.06 to 5.00 L/h in 128 individuals and was 7.81 L/h one individual. By univariable linear regression, CYP2B6 516G→T (CYP2B6*6) was associated with lower nevirapine clearances (β=-0.56, P=3.5x10-6). After controlling for CYP2B6 516G→T, independent associations were identified with CYP2B6 rs7251950, CYP2B6 rs2279343, and CYP3A4 rs2687116. In a sensitivity analysis, censoring of the single outlier value eliminated the CYP3A4 association. A model that included CYP2B6 516G→T (β=-1.61; P=1.01x10-9), rs7251950 (β=0.50, P=4.8x10-5), rs2279343 (β=4.13; P=7.1x10-5), and CYP3A4 2687116 (β=-1.91, P=8.0x10-6) explained interindividual variability in nevirapine clearance.

Conclusions Among HIV-infected Cambodians, several CYP2B6 polymorphisms were independently associated with, and in combination substantially improved prediction of interindividual variability in steady-state nevirapine clearance

Key words: Nevirapine pharmacokinetics, CYP2B6, pharmacogenetics, population approach, Cambodia

3.1.3 Pharmacocinétique des métabolites de la névirapine après dose unique ou administration répétée

Les métabolites plasmatiques de phase 1 de la névirapine ont été dosés dans le laboratoire du Pr Havard. Les paramètres mesurés chez 10 patients cambodgiens à l'état d'équilibre ont été comparés à ceux obtenus par le Pr David Haas chez 10 patients afro-américains après administration d'une dose unique. Les analyses pharmacocinétiques et statistiques ont été réalisées au laboratoire. Après le résumé en français de l'étude, nous présenterons le résumé soumis à la CROI 2012 ainsi que le manuscrit sur lequel nous travaillons avec les auteurs de ce travail.

Objectif : Aucune étude n'a, à ce jour, comparé les concentrations plasmatiques des métabolites de la névirapine après administration d'une dose unique ou à l'état d'équilibre après administration répétée. Une collaboration avec le Pr David Haas (Vanderbilt University) et le Pr Patty Havard (Ohio University) a permis le dosage des métabolites de la névirapine d'une part chez 10 volontaires sains d'origine afro américaine qui ont reçu une dose unique de névirapine et chez 10 patients cambodgiens qui ont participé à l'étude ANRS12154.

Méthode : Le dosage plasmatique de la névirapine a été réalisé par CLHP. Le dosage des métabolites de névirapine a été réalisé par une technique LC-MS/MS. L'analyse pharmacocinétique a été réalisée par modèle non compartimental en utilisant le logiciel WinNonLin, Pharsight v6.1. Le calcul de l'AUC est réalisé par la méthode des trapèzes et extrapolé à l'infini $AUC_{0\text{-}inf}$ = AUCt + Ct/λz pour la dose unique et à l'état équilibre $AUC_{0\text{-}12}$ en supposant que C0 = C12h. L'index métabolique a été calculé comme le rapport des AUC de chaque métabolite sur celle de la névirapine pendant le même intervalle de temps.

Résultat : La Cl/F de la névirapine est plus élevée après administrations répétées qu'après dose unique (47 ± 15 mL/min vs 22 ± 3 mL/min) et ce probablement du fait de l'auto induction de la névirapine après administrations répétées. Toutes les concentrations des métabolites sont inférieures à celle de la névirapine. Il n'y a pas de différence significative entre les demi-vies de la névirapine et celle des métabolites ce qui indique que la vitesse de formation des métabolites

est l'étape limitante de leur cinétique. La comparaison des concentrations des métabolites entre les deux groupe montre que :

- Les concentrations de névirapine sont identiques à ce qui est attendu après administration d'une dose unique ou à l'état d'équilibre, après administrations répétées ; la comparaison des demi-vies est difficile compte tenu de l'intervalle de temps entre deux prises (12 h) et de la demi-vie longue, même à l'état d'équilibre.
- La concentration de 2-hydroxy névirapine est diminuée après administrations répétées avec les AUC moyennes suivantes AUCτ = 0,11 µM.h vs $AUC_{0\text{-}inf}$ = 2,1 µM.h ($p<0,001$) et les index métaboliques de 0,039 ± 0,007 % vs 0,286 ± 0,178 %. Ceci pourrait être la conséquence de l'inhibition du CYP3A4 impliqué dans cette voie métabolique par un métabolite intermédiaire réactif.
- Le métabolite 8-hydroxy névirapine n'a été détecté qu'après administrations répétées, ce qui laisse supposer que la formation est plus rapide après induction.
- La Cmax du 3-hydroxy-névirapine est plus élevée à l'état équilibre qu'à dose unique. L'index métabolique est également supérieur à l'état équilibre qu'à dose unique (0,832 ± 0,602 % vs 0,288 ± 0,106 % $p<0,01$), ce qui pourrait être la conséquence de l'induction du CYP2B6 impliqué dans cette voie métabolique par la névirapine.
- Les concentrations de 12-hydroxy-névirapine sont environ 3 fois plus élevées à l'état équilibre qu'à dose unique mais les index métaboliques sont proches, indiquant l'absence d'induction ou d'inhibition du CYP impliqué le CYP2D6.
- La relation trouvée entre les concentrations de 12- hydroxy-névirapine et 4-carboxy névirapine s'explique par la formation de 4-carboxy-névirapine à partir de 12 hydroxy-névirapine.

Conclusion : Cette étude suggère pour la première fois qu'après administration d'une dose unique ou d'administrations répétées, les concentrations plasmatiques des 5 métabolites de la névirapine dosées sont très inférieures à celles de la névirapine. Le profil des concentrations des métabolites après administration d'une dose unique ou administrations répétées est différent d'une part du fait de l'induction enzymatique de certaines voies métaboliques et d'autre part de la formation lente d'autres métabolites. Bien sur ces résultats doivent être interprétés avec

prudence, puisque les populations étudiées afroaméricaine et cambodgienne sont très différentesx. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'impact de ces métabolites sur les effets indésirables de la névirapine.

Résumé accepté à la CROI, 2012

Your abstract entitled "Different Nevirapine Metabolite Profiles with Single-dose and at Steady-state" has been submitted. Please keep this confirmation until you receive your disposition via email on or November 28, 2011. *Again this year*: edits to the abstract (other than designating a different category) may be made online after submission up until the deadline of 5 pm ET, October 5, 2011 (please note that you will not receive an updated confirmation email when making additional edits).

Abstract Number	
	N-112
Authors and Affiliations	
Authors and Affiliations	Patty Fan-Havard[1], Zhongfa Liu[2], Monidarin Chou[3], Yonghua Lin[2], Aurélie Barrail-Tran[4,5], David Haas[6], Anne-Marie Taburet*[4], and ANRS 12154 Study group *[1]Sch of Pharmacy and Pharmaceutical Sci. Univ at Buffalo, Amherst, NY, US~ [2]Coll of Pharmacy, The Ohio State Univ, Columbus, OH, US~ [3]Faculty of Pharmacy, Univ Health Sciences, Phnom Penh, Cambodia~ [4]Bicêtre Hosp Univ Paris Sud, Kremlin-Bicêtre, France~ [5]Faculty of Pharmacy, Univ Paris-Sud, Chatenay-Malabry, France~ and [6]Vanderbilt Univ Sch of Med, Nashville, TN, US*
Abstract	
Title	Different Nevirapine Metabolite Profiles with Single-dose and at Steady-state
Describes New Compound	Not Applicable

Body

Background: Nevirapine (NVP) undergoes phase 1 hydroxylation by CYP isoforms (2-OH by CYP3A4/5; 3-OH by CYP2B6; 8-OH by CYP2D6; 12-OH by CYP3A4/5 and CYP2D6), with subsequent 4-carboxylation (CA). It has been suggest that metabolites may mediate NVP toxicity. The purpose of this study was to characterize NVP metabolite profiles following a single-dose (SD) and at steady-state (SS) in cohorts from two previous studies.

Methods: The SD cohort comprised 10 HIV-negative African Americans, a single 200 mg NVP dose, and serial plasma pharmacokinetic (PK) sampling for 13 days. The SS cohort comprised 10 HIV-infected Cambodians, chronic twice-daily NVP 200 mg dosing, and serial plasma PK sampling for 12 hrs. Parent NVP was assayed by HPLC, and 2-OH, 3-OH, 8-OH, 12-OH and 4-CA metabolites by LC/MS/MS. PK parameters were calculated by non-compartmental analysis. With SD, AUC was extrapolated to infinity; With SS, AUC was calculated for 12 hrs. Apparent NVP clearance (Cl/F) was dose divided by AUC. Metabolic index (MI) was defined as metabolite-to-NVP AUC ratio. Results are expressed as median and range.

Results: The SD and SS cohort, respectively, included 8 and 5 females, median ages were 25 and 32 years, and median weights were 68 and 52 kg. NVP Cl/F with SD and SS were 0.29 and 0.83 mL/min/kg, respectively (p<0.001). Parent NVP exceeded metabolite concentrations at every time point. Metabolite concentrations tended to parallel declines in NVP concentrations. With both SD and SS the major metabolite was 12-OH-NVP. Only with SS was 8OH-NVP detected. The Table shows MI values.

	Metabolic indices -% as median (range)		
	Single-dose	Steady-state	P-value
2-OH-NVP	0.25 (0.12 0.66)	0.04 (0.03 0.05)	p<0.001
3-OH-NVP	0.32 (0.13 0.39)	0.62 (0.33 2.01)	p<0.01
8-OH-NVP	<LLQ	0.28 (0.17 0.55)	-
12-OH-NVP	6.79 (2.24 11.14)	3.62 (2.19 7.49)	0.10
4-CA-NVP	0.56 (0.26 1.14)	0.47 (0.32 0.58)	0.38

A lower MI for 2-OH-NVP with SS suggests inhibition of CYP3A. The higher MI for 3-OH-NVP with SS is consistent with NVP induction of CYP2B6. There were no such changes in MI for 12-OH-NVP or 4-CA-NVP, which are formed in part by non-inducible CYP2D6.

Conclusions: These data suggest that NVP metabolite profiles evolve over time as a consequence of CYP2B6 induction, and possibly CYP3A inhibition as demonstrated in vitro. We suspect that human genetic variants also play a role. These results may have implications for NVP toxicity and/or efficacy.

CROI Secretariat
115 South Saint Asaph Street, Alexandria, VA 22314 USA
telephone: 703-535-6862 | fax: 703-535-6899
email: info@retroconference.org | website: www.retroconference.org

1ère version du manuscrit à soumettre à Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Pharmacokinetics of phase I nevirapine metabolitesfollowing a single dose and at steady state

Patty FAN-HAVARD[1], Zhongfa LIU[2], Monidarin CHOU[3,] Yonghua LIN[2], Aurélie BARRAIL-TRAN[4,5], David W. HAAS[6,] Anne-Marie TABURET*[5] and the ANRS12154 study group

[1]School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, Amherst, NY, 14260 and College of Medicine, the Ohio State University Columbus, OH, 43210; [2]College of Pharmacy, the Ohio State University Columbus, OH, 43210; [3]Rodolphe Mérieux Laboratory, Faculty of Pharmacy University of Health Sciences, Phnom Penh, Cambodia, [4]Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Clinical Pharmacy, France, [5] EA4123, Faculty of Pharmacy, University Paris Sud, France [6] Department of Medicine; Divisions of Infectious Diseases and Clinical Pharmacology; Departments of Pharmacology, Microbiology & Immunology; Center for Human Genetics Research, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, 37232 USA.

Text 2937 words 12 pages

Abstract 242 words

3 figures and 2 tables

Short title (40/54 characters and space): Nevirapine metabolites pharmacokinetics

***Correspondance to**: Dr Anne-Marie Taburet
Clinical Pharmacy Department

Hôpitaux Universitaires Paris Sud

Hôpital Bicêtre

78 rue du Général Leclerc

94270 Kremlin Bicêtre France

Fax +33 1 45 21 28 60 Phone +33 1 45 21 28 60

Abstract (233/250 words)

Nevirapine is one of the most extensively prescribed antiretrovirals worldwide. The present analyses used data and specimens from two prior studies to characterize and compare plasma nevirapine phase I metabolite profiles following a single 200 mg oral dose of nevirapine in 10 HIV-negative African Americans, and at steady state with 200 mg twice-daily in 10 HIV-infected Cambodians. Nevirapine was assayed by HPLC. The 2-, 3-, 8- and 12-hydroxy and 4-carboxy metabolites of nevirapine were assayed by LC/MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartmental analysis. The metabolic index for each metabolite was defined as the ratio of metabolite AUC to nevirapine AUC. Every metabolite concentration was less than the corresponding nevirapine concentration. The predominant metabolite after single dose and at steady state was 12-hydroxynevirapine. From single to steady state, the metabolic index increased for 3-hydroxynevirapine ($p<0.01$), but decreased for 2-hydroxynevirapine ($p<0.001$), The 3-hydroxynevirapine metabolic index was correlated with nevirapine apparent clearance ($p<0.001$). These findings are consistent with induction of CYP2B6 (3-hydroxy metabolite) and inhibition of CYP3A4 (2-hydroxy metabolite). There were no such changes in metabolic indexes for 12-hydroxynevirapine or 4-carboxynevirapine. Two subjects with the CYP2B6516TT genetic polymorphism had metabolic indexes in the same range as other subjects. These results suggest that nevirapine metabolite profiles change over time under the influence of enzyme induction, enzyme inhibition, and host genetics. Further work is warranted to elucidate nevirapine biotransformation pathways, and implications for drug efficacy and toxicity.

Key words: nevirapine, metabolites, single dose, steady state, pharmacokinetics,

Introduction

In resource-limited settings, the non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) nevirapine is among WHO recommended components of first-line antiretroviral therapy. At the time of this study, nevirapine in combination with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors such as stavudine or zidovudine, together with lamivudine was the preferred regimen for treatment-naïve patients, mainly because of the availability of WHO prequalified low-cost generic fixed-dose combination (3, 23). In addition, single dose nevirapine administered to pregnant, HIV-infected women at delivery has been widely prescribed to prevent mother-to-child transmission (17, 21, 24). Despite its major therapeutic benefits, treatment with nevirapine has been associated with a substantial incidence of hepatotoxicity and skin rash (5). Although the molecular mechanism of nevirapine toxicity is incompletely understood, a causal role of metabolites has been suggested (2, 6).

Despite its widespread use, there remain gaps in understanding of nevirapine metabolism and disposition. Its pharmacokinetics are characterized by a long plasma half-life after single dose administration, which decreases with repeated doses due to autoinduction of its biotransformation (1, 5, 13, 22). Nevirapine is 60% bound to plasma proteins, and elimination occurs mainly through oxidative metabolism. Five metabolites have been identified, including hydroxyl metabolites at positions 2, 3, 8 and 12 (figure 1), and4-carboxynevirapine derived from the 12-hydroxy metabolite. In vitro microsome data suggest that CYP3A4 is involved in 2-hydroxynevirapine formation, and CYP2B6 in 3-hydroxynevirapine formation (12). Several CYPs are involved in the other pathways (4, 12). These metabolites are further eliminated in the urine as conjugates, mainly

glucuronides (31). Little is known regarding the nevirapine biotransformation and metabolite disposition, in part due to the lack of a direct and sensitive assay.and uptodate, studies reported metabolites concentration in plasma after hydrolysis of the conjugates (4, 16).

A sensitive LC/MS/MS assay was recently developed to quantitate the phase I metabolites of nevirapine (30). The present analyses applied this assay to specimens from two prior studies to characterize and compare plasma nevirapine phase I metabolite profiles following a single 200 mg oral dose of nevirapine in 10 HIV-negative African Americans, and at steady state with 200 mg twice-daily in 10 HIV-infected Cambodians.

Methods

Patients and study design

Data and specimens for these pharmacokinetic analyses were from individuals who had participated in two previously published studies (7, 15). This analysis was approved by the National Ethics Committee of Cambodia, and by the Vanderbilt University Institutional Review Board. Plasma samples were from 10 healthy, HIV-negative African Americans (group A) who had received a single oral dose of nevirapine 200 mg(15), and from 10 HIV-infected Cambodians (group B) from the Esther cohort at the Calmette Hospital (Phnom Penh) (7). In both groups, plasma was kept frozen until analysis, and genotype data for *CYP2B6* 516G→T was available from the previous studies (7, 15).

Group B patients were on chronic, steady-state antiretroviral therapy with nevirapine 200 mg twice-daily plus two nucleoside analogs (lamivudine with either stavudine or zidovudine), and agreed to participate to this extensive pharmacokinetic study

as part of the ANRS12154 study. In that study plasma HIV-1 RNA were measured in addition to standard laboratory tests.

Plasma samples from group A subjects were obtained at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 hours after a single dose of nevirapine, and on days 1 (24 hours), 2, 3, 5, 7, 9 and 13. Plasma samples from group B subjects were collected at pre-dose and at 1, 2, 4 and 8 hours after the morning nevirapine dose.

Assay of nevirapine and metabolites in plasma

Plasma nevirapine assays for group A were performed in the United States (15), and for group B were performed in Cambodia (7), both by liquid chromatography according to previously validated assays. The lower limit of quantification was 50 ng/mL. Standard curves were linear up to 5,000 ng/mL (15) or 10,000 ng/mL (7). The within-day and day-to-day precisions of quality control samples included in each analytical run were below 12%.

Nevirapine metabolites were assayed using a validated tandem LC/MS/MS recently published by the Biomedical Mass Spectrometry Laboratory at the Ohio State University (30). The lower limit of quantification was 1 ng/mL for each hydroxy metabolites and 5 ng/mL for 4-carboxy nevirapine. Day-to-day precision of quality control was below 14%, and accuracy for between-run validation was within 93 and 116%. All concentrations were converted in molar equivalents based on molecular weights: nevirapine, 266; hydroxy nevirapine, 282; and 4-carboxynevirapine, 292.

Pharmacokinetic analysis

Pharmacokinetic parameters for nevirapine and its phase I metabolites were assessed by non-compartmental methods (WinNonlin v6.1; Pharsight Corporation, Mountain View, Calif.). The linear-log trapezoidal method was used to calculate areas under concentration-versus-time curves (AUCs), for group A to the last measurable concentration at time t (AUC_{0-t}), and for group B over a 12-hour dosing interval ($AUC_{\square\square}$). For group B we assumed identical pre-dose and 12-hour post-dose concentrations. The AUCs from t to infinity (AUC_{inf}) were calculated by extrapolation whenever determination of the terminal rate constant (λ_z) was possible. Significant differences between AUC_{12} and AUC_{inf} suggest non-linear pharmacokinetics. Apparent clearance of nevirapine (CL/F) were calculated by the following standard equations after single or repeated doses, respectively: CLs_D/F = dose/AUC_{inf} and CL_{SS}/F. Metabolic index was defined as the ratio of metabolite AUC to nevirapine AUC. For consistency in group A, AUC_{0-t} to the same last time ”t” of concentration detection was used for metabolites and nevirapine to calculate metabolic indices, due to inability to accurately determine the terminal rate constants (λ_z) for metabolites that were detected at very low concentrations. The maximum plasma concentration (C_{max}), the observed pre-dose concentration (C_0), and time to C_{max} (T_{max}) were obtained from visual inspection of concentration-time curves.

Statistical analyses

This observational pharmacokinetic study assessed plasma concentrations of nevirapine metabolites following single or repeated doses of nevirapine. When this pilot study was designed there were no data to guide sample size estimates . We chose to study

10 individuals in each group to detect major differences in nevirapine metabolite disposition.

Pharmacokinetic parameters for nevirapine and its metabolites were described by medians and ranges. Parameters were compared between group A and group B using the non-parametric Wilcoxon rank-sum test. When appropriate, associations between pharmacokinetic parameters were examined using a Pearson correlation test. All analyses were performed using Statgraphics 5 plus (Manugistics, Inc., Maryland, USA).

Results

Study subject characteristics

Subject characteristics are summarized in **Table 1**. Group A comprised healthy, HIV-negative African Americans who received a single dose of nevirapine. Group B comprised HIV-infected Asians in Cambodia who were studied at steady state on nevirapine-containing regimens for at least one year. All patients had plasma HIV-1 RNA <400 copies/mL at the time of study, and CD4 T cell counts ranged from 155 to 513 cells/mL (median 277 cells/mL). Eight patients were receiving concomitant zidovudine and lamivudine, and 2 concomitant stavudine and lamivudine. None of the patients were receiving medications that induce or inhibit drug metabolizing enzymes (e.g. rifampin or fluconazole). In addition to race/ethnicity, the two populations differ by BMI and proportion of female participants. Frequencies of CYP2B6 516G→T genotypes were similar between groups, with one subject in each group being homozygous for TT. All but one patients in group B had normal liver function tests (one with ALAT = 99 IU/mL), all had plasma creatinine <100 μmol/L, and calculated creatinine clearances >60 mL/min. had

,

Concentrations of nevirapine and its phase I metabolites

In groups A and B, plasma concentrations of each metabolite were well below concentrations of nevirapine at every timepoint (**Figure 2**). Of the metabolites assayed, 12-hydroxynevirapine was most abundant in both groups. Concentrations of 12-hydroxynevirapine were on average 5-times greater in group B than in group A, which parallels nevirapine concentrations. Concentrations of 3-hydroxynevirapine and 4-carboxynevirapine increased 5- to 20-fold in group B compared to group A. Interestingly, 2-hydroxynevirapine concentration decreased from group A to group B. Plasma levels of8-hydroxynevirapine were undetectable following a single dose of nevirapine. In contrast, measurable concentrations of 8-hydroxynevirapine were detected in all samples in group B, with a median Cmax concentration of 0.075 μM. Temporal declines in metabolite concentrations tended to parallel declines in nevirapine concentrations, indicating that the rate of metabolite formation is the rate-limiting step in their disposition and is driven by the slow elimination rate for nevirapine.

Pharmacokinetics of nevirapine metabolites

Pharmacokinetic parameters of nevirapine and its phase I metabolites are summarized in **Table 2**. As expected, the half-life of nevirapine was long in group A, with considerable interindividual variability (median 99 hours, range 53 to 217 hours). Although median half-lives of some metabolites tended to be shorter than that of nevirapine, these differences were not statistically significant, perhaps because plasma concentrations were low and approached limits of assay quantification. We could not calculate half-lives for nevirapine or its metabolites at steady state as the dosing interval was too short.

The nevirapine AUC_{12} in group B was significantly less than the AUC_{inf} in group A, and Cl/F was significantly greater in group B than in group A (43 mL/min and 22 mL/min, respectively, or 0.83 mL/min/kg and 0.29 mL/min/kg, respectively, $p< 0.001$), indicating non-linear pharmacokinetics and autoinduction. As a possible consequence of enzyme induction and increase in rate of formation, the 3-hydroxynevirapine AUC_{12} in group B was greater than the 3-hydroxynevirapine AUC_{inf} in group A, although this difference was not significant. In contrast, the 2-hydroxynevirapine AUC_{12} was 95% lower in group B than the 2-hydroxynevirapine AUC_{inf} in group A ($p<0.001$). 8-hydroxynevirapine was detected in group B but not in group A. In contrast, 12-hydroxynevirapine and 4-carboxynevirapine AUC_{12} values were significantly lower in group B, representing approximately 30 and 40% of group A AUC_{inf} values, respectively. There was a correlation between AUCs of 4-carboxynevirapine and 12-hydroxynevirapine ($r^2=0.66$ $p<0.0001$). Metabolite indices were compared between group A and group B (**Figure 3**). The 2-hydroxynevirapine metabolite index was lower in group B than in group A ($p=0.0002$), while the 3-hydroxynevirapine metabolite index was higher in group B than in group A ($p=0.007$). In contrast, for 12-hydroxynevirapine and 4-carboxynevirapine metabolic indexes there were no significant differences between group A and group B. in in analyses involving all 20 study subjects there were correlations between the apparent clearance of nevirapine and metabolite indices for 2-hydroxynevirapine ($r^2=0.52$, $p<0.001$), 3-hydroxynevirapine ($r^2=0.30$, $p<0.01$), and 12-hydroxynevirapine ($r^2=0.18$, $p=0.03$).

The 2 subjects carrying the CYP2B6 516 TT genotype had nevirapine and metabolite concentrations in the same range as the other subjects either after single dose administration or at steady state.

Discussion

This is the first study to describe the pharmacokinetics of nevirapine, its phase I metabolites after a single dose of nevirapine, and at steady state with twice-daily dosing. The most important findings from this study are the low concentrations of nevirapine metabolites, compared to nevirapine, and the effect of repeated administration on metabolite concentration and production with a dual inhibiting, inducing effect. The effect of nevirapine induction in increasing CYP2B6 pathway and 3-hydroxymetabolite and the lower concentration of the metabolite formed through CYP3A pathway as a possible consequence of CYP3A inhibition by an intermediate reactive metabolite have never been described. Therefore, interestingly, disposition of hydroxylated metabolites differ, possibly in keeping with the different CYP involved in the metabolic pathways (12). Pharmacokinetic characteristics of nevirapine are in agreement with previous studies conducted after single dose or at steady state which clearly demonstrates the auto inducing properties of nevirapine (8-10, 13, 20, 24, 25, 27, 28, 32, 36). Indeed the two populations differ by their ethnicity and demographic characteristics, although the CYP2B6 516G→T genetic polymorphism frequency is very close but the significant difference remains when clearances are weight normalized (0.83 mL/min/kg vs 0.29 mL/min/kg). Low apparent nevirapine clearance suggests that biotransformation occurs mainly in the liver and that intestinal first pass effect is negligible. Consequently, as previously mentioned, the higher nevirapine clearance observed at steady state was due to a change in nevirapine metabolism rather than to altered bioavailability.

This study provides new information on non-conjugated nevirapine metabolites disposition in plasma. After single dose or at steady state, concentrations are well smaller

than those of nevirapine. On one hand, the volume of distribution of polar metabolite should be close or smaller than that of nevirapine and on the other hand, a very fast rate of glucuronide conjugates elimination is limited by their rate of formation from nevirapine or from 12-hydroxynevirapine for 4-carboxynevirapine. Consequently, different concentrations may be related to different rates of formation. This is in keeping with the previous findings of Riska et al. (31) who demonstrate that after autoinduction and administration of a single oral dose (solution) of 50 mg containing 100 mCi of [^{14}C]NVP, glucuronide conjugation, and urinary excretion of glucuronidated metabolites represent the primary route of nevirapine biotransformation and elimination in humans. 2-hydroxynevirapine glucuronide (18.6%), 3-hydroxynevirapine glucuronide (25.7%), 12-hydroxynevirapine glucuronide (23.7%) were the major metabolites recovered in urines. They also showed that disposition of radioactivity was rate-limited by biotransformation of nevirapine to its hydroxylated metabolites rather than by excretion of the metabolites into feces and urine which is in keeping with our results. Our plasma samples were not hydrolysed; therefore the plasma ratio of hydroxynevirapine to their glucuronide is not available in our study. Comparison of trough plasma concentrations measured at steady state in our patients with the concentrations measured in HIV-infected patients with mild liver fibrosis (4) showed that non conjugated 2-hydroxynevirapine or 3-hydroxynevirapine concentrations are well below those of the glucuronides which remained lower than those of nevirapine, roughly 2 ng/mL vs 177 ng/mL and 12ng/mL vs 759 ng/mL respectively. In contrast, 8-hydroxynevirapine and 12-hydroxynevirapine concentrations are closer whether plasma was hydrolyzed or not (29 vs 31ng/mL, 504 vs 142 ng/mL), indicating that glucuronide concentrations of these metabolites in plasma are low. Concentrations of 4-

carboxynevirapine were low and in the same range which is explained by the elimination of this metabolite unchanged in urine (31).

Comparison of concentrations of nevirapine metabolites or metabolic indexes after single dose administration and steady state provides interesting insight in nevirapine disposition. Clearly disposition of the four hydroxylated metabolites is different which could be related to different CYP involved in their formation. In vitro data demonstrated that CYP3A4 and CYP2B6 were responsible of the formation of 2- and 3-hydroxynevirapine respectively, while CYP3A4 and CYP2D6 participated to the formation of 8- and 12-hydroxynevirapine (12). Hepatic CYP2B genes represent the most inducible CYP isoforms by phenobarbital-type compounds in most mammalian species (26, 33). Consequently, induction of CYP2B6 can explain the increase in 3-hydroxymetabolite concentrations at steady state. Surprisingly, the 2 subjects from group A and B carrying the CYP2B6 516TT do not have decreased concentration of 3-hydroxynevirapine suggesting that this variant could be inducible by nevirapine. CYP3A4 was identified as the unique CYP involved in the formation of 2-hydroxynevirapine which surprisingly is decreased at steady state compared to single dose. A recent investigation conducted in human liver microsomes revealed the formation of a quinine methide reactive intermediate which is subsequently attacked by glutathione to yield a sulfydryl conjugate of nevirapine (34). This reactive intermediate was primarily catalyzed by CYP3A4, and possibly CYP2D6, CYP2C19 and CYP2A6 and was shown to be an inactivator of CYP3A4 with a Ki=31µM (about 8000 ng/mL), not far from average concentration of nevirapine at steady state. This in vitro data corresponds to the clinical observation of potent attenuation of CYP3A4 induction and possibly to the decreased formation of 2-hydroxynevirapine. Such dual

mechanism of inhibition/inactivation and induction has been demonstrated for other drugs such as ritonavir or nelfinavir (14, 18), although the net effect of those antiretroviral drugs is potent CYP3A inhibition, in contrast to nevirapine where induction of CYP2B6 could be the primary pathway. The exact contribution of different CYPs to the formation of 8-hydroxynevirapine and 12-hydroxynevirapine is unknown. From in vitro data, 8- and 12-hydroxynevirapine formation is supposed to involve CYP3A4 and CYP2D6. The 8-hydroxynevirapine was detected in plasma only at steady state, one would anticipate induction of metabolic pathway by nevirapine, which is not supported by in vitro data or alternatively, slow rate of formation by non inducible CYP2D6 and accumulation at steady state (11, 19). Decreased AUC_{12} compared to AUC_{inf} but no differences in metabolic indexes suggest major contribution of non inducible CYP2D6.

Nevirapine is associated with a relatively high incidence of life-threatening skin rash and liver toxicity in humans (29). It has been suggested from in vitro experiments and animal models that the 12-hydroxynevirapine pathway could be involved in nevirapine toxicity. An ultimate reactive metabolite for both liver toxicity and skin rash could be the quinone methide formed by CYP3A4 as previously mentioned (2, 6, 34). Conversely, recent toxicogenomics of nevirapine suggest fundamentally different mechanisms of adverse events: cutaneous, most likely major histocompatibility complex (MHC) class I-mediated, influenced by nevirapine CYP2B6 metabolism; hepatic, most likely MHC class II-mediated and unaffected by such metabolism (35). Our study conducted in a limited number of subjects, was not designed to compare metabolites exposure and occurrence of side events. Reactive metabolites in the liver or skin formed protein adduct, and it is

unlikely that 12-hydroxynevirapine concentrations in plasma will be directly related to toxicities.

This study has limitations as two groups of different patients from different genetic origin are compared.

In conclusion, this study demonstrates the different disposition of unconjugated plasma nevirapine metabolites after single dose administration of nevirapine or at steady state. All concentrations are well below those of nevirpaine, the 12-hydroxynevirapine being the highest. Interestingly, concentrations of the 2-hydroxynevirapine whose formation is CYP3A4 mediated dropped from single dose to steady state, likely by an inhibition mechanism. In contrast those of 3-hydroxynevirapine CYP2B6 mediated increased from single dose to steady state as a consequence of induction. Clinical consequences of such findings are presently unknown and warrant further investigations.

Acknowledgements

We acknowledge and the French Agence Nationale de Recherche contre le VIH/SIDA et les Hepatitis Virales (ANRS) for sponsoring the ANRS12154 trial. We thank all Cambodian health care providers who take care of the patients and the patients who agreed to participate to the study.

The ANRS12154 trial group is constituted as follows: the principal investigators are Chou Monidarin (Phnom Penh, Cambodia) and Anne-Marie Taburet (Paris, France). Coinvestigators are Julie Bertrand, France Mentré, Olivier Segeral, Céline Verstuyft (Paris, France); Laurence Borand and Ouk Vara (Phnom Penh, Cambodia).

Conflict of interest/disclosure

None of the authors have conflicts of interest related to the present study

References

1. **Almond, L. M., D. Edirisinghe, M. Dalton, A. Bonington, D. J. Back, and S. H. Khoo**. 2005. Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus-infected individuals. Clin Pharmacol Ther. 78:132-142.

2. **Antunes AM, Duarte MP, Santos PP, da Costa GG, Heinze TM, Beland FA, Marques MM.** 2008. Synthesis and characterization of DNA adducts from the HIV reverse transcriptase inhibitor nevirapine. Chem Res Toxicol. 21:1443-56.

3. **Calmy, A., L. Pinoges, E. Szumilin, R. Zachariah, N. Ford, and L. Ferradini**. 2006. Generic fixed-dose combination antiretroviral treatment in resource-poor settings: multicentric observational cohort. Aids. 20:1163-1169.

4. **Cammett, A. M., T. R. MacGregor, J. M. Wruck, F. Felizarta, P. Miailhes, J. Mallolas, and P. J. Piliero**. 2009. Pharmacokinetic assessment of nevirapine and metabolites in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with hepatic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 53:4147-4152.

5. **Chantarangsu, S., T. R. Cressey, S. Mahasirimongkol, E. Capparelli, Y. Tawon, N. Ngo-Giang-Huong, G. Jourdain, M. Lallemant, and W. Chantratita**. 2009. Influence of CYP2B6 polymorphisms on the persistence of plasma nevirapine concentrations following a single intra-partum dose for the prevention of mother to child transmission in HIV-infected Thai women. J Antimicrob Chemother. 64:1265-1273.

6. **Chen J, Mannargudi BM, Xu L, Uetrecht J**. 2008. Demonstration of the metabolic pathway responsible for nevirapine-induced skin rash. Chem Res Toxicol. 2008;21(9):1862-70.

7. **Chou M, Bertrand J, Segeral O, Verstuyft C, Borand L, Comets E, Le Tiec C, Becquemont L, Ouk V, Mentre F, Taburet AM**. 2010. Population pharmacokinetic-pharmacogenetic study of nevirapine in HIV-infected Cambodian patients. Antimicrob Agents Chemother. 54(10):4432-9

8. **Cressey TR, Jourdain G, Lallemant MJ, Kunkeaw S, Jackson JB, Musoke P, Capparelli E, Mirochnick M**. 2005. Persistence of nevirapine exposure during the postpartum period after intrapartum single-dose nevirapine in addition to zidovudine prophylaxis for the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. J Acquir Immune Defic Syndr. 38(3):283-8.

9. **Dailly, E., E. Billaud, V. Reliquet, S. Breurec, P. Perre, S. Leautez, P. Jolliet, M. Bourin, and F. Raffi**. 2004. No relationship between high nevirapine plasma concentration and hepatotoxicity in HIV-1-infected patients naive of antiretroviral treatment or switched from protease inhibitors. Eur J Clin Pharmacol. 60:343-348.

10. **de Maat, M. M., A. D. Huitema, J. W. Mulder, P. L. Meenhorst, E. C. van Gorp, and J. H. Beijnen**. 2002. Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals. Br J Clin Pharmacol. 54:378-385.

11. **Dixit V, Hariparsad N, Li F, Desai P, Thummel KE, Unadkat JD**. 2007. Cytochrome P450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors in human. 35(10):1853-9.

12. **Erickson, D. A., G. Mather, W. F. Trager, R. H. Levy, and J. J. Keirns**. 1999. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. Drug Metab Dispos. 27:1488-1495.

13. **Gandhi, M., L. Z. Benet, P. Bacchetti, A. Kalinowski, K. Anastos, A. R. Wolfe, M. Young, M. Cohen, H. Minkoff, S. J. Gange, and R. M. Greenblatt**. 2009. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor pharmacokinetics in a large unselected cohort of HIV-infected women. J Acquir Immune Defic Syndr. 50:482-491.

14. **Greenblatt, D.J., von Moltke, L.L., Daily, J.P., Harmatz, J.S. & Shader, R.I**. 1999. Extensive impairment of triazolam and alprazolam clearance by short term low-dose ritonavir: the clinical dilemma of concurrent inhibition and induction. J. Clin. Psychopharmacol. 19, 293–296

15. **Haas, D. W., T. Gebretsadik, G. Mayo, U. N. Menon, E. P. Acosta, A. Shintani, M. Floyd, C. M. Stein, and G. R. Wilkinson**. 2009. Associations between CYP2B6 polymorphisms and pharmacokinetics after a single dose of nevirapine or efavirenz in African americans. J Infect Dis. 199:872-880.

16. **Hall DB, Macgregor TR**. 2007. Case-control exploration of relationships between early rash or liver toxicity and plasma concentrations of nevirapine and primary metabolites. HIV Clin Trials. 8(6):391-9.

17. **Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Owor M, Ducar C, Deseyve M, Mwatha A, Emel L, Duefield C, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Gigliotti M, Bray D, Mmiro F..**

2003. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. Lancet 362:859–68.

18. **Kirby BJ, Collier AC, Kharasch ED, Whittington D, Thummel KE, Unadkat JD**. 2011. Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 1: inactivation, induction, and inhibition of cytochrome P450 3A by ritonavir or nelfinavir. Drug Metab Dispos. 39(6):1070-8.

19. **Kojima K, Nagata K, Matsubara T, Yamazoe Y**. 2007. Broad but distinct role of pregnane x receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes. Drug Metab Pharmacokinet. 22(4):276-86.

20. **Kunz A, Frank M, Mugenyi K, Kabasinguzi R, Weidenhammer A, Kurowski M, Kloft C, Harms G**. 2009. Persistence of nevirapine in breast milk and plasma of mothers and their children after single-dose administration. J Antimicrob Chemother. 63(1):170-7.

21. **Lallemant M, Jourdain G, Le Coeur S, Mary JY, Ngo-Giang-Huong N, Koetsawang S,Kanshana S, McIntosh K, Thaineua V**. 2004. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. N Engl J Med. 15;351(3):217-28.

22. **Lamson, M. J., J. P. Sabo, T. R. MacGregor, J. W. Pav, L. Rowland, A. Hawi, M. Cappola, and P. Robinson**. 1999. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers. Biopharm Drug Dispos. 20:285-291.

23. **Laurent, C., C. Kouanfack, S. Koulla-Shiro, N. Nkoue, A. Bourgeois, A. Calmy, B. Lactuock, V. Nzeusseu, R. Mougnutou, G. Peytavin, F. Liegeois, E. Nerrienet, M. Tardy, M. Peeters, I. Andrieux-Meyer, L. Zekeng, M. Kazatchkine, E. Mpoudi-Ngole, and E. Delaporte**. 2004. Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial. Lancet. 364:29-34.

24. **Lockman S, Shapiro RL, Smeaton LM, Wester C, Thior I, Stevens L, Chand F, Makhema J, Moffat C, Asmelash A, Ndase P, Arimi P, van Widenfelt E, Mazhani L, Novitsky V, Lagakos S, Essex M**. Response to antiretroviral therapy after a single, peripartum dose of nevirapine. N Engl J Med. 2007;356(2):135-47.

25. **Marier, J. F., M. Dimarco, R. Guilbaud, C. Dodard, G. Morelli, S. K. Tippabhotla, A. K. Singla, N. R. Thudi, and T. Monif.** 2007. Pharmacokinetics of lamivudine, zidovudine, and nevirapine administered as a fixed-dose combination formulation versus coadministration of the individual products. J Clin Pharmacol. 47:1381-1389.

26. **Mo SL, Liu YH, Duan W, Wei MQ, Kanwar JR, Zhou SF**. 2009. Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. Curr Drug Metab. 10(7):730-53

27. **Molto, J., M. Valle, C. Miranda, S. Cedeno, J. Miranda, J. R. Santos, E. Negredo, J. Vilaro, J. Costa, and B. Clotet**. 2008. Once- or twice-daily dosing of nevirapine in HIV-infected adults: a population pharmacokinetics approach. J Antimicrob Chemother. 62:784-792.

28. **Muro E, Droste JA, Hofstede HT, Bosch M, Dolmans W, Burger DM**. 2005. Nevirapine plasma concentrations are still detectable after more than 2 weeks in the majority of women receiving single-dose nevirapine: implications for intervention studies. J Acquir Immune Defic Syndr. 39(4):419-21.

29. **Murphy RL**. 2003. Defining the toxicity profile of nevirapine and other antiretroviral drugs. JAIDS 34:15-20

30. **Ren C, Fan-Havard P, Schlabritz-Loutsevitch N, Ling Y, Chan KK, Liu Z**. 2010. A sensitive and specific liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantification of nevirapine and its five metabolites and their pharmacokinetics in baboons. Biomed Chromatogr. 24(7):717-26

31. **Riska P, Lamson M, MacGregor T, Sabo J, Hattox S, Pav J, Keirns J**. 1999. Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. Drug Metab Dispos. 27(8):895-901.

32. **Sabo, J. P., M. J. Lamson, G. Leitz, C. L. Yong, and T. R. MacGregor**. 2000. Pharmacokinetics of nevirapine and lamivudine in patients with HIV-1 infection. AAPS PharmSci. 2:E1.

33. **Wang H, Tompkins LM.** 2008. CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. Curr Drug Metab. 9(7):598-610.

34. **Wen B, Chen Y, Fitch WL.** 2009. Metabolic activation of nevirapine in human liver microsomes: dehydrogenation and inactivation of cytochrome P450 3A4. Drug Metab Dispos37(7):1557-62.

35. **Yuan J, Guo S, Hall D, Cammett AM, Jayadev S, Distel M, Storfer S, Huang Z, Mootsikapun P, Ruxrungtham K, Podzamczer D, Haas DW** 2011. The Nevirapine Toxicogenomics Study Team. Toxicogenomics of nevirapine-associated cutaneous and hepatic adverse events among populations of African, Asian, and European descent. AIDS. 25(10):1271-1280

36. **Zhou, X. J., L. B. Sheiner, R. T. D'Aquila, M. D. Hughes, M. S. Hirsch, M. A. Fischl, V. A. Johnson, M. Myers, and J. P. Sommadossi.** 1999. Population pharmacokinetics of nevirapine, zidovudine, and didanosine in human immunodeficiency virus-infected patients. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. Antimicrob Agents Chemother. 43:121-128.

Figure legends

Figure 1. Structures of nevirapine (parent drug) and its 5 metabolites quantitated in this study (4)

Figure 2. Median plasma concentrations of nevirapine and its 5 metabolites after single dose administration of nevirapine 200 mg (panel A), or at steady state during a 12 hour dosing interval after administration of nevirapine 200 mg twice daily (panel B).

Figure 3. Median metabolic indiceses of nevirapine metabolites after single dose administration of nevirapine 200 mg (dark bars), or at steady state during a 12 hour dosing interval after administration of nevirapine 200 mg twice daily (white bars). * $p<0.001$, ** $p<0.01$

Table 1. Characteristics of study subjects

	HIV-negative adults in United States (n=10)	HIV-infected adults in Cambodia (n=10)
Race/ethnicity	African American	Cambodian
Female sex (n)	8	5
Age in years (range)	25 (21-43)	32 (28-44)
Weight in kg (range)	68 (59 – 100)	52 (42 -66)
BMI (range)	23 (18 - 33)	21 (19 – 22)
CYP2B6 516G→T (n)		
GG	5	6
GT	4	3
TT	1	1

Table 2. Pharmacokinetic parameters of nevirapine and its metabolites after single dose (group A) and at steady state (group B).

	Group A					Group B			
	Cmax	Tmax	T1/2	AUCt	AUC_{inf}	C_0	Cmax	Tmax	AUC_{12}
	µM	h	h	µM.h	µM.h	µM	µM	h	µM.h
					Nevirapine				
median	5.745	2.0	99.2	512.96	560.22	21.81	26.78	2.08	291.85*
Min	3.800	0.5	53.4	379.99	430.01	13.52	19.13	0.00	161.95
Max	12.103	8.0	216.6	592.11	684.29	36.48	50.24	4.03	459.79
					2-hydroxynevirapine				
median	0.016	1.0	99.2	0.97	1.55	0.007	0.012	2.04	0.11*
Min	0.008	0.5	47.7	0.59	0.85	0.003	0.008	0.93	0.06
Max	0.083	24.0	882.5	3.59	4.36	0.012	0.017	8.10	0.17
					8-hydroxynevirapine				
median	Undetected					0.042	0.075	2.11	0.76
min						0.026	0.049	1.08	0.46
max						0.083	0.014	14.13	1.29

					3-hydroxynevirapine					
	median	0.013	24.0	59.3	1.14	1.37	0.111	0.176	1.03	1.76
	min	0.005	6.0	34.7	0.47	0.73	0.049	0.083	0.00	0.77
	max	0.031	72.0	216.8	2.12	2.40	0.230	0.485	8.05	4.17
					12-hydroxynevirapine					
	median	0.321	12	61.2	27.11	34.92	0.505	0.999	3.08	9.53**
	min	0.141	2	43.1	12.47	14.17	0.181	0.496	1.00	4.18
	max	0.721	24	1220.6	54.92	78.17	2.669	3.805	11.92	34.42
					4-carboxynevirapine					
	median	0.029	12.0	47.9	2.37	2.77	0.074	0.122	3.09	1.12**
	min	0.016	2.0	24.9	0.82	0.90	0.033	0.088	1.08	0.75
	max	0.117	24.0	81.1	6.88	7.24	0.199	0.259	14.13	2.65

1 4 AUC_{12} compared to AUC_{inf} * $p<0.001$ **$p<0.01$

Figures

Figure 1

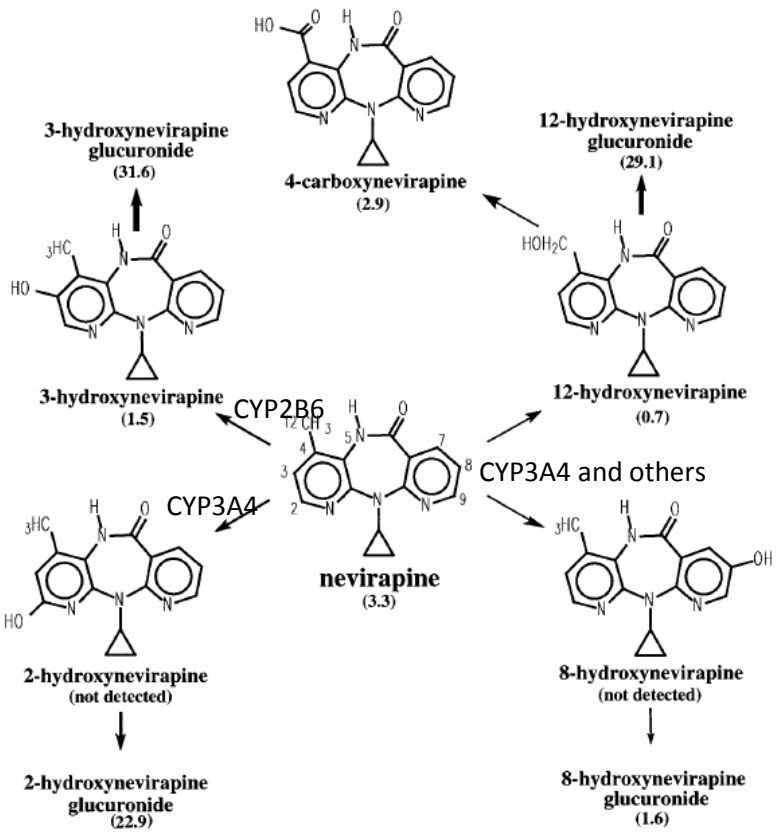


Figure 2

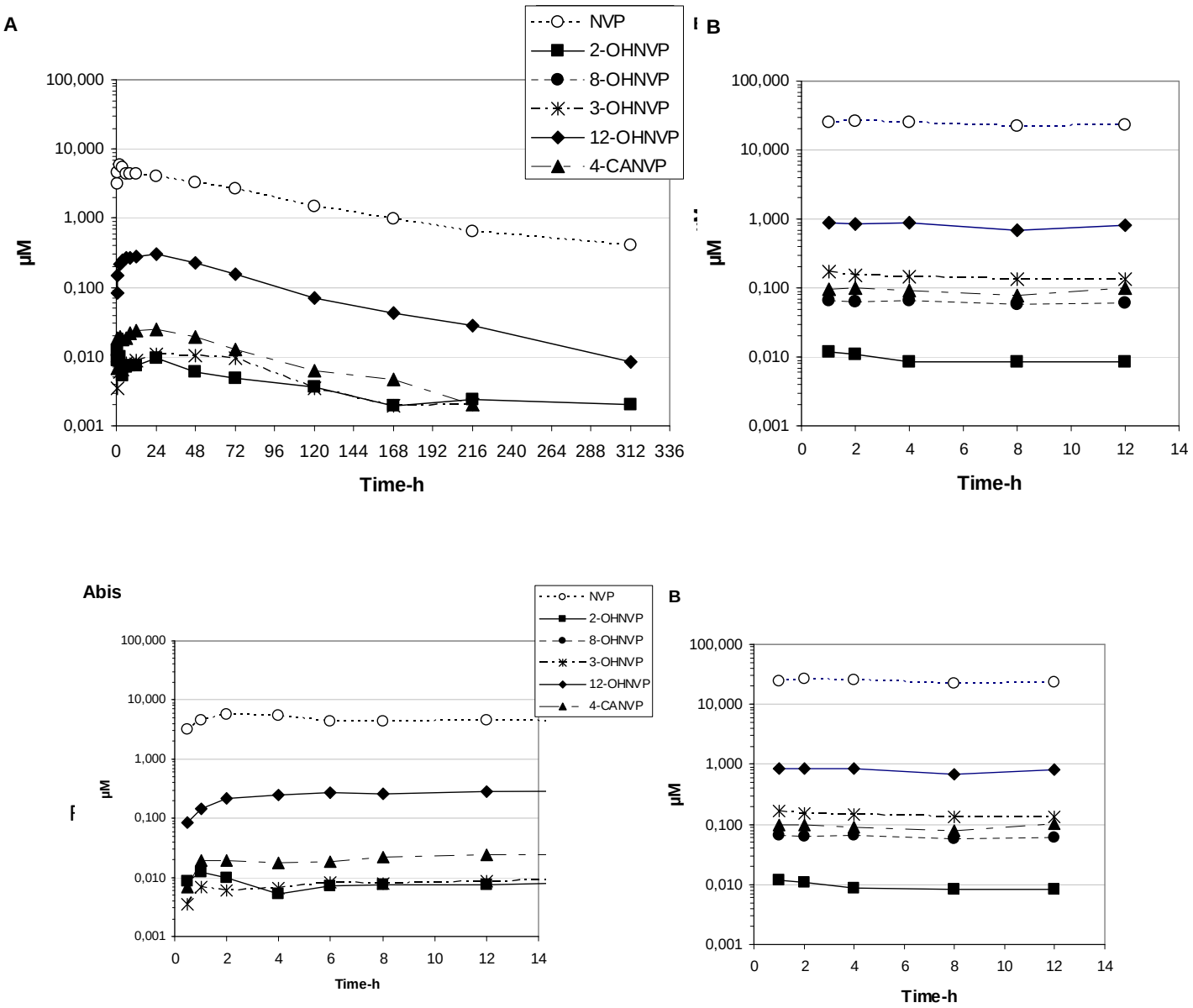
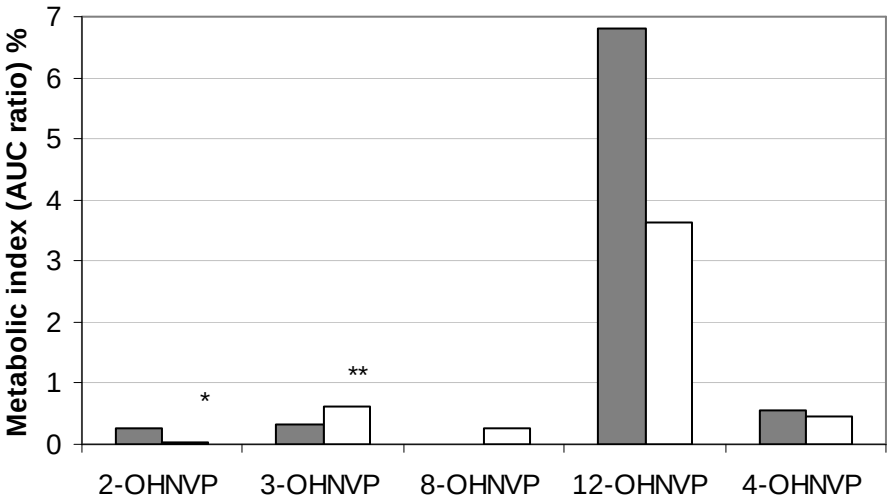


Figure 3



* p<0.001

** p<0.01

3.2. Pharmacocinétique de l'éfavirenz

Cette partie de l'étude est en cours d'analyse pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques de population et l'analyse des covariables l'influençant de façon significative. Nous présenterons donc successivment nos principaux résultats. Tout d'abord, les concentrations plasmatiques d'éfavirenz, la fréquence des polymorphismes des enzymes et transporteurs étudiés, puis les premiers résultats des parametre pharmacocinétiques dont le résumé soumis à la 19ème Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, CROI, 2012.

3.2.1 Concentrations plasmatiques d'éfavirenz

Les concentrations résiduelles d'éfavirenz ont été mesurées chez les 660 patients inclus dans l'essai CAMELIA. Nous présenterons successivement le résumé des concentrations obtenues chez ces patients ainsi que le résumé accepté au congrès de l'International AIDS Society (IAS Rome, août 2011). Puis nous analyserons les concentrations obtenues chez les 312 patients qui ont participé à l'étude pharmacogénétique et les profils pharmacocinétiques des 10 patients ayant eu des prélèvements entre deux administrations, qui sont utilisées pour l'analyse de pharmacocinétique de population (étude PECAN).

3.2.1.1 Concentrations chez les patients inclus dans l'étude CAMELIA

Objectif : Mesurer la concentration plasmatique de l'éfavirenz des patients co-infectés par la tuberculose (TB) et le VIH et inclus dans l'essai clinique ANRS 1295 – CIPRA KH 001, CAMELIA. Cet essai avait pour objectif de comparer la survie selon que le traitement antirétroviral était initié à 2 semaines (bras précoce) ou 8 semaines (bras retardé) après le début du traitement antituberculeux qui comprenait la rifampicine.

Méthodes : Les patients ont reçu un traitement antituberculeux standard pendant 6 mois, soit une quadrithérapie (isoniazide+rifampicine+ethambutol+pyrazynamide) pendant 2 mois puis une bithérapie (isoniazide+rifampicine). Le traitement antirétroviral est une combinaison de stavudine+lamivudine associé à 600 mg d'éfavirenz indépendamment du poids de patient. Des échantillons sanguins pour doser l'éfavirenz ont été prélevés à 14 h (+/- 2 h) après la prise du médicament à deux et six semaines après l'initiation de ART, à la

semaine 22 (tout en recevant la rifampicine) et à la semaine 50 (sans rifampicine). L'éfavirenz plasmatique a été dosé au Cambodge par une méthode CLHP avec détection UV. La limite inférieure de quantification est de 50 ng/mL. Les facteurs associés aux concentrations d'éfavirenz en dessous de la fourchette thérapeutique ont été identifiés par régression logistique.

Résultats : Parmi les 1844 échantillons analysés, la médiane des concentrations plasmatiques (range) d'éfavirenz aux semaines 2 (N = 473), 6 (N = 481), 22 (N = 474) et 50 (N = 416) ont été respectivement de 2660 ng/mL (1595-4493), 2647 ng/mL (1704-4395), 2719 ng/mL (1769 - 4574), 2746 ng/mL (1936 - 3829). Les facteurs indépendamment associées à une faible concentration plasmatique d'éfavirenz, étaient une arrivée tardive à la consultation (odds ratio 5,64) et une concentration d'éfavirenz faible sur les échantillons précédents (odds ratio 4,39). A noter, la co-administration de rifampicine et le poids corporel supérieur à 60 kg n'ont pas été associés à une faible concentration plasmatique d'éfavirenz.

Conclusion : Nos résultats indiquent qu'une dose quotidienne de 600 mg EFV conduit à des concentrations plasmatiques d'EFV supérieures à 1000 ng/ml même en cas de co-administration avec la rifampicine et ce même pour les patients avec un poids plus de 60 kg.

Résumé accepté à l'IAS, Rome, août 2011

Efavirenz plasma concentration in HIV-infected patients treated for tuberculosis by a rifampicin-based regimen in the CAMELIA clinical trial (ANRS 1295/12160 - CIPRA KH001/10425)

L Borand[1], D Laureillard[2,3], M Chou[4], Y Madec[5], P Pheng[1], E Nerrienet[6], K Phon[6], O Marcy[2], T Sok[2], S Chan[2], N. Prak[7], C Kim[8,9], KK Lak[10], C Hak[11], B Dim[12,9], AE Goldfeld[2,13], FX Blanc[14], A Fontanet[5], AM Taburet[15].

[1]*Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia,*
[2]*Cambodian Health Committee, Phnom Penh, Cambodia,*
[3]*ANRS, Ho Cho Minh City, Vietnam,*
[4]*Faculty of Pharmacy University of Health Sciences, Phnom Penh, Cambodia,*
[5]*Unité d'Epidémiologie des Maladies Emergentes, Institut Pasteur, Paris, France,*
[6]*HIV and Hepatitis Unit, Institut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia,*
[7]*Infectious Diseases Department, Khmer Soviet Friendship Hospital, Phnom Penh, Cambodia,*
[8]*Donkeo Provincial Hospital, Takeo, Cambodia,*
[9]*Médecins Sans Frontières, Cambodia, Phnom Penh,Cambodia,*
[10]*Svay Rieng Provincial Hospital, Svay Rieng, Cambodia,*
[11]*Calmette Hospital, Phnom Penh,Cambodia,*
[12]*Siem Reap Referral Hospital, Siem Reap, Cambodia,*
[13]*Harvard Medical School, Boston, United States*
[14]*Pneumology Unit, Bicêtre Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France,*
[15]*Clinical Pharmacy, Bicêtre Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France.*

Background: Efavirenz (EFV) is part of the backbone antiretroviral treatment (ART) in HIV-infected individuals with active tuberculosis (TB), at the standard 600 mg daily dose according to WHO recommendations. However, concerns were raised that co-administration of rifampicin may lead to sub-therapeutic EFV plasma concentrations (<1000 ng/ml). Therefore, assessing EFV plasma concentration in TB-HIV co-infected patients was a secondary objective of the CAMELIA clinical trial that showed markedly improved survival after ART initiation at 2 weeks (early arm) versus 8 weeks (late arm) after TB treatment onset.

Methods: Patients received a standard 6-months TB regimen including rifampicin (10 mg/kg/d). ART was a combination of d4T+3TC and EFV 600 mg daily, irrespective of the body weight. Blood samples for EFV measurements were drawn 14 h (+/- 2 h) after drug intake at +2 and +6 weeks after ART initiation, at week 22 (while still receiving rifampicin) and at week 50 (without rifampicin). EFV was assayed in plasma by a liquid chromatography method with UV detection. Lower limit of quantification was 50 ng/mL. Factors associated with EFV plasma concentration below the therapeutic range were identified using random-effect logistic regression.

Results: Among the 1844 samples analyzed, median (range) EFV plasma concentration at weeks +2 (N=473), +6 (N=481), 22 (N=474) and 50 (N=416) were 2660 ng/mL (1595 – 4493),

2647 ng/mL (1704 – 4395), 2719 ng/mL (1769 – 4574), 2746 ng/mL (1936 – 3829), respectively. Factors independently associated with low EFV plasma concentration were late arrival at the visit (odds ratio 5.64) and low EFV concentration of the previous samples (odds ratio 4.39). Notably, co-administration of rifampicin and body weight higher than 60 kg were not associated with low EFV plasma concentration.

Conclusion: Our results indicate that a daily dose of EFV 600 mg leads to EFV plasma concentrations upper than 1000 ng/mL when co-administrated with rifampicin and for patients with a body weight over 60 kg.

3.2.1.2 Concentrations chez les patients inclus dans l'étude PECAN

Les caractéristiques démographiques des 312 patients à l'inclusion dans l'essai CAMELIA sont résumées ci-dessous :

Patient	n	Age (ans)	Poids (kg)
M	203	36 [20; 60]	45 [31 ; 72]
F	109	34 [20 ; 63]	39 [29 ; 55]
Total	312	35 [20 ; 63]	44 [29 ; 72]

On notera le faible poids de ces patients fortement immunodéprimés, en particulier des femmes.

Les concentrations d'éfavirenz mesurées en moyenne 14 h après la prise d'éfavirenz le soir et aux différentes semaines après le début du traitement sont résumées dans le tableau ci-dessous. A noter que jusqu'à la semaine 26 les patients recoivent également un traitement antituberculeux associant de la rifampicine.

Semaines de traitement	**2**	**6**	**22**	**50**
n	289	293	294	281
Médiane (ng/mL)	2541	2436	2753	2669
Min (ng/mL)	<50	<50	<50	<50
Max (ng/mL)	25200	34260	37769	20387

La répartition du nombre de patients par tranche de concentrations est récapitulée dans le tableau ci-dessous qui présente le nombre de patients (et le %) qui ont des concentrations d'éfavirenz dans les zones définies.

Semaine de traitement	2	6	22	50
n	289	293	294	281
<50 ng/mL	11 (3,8)	14 (4,8)	7 (2,4)	11 (3,9)
<1000 ng/mL	27 (9,3)	16 (5,5)	13 (4,4)	9 (3,2)
1000-5000 ng/mL	169 (58,5)	185 (63,1)	184 (62,6)	199 (70,8)
>5000 ng/mL	82 (28,4)	78 (26,6)	90 (30,6)	62 (22,1)

Les patients dont la concentration est <50 ng/mL, limite de quantification de la technique analytique ou < 1000 ng/mL, concentration déterminée comme étant la concentration minimale efficace [Marzolini et al., 2001] sont les patients dont l'adhésion au traitement est faible, ou ceux qui n'ont pas débuté le traitement, ou l'ont arrêté pour effets indésirables. On remarquera que de 20 à 30 % des patients ont des concentrations très élevées d'éfavirenz. La suite de cette étude a pour objectif d'identifier les covariables pouvant expliquer cette variabilité interindividuelle importante.

3.2.2 Pharmacogénétique de l'éfavirenz

Objectif : Analyser la fréquence, dans la population étudiée, des polymorphismes génétiques des enzymes et transporteurs potentiellement impliqués dans l'élimination de l'éfavirenz est un pre-requis à l'étude de l'effet de ces polymorphismes sur les paramètres pharmacocinétiques de l'éfavirenz. Les polymorphismes génétiques des enzymes et les transporteurs suivants *CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, ABCB1-MDR1, OATPC* et *PXR* ont été analysés.

Méthode : Les polymorphismes des cytochromes *CYP2B6, CYP3A5, 2A6, MDR1* ont été étudiés sur les ADN extraits des prélèvements sanguins de 312 patients inclus dans l'essai ANRS 1295 – CIPRA KH 001, CAMELIA et ayant donné leur consentement. Les génotypages sont réalisés par PCR Temps Réel selon la méthode décrite précédemment.

Résultat : La fréquence des polymorphismes étudiés dans cette population de patients cambodgiens est représentée dans le tableau ci-dessous :

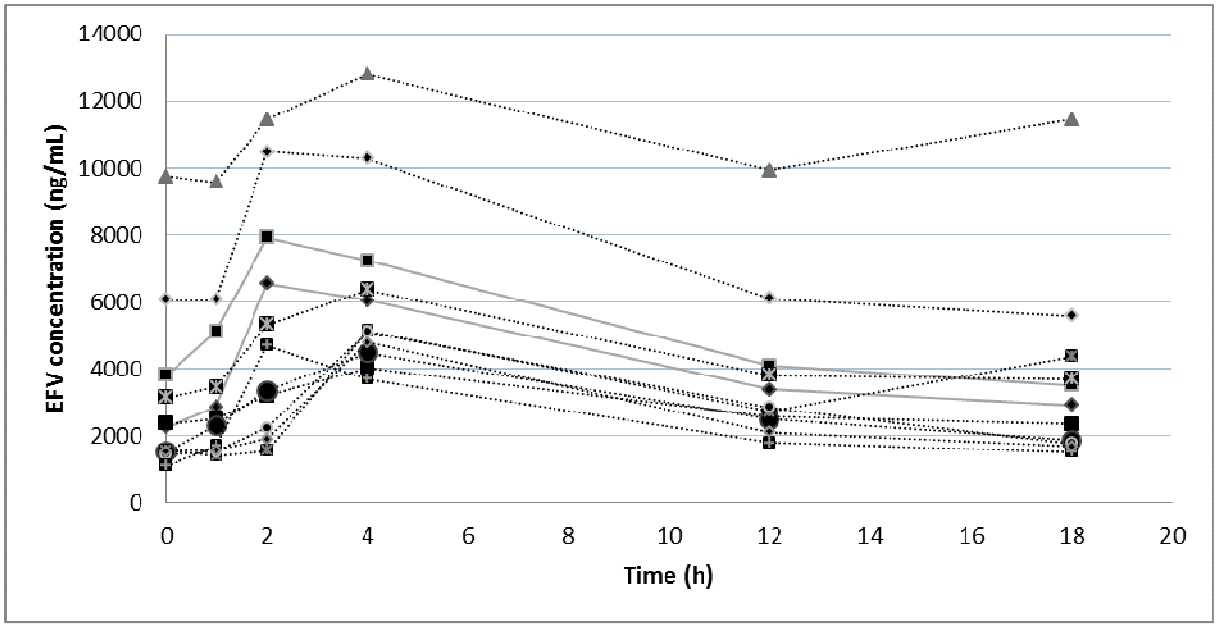
CYP 450	**n**	**fréquence allélique**	
CYP3A5 (rs 776746)	312	A (0.35)	G (0.65)
CYP2B6 C1459T(rs 321171)	306	C (0.97)	T (0.03)
CYP2B6 G516T (rs3745274)	308	G (0.68)	T (0.32)
CYP3A4 *1B (rs4646437)	312	A (0.28)	G (0.72)
CYP 2A6 (rs 8192726)	306	A (0.11)	C (0.89)
Transporteurs			
MDR1 (rs1045642)	311	C (0.62)	T (0.38)
OATP-C (rs 4149056)	311	C (0.13)	T (0.87)
PXR (rs 6785049)	312	A (0.34)	G (0.66)

Conclusion : La fréquence des polymorphismes des *CYP 3A5*3, CYP 2B6 C1459T, CYP 2B6 G516T, MDR1* est tout à fait superposable à celle trouvée dans la cohorte des 170 patients cambodgiens traités par névirapine [Chou *et al.*, 2010] et proches que celles trouvés chez les populations asiatiques : vietnamiennes [Veiga *et al.* 2009] ou thailandaises [Chantarangsu *et al.* 2009]; [Puthanakit *et al.* 2009] voisines du Cambodge. La fréquence du polymorphisme du *CYP3A4*1B* est proche des populations afro-américaines, mais elle est très différente chez les populations caucasiennes [Zhou *et al.* 2006]. Peu de données sont à l'heure actuelle publiées sur la fréquence des polymorphismes du transporteur *OATP-C* et du récepteur *PXR*.

3.2.3 Parametres pharmacocinétiques de l'efavirenz

3.2.3.1 Pharmacocinétique des 10 patients

Le profil de l'évolution des concentrations d'éfavirenz chez les 10 patients ayant accepté les prélèvements pour une pharmacocinétique complète entre deux administrations, après la fin du traitement antituberculeux est représenté sur la figure ci-dessous.



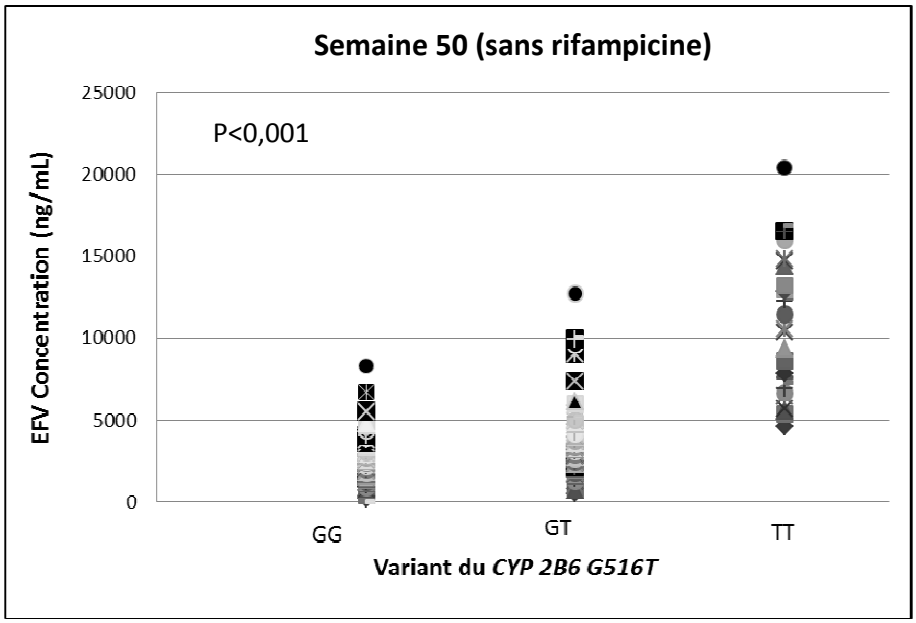
Les paramètres pharmacocinétiques de l'éfavirenz de ces 10 patients calculés par méthode non compartimentale, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Médiane	Min	max
Cmax (ng/mL)	5122	4040	12885
Tmax (h)	3,7	1,8	4,1
$C_{residuelle}$ (ng/mL)	1922	1119	9750
AUC (ng.h/mL)	67534	51865	263526
Cl/F (L/h)	7,7	2,3	11,6

3.2.3.2 Pharmacocinétique de population

Les résultats très préliminaires de la pharmacocinétique de population de l'éfavirenz ont été soumis au congrès francophone AFRAVIH (Genève 2012). Les principaux résultats et le résumé soumis figurent ci-dessous.

307 patients ont été inclus dans l'analyse (âge et poids médians 35 ans et 44 kg). Le modèle a été construit à partir de 1119 couples concentrations/temps avec le logiciel NonMEM. La Cl/F estimée est de 7,7 L/h. Les variabilités inter et intra patients sont de 37% et 15% respectivement. Seul le polymorphisme du *CYP2B6 G516T* modifie significativement la Cl/F. L'absence d'effet de la rifampicine sur la pharmacocinétique de l'éfavirenz est à souligner. Les conséquences de la diminution de Cl/F sur les concentrations d'éfavirenz chez les patients homozygotes *CYP2B6 516TT* qui ont une diminution de l'activité du CYP2B6 sont représentées sur la figure ci-dessous.



Résumé soumis au congrès AFRAVIH (2012)**Variabilité pharmacocinétique de la névirapine et de l'éfavirenz : rôle du polymorphisme génétique du *CYP2B6 G516T* chez des patients cambodgiens (étude ANRS12154-PECAN)**

Monidarin Chou[1], Céline Verstuyft[2], Julie Bertrand[3], Laurence Borand[4], Ouk Vara[5], Olivier Ségeral[2], François-Xavier Blanc[2], France Mentré[3], Anne-Marie Taburet[2], et le groupe PECAN

1 Faculté de Pharmacie et laboratoire Rodolphe Mérieux, Phnom Penh, Cambodge
2 Hôpital Bicêtre AP/HP, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Paris, France
3 Inserm UMR738, et Université Paris Diderot, Paris, France
4 Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodge
5 Hôpital Calmette, Phnom Penh, Cambodge

Objet de l'étude

Le cytochrome P-450 2B6 (CYP2B6) métabolise les deux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse les plus souvent utilisés en 1ère ligne : la névirapine (N) et l'éfavirenz (E). La fréquence des polymorphismes génétiques conduisant au codage de protéines enzymatiques non fonctionnelles est peu étudiée en pays du Sud et est inconnue au Cambodge, de même que l'impact de ces polymorphismes sur la variabilité interindividuelle des concentrations de N et E.

Méthodes

Cette étude a eu lieu au Cambodge chez des patients infectés par le VIH traités par N ou E associé à la lamivudine + stavudine ou zidovudine. Les patients sous N (200 mg 2 fois/j) provenaient de la cohorte Esther (hôpital Calmette, Phnom Penh). Les autres ont reçu E (600 mg/j) associé à un traitement antituberculeux incluant rifampicine (R) durant les 26 premières semaines dans le cadre de l'étude CAMELIA. Des prélèvements sanguins ont été réalisés à l'état d'équilibre (à M18 et 36 pour N et aux semaines 2, 6, 22 et 50 pour E) pour doser N et E dans le plasma par CLHP. Après signature du consentement spécifique, l'ADN a été extrait du culot cellulaire pour rechercher le polymorphisme *CYP2B6G516T*. Les concentrations ont été modélisées par modèle non linéaire à effet mixte et l'influence des covariables environnementales ou génétiques recherchée sur la clairance apparente (Cl/F).

Résultats

170 patients traités par N (médianes : 36 ans, 55 kg, CD4 299/mL, ARN-VIH plasmatique <400 copies/mL 94% des patients à M36) et 307 traités par E (35 ans, 44 kg, CD4 26/mL et ARN-VIH 363000 copies/mL) ont été inclus. Les Cl/F estimées de N et E sont respectivement de 2,7 et 7,7 L/h avec des variabilités intra et inter individuelles respectives de 17% et 15% et 28% et 37%. La fréquence de l'allèle non fonctionnel *CYP2B6 516T* chez 442 patients est de 34% avec une fréquence des patients homozygotes *TT* de 10%. Chez les patients *GT* et *TT*, Cl/F de N et E est diminuée de 11% et 37% et 14% et 41%. R n'impacte pas Cl/F de E.

Conclusion

CYP2B6 G516T n'explique qu'une partie de la variabilité interindividuelle qui est faible. Ce polymorphisme et l'adhésion optimale des patients cambodgiens au traitement expliquent en partie les concentrations élevées de N et E et la bonne réponse virologique observée.

4. CONCLUSION GENERALE

Le traitement des patients infectés par le VIH s'est considérablement amélioré ces dernières années du fait de la disponibilité de médicaments antirétroviraux puissants, de formes galéniques associant plusieurs antirétroviraux facilitant les prises et de la mise en place de programmes d'éducation thérapeutique permettant une adhésion optimale des patients à leur traitement au long cours. L'exposition aux médicaments antirétroviraux est un des facteurs de la réussite du traitement, puisqu'une concentration du médicament libre, non fixé aux protéines plasmatiques supérieure à la concentration virale inhibitrice (CI) 50 ou 90% (le plus souvent mesurée *in vitro*) est nécessaire pour éviter la sélection de virus mutants resistants et l'échec thérapeutique. Si dans les pays du Nord, le choix de la première ligne de traitement est laissé à l'initiative du clinicien en se basant sur les recommandations nationales [Yeni 2010], dans les pays du Sud, afin de permettre le traitement du plus grand nombre de patients, l'OMS a sélectionné des médicaments antirétroviraux disponibles sous forme générique et donc peu onéreux. Les recommandations actuelles pour une première ligne de traitement sont donc d'associer un inhibiteur de la transcriptase inverse non nucléosidique, la névirapine ou l'éfavirenz à deux analogues nucléosidiques. Névirapine et éfavirenz, sont donc les médicaments antirétroviraux les plus utilisés dans les pays du Sud, y compris au Cambodge. Malgré cette utilisation très large, les données en particulier pharmacocinétiques sont limitées chez des patients dont les caractéristiques pharmacogénétiques sont différentes de celles des patients des pays occidentaux, chez lesquels sont réalisés la majorité des essais cliniques.

Nos travaux ont permis d'apporter des informations complémentaires sur les caractéristiques pharmacocinétiques de la névirapine et de l'éfavirenz chez deux cohortes de patients cambodgiens infectés par le VIH et pour lesquels névirapine ou éfavirenz font partie du traitement antirétroviral de première ligne.

Le traitement des patients de la cohorte ESTHER traités par la névirapine en première intention et ayant eu des signes d'hépatotoxicité ou de rash en début de traitement a été modifié et la névirapine substituée par l'éfavirenz. Ainsi cette étude descriptive ne permettra pas d'identifier des patients à risque d'intolérance à la névirapine, c'est une de ses limites.

Chez les patients de la cohorte ESTHER de l'hôpital Calmette de Phnom-Penh, traités par névirapine, les concentrations résiduelles mesurées après 18 ou 36 mois de traitement sont en médiane de 5,7 µg/mL, expliquant l'efficacité remarquable de ce traitement chez des patients dont l'adhésion au traitement antirétroviral est excellente. Les variabilités inter et intra-individuelles de la clairance de la névirapine sont faibles et respectivement de 28 et 17 %. La clairance est plus faible chez les patients porteurs du variant *TT* codant pour une protéine non fonctionnelle du CYP2B6 G516T, soit 1,9 L/h vs 2,9 L/h chez les porteurs du variant *GG*. Le polymorphisme du *CYP2B6 G516T* n'explique que 3 % de la variabilité interindividuelle, suggérant un métabolisme complexe et la participation d'autres cytochromes, enzymes ou transporteurs.

L'étude pharmacogénétique complémentaire a permis de confirmer que seul le *CYP2B6 516G>T* était fortement associé à la clairance de la névirapine, les métaboliseurs lents ayant une diminution de 36 % de cette clairance. Un haplotype incluant l'allèle 516T a été identifié dans cette population. Aucun des « single nucleotide polymorphisms ou SNP » identifiés dans les gènes codant pour les CYP3A4, CYP3A5, NR1I2 (PXR) et ABCB1 n'est relié à la clairance de la névirapine.

Les concentrations plasmatiques des métabolites de la névirapine mesurées dans le plasma de 10 patients cambodgiens après administrations répétées de névirapine, sont très inférieures à celles de la névirapine, comme celles mesurées après administration d'une dose unique chez un groupe de 10 patients volontaires d'origine afro-américaine. Les concentrations de 2-hydroxy névirapine sont effondrées après administrations répétées, suggérant l'effet inhibiteur d'un métabolite intermédiaire sur le CYP3A. Par contre les concentrations de 3-hydroxy névirapine sont plus élevées à l'état d'équilibre, probablement du fait de l'induction du CYP2B6 par la névirapine. Cette étude doit être poursuivie par l'étude des index métaboliques chez les patients de la cohorte ESTHER et la recherche d'éventuels polymorphismes génétiques expliquant leur variabilité.

Les concentrations d'éfavirenz mesurées chez les patients co-infectés par le VIH et la tuberculose traités par éfavirenz à la posologie de 600 mg/j et inclus dans l'essai CAMELIA sont dans la zone des concentrations mesurées chez les patients monoinfectés, confirmant le faible impact de la rifampicine sur le métabolisme de l'éfavirenz, justifiant l'absence d'augmentation de posologie. Les caractéristiques pharmacogénétiques de la moitié des

patients ayant accepté un prélèvement d'ADN, sont tout à fait comparables à celles décrites pour les patients traités par la névirapine.

Les résultats préliminaires suggèrent que le polymorphisme du *CYP2B6 G516T* joue un rôle majeur dans la variabilité interindividuelle des concentrations d'éfavirenz, expliquant les concentrations élevées, supérieures à 10 000 ng/mL d'éfavirenz chez un certain nombre de patients. A noter que la rifampicine n'a pas été identifiée comme étant une covariable modifiant la clairance de l'éfavirenz justifiant l'absence d'adaptation de posologie de l'éfavirenz nécessaire dans cette population. Si les résultats de l'étude CAMELIA montre l'efficacité antirétrovirale remarquable du traitement, la tolérance en particulier neurologique doit être analysée.

En conclusion, les études réalisées sont une contribution importante à une meilleure connaissance de la pharmacocinétique clinique de deux médicaments antirétroviraux parmi les plus utilisés dans le monde et en particulier dans les pays du Sud, à savoir la névirapine et l'éfavirenz. Peu d'études ont été réalisées dans des populations asiatiques et notre étude est la première dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH. Dans cette population, les concentrations de névirapine et d'éfavirenz sont dans la zone de celles observées dans les pays occidentaux, voire supérieure expliquant avec une adhésion au traitement optimale, la remarquable efficacité de ces traitements. La fréquence des patients porteurs du variant TT du *CYP2B6 G516T*, voisine de 10% (pour une fréquence de l'allèle T de 34% intermédiaire entre les patients d'origine caucasienne, 22-25% ou africaine, 42% en Afrique de l'Ouest) explique une partie de la variabilité des concentrations de ces deux médicaments. L'absence d'interaction significative entre la rifampicine et l'éfavirenz est un point également à souligner. D'autres facteurs restent à identifier pour expliquer la variabilité pharmacocinétique de ces médicaments, cependant moins importante que celle d'autres classes de médicaments antirétroviraux telle que la famille des inhibiteurs de la protéase. Ces caractéristiques pharmacocinétiques favorables sont en faveur du maintien de ces deux médicaments, névirapine et éfavirenz, en première ligne de traitement tout en mettant à disposition des analogues nucléosidiques mieux tolérés que la stavudine ou la zidovudine. Un des enjeux de ces prochaines années avec les progrès de la pharmacogénétique, serait de pouvoir identifier les patients à risque d'intolérance ou de survenue d'effets indésirables graves tels que l'hépatotoxicité de la névirapine, afin d'individualiser le traitement.

Très peu d'études de pharmacologie clinique ont été réalisées à ce jour au Cambodge. Les études présentées ont été réalisées grâce au partenariat franco-cambodgien soutenu par l'ANRS. Des transferts de technologie, en particulier analytique ont permis que je réalise les dosages de névirapine et d'éfavirenz dans le laboratoire Rodolphe Mérieux de la faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge. Grâce aux formations aux quelles j'ai participé, aux méthodes mises au point au laboratoire, aux résultats obtenus, aux collaborations initiées et aux différents partenariats, le développement de la pharmacocinétique clinique est désormais un des axes de recherche du laboratoire Rodolphe Mérieux du Cambodge.

5 Références Bibliographiques

Adkins J and Noble S. Efavirenz. Drugs 1998. 56 (6): 1055-1064

Allorge D and Loriot M. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. Ann Biol Clin (Paris), 2004. 62 (5): 499-511.

Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter M, Cassinat B, Beaune P, Legendre C and Thervet E. Association of the Multidrug Resistance-1 Gene Single-Nucleotide Polymorphisms with the Tacrolimus Dose Requirements in Renal Transplant Recipients. J Am Soc Nephrol, 2003. 14 1889-1896.

Avery L, Bakshi R, Cao Y and Hendrix C. The male genital tract is not a pharmacological sanctuary from efavirenz. Clin Pharmacol Ther 2011. 90 (1): 151-156.

Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec C, Rey E, Mentré F and Taburet A. Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. Clin Pharmacokinet, 2010. 49 (1): 17-45.

Beaune P-H. La pharmacogénétique : du concept à la pratique clinique. La pharmacogénétique : de la recherche fondamentale aux applications clinique. Ann Pharm Fr, 2007. 65 365-370.

Benz I and Le Guellec C. Pharmacogénétique : une aide à l'optimisation thérapeutique en infectiologie ? La Lettre de l'Infectiologue, 2008. 23 (4): 136-145.

Best B, Koopmans P, Letendre S, Capparelli E, Rossi S, Clifford D, Collier A, Gelman B, Mbeo G, Mccutchan J, Simpson D, Haubrich R, Ellis R, Grant I and Group C. Efavirenz concentrations in CSF exceed IC50 for wild-type HIV. J Antimicrob Chemother, 2011. 66 (2): 354-357.

Blanc F, Sok T, Laureillard D, Borand L, Rekacewicz C, Nerrienet E, Madec Y, Marcy O, Chan S, Prak N, Kim C, Lak K, Hak C, Dim B, Sin C, Sun S, Guillard B, Sar B, Vong S, Fernandez M, Fox L, Delfraissy J, Goldfeld A and Team C. Earlier versus later start of antiretroviral therapy in HIV-infected adults with tuberculosis. N Engl J Med, 2011. 365 (16): 1471-1481.

Bristol-Myers Squibb C. SUSTIVA® (efavirenz) Highlights of prescribing information. Site internet de Bristol-Myers Squibb Company, 2011.

Burk O and Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004. 369 (1): 105-124.

Calmy A, Pinoges L, Szumilin E, Zachariah R, Ford N and Ferradini L. Generic fixed-dose combination antiretroviral treatment in resource-poor settings: multicentric observational cohort. AIDS, 2006. 20 (8): 1163-1169.

Castro K, Ward J, Slutsker L, Buehler J, Jaffe H and Berkelman R. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. Source site internet WHO http://www.who.int/hiv/strategic/cdc_1993_hivaids_def.pdf, 1992. 1-17.

Chantarangsu S, Cressey TR, Mahasirimongkol S, Capparelli E, Tawon Y, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Lallemant M and Chantratita W. Influence of CYP2B6 polymorphisms on the persistence of plasma nevirapine concentrations following a single intra-partum dose for the prevention of mother to child transmission in HIV-infected Thai women. J Antimicrob Chemother, 2009. 64 (6): 1265-1273.

Chou M, Bertrand J, Segeral O, Verstuyft C, Borand L, Comets E, Le Tiec C, Becquemont L, Ouk V, Mentre F and Taburet AM. Population pharmacokinetic-pharmacogenetic study of nevirapine in HIV-infected Cambodian patients. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54 (10): 4432-4439.

Clercq ED. Structures et activités des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH (INNTI). Medicine et Maladies Infectieuses 2000. 30 421-430.

Cropp C, Yee S and Giacomini K. Genetic variation in drug transporters in ethnic populations. Clin Pharmacol Ther, 2008. 84 (3): 412-416.

Dailly E, Billaud E, Reliquet V, Breurec S, Perre P, Leautez S, Jolliet P, Bourin M and Raffi F. No relationship between high nevirapine plasma concentration and hepatotoxicity in HIV-1-infected patients naive of antiretroviral treatment or switched from protease inhibitors. Eur J Clin Pharmacol, 2004. 60 (5): 343-348.

Daly A. Development of analytical technology in pharmacogenetic research. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. 369 (1): 133-140.

Daly A. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. Clin Pharmacokinet 2006. 45 (1): 13-31.

De Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, Van Gorp EC and Beijnen JH. Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals. Br J Clin Pharmacol, 2002. 54 (4): 378-385.

Delfraissy J-F and Goujard C. Les inhibiteurs de protéases - Caractéristiques, molécules, essais cliniques. Transcriptases (revue critique de l'actualité scientifique internationale sur le VIH et les virus des hépatites), 1996. 47

Di Iulio J, Fayet A, Arab-Alameddine M, Rotger M, Lubomirov R, Cavassini M, Furrer H, Günthard H, Colombo S, Csajka C, Eap C, Decosterd L, Telenti A, Hiv S and Study. C. In vivo analysis of efavirenz metabolism in individuals with impaired CYP2A6 function. Pharmacogenetics Genomics 2009. 19 (4): 300-309.

Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH and Keirns JJ. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. Drug Metab Dispos, 1999. 27 (12): 1488-1495.

Ernest C, Hall S and Jones D. Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. J Pharmacol Exp Ther, 2005. 312 (2): 583-591.

Ferradini L, Laureillard D, Prak N, Ngeth C, Fernandez M, Pinoges L, Puertas G, Taburet A, Ly N, Rouzioux C, Balkan S, Quillet C and Delfraissy J. Positive outcomes of HAART at 24 months in HIV-infected patients in Cambodia. AIDS, 2007. 21 (17): 2293-2301.

Finta C and Zaphiropoulos P. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. Gene, 2000. 260 (1-2): 13-23.

Fröhlich M, Hoffmann M, Burhenne J, Mikus G, Weiss J and Haefeli W. Association of the CYP3A5 A6986G (CYP3A5*3) polymorphism with saquinavir pharmacokinetics. Br J Clin Pharmacol, 2004. 58 (4): 443-444.

Fuhr U, Jetter A and Kirchheiner J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach. Clin Pharmacol Ther, 2007. 81 (2): 270-283.

Funck-Brentano C, Boëlle P, Verstuyft C, Bornert C, Becquemont L and Poirier J. Measurement of CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo with dextromethorphan: sources of variability and predictors of adverse effects in 419 healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol, 2005. 61 (11): 821-829.

Geick A, Eichelbaum M and Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J Biol Chem, 2001. 276 (18): 14581-14587.

Girard P-M, Katlama C and Pialoux G. VIH. Edition 2011, Rueil-Malmaison, DOIN éditeurs, 2011, 839 pages.

Haas D, Ribaudo H, Kim R, Tierney C, Wilkinson G, Gulick R, Clifford D, Hulgan T, Marzolini C and Acosta E. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. AIDS, 2004. 18 (18): 2391-2400.

Haas D, Smeaton L, Shafer R, Robbins G, Morse G, Labbe L, Wilkinson G, Clifford A, Aquila R, Gruttola V, Pollard R, Merigan T, Hirsch M, George A, Donahue J and Kim R. Pharmacogenetics of Long-Term Responses to Antiretroviral Regimens Containing Efavirenz and/or Nelfinavir: An Adult AIDS Clinical Trials Group Study. JID, 2005. 192 1931–1942.

Hagenbuch B. Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective. Clin Pharmacol Ther, 2010. 87 (1): 39-47.

Handschin C and Meyer U. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. Pharmacol Rev, 2003. 55 (4): 649-673.

Ho R and Kim R. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. Clin Pharmacol Ther, 2005. 78 (3): 260-277.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He Y, Klein K, Nuessler A, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert J, Zanger U and Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. Pharmacogenetics, 2001. 11 (9): 773-779.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M and Mclellan R. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20 (8): 342-349.

Jana S and Paliwal J. Molecular mechanisms of cytochrome p450 induction: potential for drug-drug interactions. Curr Protein Pept Sci, 2007. 8 (6): 619-628.

Joly V and Yeni P. Inhibiteurs Non-nucleosidiques de la transcriptase Inverse. Ann Med Interne (Paris), 2000. 151 (4): 260-267.

Kaplan S and Hicks C. Lopinavir/ritonavir in the treatment of human immunodeficiency virus infection. Expert Opin Pharmacother, 2005. 6 (9): 1573-1585.

Kis O, Robillard K, Chan GN and Bendayan R. The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. Trends Pharmacol Sci, 2009. 31 (1): 22-35.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins P, Daly A, Wrighton S, Hall S, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski M and Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nat Genet, 2001. 27 (4): 383-391.

Kwara A, Lartey M, Sagoe K, Kenu E and Court M. CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 Genetic Polymorphisms are Predictors of Efavirenz Mid-dose Concentration in HIV-infected Patients. AIDS, 2009. 23 (16): 2101–2106.

Lamson M, Sabo J, Macgregor T, Pav J, Rowland L, Hawi A, Cappola M and Robinson P. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers. Biopharm Drug Dispos, 1999. 20 (6): 285-291.

Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler A, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M and Zanger U. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. Pharmacogenetics, 2001. 11 (5): 399-415.

Lhermitte M, Allorge D and Broly F. Echec thérapeutique : peut-être une affaire de gène? Ann Pharm Fr, 2006. 64 406-415.

Livak K. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genet Anal Tech Appl, 1999. 14 (5-6): 143-149.

Loriot M and Beaune P. Pharmacogenomics: the link between genes and response to drugs. Med Sci (Paris), 2004. 20 (6-7): 634-636.

Maggiolo F. Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. J Antimicrob Chemother, 2009. 64 (5): 910-928.

Marier JF, Dimarco M, Guilbaud R, Dodard C, Morelli G, Tippabhotla SK, Singla AK, Thudi NR and Monif T. Pharmacokinetics of lamivudine, zidovudine, and nevirapine administered as a fixed-dose combination formulation versus coadministration of the individual products. J Clin Pharmacol, 2007. 47 (11): 1381-1389.

Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J and Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. AIDS, 2001. 15 (1): 71-75.

Mo S, Liu Y, Duan W, Wei M, Kanwar J and Zhou S. Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. Curr Drug Metab, 2009. 10 (7): 730-753.

Molto J, Valle M, Miranda C, Cedeno S, Miranda J, Santos JR, Negredo E, Vilaro J, Costa J and Clotet B. Once- or twice-daily dosing of nevirapine in HIV-infected adults: a population pharmacokinetics approach. J Antimicrob Chemother, 2008. 62 (4): 784-792.

Mouscadet J-F and Deprez E. Cibles thérapeutiques et médicaments : récents développements de la pharmacologie anti-VIH. L'actualité chimique, 2003. nov-dec : 128-134.

NCHADS. National Guidline for the use of Antiretroviral Therapy in Adults and Adolescents, Revised in March 2007. http:/www.nchads.org/2007. 54 pages.

NCHADS. Annual Report 2009. http://www.nchads.org/ 2010. 25 pages.

Pancera M. Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). Virologie, 2005. 9 457-472.

Puthanakit T, Tanpaiboon P, Aurpibul L, Cressey TR and Sirisanthana V. Plasma efavirenz concentrations and the association with CYP2B6-516G >T polymorphism in HIV-infected Thai children. Antivir Ther, 2009. 14 (3): 315-320.

Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, Taburet AM, Charpentier B and Becquemont L. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. 103 (6): 546-552.

Rakhmanina N and Van Den Anker J. Efavirenz in the therapy of HIV infection. Expert Opin Drug Metab Toxicol., 2010. 6 (1): 95-103.

Rakhmanina N and Van Den Ankerb J. Efavirenz in the Therapy of HIV Infection. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010. 6 (1): 95–103.

Reil H, Bukovsky A, Gelderblom H and Gottlinger H. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. Embo J, 1998. 17 (9): 2699-2708.

Ribaudo H, Haas D, Tierney C, Kim R, Wilkinson G, Gulick R, Clifford D, Marzolini C, Fletcher C, Tashima K, Kuritzkes D and Acosta E. Pharmacogenetics of Plasma Efavirenz Exposure after Treatment Discontinuation: An Adult AIDS Clinical Trials Group Study. Clin Infect Dis, 2006. 42 401–407.

Riska P, Joseph D, Dinallo R, Davidson W, Keirns J and Hattox S. Biotransformation of nevirapine, a non-nucleoside hiv-1 reverse transcriptase inhibitor, in mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, and chimpanzees1. Drug Metab Dispos, 1999. 27 (12).

Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Decosterd L and Telenti A. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. Pharmacogenet Genomics, 2005. 15 (1): 1-5.

Sabo JP, Lamson MJ, Leitz G, Yong CL and Macgregor TR. Pharmacokinetics of nevirapine and lamivudine in patients with HIV-1 infection. AAPS PharmSci, 2000. 2 (1): E1.

Schaik RN. Dose adjustments based on pharmacogenetics of CYP450 enzymes. Source site internet http://www.ifcc.org/PDF/190101200807.pdf, 2008. 11 (77-98): 41-46.

Sevrioukova I and Poulos T. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107 (43): 18422-18427.

Specter S, Hodinka R and Young S A (2008). Human Retroviruses, HIV and HTLV. Clinical virology manual. S. J. Washington, American society for microbiology press**:** 1-66.

Telenti A and Zanger UM. Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. 48 227-256.

Tirona R and Kim R. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. Pharm Sci, 2005. 94 (6): 1169-1186.

Titier K, Lagrange F, Pehourcq F, Edno-Mcheik L, Moore N and Molimard M. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the six HIV-protease inhibitors and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma. Ther Drug Monit, 2002. 24 (3): 417-424.

Turner B and Summers MF. Structural Biology of HIV. J Mol Biol, 1999. 285 1-32.

UNAIDS. Global report : report on the global AIDS epidemic, Edition 2010. Genève, WHO, 359 pages

Veiga M, Asimus S, Ferreira P, Martins J, Cavaco I, Ribeiro V, Hai T, Petzold M, Björkman A, Ashton M and Gil J. Pharmacogenomics of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 in Vietnam. Eur J Clin Pharmacol., 2009. 65 (4): 355-363.

Verstuyft C, Morin S, Yang J, Loriot MA, Barbu V, Kerb R, Brinkmann U, Beaune P, Jaillon P and Becquemont L. Nouvelle méthode rapide et robuste de génotypage du CYP2C9 et MDR1. Ann Biol Clin (Paris), 2003. 61 (3): 305-309.

Wang H and Lecluyse E. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. Clin Pharmacokinet., 2003. 42 (15): 1331-1357.

Ward B, Gorski J, Jones D, Hall S, Flockhart D and Desta Z. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 306 (1): 287-300.

Weinshilboum R and Wang L. Pharmacogenomics: bench to bedside. Nat Rev Drug Discov., 2004. 3 (9): 739-748.

Wen B, Chen Y and Fitch W. Metabolic activation of nevirapine in human liver microsomes: dehydrogenation and inactivation of cytochrome P450 3A4. Drug Metab Dispos, 2009. 37 (7): 1557-1562.

WHO. WHO case definitions of hiv for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of hiv-related disease in adults and children. Geneve, World Health Organization (2007).

WHO. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents Recommendations for a public health approach ; 2010 revision. Geneve, World Health Organization (2010).

Wilkinson GR. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. New Engl J Med, 2005. 352 (21): 2211-2221.

Yeni P. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH ; édition 2010. Paris, La Documentation Française, 2010, 417 pages.

Yuan J, Guo S, Hall D, Cammett A, Jayadev S, Distel M, Storfer S, Huang Z, Mootsikapun P, Ruxrungtham K, Podzamczer D and Haas D. Toxicogenomics of nevirapine-associated cutaneous and hepatic adverse events among populations of African, Asian, and European descent. AIDS 2011. 25 (10): 1271-1280.

Zhou X, Barber W, Moore C, Tee L, Aru G, Harrison S, Mangilog B and Mcdaniel D. Frequency distribution of cytochrome P450 3A4 gene polymorphism in ethnic populations and in transplant recipients. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 2006. 119 (1-6): 89-104.

Zhou XJ, Sheiner LB, D'aquila RT, Hughes MD, Hirsch MS, Fischl MA, Johnson VA, Myers M and Sommadossi JP. Population pharmacokinetics of nevirapine, zidovudine, and didanosine in human immunodeficiency virus-infected patients Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43 (1): 121-128.

6 Annexes

6.1 Annexe 1 : Résumé de l'essai ANRS12154-PECAN

Titre : Variabilité pharmacocinétique et polymorphisme des cytochromes P-450 dans une population de patients Cambodgiens infectés par le VIH et traités par une association d'antirétroviraux comprenant névirapine ou éfavirenz

Objectif principal :

Evaluation de la variabilité de la pharmacocinétique de la NVP et de EFV dans une population de patients cambodgiens infectés par le VIH, et de rechercher une relation avec la fréquence du variant allèlique CYP2B6*6 (EFV et NVP) et/ou CYP3A5*1 (NVP).

Objectifs secondaires : étude de :

- la fréquence des différents variants alléliques du CYP2B6 et du CYP3A5 dans cette population de patients asiatiques,
- la fréquence du polymorphisme d'autres enzymes ou transporteurs impliqués dans le métabolisme ou l'élimination des médicaments (NAT2, GST, MDR) dans cette population de patients asiatiques,
- la relation entre le polymorphisme génétique des CYP, enzymes de phase II ou transporteur et la survenue d'effets indésirables de type neurologique ou hépatique chez les patients de l'essai Camelia (essai ANRS1295) qui reçoivent un traitement antituberculeux associé à un traitement antirétroviral,
- la relation entre le polymorphisme du CYP2B6 et l'interaction EFV /rifampicine chez les patients de l'essai ANRS 1295.
-

Critères d'inclusion :

- patients infectés par le VIH
- appartenant à la cohorte Esther, traités par névirapine et ayant participé à l'évaluation M18
  parmi ces patients 10 participeront à une étude pharmacocinétique « complète »
  dans l'intervalle entre deux doses

- inclus dans l'essai Camelia et traités par efavirenz ; la mesure des concentrations résiduelles
  parmi ces patients 10 participeront à une étude pharmacocinétique « complète »
  dans l'intervalle entre deux doses à la fin de l'essai (période sans rifampicine)

Critères de non-inclusion :

- refus de signer ou incapacité à comprendre le consentement pour l'étude de pharmacogénétique
- refus de signer le consentement ou incapacité à comprendre le consentement pour l'étude pharmacocinétique « complète »

Schéma de l'essai :

Etude descriptive qui comporte deux parties :

- **pharmacocinétique**

・recueil des concentrations résiduelles de l'évaluation « M18 » des patients de la cohorte Esther (c'est-à-dire à 18 mois de traitement par névirapine 200 mg x2) ; données disponibles par la cohorte Esther

・recueil des concentrations d'éfavirenz mesurées 12h après la prise à S50 des 300 premiers patients inclus dans l'essai Camelia ; données disponibles dans l'essai Camelia.

・calcul des paramètres pharmacocinétiques chez 10 patients traités par névirapine et 10 patients traités par efavirenz

・calcul des paramètres de population (clairance orale Cl/F) des deux médicaments étudiés

- **pharmacogénétique**

・recherche des variants alléliques des CYP2B6 et CYP3A5 dans un premier temps

・puis NAT2, GST, MDR, en fonction de la fréquence des effets indésirables observés

・calcul des fréquences des variants alléliques

Critère principal de jugement :

Relation entre polymorphisme des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments et les caractéristiques pharmacocinétiques de l'EFV ou NVP (clairance orale).

Nombre de patients : Pour l'étude de pharmacogénétique il est prévu d'inclure 150 patients traités par NVP et 300 patients traités par EFV. 10 patients traités par névirapine et 10 patients traités par efavirenz participeront à la pharmacocinétique « complète ».

Promotion : ANRS

6.2 Annexe 2 : Résumé de l'essai ANRS 1295-CIPRA KH001CAMELIA

Titre : Introduction précoce vs tardive d'un traitement antirétroviral chez des patients adultes atteints de tuberculose et co-infectés par le VIH au Cambodge

Au Cambodge, pays reconnu comme faisant partie des 22 pays dans lesquels l'incidence de la tuberculose (TB) est la plus élevée et où l'accès aux antirétroviraux (ARV) reste limité (on estime que moins de 5% des personnes vivant avec le VIH et nécessitant des ARV ont accès à ces derniers), nous proposons de conduire une étude prospective, randomisée, à deux bras sans placebo construite comme un essai de non – infériorité destiné à comparer l'efficacité et la sécurité d'une introduction précoce des ARV (2 semaines après l'initiation des antituberculeux) vs une introduction tardive (2 mois après l'initiation des antituberculeux) chez des patients infectés par le VIH et récemment diagnostiqués pour une TB.

Chez les patient infectés par le VIH et porteurs d'une TB, le risque de mortalité est élevé même lorsque le bacille de Koch (BK) est sencible aux antituberculeux prescrits et que la réponse au traitement est positive. En effet, il a été montré qu'une TB active était associée à un plus grand risque de décès chez les patients infectés par le VIH, l'âge des patients, les infections opportunistes antérieures, le taux de base des CD4 et le traitement ARV étant comparable par ailleurs. Le degré d'immunosuppression semble être l'élément prédictif de survie le plus important chez les patients co-infectés par le VIH et le BK. Il a également été montré que le BK augmentait la replication du VIH dans des modèles *in vivo* et *in vitro.* L'ensemble de ces données suggère qu'une prise en charge intensive de l'infection à VIH lors du traitement de la TB pourrait améliorer la survie en diminuant la réplication virale et en restaurant l'immunité. Donneés seuls sans association à des ARV, les antituberculeux s'avèrent en effet incapables de diminuer rapidement la charge virale des patients avec faible taux de CD4.

Les ARV permettent de diminuer la morbilité et la mortalité associées à l'infection à VIH. Leur utilisation chez les patients atteints de TB est compliquée en raison des interactions entre la rifampicine (clé du traitement antituberculeux, en association à l'isoniazide) et les inhibiteurs de protéases (IP) ou les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. Certaines de ces interactions médicamenteuses sont si importantes qu'elles constituent des contre-indications à l'utilisation concomittante de certains ARV avec la rifampicine. Par alleurs, la reconstitution de l'immunité obtenue avec les ARV peut s'accompagner d'une aggravation transitoire ou de l'apparition de signes cliniques ou radiologique de TB. Ces « réactions paradoxales » pourraient être la conséquence de la restauration de l'immunité dirigée contre les antigènes des mycobactéties, incluant une prolifération de cellules T et l'élaboration de cytokines proinflammatoires en réponse aux antigènes de BK. Il a été suggéré que ces réactions pourrairent être particulièrement sévères

quand les ARV sont débutés précocément après l'instauration des antituberculeux. Les facteurs génétiques de l'hôte contribuant à ce phénomène restent méconnus.

L'existence de profils de toxicité se chevauchant entre les ARV et les antituberculeux ainsi que la possibilité de générer des réactions paradoxales ont conduit certains à retarder l'introduction des ARV jusqu'à ce que les effets indésirable précoces des antituberculeux aient pu être gérés afin de simplifier le prise en charge clinique de ces patients co-infectés par VIH et BK. Par exemple, certains auteurs recommandent de retarder l'introduction des ARV après que les 2 premiers mois de traitement antituberculeux aient été achevés, y compris chez les patients avec un faible taux initial de CD4. D'autres auteurs recommandent de débuter précosément les ARV losques le taux de CD4 est inférieur à 100 x 10^6 cellules/l et préconisent un délai de 15 jours entre le début des antituberculeux et l'introduction des ARV.

Dans l'étude proposée ici, après que les patients cambodgiens aient donné leur consentement éclairé à leur participation à l'essai, les nouveaux cas de TB (pulmonaire ou extra- pulmonaire) infectés par le VIH et dont le taux initial de CD4 est inférieux à 200 x 106 cellules/l seront randomisés dans l'un des deux bras deux semaines après le début de leur traitement antituberculeux. Les patients seront ou non hospitalisés selon leur état médical jugé lors de l'évaluation initiale. L'introduction des ARV sera randomisée entre 2 bras : introduction « précoce » 15 jours après le début des antituberculeux (bras 1) vs introduction « tardive » 8 semaines après le début des antituberculeux (bras 2). Dans cette étude, les ARV ne comprendront pas d'IP et associeront 3 médicament : D4T (stavudine), 3TC (lamivudine) et efavirenz. Tous les patients recevront une quadrithérapie initiale antituberculeuse pendant 2 mois (rifampicine, isoniazide, éthambutol et pyrazinamide). La seconde partie du traitement antituberculeux sera conforme au programme National Cambodgien de prise en charge de la TB (6 mois de bithérapie isoniazide + éthambutol). Durant toute la durée de l'étude (12 mois), une prophylaxie active contre la pneumocystose (cotrimoxazole) et la cryptococose (fluconazole) sera également administrée si besoin. 570 patients (285 dans chaque bras) seront recrutés dans plusieurs centres urbains et ruraux au Cambodge. L'objectif pricipal sera d'évaluer l'efficacité clinique d'une introduction retardée des ARV par rapport à leur instauration précoce chez des patients infectés par le VIH récemments diagnostiqués comme étant porteurs d'une TB et naifs de toute drogue. L'efficacité sera évaluée par le taux de survie et le taux d'hospitalisations (quelles qu'en soient les causes). Les objectifs secondaires incluront l'évaluation de la sécurité d'une introduction retardée des ARV en termes d'interactions médicamenteuses ou de survenue de réactions paradoxales ; la survenue d'infections opportunistes ; le succès du traitement de la TB ; la survenue de rechutes TB ; le succès des ARV ; les profils de résistance des souches de BK et VIH-1 isolées ainsi que leur association avec un sucès ou un échec ; la compliance médicamenteuse (ARV + antituberculeux). Il sera également déterminé si les marqueus

génétiques de l'hôte sont associés ou non avec un succès ou un échec thérapeutique ou avec la survenue de réactions paradoxales.

6.3 Annexe 3 : Fiche technique du dosage de la nevirapine dans le plasma par CLHP

I. Matériels

- ***Chaîne CLHP Agilent serie 1100***

- Détecteur Barrette diode, Agilent serie 1100
- Informatisé : Logiciel « Agilent Chemstation for LC and LC/MS syteme ».

- ***Colonne*** : Type LichroCART® 250-4, phase LiChrospher® 100 RP-8 (5µm), et pré-colonne de même type (interchim)

II. Réactifs

- Acétonitrile pour CLHP (Prolabo, VWR)
- Méthanol (Prolabo, VWR)
- Eau ultra pure (obtenue du système Milli-D, Millipore)
- Tampon d'hydrogénophosphate de potassium, KH2PO4 (Merck)
- Tampon d'hydrogénophosphate de sodium, Na2HPO4 (BDH, VWR)

III. Conditions chromatographiques

Préparation du tampon phosphate pH5

- ***Solution de Phosphate monopotassique (A) :*** peser exactement 6,8045 g de KH_2PO_4 et compléter d'eau ultrapure dans une fiole jaugée 1L.

- ***Solution de Phosphate disodique (B) :*** peser exactement 8,8995 g/L de Na_2HPO_4 et compléter d'eau ultra pure dans une fiole jaugée 1L.

Dans une éprouvette d'un litre, mesurer 990 ml de solution (A) et compléter à 1L avec le solvant (B). Bien mélanger et ajuster au pH 5.

- Filtrer cette solution tampon.

Préparation de la phase mobile

La composition de phase mobile sont : Tampon phosphate pH5/ACN/Méthanol : 70/18/12 (v/v/v)

Dans une éprouvette d'un litre, introduire : 700 ml de tampon phosphate pH5, additionner jusqu'à 820 ml de méthanol et compléter jusqu'à un litre d'acétonitrile.

Après agitation, la phase mobile est transférée dans un flacon de 1L puis dégazée au bac à ultrasons pendant 15 min.

Note : *la colonne doit être équilibrée environ 1heure sous cette phase mobile avant injection et la ligne de base vérifiée*

- Débit Phase Mobile : 1,5 mL/min

- Détecteur : Longueur d'onde : 240 nm

- Run time : 20 minutes

IV. Concentrations des gammes d'étalonnages et contrôles

Gamme d'étalonnage de EFV sont : 0, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10 000 ng/mL

Etiqueter et indiquer la date de fabrication

Points de gamme	0	1	2	4	5	6	7	9
(ng/mL)	0	50	100	500	1000	2500	5000	10000
SF1 (mL)						1,25	2,5	5
SF2 (mL)		0,1	0,2	1	2			
Plasma qsp	10	10	10	10	10	10	10	10

Contrôle de qualité : C1 à 200 ng/mL (contrôle interne)

AR1 et AR2 (Contrôle externe Asqualab)

V. Préparation de la solution d'étalon interne :

- Préparation de la solution mère de l'étalon interne BROMAZEPAM de 500 000 ng/ml :

Peser exactement 5 mg de Bromazépam et compléter le méthanol dans une fiole jaugée de 10 ml.

-***Préparation de la solution fille (F1) de l'étalon interne de 5000 ng/ml***

Elle est obtenue après dilution 1/100 de la solution mère (SM) dans le méthanol. Dans une fiole jaugée de 10 mL, introduire 100 µL de la solution mère (SM) à 500 000 ng/mL et compléter 10 ml de méthanol.

Note : *Toutes les solutions préparées sont bien étiquetées en précisant la date de fabrication et conservées dans le congélateur -20°C* (chambre 003)

VI. Traitement des échantillons

Les plasmas congelés sont décongelés à température ambiante et vortexés.

Dans des micro- tubes Safe-Lock de 1,5 ml à usage unique introduire :

- 200 µL de solution F2 de l'étalon interne BZP à 5000 ng/mL,
- 100 µL d'échantillon à doser (point de gamme, contrôles de qualité ou plasma malade),
- Vortexer pendant 5 secondes,

- Agiter par agitateur multitubes pendant 5 min,
- Centrifuger à 4000 tours/min pendant 15 min,
- Transférer le surnageant 200 µl dans un autre micro tube 1,5 ml Safe-Lock, et additionner 200 µl de phase mobile,
- Vortexer pendant 5 secondes,
- Centrifuger à 4000 tours/min pendant 10 min,
- Récupérer 200 µl de phase liquide et transférer dans un flacon avec réducteur conique pour injecter.

VII. Caractéristique de la méthode

Temps de rétention :

- Pic de névirapine : 8,3 minutes

- Pic de Bromazepame : 13,6 minutes

Limite de quantification : 50 ng/mL

Linéarité : de 50 à 10000 ng/mL

VIII. Quantification :

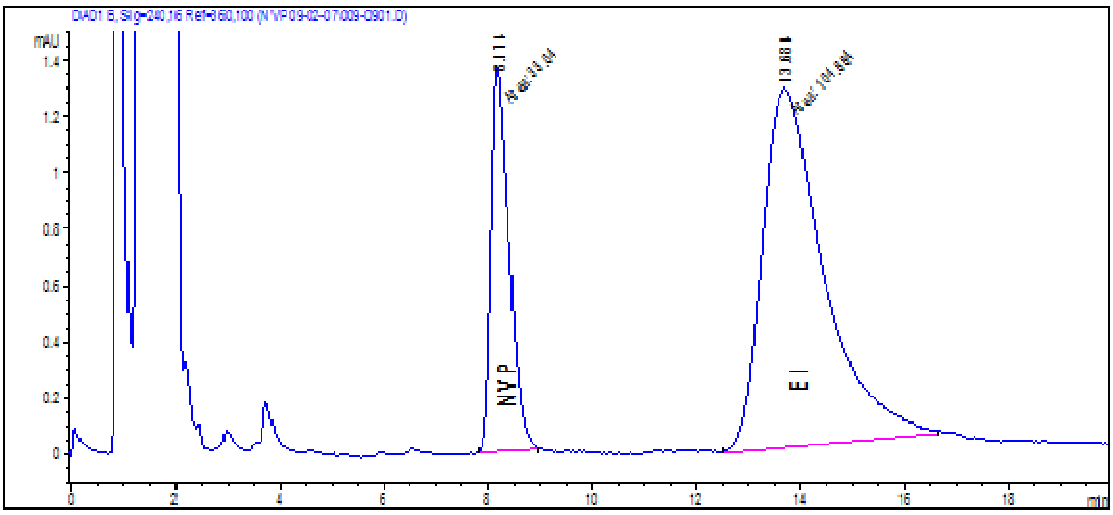
- Intégré par logiciel : Chem Station
- Lecture air du pic
- Calcule : Air du pic NVP / air du pic Bromazépame (EI)
- Unité : ng/mL

La courbe de la gamme et le calcul des concentrations sont réalisés sur la feuille calcul 'EXCEL' sur PC (Fichier NVP –HPLC) situé dans le bureau du laboratoire ou sur PC de serveur dans le bureau.

Les courbes d'étalonnage sont ajustées par régression linéaire par la méthode des moindres carrés pondérée par $1/C^2$ de manière à obtenir les équations de droites de régression :

Rapport des airs = (Pente x Concentration) + Origine

Lire sur la gamme d'étalonnage les concentrations des contrôles et des patients



Chromatogramme de la Névirapine et de l'Etalon interne

6.4 Annexe 4 : Fiche technique du dosage de l'efavirenz dans le plasma par CLHP

I. Matériels

- ***Chaîne CLHP Agilent serie 1100***

- Détecteur Barrette diode, Agilent serie 1100

- Informatisé : Logiciel « Agilent Chemstation for LC and LC/MS syteme »

- ***Colonne*** : phase inverse RP18 (Silice greffée octadécyl), Type : Lichrocart® 250-4, phase Lichrospher® 100 RP-18 end-capped (5µm) et pré-colonne de même type (interchim)

II. Réactifs

- Acétonitrile pour CLHP (Prolabo, VWR)
- Méthanol (Prolabo, VWR)
- Eau ultra pure (obtenue du système Milli-D, Millipore)
- Tampon d'hydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 (Merck)
- Tampon d'hydrogénophosphate de sodium, Na_2HPO_4 (BDH, VWR)
- solution d'ammoniaque à 25 % (BDH, VWR)
- Ter Butyl Methyl Ether (TBME), Chromanorm pour CLHP (Prolabo, VWR)

III. Conditions chromatographiques

* Préparation du tampon phosphate pH = 5,6

- Solution d'hydrogénophosphate de potassium à 9,073 g/L (A) : dans une fiole jaugée de 1L, peser 9,073 g de KH_2PO_4 et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Solution d'hydrogénophosphate de sodium à 11,87 g/L (B): dans une fiole jaugée de 1L, peser 11,87 g de Na_2HPO_4 et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Dans une éprouvette de 1 L, mesurer 955 mL de solution A et compléter à 1L avec de la solution B.

- Mesurer le pH et filtrer

* **Phase mobile** : **tampon phosphate pH 5,6 / Acétonitrile : 480/520 (V/V).**

- Dans une éprouvette de 1L, mesurer 480 mL de tampon phosphate filtré et compléter à 1L avec de l'acétonitrile.

Note : La colonne doit être équilibrée environ 1h sous cette phase mobile, préalablement filtrée et dégazée au bac à ultrasons pendant 15 minutes, avant injection.

- Débit Phase Mobile : 1,1 mL/min

- Détecteur : Longueur d'onde : 248 nm

- Run time : 16 minutes

IV. Concentrations des gammes d'étalonnages et contrôles

Gamme d'étalonnage de EFV sont : 0, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 ng/mL

Etiqueter et indiquer la date de fabrication

Points de gamme	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(ng/mL)	0	50	100	250	500	1000	2500	5000	7500	10000
SF1 (mL)								1	1,5	2
SF2 (mL)					1	2	5			
SF3 (mL)		1	2	5						
Plasma qsp	10	10	10	10	10	10	10	10		10

Contrôle de qualité : C1 à 230 ng/mL (contrôle interne)

AR3 et AR4 (Contrôle externe Asqualab)

V. Préparation de la solution d'étalon interne :

- Préparation de la solution mère de Quinoxaline (SM = 1 mg/mL) : peser exactement 10 mg de poudre Quinoxaline et compléter dans une fiole de jaugée 10 ml de méthanol.
- Préparation de la solution fille 1 de Quinoxaline (SF1 = 1 mg/mL) en prenant 1 ml de SM et compéter de ACN dans une fiole de jaugée de 10 ml.
- Préparation de la solution fille 2 de Quinoxaline (SF2 = 2 mg/mL) en prenant 50 µl de SF1 et compléter de ACN dans une fiole de jaugée de 25 mL).

Note : Il faut bien étiqueter et indiquer la date de fabrication et conserver dans le congélateur -20^{o}C (chambre 003).

VI. Traitement des échantillons

Les plasmas congelés sont décongelés à température ambiante et vortexés.

Dans des tubes à hémolyse en verre identifiés au marqueur :

- Prélever une prise d'essai de 200 µL de plasma (pipette ATRV)

- Ajouter 50 µl de solution fille d'étalon interne à 2 mg/L à l'aide d'une pipette SMI

- Ajouter 200 µl de solution d'ammoniaque à 25 % diluée au 1/10ème dans de l'eau distillée (environ 1 M) à l'aide de la multi pipette

- Ajouter 2,5 ml de Ter Butyl Methyl Ether (TBME) à l'aide de la multi pipette

Les tubes sont bouchés et agités au Vortex pendant 4 minutes.

- Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 tours/min (centrifugeuse JOUAN K82)

- Récupérer le maximum de phase éthérée supérieure dans un tube en verre conique, à l'aide de transfère pipettes

- Evaporer à sec les extraits sous courant d'azote

- Le résidu sec est repris par 100 µl de phase mobile et homogénéisé au vortex pendant 2 minutes.

Ce concentré est transvasé dans un flacon avec réducteur conique pour injecteur

- 25 µL sont injectés dans le système chromatographique

VII. Caractéristique de la méthode

- ***Temps de rétention :***

- Pic de Quinoxaline : 6,3 minutes

- Pic de l'efavirenz : 13,9 minutes

- ***Limite de quantification : 50 ng/mL***

- Linéarité : de 50 à 10000 ng/mL

VIII. Quantification :

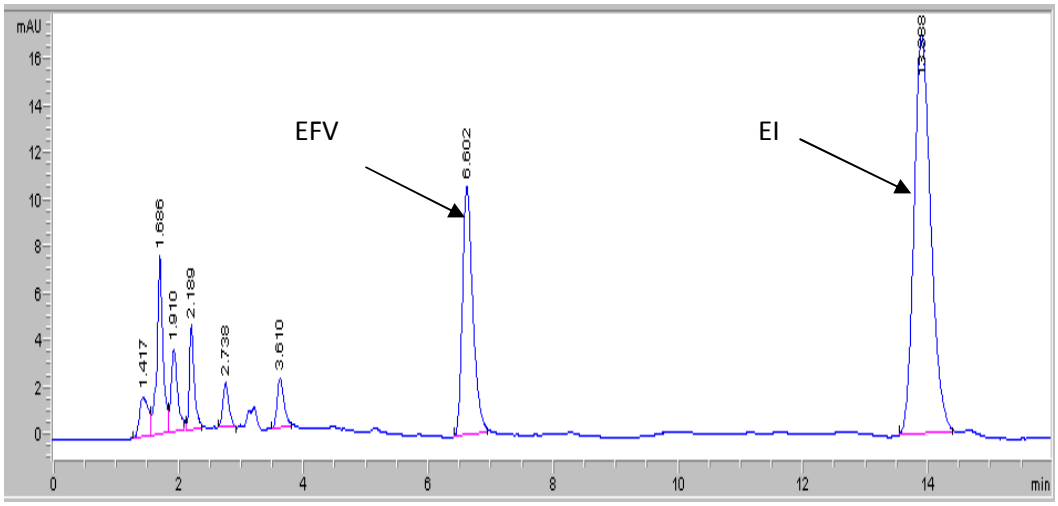
- Intégré par logiciel : Chem Station
- Lecture hauteur du pic
- Calcule : hauteur du pic EFV/ hauteur du pic Quinoxaline (EI)
- Unité : ng/mL

La courbe de la gamme et le calcul des concentrations sont réalisés sur la feuille calcul 'EXCEL' sur PC situé dans le bureau du laboratoire ou sur PC de serveur dans le bureau.

Les courbes d'étalonnage sont ajustées par régression linéaire par la méthode des moindres carrés pondérée par $1/C^2$ de manière à obtenir les équations de droites de régression :

Rapport des hauteurs = (Pente x Concentration) + Origine

Lire sur la gamme d'étalonnage les concentrations des contrôles et des patients



Chromatogramme de l'efavirenz et de l'Etalon interne

6.5 Annexe 5 : Les amorces, les sondes et les kits utilises pour les genotypages

Gène génotype	Numéro rs	Amorces	Sonde
CYP3A5 6986A>G	(rs776746)	sens : 5’-ACC-CAG-CTT-AAC-GAA-TGC-TCT-ACT-3’ Anti-sens : 5’-GAA-GGG-TAA-TGT-GGT-CCA-AAC-AG-3’	ViC : 5’-TTT-TGT-CTT-TCA-ATA-TCT-CTT-3’ FAM : 5’-TTG-TCT-TTC-AGT-ATC-TCT-T-3’
ABCB1 3435C>T exon 26	(rs1045642)	Sens : 5'-ATG-TAT-GTT-GGC-CTC-CTT-TGC-T-3’ Anti-sens : 5'-AAC-AGC-CGG-GTG-GTG-TCA-3’	ViC : 5’- CCT-CAC-AAT-CTC-TT -3’ FAM : 5’- CCT-CAC-GAT-CTC-T -3’

Référence des trousses commerciales (fournisseur DME) utilisées pour le génotypage

Gène génotypé	Numéro rs	Référence DME
CYP2B6 516G>T	rs3745274	C___7817765_60
CYP2B6 1459C>T	rs3211371	C__30634242_40
OATPC 521T>C	rs4149056	C__30633906_10
CYP3A4*1B A>G	rs4646437	C__32306227_10
CYP2A6 1836G>T	rs8192726	C__29560333_20
PXR 7635A>G	rs6785049	C__29280426_10

RESUME
La variabilité de la pharmacocinétique de la névirapine et de l'éfavirenz, deux médicaments antirétroviraux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH, a été étudiée chez des patients cambodgiens infectés par le VIH par une méthode de pharmacocinétique de population. Cent soixante dix patients traités par névirapine faisaient partie de la cohorte ESTHER de l'hôpital Calmette de Phnom-Penh et 312 patients co-infectés par le VIH et la tuberculose et traités par éfavirenz étaient inclus dans l'essai clinique CAMELIA (ANRS1295–CIPRA KH001) conduit au Cambodge. Les dosages plasmatiques de névirapine et d'éfavirenz ont été réalisés par des méthodes CLHP avec détection UV. Après 18 et 36 mois de traitement, les concentrations plasmatiques médianes de la névirapine sont de 5,7 µg/mL. Après 22 et 50 semaines de traitement, les concentrations médianes d'éfavirenz sont de 2,7 µg/mL, que l'éfavirenz soit associé (22 semaines) ou non (50 semaines) à la rifampicine. Les clairances apparentes estimées de la névirapine et de l'éfavirenz sont respectivement de 2,6 L/h et de 7,7 L/h. Les variabilités intra et inter individuelles des clairances apparentes sont respectivement de 17% et 28% pour la névirapine et 15% et 37% pour l'éfavirenz. Parmi les covariables démographiques, biologiques ou génétiques étudiées, seul le polymorphisme génétique du *CYP2B6 G516T* est significativement associé à la clairance apparente de ces deux médicaments. Ainsi la clairance apparente estimée de la névirapine est de 2,95 L/h, 2,62 L/h et 1,86 L/h respectivement pour les génotypes *CYP2B6 516GG, 516GT, et 516TT*. La fréquence de l'allèle mutée T qui code pour une enzyme non fonctionnelle est de 34% dans cette population de 442 patients d'Asie du Sud-Est.

ABSTRACT
Variability of pharmacokinetic parameters of nevirapine and efavirenz was studied in Cambodian HIV-infected patients by population method. 170 patients on nevirapine-based antiretroviral therapy were from the ESTHER cohort of the Calmette hospital in Phnom-Penh. 312 patients on efavirenz-based therapy were included in the CAMELIA (ANRS1295–CIPRAKH001) clinical trial conducted in Cambodia. Plasma concentrations of nevirapine and efavirenz were measured by HPLC and UV detection. Median plasma concentrations of nevirapine and efavirenz were 5.7 µg/mL and 2.7 µg/mL respectively. Apparent plasma clearances of nevirapine and efavirenz were 2.6 L/h and 7.7 L/h respectively. Among demographic, clinical, biological or genetic covariates, genetic polymorphism of *CYP2B6 G516T* was the only one which was shown to affect the clearance of the 2 drugs. Frequency of the T allele was 34% in this population of South-East Asia.

MOTS CLES
Névirapine, éfavirenz, médicaments antirétroviraux, pharmacocinétique, pharmacogénétique, *CYP2B6 G516T*

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT
Service de pharmacie clinique, Hôpital Bicêtre, Université Paris Sud, France

PÔLE : PHARMACOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS XI
UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY»
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex