



**HAL**  
open science

# Étude phénotypique des enzymes du métabolisme des thiopurines (ITPA, IMPDH), lien avec les métabolites thiopuriques et optimisation thérapeutique en gastro-entérologie

Antony Citterio-Quentin

## ► To cite this version:

Antony Citterio-Quentin. Étude phénotypique des enzymes du métabolisme des thiopurines (ITPA, IMPDH), lien avec les métabolites thiopuriques et optimisation thérapeutique en gastro-entérologie. Pharmacologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1225 . tel-01636796

**HAL Id: tel-01636796**

**<https://theses.hal.science/tel-01636796v1>**

Submitted on 17 Nov 2017

**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.



N°d'ordre NNT : **2016LYSE1225**

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° ED 205**

**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)**

**Spécialité de doctorat** : Pharmacologie

Soutenue publiquement le 16/11/2016, par :

**Antony CITTERIO-QUENTIN**

---

Etude phénotypique des enzymes du  
métabolisme des thiopurines (ITPA, IMPDH),  
lien avec les métabolites thiopuriques et  
optimisation thérapeutique  
en gastro-entérologie

---

Devant le jury composé de :

JACQZ-AIGRAIN, Evelyne PU-PH Université PARIS-DIDEROT  
SAINT-MARCOUX, Franck PU-PH Université de LIMOGES  
GUSTIN, Marie-Paule MCU Université LYON 1  
LACHAUX, Alain PU-PH Université LYON 1  
MOULSMA, Mustapha PH Hospices Civils de LYON

**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examinatrice**  
**Examineur**  
**Examineur**

BOULIEU, Roselyne PU-PH Université LYON 1

**Directrice de thèse**

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

## RESUME

Cette étude a pour objectifs 1) d'évaluer l'activité érythrocytaire de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) et de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) en lien avec le suivi des métabolites thiopuriques et le phénotypage de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), 2) d'étudier le lien entre l'activité de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables observés sous azathioprine (AZA).

L'étude rétrospective réalisée sur une large population de sujets adultes et enfants, sains et atteints de maladies auto-immunes, a permis d'identifier une distribution quadrimodale de l'activité de l'ITPA à l'aide d'un modèle de mélange gaussien ainsi qu'une faible variabilité intra-individuelle de cette activité. Dans la population pédiatrique, une activité de l'ITPA basse est corrélée à une augmentation des dérivés méthylés suggérant un risque d'hépatotoxicité. Le lien observé entre l'activité ITPAsique, le volume globulaire moyen et les gammaglobulines chez les enfants atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin sous AZA suggère que la mesure de l'activité de l'ITPA permettrait d'anticiper la persistance d'un syndrome inflammatoire chez les sujets à activité élevée.

L'étude phénotypique de l'IMPDH montre une importante variabilité inter-individuelle de l'activité de cette enzyme et l'absence d'influence de l'âge, du sexe et du traitement par AZA sur cette activité. Une distribution bimodale de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire a été observée ainsi qu'un lien entre cette activité et les dérivés méthylés.

En perspective, l'étude combinée des activités de l'ITPA, l'IMPDH et de la TPMT sur la variabilité de la réponse aux traitements thiopuriques sera envisagée.

# ABSTRACT

**Title:** Phenotypic study of enzymes involved in thiopurine metabolism (ITPA, IMPDH), relationship with thiopurine metabolites and therapeutic optimization in gastro-enterology

**Abstract:** The aims of this study are 1) to evaluate inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) and inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activities in red blood cells (RBCs) in relation to the monitoring of thiopurine metabolites and the phenotyping of thiopurine S-methyltransferase (TPMT), 2) to investigate a possible link between ITPA activity and the occurrence of adverse effects observed under azathioprine (AZA) treatment.

The retrospective study was carried out on a large population of healthy adults and children as well as those suffering from immunological diseases. A quadrimodal distribution of ITPA was identified among the population using a gaussian mixture model. A weak intraindividual variability of ITPA activity was found. In the paediatric population, a low ITPA activity is correlated with increased levels of methyl nucleotides, suggesting a risk of hepatotoxicity. The relationship observed between ITPA activity and both mean corpuscular volume and gammaglobulin levels in IBD children on AZA therapy suggests that the determination of ITPA activity may allow the prediction of a persistent inflammatory process in subjects with elevated ITPA activity.

The phenotypic study of IMPDH shows no influence of age, sex and AZA therapy on the activity of IMPDH. Moreover a large interindividual variability in the activity of IMPDH was found. A bimodal distribution of IMPDH activity in RBCs was observed as well as a relation between this activity and the methyl nucleotides.

Further study on the combined effect of the three enzymes ITPA, IMPDH and TPMT on the variability of response to thiopurine therapy will be considered.

**Mots clés:** ITPA, IMPDH, phénotype, érythrocytes, azathioprine, métabolites thiopuriques, gastro-entérologie

**Keywords:** ITPA, IMPDH, phenotype, red blood cells, azathioprine, thiopurine metabolites, gastro-enterology

**Adresse du laboratoire:** Université de Lyon, Université Lyon 1 - ISPB - Faculté de Pharmacie, Pharmacie Clinique, Pharmacocinétique et Evaluation du Médicament, Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR CNRS 5305, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

# REMERCIEMENTS

## **Aux Professeurs Evelyne Jacqz-Aigrain et Franck Saint-Marcoux,**

Pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

## **Au Docteur Marie-Paule Gustin,**

Pour votre aide précieuse et le temps que vous m'avez consacré durant la préparation de ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de mes sincères remerciements.

## **Au Professeur Alain Lachaux,**

Très touché de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury, soyez assuré de mon profond respect.

## **Au Docteur Mustapha Moulisma,**

Pour votre soutien et vos précieux conseils tout au long de ce travail et dans l'ensemble de mes projets professionnels. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et mon profond attachement.

## **Au Professeur Roselyne Boulieu,**

Pour m'avoir accompagné, soutenu, guidé en tant que directrice de thèse, je vous remercie pour votre grande disponibilité, votre patience et vos précieux conseils, soyez assurée de toute mon estime.

## **A tous les étudiants du secteur de Pharmacocinétique Clinique,**

Pour m'avoir permis de faire progresser ce travail notamment par vos remarques et questions judicieuses.

## **A toute l'équipe de Pharmaco-Toxicologie,**

Pour votre soutien, votre compréhension et pour le plaisir de travailler avec vous au quotidien.

## **A toute ma famille, mes amis et bien sûr à toi Lolo !**

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES .....	8
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
<b>II. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>14</b>
1. LES MEDICAMENTS THIOPURIQUES.....	14
a) <i>Indications</i> .....	15
i. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	15
ii. Hépatites auto-immunes.....	17
b) <i>Propriétés pharmacocinétiques</i> .....	18
i. Métabolisation (8, 15, 55, 73).....	19
c) <i>Mécanisme d'action</i> .....	25
i. Incorporation des 6-TGTP et d6-TGTP dans l'ARN/ADN .....	25
ii. Inhibition de la synthèse <i>de novo</i> des purines .....	25
iii. Blocage de la voie anti-apoptotique des lymphocytes T <i>via</i> Rac1 .....	26
iv. Blocage de cytokines pro-inflammatoires.....	27
d) <i>Effets indésirables</i> .....	28
i. Les effets dose-indépendants .....	28
ii. Les effets dose-dépendants .....	28
iii. Fréquence des effets indésirables.....	30
2. SUIVI BIOLOGIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DES MEDICAMENTS THIOPURIQUES .....	31
a) <i>Suivi des marqueurs biologiques</i> .....	31
b) <i>Suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments thiopuriques</i> .....	31
c) <i>Etude des enzymes du métabolisme</i> .....	33
i. Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT).....	34
ii. Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA).....	37
iii. Inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) .....	40
<b>III. TRAVAUX DE RECHERCHE .....</b>	<b>43</b>
1. DETERMINATION DE L'ACTIVITE INTRA-ERYTHROCYTAIRE DE L'ITPA.....	45
2. AMELIORATION DE LA METHODE DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE ITPASIQUE.....	50
3. ETUDE PHENOTYPIQUE DE L'ITPA DANS DES POPULATIONS PEDIATRIQUES ET ADULTES TRAITEES OU NON PAR L'AZATHIOPRINE.....	54
4. ETUDE DES LIENS ENTRE ACTIVITE DE L'ITPA ET EFFETS INDESIRABLES DANS UNE POPULATION PEDIATRIQUE TRAITEE PAR L'AZATHIOPRINE .....	80
5. DETERMINATION DE L'ACTIVITE INTRA-ERYTHROCYTAIRE DE L'IMPDH .....	108
6. ETUDE PHENOTYPIQUE DE L'IMPDH DANS DES POPULATIONS PEDIATRIQUES ET ADULTES TRAITEES OU NON PAR L'AZATHIOPRINE.....	128
<b>IV. DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>135</b>
<b>V. CONCLUSION.....</b>	<b>142</b>
<b>VI. PERSPECTIVES .....</b>	<b>143</b>
<b>VII. REFERENCES .....</b>	<b>144</b>

## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure des bases puriques : adénine (a) et guanine (b).....	14
<b>Figure 2</b> : Structures chimiques de la 6-mercaptopurine (a), de l'hypoxanthine (b) et de l'azathioprine (c).....	14
<b>Figure 3</b> : Conversion de l'azathioprine en 6-mercaptopurine avec libération d'une molécule d'imidazole. ....	19
<b>Figure 4</b> : Voies dites d'inactivation de la 6-mercaptopurine <i>via</i> la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) et la xanthine oxydase (XO). ....	19
<b>Figure 5</b> : Action de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) sur la 6-mercaptopurine .....	20
<b>Figure 6</b> : Action de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) sur la 6-thioinosine monophosphate.....	20
<b>Figure 7</b> : Action de la guanosine monophosphate synthétase (GMPS) sur la 6-thioxanthosine monophosphate.....	20
<b>Figure 8</b> : Phosphorylations de la 6-thioguanosine monophosphate en 6-thioguanosine diphosphate et 6-thioguanosine triphosphate .....	21
<b>Figure 9</b> : Méthylation puis phosphorylations de la 6-thioguanosine monophosphate.....	21
<b>Figure 10</b> : Phosphorylation de la 6-thioinosine monophosphate et intervention de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) .....	22
<b>Figure 11</b> : Méthylation de la 6-thioinosine monophosphate puis phosphorylation en dérivés di- et triphosphate de la méthyl 6-thioinosine.....	22
<b>Figure 12</b> : Schéma général du métabolisme de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine...24	
<b>Figure 13</b> : Inhibition de la synthèse <i>de novo</i> des purines par la méthyl 6-thioinosine monophosphate (91, 92) .....	26
<b>Figure 14</b> : Blocage de la voie anti-apoptotique des lymphocytes T <i>via</i> Rac1 par les 6-TGTP .....	27

## TABLE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Paramètres pharmacocinétiques de l’AZA et son métabolite la 6-MP (58, 62, 71, 72).....	18
<b>Tableau 2</b> : Fréquence des effets indésirables associés aux médicaments thiopuriques chez les patients atteints de MICI (13, 15, 21) .....	30
<b>Tableau 3</b> : Interprétation combinée des concentrations intra-érythrocytaires des 6-TGN et Me6-MPN .....	33
<b>Tableau 4</b> : Distributions de l’activité de l’ITPA intra-érythrocytaire rapportées dans la littérature .....	38
<b>Tableau 5</b> : Récapitulatif des études portant sur le lien entre polymorphisme de l’ITPA et métabolites thiopuriques.....	38
<b>Tableau 6</b> : Récapitulatif des études rapportant une association entre le polymorphisme génétique de l’ITPA et la survenue d’effets indésirables.....	39
<b>Tableau 7</b> : Récapitulatif des études ne rapportant pas d’association entre le polymorphisme génétique de l’ITPA et la survenue d’effets indésirables.....	39
<b>Tableau 8</b> : Récapitulatif des études menées sur l’association entre la diminution de l’activité de l’ITPA et la survenue d’effets indésirables .....	40

## LISTE DES ABREVIATIONS

- 5-ASA** : Acide 5-aminosalicylique
- 6-MP** : 6-mercaptopurine
- 6-TGDP** : 6-thioguanosine diphosphate
- 6-TGMP** : 6-thioguanosine monophosphate
- 6-TGN** : 6-thioguanine nucléotides
- 6-TGTP** : 6-thioguanosine triphosphate
- 6-TIDP** : 6-thioinosine diphosphate
- 6-TIMP** : 6-thioinosine monophosphate
- 6-TITP** : 6-thioinosine triphosphate
- 6-TU** : Acide 6-thiourique
- 6-TXMP** : 6-thioxanthosine monophosphate
- ALAT** : Alanine amino-transférase
- ASAT** : Aspartate amino-transférase
- AZA** : Azathioprine
- CLHP** : Chromatographie liquide haute performance
- d6-TGDP** : Désoxy 6-thioguanosine diphosphate
- d6-TGTP** : Désoxy 6-thioguanosine triphosphate
- DTT** : Dithiothréitol
- EDTA** : Éthylène diamine tétra-acétique
- EPPM** : Etude permanente de la prescription médicale
- ENT** : Equilibrative nucleoside transporters
- GGT** : Gamma glutamyl transpeptidase
- GMPS** : Guanosine monophosphate synthétase
- GNEFs** : Guanosine nucleotide exchange factors
- GST** : Glutathion S-transférase
- HAI** : Hépatite auto-immune
- HGPRT** : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
- HNR** : Hyperplasie nodulaire régénérative
- IMPDH** : Inosine monophosphate deshydrogénase
- ITPA** : Inosine triphosphate pyrophosphatase
- K<sub>m</sub>** : Constante d'affinité
- LAL** : Leucémie aiguë lymphoblastique
- MC** : Maladie de Crohn
- Me6-MP** : Méthyl 6-mercaptopurine
- Me6-MPN** : Méthyl 6-mercaptopurine nucléotides

**Me6-TGDP** : Méthyl 6-thioguanosine diphosphate  
**Me6-TGMP** : Méthyl 6-thioguanosine monophosphate  
**Me6-TGTP** : Méthyl 6-thioguanosine triphosphate  
**Me6-TIDP** : Méthyl 6-thioinosine diphosphate  
**Me6-TIMP** : Méthyl 6-thioinosine monophosphate  
**Me6-TITP** : Méthyl 6-thioinosine triphosphate  
**Me-d6-TGTP** : Méthyl déoxy 6-thioguanosine triphosphate  
**MEK** : Mitogen-activated protein kinase  
**MICI** : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin  
**MMR** : Mismatch repair  
**MRPs** : Multidrug resistance proteins  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-kappa B  
**PAL** : Phosphatase alcaline  
**PRPP** : 5-phospho-D-ribose-1-pyrophosphate  
**PRPP-AT** : Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransférase  
**RCH** : Rectocolite hémorragique  
**SAM** : S-adénosyl-L-méthionine  
**SLC** : Solute carrier  
**STP** : Suivi thérapeutique pharmacologique  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**TPMT** : Thiopurine S-méthyltransférase  
**TRIS** : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
**VGM** : Volume globulaire moyen  
**V<sub>max</sub>** : Vitesse initiale maximale  
**XO** : Xanthine oxydase  
 **$\beta$ -NAD** :  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide

## I. INTRODUCTION

La 6-mercaptopurine (6-MP) (Purinéthol®) et sa prodrogue l'azathioprine (AZA) (Imurel®) sont des médicaments thiopuriques largement utilisés pour leurs propriétés immunomodulatrices notamment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (1, 2) et les hépatites auto-immunes (HAI) (3, 4).

Actuellement en France, environ 200 000 personnes sont atteintes de MICI (5) et près d'un patient sur deux est traité par ces médicaments thiopuriques (1). Ces molécules anciennes, synthétisées dans les années 1950, restent essentielles dans la prise en charge de ces pathologies (2, 6-11). L'efficacité de ces médicaments est cependant contrebalancée par l'apparition d'effets indésirables incluant, en autres, myélotoxicité, hépatotoxicité, troubles digestifs, réactions cutanées et pancréatites (12). Ces effets touchent 10 à 30% des patients et nécessitent le plus souvent une réduction voire un arrêt du traitement (12-15). S'associe à ces effets indésirables une forte variabilité inter-individuelle en terme de réponse clinique avec près de 9% de sujets non répondeurs (16). Il est estimé que 30 à 50% des patients arrêtent ces traitements devant l'apparition d'effets indésirables ou le manque d'efficacité (14, 16-18).

Afin d'anticiper et d'éviter ces effets indésirables et cette variabilité de réponse, un suivi biologique des traitements thiopuriques peut être réalisé par un contrôle régulier de certains marqueurs de toxicité associé ou non à un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de ces médicaments. Actuellement, ce STP consiste en la mesure des concentrations intra-érythrocytaires de certains métabolites de ces molécules ainsi qu'en l'étude d'une des nombreuses enzymes impliquées dans leur métabolisation, la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT ; EC 2.1.1.67). L'AZA et la 6-MP sont en effet des prodrogues qui nécessitent une activation intracellulaire par métabolisation impliquant un grand nombre d'enzymes dont la TPMT. Le polymorphisme de cette dernière est tenu responsable de l'apparition d'une partie de la toxicité hématologique qui reste l'un des effets indésirables les plus sévères. La variabilité génétique de la TPMT n'explique cependant que 30 à 60% de l'ensemble des effets indésirables observés (19). L'étude d'autres enzymes du métabolisme des médicaments thiopuriques pourrait être une approche complémentaire à celle de la TPMT dans la compréhension des mécanismes d'apparition des effets indésirables liés à ces traitements.

Parmi les nombreuses enzymes impliquées dans ce métabolisme, deux ont fait l'objet de nos travaux : l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA ; EC 3.6.1.19) et l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH ; EC 1.1.1.205).

Au cours de ces dix dernières années, de nombreuses études génotypiques ont été menées sur le lien possible entre le polymorphisme de l'ITPA et l'apparition d'effets indésirables sous médicaments thiopuriques (9, 12, 20-46). Malheureusement, les résultats rapportés sont discordants et ne permettent pas, à ce jour, de conclure sur l'utilité en pratique courante de l'étude génotypique de cette enzyme dans le suivi des médicaments thiopuriques (15, 47, 48). L'étude phénotypique pourrait apporter des informations supplémentaires sur l'existence éventuelle d'un tel lien, mais peu d'équipes ont confronté l'activité enzymatique de l'ITPA à la survenue d'effets indésirables (12, 38, 44).

Nos travaux ont donc porté dans un premier temps sur la mise au point d'une technique de détermination de l'activité de l'ITPA dans les érythrocytes. Cette technique validée, a par la suite été appliquée à une large population adulte et pédiatrique incluant des sujets sains et des sujets atteints de maladies auto-immunes traités ou non par des médicaments thiopuriques. Ceci a permis d'étudier la distribution de l'activité de l'ITPA dans la population et d'évaluer l'influence de paramètres génétiques et non génétiques sur cette activité. Dans un deuxième temps, l'impact de l'activité de l'ITPA sur le métabolisme des médicaments thiopuriques a été exploré. Enfin, une étude du lien entre l'activité de l'ITPA et l'apparition d'effets indésirables dans la population pédiatrique ainsi que l'évaluation de la relation entre l'activité de l'ITPA et la réponse inflammatoire observée chez les enfants traités par AZA atteints de MICI ont été menées.

Concernant l'IMPDH, enzyme également impliquée dans le métabolisme des thiopurines, les études menées sur son impact dans le cadre des traitements par médicaments thiopuriques sont beaucoup moins nombreuses (9, 29, 49-53). Dans l'objectif d'étudier l'implication de cette enzyme dans le métabolisme des thiopurines, une méthode de détermination de son activité intra-érythrocytaire a été développée. Une étude phénotypique de l'IMPDH, associée à la recherche d'un lien potentiel entre l'activité de l'IMPDH et le métabolisme des médicaments thiopuriques a également été initiée dans ce travail.

## II. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. Les médicaments thiopuriques

Les médicaments thiopuriques sont des analogues des bases puriques (Figure 1) utilisés pour leurs propriétés antinéoplasiques, immunosuppressives et immunomodulatrices. Trois spécialités sont actuellement disponibles en France :

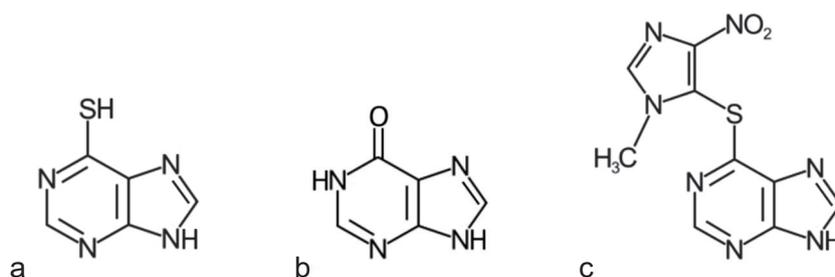
- la 6-thioguanine / LANVIS®
- la 6-mercaptopurine (6-MP) / PURINETHOL®
- l'azathioprine (AZA) / IMUREL®



*Figure 1 : Structure des bases puriques : adénine (a) et guanine (b)*

Contrairement à la 6-MP et à sa prodrogue l'AZA, la 6-thioguanine est soumise à un métabolisme moins intense et n'entre donc pas dans le cadre de nos travaux.

La 6-MP (Figure 2a), analogue sulfhydrile de l'hypoxanthine (Figure 2b), et sa prodrogue l'AZA (Figure 2c), dérivé méthyl-nitro-imidazole de la 6-MP ont été synthétisées initialement pour le traitement des leucémies infantiles, respectivement en 1951 par Gertrude Elion et George Herbert Hitchings (54) et en 1957 par le laboratoire Hitchings-Elion (55).



*Figure 2 : Structures chimiques de la 6-mercaptopurine (a), de l'hypoxanthine (b) et de l'azathioprine (c)*

## a) Indications

Leur première utilisation dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) remonte à 1962 (56), mais c'est à partir des années 1980 que leur application dans des pathologies impliquant le système immunitaire s'est plus largement répandue. Actuellement près d'un patient sur deux atteints de MICI est traité par ces médicaments (1). Bien qu'une modification de traitement de l'AZA par la 6-MP puisse être réalisée chez certains sujets (57), les indications de ces deux molécules diffèrent, notamment en France, où le laboratoire commercialisant l'AZA a obtenu des autorités de santé, une indication spécifique du produit pour les MICI. Cette démarche n'a pas été réalisée pour la 6-MP.

L'AZA était principalement utilisée, depuis les années 1980 et jusqu'à la fin des années 1990 (9), dans le traitement des MICI les plus évolutives ou de traitement difficile (rechutes fréquentes, poussées sévères, dépendance aux corticoïdes, lésions périnéales sévères,...). Depuis les années 2000, l'AZA est plus largement et plus précocement prescrite à la suite du diagnostic de la maladie car elle permet d'en ralentir l'évolution (15). L'AZA est également très largement utilisée dans le traitement des hépatites chroniques auto-immunes ainsi que dans d'autres pathologies faisant intervenir un désordre immunologique : anémie hémolytique auto-immune, dermatomyosite, lupus érythémateux disséminé, pemphigus, polyarthrite rhumatoïde, polymyosite, purpura thrombopénique idiopathique et vascularite (58, 59). Son utilisation dans la prévention des rejets de greffes est en recul (60) depuis l'arrivée de l'acide mycophénolique (61). Selon les données de l'étude permanente de la prescription médicale (EPPM) réalisée par IMS-Health® (59), l'IMUREL® a fait l'objet de 113 985 prescriptions en France en 2014 ; dans 67% des cas dans le traitement de MICI.

La 6-MP est quant à elle principalement utilisée en France dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), des leucémies aiguës myéloïdes et des leucémies myéloïdes chroniques (62). Nous n'aborderons pas dans ce travail ce type de pathologies.

### i. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les MICI sont des pathologies chroniques touchant le tractus gastro-intestinal et évoluant typiquement par poussées, espacées par des phases dites de rémission, asymptomatiques. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI décrites.

Ces maladies toucheraient près de 5 millions de patients dans le monde dont 2,5 en Europe et concernent près de 200 000 personnes en France (5). Elles sont le plus souvent

diagnostiquées chez des sujets jeunes, entre 20 et 30 ans pour la MC (5), 30 à 40 ans pour la RCH. Près de 10% des nouveaux cas concernent des enfants.

L'étiologie de ces pathologies reste mal connue. L'hypothèse la plus communément admise serait une dérégulation de la réaction immunitaire vis-à-vis d'une flore intestinale déséquilibrée, sous l'influence de facteurs environnementaux (tabac, appendicectomie...(63)) et génétiques (64).

La MC et la RCH diffèrent l'une de l'autre notamment par la localisation de leurs atteintes. La MC peut toucher l'ensemble du tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus et éventuellement la peau, les articulations et les yeux. Elle est cependant préférentiellement localisée au niveau de la région iléo-caecale. Cette maladie a également comme particularité l'atteinte de l'ensemble de la paroi intestinale (65). La RCH, quant à elle, affecte exclusivement l'extrémité distale du tube digestif, c'est-à-dire le côlon et le rectum, et ne lèse que la muqueuse, partie intra-luminale de la paroi colique. Il n'y a donc pas de formation de fistule dans la RCH.

D'un point de vue clinique, les signes digestifs de la MC sont le plus souvent marqués par des diarrhées, des douleurs abdominales et/ou des saignements gastro-intestinaux tandis que pour la RCH les symptômes sont plus bruyants, avec émission dans presque 100% des cas de sang mêlé à des glaires, faisant consulter rapidement les patients. Tout comme la MC, elle peut s'accompagner de manifestations extra-intestinales (articulaires, cutanées, oculaires, etc.). Le diagnostic des MICI repose essentiellement sur les examens histologiques qui accompagnent les prélèvements réalisés lors d'une coloscopie.

Ces pathologies n'augmentent pas la mortalité mais, en raison de leur chronicité et de leur survenue précoce, induisent une morbidité élevée altérant la qualité de vie des patients (65). Il n'existe actuellement aucun traitement curatif (5). La cible des traitements médicamenteux est l'inflammation intestinale. Grâce à ses propriétés immunomodulatrices, et malgré l'introduction des anticorps monoclonaux (ex : anticorps anti-TNF- $\alpha$ ) dans l'arsenal thérapeutique de ces pathologies, l'AZA reste une molécule majeure dans le traitement des MICI pour l'induction et le maintien d'un état de rémission (2, 6-11). Elle permet également de réduire, chez plus de 65% des patients, l'usage des corticoïdes et leurs nombreux effets indésirables associés (6, 8). Cependant, la réponse à l'AZA est souvent lente, pouvant prendre parfois plusieurs mois (en moyenne 3 à 4 mois) (66, 67). Ce n'est donc pas une molécule utilisée seule dans les traitements d'attaque ou susceptible de résoudre une situation urgente.

## ii. Hépatites auto-immunes

Les hépatites auto-immunes (HAI) sont des pathologies hépatiques chroniques d'étiologie encore mal connue (4, 68). Il est cependant établi que l'association de facteurs environnementaux, d'un déséquilibre de la réponse immune et de prédispositions génétiques, concourent au développement d'une atteinte hépatique (inflammation +/- fibrose) médiée par les lymphocytes T (4, 69).

Les HAI sont des pathologies rares avec une prévalence comprise entre 10 et 17 pour 100 000 habitants en Europe (4). Elles sont plus fréquentes chez les femmes (4, 69) sans prédominance ethnique ou d'âge.

Les symptômes sont variables et peu spécifiques : asthénie, nausées, douleurs abdominales, perte de poids, prurit, ictère (4). Ils peuvent également être associés à des signes extra-hépatiques (thyroïdite auto-immune, arthrite, synovite, colite ulcéreuse, maladie coeliaque). 12 à 35% des patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic (4). Chez 25% des patients, les HAI se manifestent de façon aiguë, les HAI fulminantes restant exceptionnelles (4).

Le diagnostic est basé sur des modifications histologiques et biologiques (aspartate amino-transférase (ASAT), alanine amino-transférase (ALAT), phosphatase alcaline (PAL), albumine, gammaglobulines, bilirubine) et la présence d'autoanticorps caractéristiques des HAI (4, 69). Deux types d'HAI sont décrits en fonction des marqueurs sérologiques retrouvés : HAI de type 1 et HAI de type 2. Le type 1 représente 80% des cas d'HAI.

Le pronostic de cette maladie est largement orienté par la présence d'un syndrome inflammatoire et la présence d'une cirrhose. Les complications des HAI sont les mêmes que pour les autres pathologies hépatiques chroniques, c'est-à-dire la progression vers la cirrhose avec décompensation et le développement de carcinome hépatocellulaire (4, 69).

L'AZA peut être utilisée dans ce type de pathologies pour l'obtention dans un premier temps d'un état de rémission en association avec des corticoïdes (68, 70). Comme pour les MICI, l'utilisation d'AZA seule ne permet pas d'induire de rémission rapide (70). Son association aux corticoïdes permet la diminution des doses de ces derniers. Cet état de rémission est atteint chez la plupart des patients dans un délai de 6 à 12 mois (69). La deuxième étape du traitement des HAI est le maintien de la rémission. Durant cette phase l'AZA peut également être utilisée seule ou en association. Le traitement est généralement instauré pour 2 à 3 ans (68, 70) mais il n'y a pas de recommandation quant à sa durée. L'arrêt du traitement ne peut être envisagé qu'après l'obtention d'une biopsie hépatique ne retrouvant aucune activité inflammatoire. Cet arrêt est réalisé progressivement par diminution des posologies et sous surveillance biologique toutes les 3 semaines puis tous les 3 mois après arrêt des thérapeutiques. Un suivi annuel est cependant maintenu à vie (69).

La rémission est déclarée, en moyenne chez 65 à 75% des patients, après 2 ans de traitement, devant la normalisation de tous les paramètres inflammatoires incluant l'histologie. Chez 20% des patients la rémission n'est jamais atteinte et implique une probable évolution des atteintes hépatiques.

## b) Propriétés pharmacocinétiques

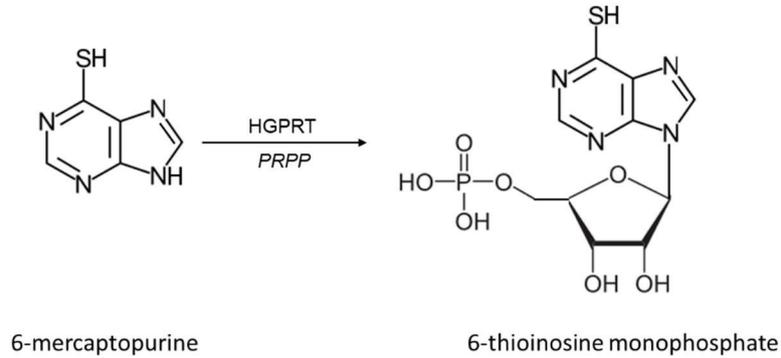
Les différents paramètres pharmacocinétiques de l'AZA et de son métabolite la 6-MP sont résumés dans le tableau 1. Les médicaments thiopuriques étant sujets à une importante métabolisation, nécessaire à leur activité pharmacologique, celle-ci sera présentée séparément.

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques de l'AZA et son métabolite la 6-MP (58, 62, 71, 72)

	<b>Azathioprine</b>	<b>6-Mercaptopurine</b>
<b>Absorption</b>	Gastro-intestinale incomplète et variable (50 à 72%) 88% de la dose convertie en 6-MP	Gastro-intestinale, rapide, incomplète et variable (environ 50%)
<b>Biodisponibilité</b>	27 à 80% (moyenne 47%)	5 à 37% (moyenne 16%)
<b>Délai d'obtention du pic plasmatique</b>	1 à 2 heures	0,4 à 4 heures (moyenne : 2,2 heures)
<b>Volume de distribution</b>	Non connu	0,9 +/-0,8 L/kg
<b>Demi-vie plasmatique</b>	6 à 28 minutes	38 à 114 minutes
<b>Liaison aux protéines plasmatiques</b>	30%	30%
<b>Métabolisation</b>	Cf paragraphe dédié (II-1-b-i)	Cf paragraphe dédié (II-1-b-i)
<b>Elimination</b>	50% de la dose éliminée dans les urines : - principalement en métabolite oxydé inactif (acide 6-thiourique) - 2 à 10% sous forme inchangée - une faible quantité en 1-méthyl-4-nitro-5-thioimidazole 12,6% de la dose est excrétée dans les selles	50% de la dose éliminée dans les urines - principalement en métabolite oxydé inactif (acide 6-thiourique) - 7% sous forme inchangée

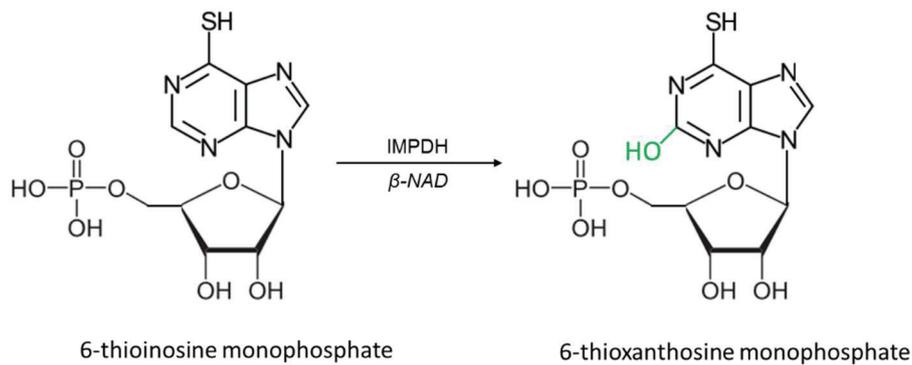


S'associe à ces deux voies, une voie dite d'activation de la 6-MP initiée par l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT ; EC 2.4.2.8) aboutissant, en présence d'un donneur de phosphoribosyl, le 5-phospho-D-ribose-1-pyrophosphate (PRPP), à la 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) (Figure 5).



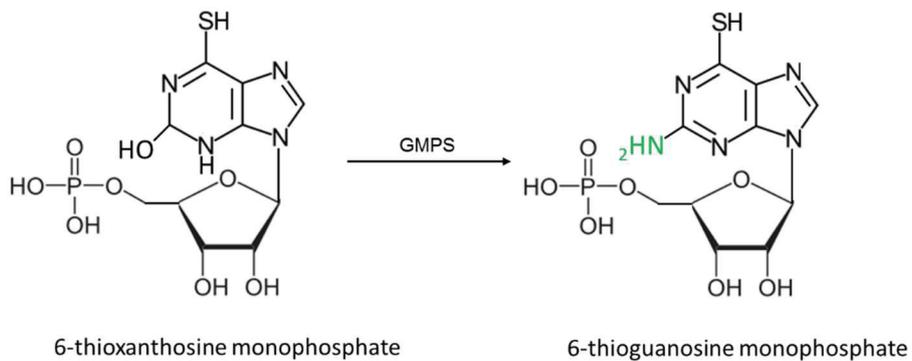
*Figure 5 : Action de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) sur la 6-mercaptopurine*

Ces 6-TIMP sont à leur tour métabolisés en 6-thioxanthosine monophosphate (6-TXMP) sous l'action de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) (Figure 6).



*Figure 6 : Action de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) sur la 6-thioinosine monophosphate*

Sous l'action de la guanosine monophosphate synthétase (GMPS ; EC 6.3.5.2), la 6-TXMP est métabolisée en 6-thioguanosine monophosphate (6-TGMP) (Figure 7).



*Figure 7 : Action de la guanosine monophosphate synthétase (GMPS) sur la 6-thioxanthosine monophosphate*

Enfin, après phosphorylations par des kinases, les dérivés di- et triphosphate de la 6-thioguanosine sont formés (6-TGDP et 6-TGTP) (Figure 8) (79).

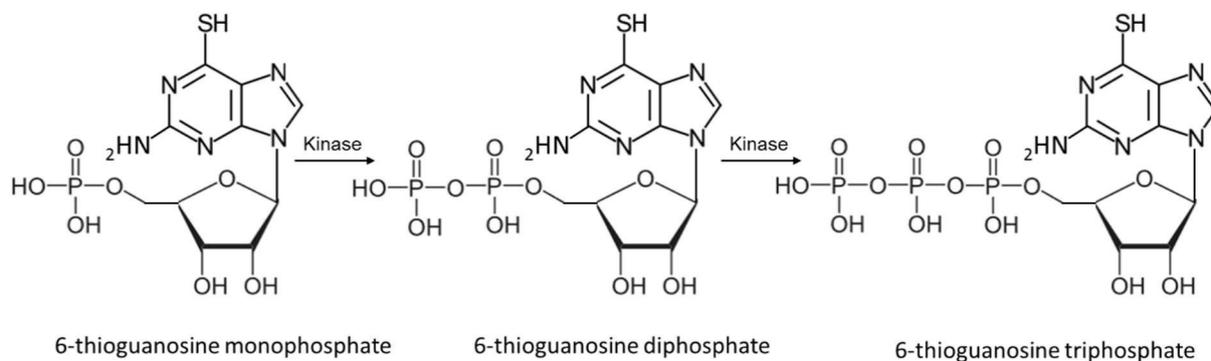


Figure 8 : Phosphorylations de la 6-thioguanosine monophosphate en 6-thioguanosine diphosphate et 6-thioguanosine triphosphate

Ces dérivés mono, di et triphosphate de la 6-thioguanosine sont regroupés sous le nom de 6-thioguanine nucléotides (6-TGN) reconnus pour leurs activités immunosuppressives (cf paragraphe « Mécanisme d'action », II-1-c). L'état d'équilibre de ces métabolites actifs est atteint en quatre à cinq semaines avec cependant une très large variabilité inter-individuelle (31, 80, 81). Ces dérivés peuvent également être méthylés sous l'action de la TPMT pour aboutir aux méthyl mono, di- et triphosphate de la 6-thioguanosine (Me6-TGMP, Me6-TGDP et Me6-TGTP) (Figure 9).

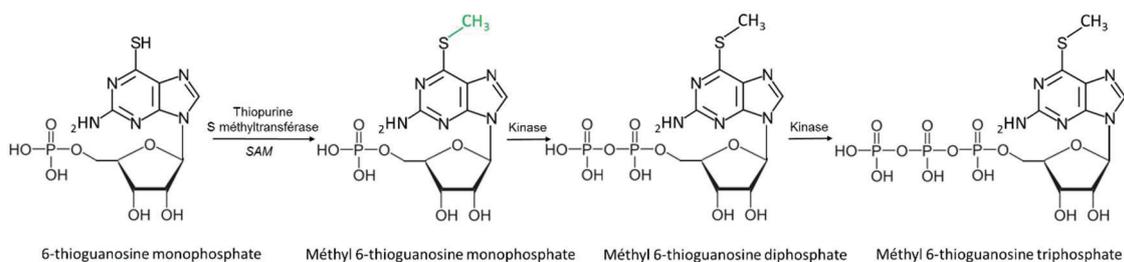
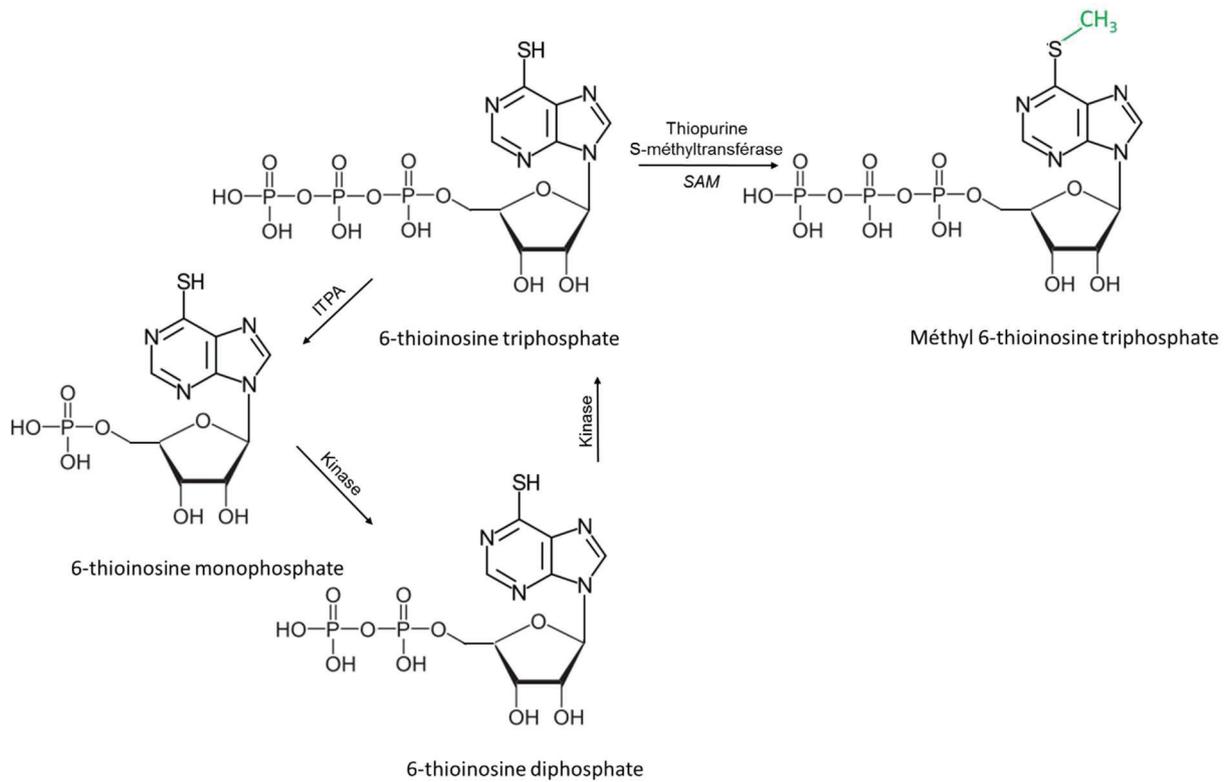


Figure 9 : Méthylation puis phosphorylations de la 6-thioguanosine monophosphate

Plusieurs autres enzymes sont impliquées tout au long de cette voie d'activation. Les 6-thioinosine monophosphates (6-TIMP) produits sous l'action de l'HGPRT peuvent subir 2 autres voies de métabolisation :

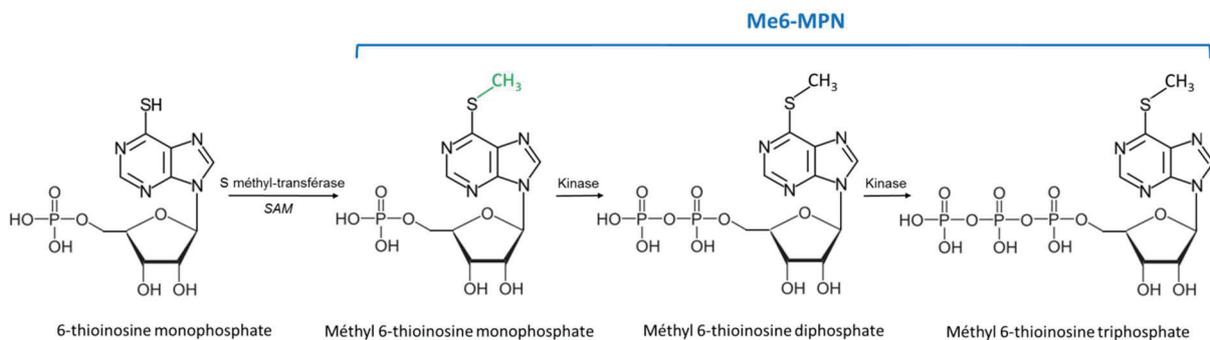
- soit une phosphorylation en 6-thioinosine diphosphate (6-TIDP) puis en 6-thioinosine triphosphate (6-TITP) par l'intervention de kinases puis, sous l'action de la TPMT aboutir à la méthyl 6-thioinosine triphosphate (Me6-TITP). Au cours de cette

phosphorylation, intervient l'inosine triphosphate pyrophosphate (ITPA) qui catalyse la conversion des 6-TITP en 6-TIMP (Figure 10)



*Figure 10 : Phosphorylation de la 6-thioinosine monophosphate et intervention de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)*

- soit une méthylation en méthyl 6-thioinosine monophosphate (Me6-TIMP) via l'intervention de la TPMT suivie d'une phosphorylation en dérivés di- et triphosphate de la méthyl 6-thioinosine (Me6-TIDP et Me6-TITP) (Figure 11). Ces dérivés mono-, di- et triphosphate étant regroupés sous le nom de méthyl 6-mercaptopurine nucléotides (Me6-MPN) (Figure 11).



*Figure 11 : Méthylation de la 6-thioinosine monophosphate puis phosphorylation en dérivés di- et triphosphate de la méthyl 6-thioinosine*

Une vue d'ensemble du métabolisme de l'AZA et de la 6-MP est présentée figure 12. Il est à noter que les 6-TGDP et 6-TGTP donnent, après réduction enzymatique, respectivement la désoxy 6-thioguanosine diphosphate (d6-TGDP) et la désoxy 6-thioguanosine triphosphate (d6-TGTP), les d6-TGDP aboutissant également aux d6-TGTP sous l'action d'une kinase (15, 55). Enfin, les 6-TIMP, 6-TXMP et 6-TGMP formées peuvent, par la suite, être exportées de la cellule par les transporteurs de la famille des Multidrug Resistance Proteins (MRPs) : ABCC4 et ABCC5 (55, 77).

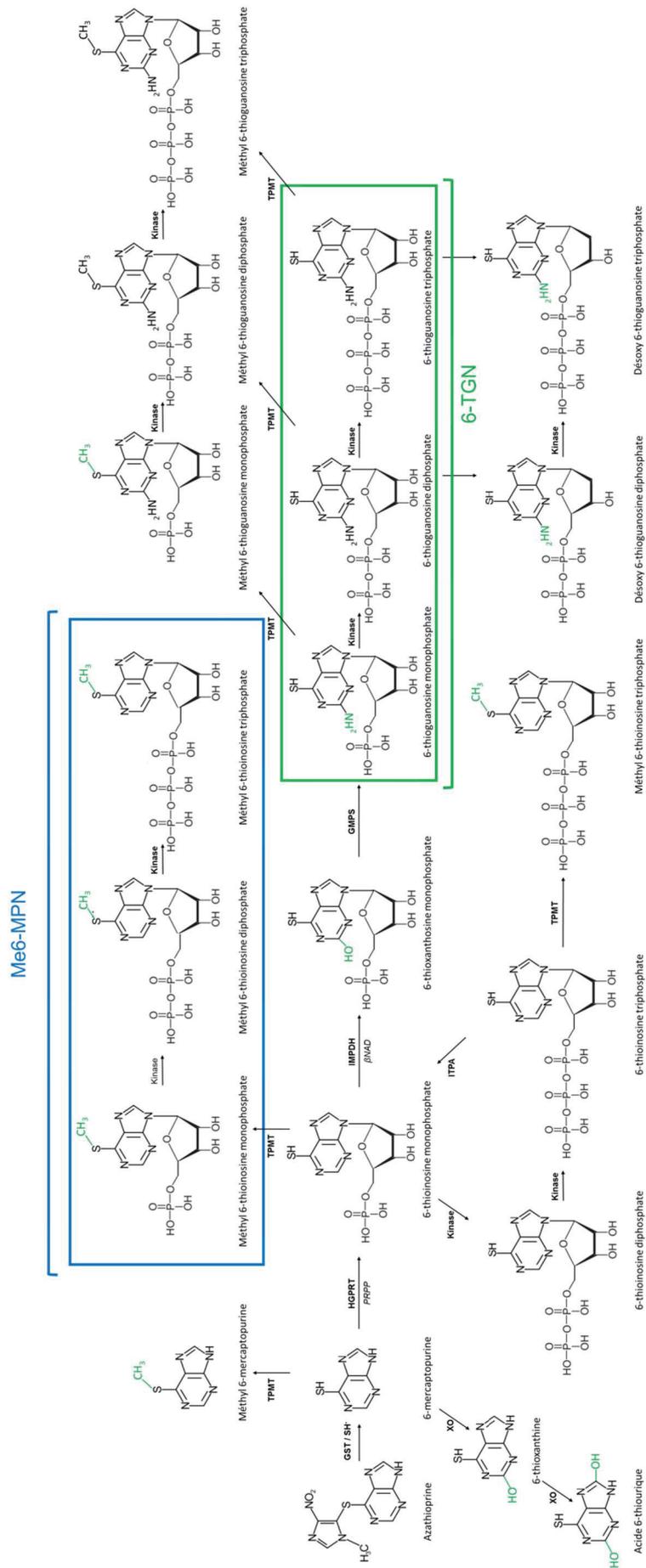


Figure 12 : Schéma général du métabolisme de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine

### c) Mécanisme d'action

Bien que de nombreuses études aient été menées durant les cinquante dernières années, le mécanisme d'action des médicaments thiopuriques n'est à ce jour pas totalement élucidé. Il est cependant communément admis que les effets antiprolifératifs et immunosuppresseurs sont liés à plusieurs mécanismes dont l'incorporation des 6-TGTP dans l'ARN et des d6-TGTP dans l'ADN, l'inhibition de la synthèse des purines *de novo* par les Me6-TIMP (82), la modulation de l'activité Rac1 par les 6-TGTP (83) et l'inhibition de certaines cytokines pro-inflammatoires par l'accumulation intracellulaire des 6-TGN.

#### i. Incorporation des 6-TGTP et d6-TGTP dans l'ARN/ADN

Les 6-TGTP et d6-TGTP, formées lors de la métabolisation des thiopurines, sont tenues responsables du principal effet cytotoxique de l'AZA et de la 6-MP. Du fait de leur similitude structurale avec les nucléotides de la guanine, les 6-TGTP et d6-TGTP peuvent s'intégrer respectivement dans l'ARN et l'ADN (84). L'intégration de ces nucléotides, analogues des purines, dans l'ADN ou l'ARN est responsable d'une perturbation du cycle cellulaire (85) conduisant à une entrée en apoptose de la cellule (72, 86). Cette perturbation du cycle de réplication interviendrait majoritairement en aval de l'ARN ou de l'ADN polymérase (pour lesquelles les 6-TGTP et d6-TGTP sont des substrats) (87), au niveau d'autres protéines impliquées dans la réplication (T4 ligase par exemple) (51, 87) et la réparation de type MMR (DNA MisMatch Repair system) (86-89). Cet effet, en aval des polymérases, expliquerait le délai observé entre l'incorporation des 6-TGTP et 6-dTGTP dans l'ADN et l'ARN et l'apparition de l'effet cytotoxique. Il a également été proposé que les Me6-TGTP et méthyl désoxy 6-thioguanosine triphosphate (Me-d6-TGTP) puissent contribuer à l'inhibition de la transcription au cours du cycle cellulaire (90) en s'intégrant également respectivement dans les chaînes d'ARN et ADN (55).

Au final, cette perturbation du cycle cellulaire aboutit à la diminution de synthèse d'ADN et d'ARN induisant préférentiellement une inhibition de la prolifération des cellules à réplication rapide (73) telles que les lymphocytes T et B (67).

#### ii. Inhibition de la synthèse *de novo* des purines

Un autre mécanisme d'action de l'AZA et de la 6-MP passe par la Me6-TIMP, autre molécule produite lors du métabolisme des thiopurines, inhibant la synthèse *de novo* des purines (91). Ce mécanisme fait suite à l'inhibition de la phosphoribosyl pyrophosphate amidotransférase (PRPP-AT) par les Me-6TIMP (55) (Figure 13).

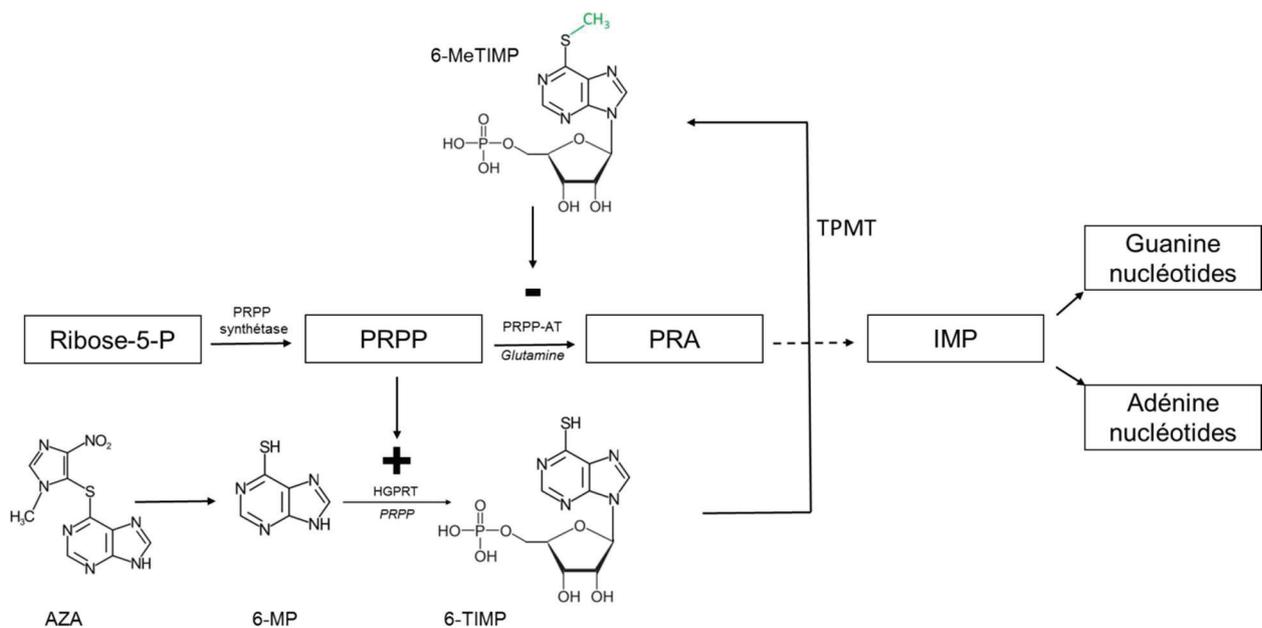


Figure 13 : Inhibition de la synthèse de novo des purines par la méthyl 6-thioinosine monophosphate (91, 92)

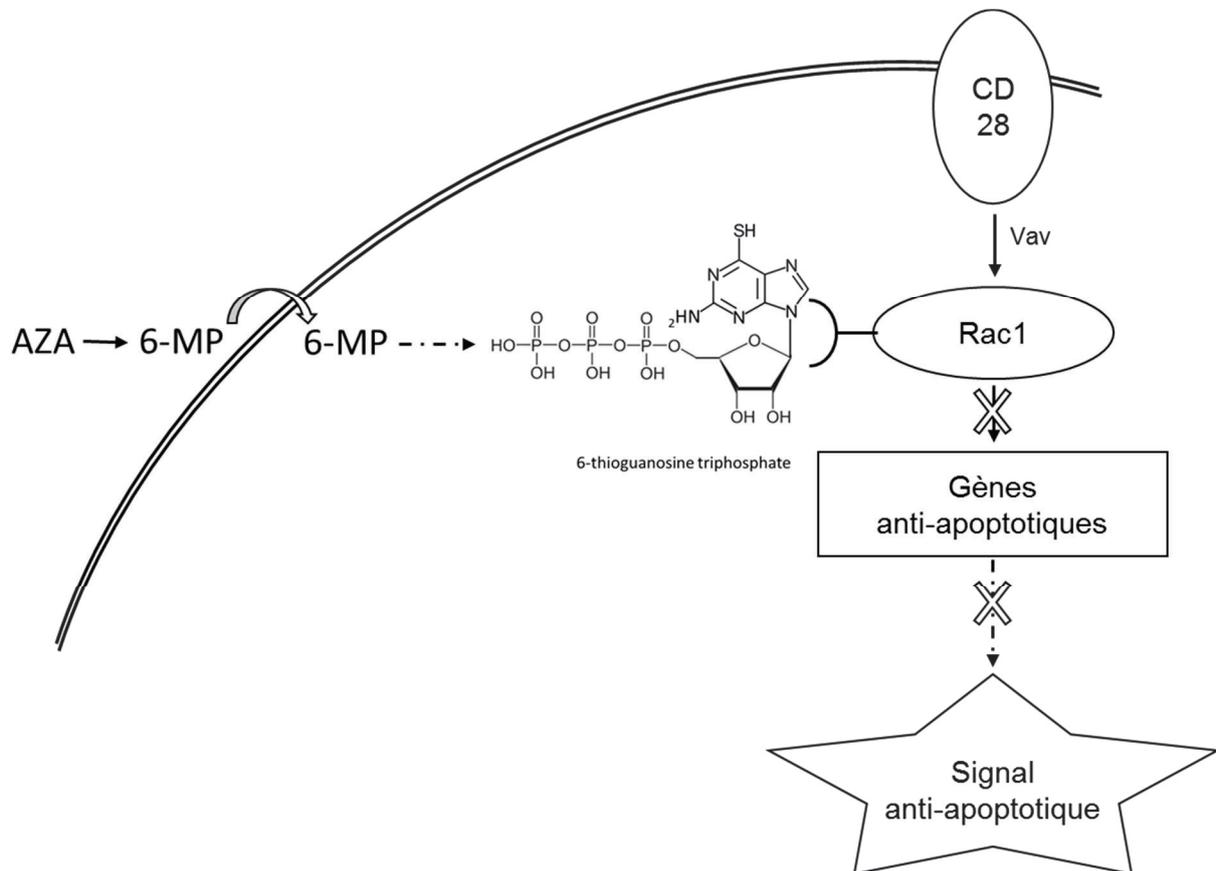
La PRPP-AT étant l'une des premières enzymes impliquée dans la synthèse *de novo* des purines, son inhibition provoque une forte diminution de la synthèse des purines. Cette diminution engendre une baisse de la synthèse d'ADN et par conséquent une réduction de la prolifération cellulaire impactant plus particulièrement les lymphocytes et leucocytes du fait d'une synthèse des purines initialement faible à l'état basal (93). Cette inhibition a également pour conséquence une accumulation de la PRPP, co-substrat de l'HGPRT, augmentant ainsi la métabolisation de la 6-MP en 6-TIMP (55) (Figure 13). De plus, le déséquilibre de concentrations entre les nucléotides puriques et pyrimidiques engendré par la réduction de la biosynthèse *de novo* des purines et l'augmentation de la synthèse des nucléotides pyrimidiques contribuerait à la mort cellulaire (55).

Au final, la prolifération des lymphocytes, dépendante de la voie de biosynthèse *de novo* des purines, serait donc impactée.

### iii. Blocage de la voie anti-apoptotique des lymphocytes T via Rac1

Il a été montré que les 6-TGTP pouvaient induire directement l'apoptose cellulaire, notamment des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, par voie mitochondriale (83). De façon simplifiée, cette induction nécessite une co-stimulation via le CD28 et est médiée par une inhibition spécifique de l'activation de Rac1 (GTPase de la famille Rho), via la signalisation Vav (Guanosine nucleotide exchange factors (GNEFs) (94). Cette inhibition spécifique de l'activation de Rac1 est générée par la liaison sur Rac1 des 6-TGTP, formées à partir du métabolisme de la 6-MP, au lieu des GTP (83) (Figure 14). Ceci a pour conséquence une activation de l'apoptose par voie mitochondriale en supprimant l'activation des gènes cibles

anti-apoptotiques de Rac1 : MEK (mitogen-activated protein kinase), NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) and bcl-x<sub>L</sub>. Ainsi l'AZA et la 6-MP convertissent un signal de co-stimulation en un signal apoptotique en modulant l'activité de Rac1. Ce mécanisme contribue à réduire le nombre de lymphocytes T activés, notamment dans la *lamina propria* digestive (tissus conjonctif de soutien) des patients atteints de MICI (83).



*Figure 14 : Blocage de la voie anti-apoptotique des lymphocytes T via Rac1 par les 6-TGN*

#### iv. Blocage de cytokines pro-inflammatoires

Un autre mécanisme d'action décrit est médié par le blocage de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF receptor S7 et l'alpha 4 integrin, par l'accumulation intra-lymphocytaire des 6-TGN. Ce blocage aurait pour conséquence une inhibition de la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes T notamment au niveau de la *lamina propria* des patients atteints de MICI (95).

**Au total, les thiopurines ont donc des sites d'action multiples au sein de la cellule. Les lymphocytes seraient plus sensibles à l'action de ces médicaments du fait d'une activité de la xanthine oxydase (XO) moins importante que dans d'autres cellules augmentant ainsi les concentrations en 6-MP disponibles pour la voie d'activation (93).**

#### **d) Effets indésirables**

L'efficacité des médicaments thiopuriques, notamment dans les MICI, est contrebalancée par l'apparition d'effets indésirables. Ceux-ci touchent 10 à 30% des patients et nécessitent une réduction voire un arrêt du traitement (12-15). Ces effets indésirables sont classiquement catégorisés en effets dose-dépendants et dose-indépendants (8, 73, 96) bien que le terme « dose » soit mal approprié et devrait plutôt être remplacé par « exposition ». Un certain nombre des effets dose-dépendants pourrait être expliqué par la variabilité inter-individuelle du métabolisme de ces molécules (13).

##### i. Les effets dose-indépendants

Ils peuvent correspondre, pour certains, à des réactions d'hypersensibilité. Ces effets indésirables apparaissent généralement dans les 2 à 4 premières semaines de traitement (8, 97) et se traduisent habituellement par de la fièvre, des réactions cutanées, des arthralgies, des pancréatites ou des hépatites (13). Ils sont indépendants de la dose et régressent à l'arrêt du traitement.

##### ii. Les effets dose-dépendants

Ils peuvent apparaître à n'importe quel moment du traitement. Parmi ces effets dose-dépendants on retrouve, entre autres, des intolérances digestives, des myélotoxicités, des hépatotoxicités ainsi que de très rares cas de manifestations cancéreuses.

Les intolérances gastro-intestinales se traduisent par des inconforts digestifs tels que des diarrhées, de l'anorexie et des nausées parfois accompagnées de vomissements. Au vu des bons résultats obtenus par la modification de traitement de l'AZA par la 6-MP chez les patients souffrant de ce type d'intolérances (98, 99), certains auteurs ont incriminé l'imidazole libéré lors de la conversion de l'AZA en 6-MP (Figure 3) comme cause potentielle de ces intolérances (100). En effet, chez des patients dits « intolérants » à l'AZA, sujets à des troubles gastro-intestinaux, un changement de traitement par la 6-MP a amélioré ces intolérances dans 61 à 77% des cas selon les études (98-100). Cependant, des intolérances digestives étant également fréquemment retrouvées chez les patients traités par la 6-MP (57, 98, 99), l'imidazole libéré lors de la conversion de l'AZA en 6-MP ne peut, à lui seul, expliquer l'ensemble des intolérances digestives.

La toxicité hématologique est la première cause de réduction des posologies chez les patients traités par les médicaments thiopuriques (8). Bien qu'une légère leucopénie ait été proposée comme un marqueur d'efficacité du traitement (14, 101, 102), la myélotoxicité est

l'effet indésirable le plus grave des médicaments thiopuriques pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient dans les cas d'aplasies médullaires. Elles peuvent être fatales chez environ 1% des patients atteints de myélotoxicité (1, 103). Toutes les lignées peuvent être touchées par cette toxicité hématologique avec cependant une fréquence plus importante pour les leucocytes (2 à 4% des patients (97)) ; les anémies et les thrombocytopénies n'apparaissant respectivement que chez 0,9 et 0,2% des sujets traités par l'AZA ou la 6-MP (13, 97). Cette myélotoxicité peut apparaître subitement à n'importe quel moment du traitement avec néanmoins une fréquence plus importante lors des premiers mois de traitement (1, 104). Elle est généralement rapidement réversible par diminution ou arrêt du traitement (1, 104).

Les atteintes hépatiques peuvent être asymptomatiques et se manifester uniquement par une augmentation transitoire et réversible des transaminases (72, 97, 105). Cette cytolyse peut être associée ou non à une cholestase (1). Cette hépatotoxicité apparaît généralement entre 1 et 3 mois après le début du traitement et peut régresser spontanément ou après diminution des posologies (1). A ce jour, aucun cas fatal d'hépatotoxicité, imputable aux médicaments thiopuriques, n'a été rapporté (1). De façon beaucoup plus rare et majoritairement chez des patients traités par la 6-thioguanine, des hyperplasies nodulaires régénératives (HNR) ainsi que des maladies veino-occlusives ont été décrites (72, 97, 105-107). Il a été montré que 0,5% des patients traités par l'AZA développent une HNR après 5 ans de traitement, ce chiffre est porté à 1% après 10 ans de traitement (97, 108, 109).

Concernant les manifestations cancéreuses, bien que des cas de lymphomes (110-113), de cancers du tractus urinaire (114) et de cancers cutanés (115, 116) aient été rapportés sous traitements thiopuriques, le lien entre manifestations cancéreuses et ces médicaments n'est actuellement pas totalement établi (117-119). De plus, au vu de la rareté de ces manifestations, le rapport bénéfice/risque est largement en faveur du maintien de l'utilisation de ces thérapies (112).

Enfin, la baisse modérée de l'immunité provoquée par ces médicaments peut accroître le risque d'infections même en l'absence de neutropénie (97). Ces infections sont favorisées par l'association de ces médicaments à d'autres traitements immunodépresseurs tels que des corticoïdes ou de l'infliximab (120, 121).

### iii. Fréquence des effets indésirables

La fréquence de ces effets indésirables est très variable d'une étude à l'autre. Ces différences peuvent être expliquées en partie par les divers profils d'études mis en place (rétrospectifs, prospectifs), les populations étudiées (ethnicité, pathologies) et les différences d'appréciations des effets indésirables (paramètres biologiques, signes cliniques). Les chiffres rapportés ici sont issus de deux études prospectives portant respectivement sur 3931 (13) et 207 (21) patients atteints de MICI (15) (Tableau 2).

Tableau 2 : Fréquence des effets indésirables associés aux médicaments thiopuriques chez les patients atteints de MICI (13, 15, 21)

<b>Effet indésirable</b>	<b>Définition</b>	<b>Fréquence (%)</b>
Intolérances digestives	Nausées, vomissements, douleurs abdominales, anorexie	8-16
Syndrome pseudo-grippal	Malaise, fièvre, douleurs articulaires et musculaires	1-5
Pancréatite	Forte douleur abdominale associée à l'élévation des marqueurs pancréatiques	3-4
Atteinte hépatique	Modification des marqueurs hépatiques	3-4
Réactions cutanées	Apparition de réactions cutanées après le début de traitement et régressant à son arrêt	3-4
Myélotoxicité	Leucopénie, neutropénie	2-4
Alopécie	Perte de cheveux à l'instauration du traitement et régressant à son arrêt	0,3
Manifestations cancéreuses		0,2
Autres	Infections, céphalées, asthénie....	2-3

## **2. *Suivi biologique et suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments thiopuriques***

La nécessité d'un suivi biologique des traitements thiopuriques est dictée par la fréquence des effets indésirables ainsi que par la variabilité inter-individuelle observée vis-à-vis de la réponse thérapeutique, 9% des patients atteints de MICI étant résistants aux thiopurines (16). Ce suivi biologique peut être réalisé par un contrôle de marqueurs biologiques (numération sanguine, bilan hépatique) associé ou non à un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des métabolites thiopuriques ainsi par que l'étude d'enzymes de leur métabolisme. Ce suivi permet d'optimiser ces traitements de façon individuelle dans le but d'augmenter leur efficacité et limiter leurs effets indésirables. Actuellement, seuls les dosages intra-érythrocytaires des 6-TGN et Me6-MPN, associés ou non au phénotypage ou au génotypage de la TPMT, sont réalisés en pratique courante dans des laboratoires spécialisés. L'étude des autres enzymes du métabolisme reste, dans l'attente de résultats consensuels, du domaine de la recherche.

### **a) Suivi des marqueurs biologiques**

Du fait de leur toxicité hépatique et hématologique, la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie recommande la réalisation d'une numération sanguine complète une fois par semaine le premier mois de traitement par médicament thiopurique puis une fois par mois les trois mois suivants puis tous les trois mois pendant toute la durée du traitement (122). S'associe à cela une surveillance hépatique (ASAT, ALAT, gamma glutamyl transpeptidase (GGT), PAL) une fois par mois durant les trois premiers mois de traitement puis une fois tous les trois mois pendant toute la durée du traitement (122).

### **b) Suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments thiopuriques**

Le dosage des molécules mères AZA et 6-MP n'a pas d'utilité, leurs concentrations sanguines n'ayant aucune valeur pronostique vis-à-vis de l'efficacité ou de la toxicité de ces composés (58, 62). Le STP est réalisé par le dosage de la concentration intra-érythrocytaire des dérivés mono- di- et triphosphates des 6-thioguanosines et méthyl 6-mercaptopurines regroupés respectivement sous les noms de 6-thioguanine nucléotides (6-TGN) et méthyl 6-mercaptopurine nucléotides (Me6-MPN) (Figures 8, 11 et 12). Ce dosage est majoritairement réalisé par techniques séparatives après hydrolyse acide de la liaison base-ribose permettant de doser la somme des dérivés mono- di- et triphosphates de chacun des métabolites (123-125). Plus récemment, des méthodes permettant de quantifier séparément

les dérivés mono- di- et triphosphates ont été décrites (126, 127). Au regard de l'excellente corrélation retrouvée entre les anciennes méthodes de dosage des 6-TGN et Me6-MPN et les nouvelles méthodes permettant le dosage individuel des formes mono- di- et triphosphates, le rapport intérêt/contraintes est en faveur des anciennes techniques et limite donc, pour l'instant, l'utilisation des nouvelles méthodes plus délicates à réaliser (128). Cependant au vu du nombre restreint d'études portant sur ce sujet, cet axe de recherche nécessiterait d'être approfondi, notamment par l'étude du lien entre les concentrations en formes mono-, di- et triphosphates et l'apparition d'effets indésirables lors des traitements par médicaments thiopuriques.

Les concentrations en 6-TGN dans les érythrocytes sont corrélées à celles des 6-TGN incorporés à l'ADN leucocytaire (129-132). De nombreuses études ont été réalisées depuis les années 2000 et un seuil d'efficacité, pour les concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN, au-delà de 230 à 260 pmol/8x10<sup>8</sup> cellules a été plusieurs fois proposé pour le traitement des MICI (16, 133-137). Cependant, ces chiffres restent à ce jour toujours débattus (73, 138, 139). De ce fait, bien que recommandés par de nombreuses sociétés savantes (ex : Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (73, 140)), aucun consensus n'a pour le moment été établi sur l'adoption ou non de ces dosages en pratique courante (102). Concernant la toxicité, un seuil à 450 pmol/8x10<sup>8</sup> cellules, au-delà duquel le risque d'apparition de myélotoxicité est majoré, a également été établi (66, 106, 135, 136, 141-143). L'intérêt du suivi thérapeutique de la concentration des 6-TGN est donc triple. En plus de vérifier l'observance du traitement, il permet à la fois de suivre l'efficacité de ce dernier (102, 133, 137, 140, 144) ainsi que sa potentielle toxicité hématologique en cas de fortes concentrations. Il permet donc d'optimiser la posologie des médicaments thiopuriques afin d'obtenir le meilleur rapport bénéfice/risque (145). Récemment il a été proposé de réaliser ce dosage 4 semaines après le début du traitement (afin de s'assurer d'avoir atteint l'état d'équilibre) pour vérifier l'observance et réaliser une adaptation posologique si besoin, puis de reconstrôler les concentrations 12 à 16 semaines plus tard (66). Ce suivi est également conseillé à n'importe quel moment du traitement lorsque des signes de surdosage surviennent (66).

Concernant le dosage des Me6-MPN, une relation entre concentrations élevées et hépatotoxicité a été plusieurs fois rapportée (16, 146-149). Un lien entre les Me6-TIMP (composant minoritaire des Me6-MPN) et la myélotoxicité a également été proposé (31). Un seuil de toxicité hépatique des Me6-MPN à 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> cellules a été établi (136). Bien que repris par d'autres études (135, 150), ce seuil ne permet pas de prédire l'ensemble des effets hépatotoxiques des thiopurines ; des manifestations hépatotoxiques pouvant être observées avec des concentrations inférieures à ce seuil (151, 152) et inversement des patients avec des concentrations supérieures au seuil n'auront pas d'hépatotoxicité (153).

Ceci tend à confirmer que la toxicité hépatique des thiopurines n'est pas exclusivement liée aux concentrations de Me6-MPN. La mesure des concentrations en Me6-MPN permet néanmoins de proposer une réduction des posologies lorsque des manifestations hépatiques sont associées à des concentrations élevées (15).

Le tableau 3 propose une interprétation combinée des concentrations de 6-TGN et Me6-MPN intra-érythrocytaires (1, 15, 66, 147, 154).

Tableau 3 : Interprétation combinée des concentrations intra-érythrocytaires des 6-TGN et Me6-MPN

<b>6-TGN</b> ( <i>pmol/8x10<sup>8</sup> cellules</i> )	<b>Me6-MPN</b> ( <i>pmol/8x10<sup>8</sup> cellules</i> )	<b>Interprétation</b>
Non détecté	Non détecté	Problème d'observance
<250	Très faible	Problème d'observance ou sous-dosage
<250	>5700	Métabolisme dévié vers les Me6-MPN, suspicion d'hyperactivité de la TPMT
250-450	<5700	Dans les fourchettes thérapeutiques
>450	Très faible	Suspicion de déficit de la TPMT
>450	>5700	Surdosage probable, à confronter à la clinique

Le calcul du ratio Me6-MPN/6-TGN pourrait également servir au STP de ces médicaments puisqu'une corrélation inverse a été plusieurs fois décrite entre ce ratio et l'efficacité thérapeutique (16, 80, 140, 147).

**Au final, au regard des connaissances actuelles, le suivi des concentrations en 6-TGN associé à celles des Me6-MPN contribue à améliorer la réponse aux traitements et à éviter certains effets indésirables (155). Une utilisation optimale de ces dosages permettrait d'augmenter l'efficacité du traitement de 15 à 30% chez les patients atteints de MICI (142) tout en diminuant la toxicité hématologique de près de 25% (1).**

### c) Etude des enzymes du métabolisme

La forte variabilité inter-individuelle observée dans la survenue des effets indésirables et la réponse thérapeutique est en partie explicable par le polymorphisme génétique de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme de ces médicaments (9). A ce sujet, la TPMT a été l'une des premières étudiée. Dans ce travail nous nous sommes également intéressés à deux autres enzymes : l'ITPA et l'IMPDH.

### i. Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT)

La TPMT, enzyme cytosolique (156), présente dans les érythrocytes et les leucocytes (55, 88), est l'enzyme du métabolisme de l'AZA et de la 6-MP la plus étudiée à ce jour. Elle est directement responsable de la formation des dérivés méthylés et limite ainsi la formation des métabolites actifs, 6-TGN (Figure 12). Son rôle physiologique n'est pas connu et aucune pathologie n'est actuellement associée à son déficit (88). Dans le cadre d'un traitement par des médicaments thiopuriques, la TPMT catalyse la S-méthylation de l'atome de soufre situé en position 6, de la 6-MP et de ses métabolites, en utilisant la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de groupements méthyl (Figures 4 et 12).

Le gène de la TPMT est situé sur le bras court du chromosome 6 (segment p22.3) et code pour une protéine de 245 acides aminés. L'allèle sauvage de la TPMT est communément dénommé *TPMT\*1* (15). A ce jour, plus d'une trentaine de variants alléliques a été identifiée (155). Parmi ces nombreux variants alléliques, 4 représentent entre 60 et 95% des mutations retrouvées dans la population générale (*TPMT\*2*, *\*3A*, *\*3B* et *\*3C*) (1, 6, 15, 155), les mutations *TPMT\*3B* et *\*3C* étant souvent coportées sur le même allèle *\*3A* (140). La présence de ces allèles variants est associée à une diminution de l'activité enzymatique liée à une destruction accrue de cette enzyme par la voie du protéasome (157). **Cette diminution d'activité a pour conséquence, chez les patients traités par l'AZA ou la 6-MP, une réduction de la transformation des thiopurines en métabolites méthylés (Me-6MP et Me-6MPN) et une déviation de ce métabolisme vers les 6-TGN potentiellement myélotoxiques (Figure 12).**

L'activité de la TPMT présente une très large variabilité inter-individuelle. Historiquement (158), sur une population de 289 individus, une activité trimodale a été rapportée avec 89% des individus à activité normale ou élevée, 11% à activité intermédiaire et 0,3% avec une activité faible ou déficitaire. Des résultats très proches ont été par la suite retrouvés (135, 155). Les 3 groupes observés, de phénotype normal, intermédiaire et déficitaire, sont porteurs respectivement d'aucun, un ou deux allèles variants (86). Plus récemment, une 4<sup>ème</sup> classe de sujets à activité dite « ultra-rapide » a été proposée (17, 155, 159, 160). Cette activité ultra-rapide aurait également une explication génétique (161).

L'impact de l'âge et du sexe sur l'activité de cette enzyme varie selon les études (159, 162-164) mais ne semble pas être un facteur prépondérant. De plus, il n'a pas été montré de différence entre les sujets sains et les sujets atteints de MICI dans des populations caucasiennes (165, 166) mais une grande variabilité inter-ethnie a été rapportée dans la distribution des différents allèles de la TPMT (1).

Dans le cadre du suivi des médicaments thiopuriques, deux approches sont réalisées en pratique courante pour l'étude de la TPMT dans des laboratoires spécialisés :

- le génotypage des variants les plus fréquemment rencontrés
- le phénotypage par mesure de l'activité intra-érythrocytaire de la TPMT qui est le reflet direct de l'activité intra-lymphocytaire (50, 55).

Ces deux approches concourent aux mêmes conclusions dans 76 à 99% des cas selon les auteurs (72). Cette différence est en partie expliquée par le fait que la plupart des laboratoires pratiquant le génotypage se concentrent uniquement sur les 3 allèles les plus représentés (*TPMT\*2*, *\*3B* et *\*3C*), sans prendre en compte les autres mutations. De plus les allèles variants actuellement étudiés ne seraient pas suffisants pour expliquer l'ensemble des variations observées dans l'activité de la TPMT (15). Enfin, d'autres variations peuvent également conduire à des diminutions de l'activité comme par exemple des déficits en donneur de méthyl (SAM) indispensable à l'action de la TPMT (15). De ce fait, la sensibilité du génotypage de la TPMT, qui est la probabilité qu'une mutation soit détectée lorsque le patient présente une activité intermédiaire ou déficitaire, a été estimée entre 70,3 et 86,2% tandis que sa spécificité, qui est la probabilité de ne pas trouver de mutation chez les patients à activité normale, est proche de 100% (6, 15). Pour ces raisons, lorsque le patient n'a pas reçu de transfusion sanguine au cours des 3 derniers mois, le phénotypage semble être à privilégier en pratique courante (6, 120, 167).

En pratique clinique, de nombreux auteurs (73, 93, 150, 155, 167-170) préconisent de réaliser en systématique une étude de la TPMT chez tous les patients avant mise sous traitement thiopurique. Cette étude pré-thérapeutique permettrait d'anticiper et d'éviter la survenue des effets cytotoxiques sévères auxquels sont exposés les patients déficitaires ou intermédiaires en TPMT (171), par une adaptation posologique :

- éviction ou 10% de la dose standard pour les patients à activité déficitaire
- 50% de la dose standard pour les sujets à activité intermédiaire
- dose standard pour les sujets à activité normale.

Cette étude pré-thérapeutique permet également de remplacer la traditionnelle mise en place des traitements thiopuriques qui consiste à augmenter progressivement les doses (172, 173) afin d'éviter la toxicité hématologique (9). Le traitement peut ainsi être débuté directement avec une dose optimisée pour l'ensemble des patients (171, 174, 175) et permettre d'obtenir plus rapidement les effets cliniques (74) (22,4 vs 18,9 semaines (176)). Enfin, au regard de la sévérité des événements hématologiques, et bien que peu fréquents, cette étude pré-thérapeutique aurait un réel impact médico-économique (93, 176). En effet, chez les sujets homozygotes pour un allèle variant ou à activité déficitaire en TPMT, le

métabolisme des thiopurines est largement dévié vers la voie des 6-TGN, prédisposant ces patients à une sévère myélotoxicité (17, 46, 73).

En ce qui concerne les patients hétérozygotes ou ayant une activité intermédiaire, la déviation du métabolisme est moins prononcée que pour les patients déficitaires mais le risque d'effets cytotoxiques reste supérieur par rapport aux patients avec une activité normale (15, 17, 46, 135). Il a été montré que 30 à 60% des patients avec une activité intermédiaire ont des effets cytotoxiques avec des doses standards (177-179).

Enfin pour la catégorie de patients avec de fortes activités en TPMT, le métabolisme pourrait être dévié vers la formation de dérivés méthylés (Me6-MPN) avec de plus faibles concentrations en 6-TGN (155). Ces patients seraient prédisposés à être résistants à ces traitements (17, 134) nécessitant une augmentation des posologies, les exposant au risque d'accumulation des Me6-MPN (134). Cette théorie reste cependant controversée (155, 180). Néanmoins chez ces patients, un co-traitement par allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, associé à une diminution des posologies d'AZA ou 6-MP de l'ordre de 25% (21) et une surveillance rapprochée des paramètres hématologiques, ont été proposés afin de dévier le métabolisme des médicaments thiopuriques vers la voie des 6-TGN (181, 182). Une autre approche permettant d'augmenter les concentrations en 6-TGN serait l'association des médicaments thiopuriques à l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA). En effet, des études *in vitro* ont montré une inhibition de la TPMT par le 5-ASA (183). Des résultats discordants ont toutefois été obtenus *in vivo* (1, 21, 88, 184, 185).

Au final, les effets myélotoxiques et dans une moindre mesure hépatotoxiques observés chez certains patients traités par les médicaments thiopuriques ainsi que certaines résistances au traitement (102) seraient en partie expliqués par le polymorphisme de la TPMT. **Cependant, seulement 25% des patients atteints de myélotoxicité sous thiopurines ont un génotype de la TPMT déficient (9, 186, 187). De même, 50 à 75% des patients atteints de leucopénie sous traitement thiopuriques ont une activité de la TPMT normale (15, 17, 66, 186).** Enfin, l'activité de la TPMT n'explique pas l'ensemble des effets indésirables sous médicaments thiopuriques (19), un suivi régulier des paramètres hématologiques et hépatiques reste donc nécessaire (6, 93, 120). C'est pourquoi, l'étude d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des thiopurines, telles que l'ITPA et l'IMPDH, pourraient être une approche complémentaire à l'étude de la TPMT.

ii. Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)

L'ITPA est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux types cellulaires notamment dans les érythrocytes (188). En présence d'un cation divalent ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ), à 37°C et à pH 9, elle catalyse la pyrophosphohydrolyse de l'inosine triphosphate (ITP) en inosine monophosphate (IMP) (189). Son rôle physiologique serait de prévenir l'accumulation, dans les cellules, de nucléotides puriques triphosphates, potentiellement mutagènes et clastogènes (189). Le gène de l'ITPA est localisé sur le bras court du chromosome 20 (190, 191). Le déficit en ITPA n'est pas associé à une pathologie particulière mais provoque l'accumulation d'ITP dans les érythrocytes (191). Dans le cadre d'un traitement par médicaments thiopuriques, l'ITPA est impliquée dans l'hydrolyse des 6-TITP, provenant du métabolisme de ces médicaments, en 6-TIMP (47) (Figure 10). Un déficit en ITPA pourrait donc jouer un rôle toxique par accumulation de 6-TITP (30, 33, 191) et/ou de Me-6TITP (28) (composé majeur des Me-6MPN (126-128)) et expliquer en partie les effets indésirables des médicaments thiopuriques indépendants du polymorphisme de la TPMT.

Ce déficit en ITPA a été étudié du point de vue génotypique et plusieurs mutations, conduisant à une diminution voire à une absence d'activité, ont été répertoriées (188, 189, 191-193). Les deux polymorphismes majoritaires, l'un sur l'exon 2 ( $94C>A$ ) et l'autre sur l'intron 2 ( $IVS2+21A>C$ ), sont des mutations fréquentes dans la population générale, estimées respectivement entre 1 à 19% et entre 10 à 18% selon les études (12, 193). Les sujets homozygotes porteurs de la mutation  $94C>A$  n'ont pas d'activité ITPasique mesurable, tandis que les patients hétérozygotes conservent 22,5% d'activité par rapport aux sujets porteurs de l'allèle sauvage (188, 191). Concernant la mutation  $IVS2+21A>C$  les porteurs homozygotes ont une activité similaire aux patients hétérozygotes pour la mutation  $94C>A$  et les patients hétérozygotes ont une activité 40% plus basse que les patients sains (188). Enfin, l'activité de l'ITPA chez les hétérozygotes composites  $94C>A / IVS2+21A>C$  est de l'ordre de 10% de l'activité moyenne de la population générale (191).

D'un point de vu phénotypique, la mesure de l'activité de l'ITPA, déterminée par le dosage de l'IMP formée sous l'action de l'ITPA sur l'ITP, est préférentiellement réalisée sur des lysats érythrocytaires ; peu de techniques sont disponibles dans la littérature (44, 188, 191, 194-196). Il existe également peu de données sur la distribution de cette activité dans la population générale (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Distributions de l'activité de l'ITPA intra-érythrocytaire rapportées dans la littérature

<b>Auteurs</b>	<b>Population étudiée</b>	<b>Nombre de sujets</b>	<b>Distribution</b>	<b>Remarques</b>
Van Waeg, 1988 (196)	Adultes sains	48	Bimodale	2 patients avec activité très faible
Duley, 1990 (195)	Adultes sains	71	Bimodale	3 patients avec activité non détectable
Sumi, 2002 (191)	Adultes sains	100	Bimodale	/
Shipkova, 2006 (188)	Adultes sains	100	Bi ou trimodale	Activité plus faible chez les femmes que chez les hommes
Atasanova, 2007 (19)	Adultes sains	185	Non précisée	Activité plus faible chez les femmes que chez les hommes
Xiong, 2009 (44)	Adultes transplantés rénaux	155	Bimodale	3 patients avec activité non détectable Pas de différence hommes/femmes
Shipkova, 2011 (12)	Adultes atteints de MICI	160	Non précisée	Pas influence de l'âge, du sexe, de la dose d'AZA et des comédications

Concernant l'influence de l'ITPA sur le métabolisme des thiopurines, seules 5 études génotypiques avec des résultats discordants ont été publiées (9, 30, 37, 50, 146) (Tableau 5) et aucune n'a porté sur des données phénotypiques.

**Tableau 5 :** Récapitulatif des études portant sur le lien entre polymorphisme de l'ITPA et métabolites thiopuriques.

<b>Auteurs</b>	<b>Population étudiée</b>	<b>Nature du lien</b>
Hawwa, 2008 (30)	19 enfants avec LAL et 35 patients avec MICI sous AZA ou 6-MP	Lien entre <i>IVS2+21A&gt;C</i> et augmentation des 6-TGN
Haglund, 2008 (50)	50 adultes avec MICI sous AZA ou 6-MP	Absence de lien
Stocco, 2009 (37)	240 enfants avec LAL sous 6-MP	Lien entre <i>94C&gt;A</i> et augmentation des Me6-MPN
Adam de Beaumais, 2011 (146)	66 enfants avec LAL sous 6-MP et méthotrexate	Lien entre <i>94C&gt;A</i> et augmentation des Me6-MPN
Lee, 2015 (9)	132 enfants avec MICI sous AZA	Lien entre ( <i>rs2236206</i> et <i>rs8362</i> ) et augmentation des 6-TGN

Quant au lien entre l'ITPA et la survenue d'effets indésirables chez les patients traités par médicaments thiopuriques, plusieurs études génotypiques ont été menées dans différentes populations. Les résultats rapportés sont discordants, certains démontrant une association (Tableau 6), d'autres non (Tableau 7).

**Tableau 6 :** Récapitulatif des études rapportant une association entre le polymorphisme génétique de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables

Type de population	Auteurs	Nombre de sujets	Pathologie(s)	Traitement(s)	Nature de l'effet indésirable
Adulte	Von Ahsen, 2005 (41)	71	MC	AZA	Non précisé
	Ansari, 2008 (21)	202	MICI	AZA	Syndrome pseudo-grippal
	Xiong, 2009 (44)	155	TR*	AZA	Intolérance gastro-intestinale Syndrome pseudo-grippal
	Shipkova, 2011 (12)	160	MICI	AZA	Leucopénie Hépatotoxicité
Pédiatrique	Stocco, 2009 (37)	240	LAL	6-MP	Fièvre Neutropénie
	Dorababu, 2012 (26)	90	LAL	6-MP	Fièvre Leucopénie
	Tanaka, 2012 (38)	60	LAL	6-MP	Hépatotoxicité
	Hareedy, 2015 (29)	70	LAL	6-MP	Neutropénie Leucopénie
	Azimi, 2015 (22)	70	LAL	6-MP	Myélosuppression Hépatotoxicité
Mixte	Marinaki, 2004 (33)	130	MICI	AZA	Syndrome pseudo-grippal Rashs cutanés Pancréatite
	Hawwa, 2008 (30)	54	MICI/LAL	AZA/6-MP	Thrombopénie
	Uchiyama, 2009 (39)	16	MICI	AZA/6-MP	Leucopénie Agranulocytose
	Zabala-Fernandez, 2011 (45)	232	MICI	AZA	Arthralgie
Non précisé	Wan Rosalina, 2012 (42)	62	LAL	6-MP	Fièvre Hépatotoxicité
	Zelinkova, 2005 (46)	262	MICI	AZA	Leucopénie
	Wang, 2014 (43)	74	DER*	AZA	Nausées Vomissements

\*TR : transplantés rénaux, DER : pathologies dermatologiques

**Tableau 7 :** Récapitulatif des études ne rapportant pas d'association entre le polymorphisme génétique de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables

Type de population	Auteurs	Nombre de sujets	Pathologie(s)	Traitement(s)
Adulte	Hindorf, 2006 (31)	54	MICI	AZA
	Wroblova, 2012 (197)	188	MICI	AZA
	Al-Judaibi, 2016 (198)	53	MICI	AZA/6-MP
Pédiatrique	De Ridder, 2006 (25)	72	MICI	AZA
	Farfan, 2014 (27)	103	LAL	6-MP
	Lee, 2015 (9)	132	MICI	AZA
Mixte	Palmieri, 2007 (35)	422	MICI	AZA/6-MP
	Kurzwawski, 2009 (32)	157	*TR	AZA
Non précisé	Gearry, 2004 (28)	147	MICI	AZA
	Van Dieren, 2005 (40)	109	MICI	AZA
	Breen, 2005 (24)	65	*TH	AZA
	Allorge, 2005 (20)	41	MICI	AZA/6-MP
	Steponaitiene, 2016 (36)	82	MICI	AZA

\*TR : transplantés rénaux, TH : transplantés hépatiques

Contrairement au génotypage, le phénotypage permet de détecter une diminution de l'activité de l'ITPA potentiellement due à des facteurs non génétiques ou des mutations non connues et/ou non recherchées. L'étude phénotypique pourrait donc apporter des informations supplémentaires aux précédentes études génotypiques conduites. Cependant peu d'équipes (12, 38, 44) ont confronté l'activité enzymatique de l'ITPA à la survenue d'effets indésirables sous médicaments thiopuriques et une seule porte sur des patients atteints de MICI (12) (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Récapitulatif des études menées sur l'association entre la diminution de l'activité de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables

<b>Auteurs</b>	<b>Population étudiée</b>	<b>Résultats obtenus</b>
Xiong, 2009 (44)	155 adultes transplantés rénaux sous AZA	Association avec - intolérances digestives - syndrome pseudo-grippal
Shipkova, 2011 (12)	160 adultes avec MICI sous AZA	Association avec - leucopénie - hépatotoxicité
Tanaka, 2012 (38)	60 enfants avec LAL sous 6-MP	Association avec - hépatotoxicité

**Au final, les résultats discordants des nombreuses études réalisées, principalement génotypiques, ne permettent pas de conclure sur l'utilité ou non d'instaurer en pratique courante l'étude de l'ITPA chez les patients traités par médicaments thiopuriques.**

### iii. Inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH)

L'IMPDH, présente dans la plupart des tissus, est une enzyme qui catalyse, en présence d'un co-substrat, le  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide ( $\beta$ -NAD), et d'un cation monovalent ( $K^+$ ) (199, 200), la conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP) (201). Cette activité enzymatique est inhibée par la présence de certains cations divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) (199). Physiologiquement, elle intervient lors de la première étape limitante de la biosynthèse *de novo* des nucléotides de la guanine (201). Dans le cadre d'un traitement thiopurique, elle catalyse la conversion de la 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) en 6-thioxanthosine monophosphate (6-TXMP) (Figure 6). Cette enzyme est considérée comme l'enzyme limitante du métabolisme des médicaments thiopuriques pour la formation des 6-TGN (50).

Il existe 2 iso-enzymes de l'IMPDH : IMPDH1 et IMPDH2. Ces 2 iso-enzymes, qui ont 84% d'acides aminés en commun (9, 202), ont des caractéristiques similaires en termes d'activité catalytique et de substrat (55). L'IMPDH1 est exprimée dans tous les tissus à l'état basal. L'IMPDH2, surtout exprimée dans les cellules en prolifération (201), serait une forme inductible (131). Le gène de l'IMPDH1 est localisé sur le chromosome 7 (203), le gène de l'IMPDH2 se trouve sur le chromosome 3 (201, 204). Il n'a pas été rapporté d'influence de l'âge ou du sexe sur l'activité de l'IMPDH mesurée dans les cellules mononucléées sanguines (49, 205), mais cette activité présente une importante variabilité inter-individuelle avec une distribution non différente d'une distribution normale (50). Un certain nombre de polymorphismes génétiques touchant l'IMPDH1 et l'IMPDH2 et pouvant conduire à une modification de l'activité de cette enzyme, ont été rapportés (131, 206-211). Par ailleurs, des mutations sur le gène de l'IMPDH1 ont été décrites comme l'une des causes possibles de rétinites pigmentaires (207, 208).

Les études portant sur l'implication de cette enzyme dans le cadre des traitements par médicaments thiopuriques sont beaucoup moins nombreuses que pour la TPMT ou l'ITPA (9, 29, 49-53). Un certain nombre de techniques de détermination de l'activité de l'IMPDH par méthodes radio-marquées (mesure du  $^3\text{H}$  libéré par l'action de l'IMPDH sur de la  $[2,8^3\text{H}]\text{IMP}$ ) (202, 212-214) et chromatographiques, souvent dérivées des méthodes proposées par Montero *et al.* (215), et Glander *et al.* (205, 216), (mesure de l'XMP formée lors de la conversion enzymatique de l'IMP par l'IMPDH) (49, 50, 217-230) dans le sang total et les cellules mononucléées sanguines, ont été décrites principalement dans le cadre d'études sur le mycophénolate. Très peu de méthodes chromatographiques ont été développées pour la mesure intra-érythrocytaire (215, 217, 231) et aucune dans le cadre des traitements de maladies auto-immunes par médicaments thiopuriques. Une technique de mesure de l'activité de l'IMPDH a également été proposée par la mesure du NADH formé lors de la conversion enzymatique de l'IMP en XMP (208).

L'étude de l'influence de l'activité, dans les cellules mononucléées, de cette enzyme sur le métabolisme des médicaments thiopuriques, chez des sujets atteints de MICI, a montré une corrélation négative avec les Me6-TIMP mais aucun lien avec les 6-TGN (50, 51). Un lien a également été rapporté entre une diminution de l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées et un ratio Me6-TIMP/6-TGN supérieur à 20 (51). Une autre étude menée sur 20 patients souffrants de MICI, résistants au traitement par l'AZA, a exploré le lien entre cette résistance et l'implication de polymorphismes sur les gènes de l'IMPDH1 et 2 (52). Cette étude a montré une mutation génétique chez un seul des 20 patients résistants indiquant que cette mutation pourrait être la cause de cette résistance mais ne peut pas expliquer l'ensemble des résistances aux traitements par AZA (52).

Concernant le lien entre le polymorphisme génétique de l'IMPDH et l'apparition d'effets indésirables sous traitement par médicaments thiopuriques, Hareedy *et al.* (29) ont rapporté, dans une population pédiatrique atteinte de LAL, une association entre un polymorphisme sur l'IMPDH 1 et un risque accru de leucopénie tandis que Lee *et al.* (9), dans une population pédiatrique atteinte de MICI, ont retrouvé un impact significatif de polymorphismes touchant l'IMPDH1 et l'IMPDH2 sur les lymphopénies.

Aucune étude n'a été réalisée sur le lien entre l'activité intra-érythrocytaire de l'IMPDH et l'apparition des effets indésirables lors des traitements par médicaments thiopuriques dans le cadre de pathologies auto-immunes. Comme pour l'ITPA, au regard des données actuelles, l'influence de l'IMPDH sur la variabilité des réponses aux médicaments thiopuriques ne peut pas être établie (15, 55). D'autres études restent nécessaires afin de pouvoir conclure sur l'intérêt de la mesure de cette enzyme dans le suivi des patients sous médicaments thiopuriques.

### III. TRAVAUX DE RECHERCHE

Ces travaux ont pour objectifs 1) d'évaluer l'activité érythrocytaire de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) et de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH) en lien avec le suivi des métabolites thiopuriques de l'azathioprine (AZA) et le phénotypage de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), 2) de rechercher le lien éventuel entre l'activité de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables observés sous AZA. Plusieurs étapes ont été nécessaires pour atteindre ces objectifs :

- 1- Développer une méthode de détermination de l'activité de l'ITPA intra-érythrocytaire (Publications N°1 (232) et 2 (233))
- 2- Réaliser une étude phénotypique de l'ITPA dans une large population de sujets (Publication 3)
- 3- Etudier la relation entre l'activité de l'ITPA et le métabolisme des médicaments thiopuriques (Publication N°3)
- 4- Etudier la relation entre l'activité de l'ITPA et les effets indésirables des médicaments thiopuriques (Publication N°4)
- 5- Etudier la relation entre l'activité de l'ITPA et la réponse inflammatoire (Publication N°4)
- 6- Développer une méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH intra-érythrocytaire (Publication N°5)
- 7- Réaliser une étude phénotypique de l'IMPDH (Rédaction en cours pour publication N°6)
- 8- Etudier la relation entre l'activité de l'IMPDH et le métabolisme des médicaments thiopuriques (Rédaction en cours pour publication N°6)

## LISTE DES PUBLICATIONS

**Publication 1** : Citterio-Quentin A, Salvi JP, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase phenotype in human red blood cells using HPLC. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 477-80.

**Publication 2** : Citterio-Quentin A, Long S, Salvi JP, Moulisma M, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase in red blood cells using HPLC: an improved method. *Ther Drug Monit* 2014; 36: 689-91.

**Publication 3** : Citterio-Quentin A, Moulisma M, Gustin MP, Boulieu R. ITPA activity in adults and children treated or not by azathioprine: relationship to TPMT activity, thiopurine metabolites and co-medications. **Version révisée soumise à *British Journal of Clinical Pharmacology*.**

**Publication 4** : Citterio-Quentin A, Mustapha M, Gustin MP, Lachaux A, Boulieu R. ITPA activity in children treated by azathioprine: relationship to the occurrence of adverse events and inflammatory response. **Soumise à *British Journal of Clinical Pharmacology*.**

**Publication 5** : Beringer A, Citterio-Quentin A, Obenza-Otero R, Gustin C, Clarke R, Salvi JP, Boulieu R. Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in red blood cells of thiopurine-treated patients using HPLC. **Version en cours de révision soumise à *Journal of Chromatography B*.**

**Publication 6** : Citterio-Quentin A, El Mahmoudi A, Perret T, Ryan A, Beringer A, Lachaux A, Boulieu R. IMPDH activity in adults and children treated or not by azathioprine: relationship to thiopurine metabolites, ITPA and TPMT activities. **Publication en cours de rédaction.**

## 1. *Détermination de l'activité intra-érythrocytaire de l'ITPA*

# Publication 1

### **Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase phenotype in human red blood cells using HPLC**

Citterio-Quentin A, Salvi JP, Boulieu R.

Therapeutic Drug Monitoring 2012; 34: 477-80

L'objectif de ce travail est de mettre au point, optimiser et valider une méthode de détermination de l'activité ITPasique intra-érythrocytaire, par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes, applicable sur le même lysat érythrocytaire que celui utilisé au laboratoire pour la mesure de l'activité de la TPMT (156).

La méthode développée repose sur la conversion enzymatique de l'ITP en IMP par l'ITPA intra-érythrocytaire après incubation de lysats érythrocytaires en présence du substrat de l'ITPA (ITP) et d'un milieu réactionnel optimisé (Tampon TRIS,  $MgCl_2$ , DTT). La séparation chromatographique de l'IMP, l>IDP et l'ITP est réalisée sur une phase stationnaire échangeuse d'ions (Hypersil APS-2), greffée avec des groupements amino-propyl permettant des interactions ioniques et hydrophobes.

Les composés d'intérêt, IMP, IDP et ITP sont élués en moins de 12,5 minutes. Les coefficients de variations intra et inter-essais sont inférieurs à 5%. Le domaine de linéarité de la méthode compris entre 5 et 1500  $\mu\text{mol/L}$  d'IMP est en adéquation avec la variabilité inter-individuelle observée chez les 73 patients analysés. La constante d'affinité ( $K_m$ ) et la vitesse initiale maximale ( $V_{\text{max}}$ ) ont été estimées respectivement à 677,4  $\mu\text{mol/L}$  et 19,6  $\mu\text{mol/L/min}$ .

La méthode décrite permettra la détermination de l'activité de l'ITPA dans les érythrocytes de patients et l'étude de la relation entre l'activité de l'ITPA et la survenue des effets indésirables observés sous traitement par les médicaments thiopuriques.









## 2. **Amélioration de la méthode de détermination de l'activité ITPAsique**

# Publication 2

### **Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase in red blood cells using HPLC: an improved method**

Citterio-Quentin A, Long S, Salvi JP, Moulisma M, Boulieu R.

Therapeutic Drug Monitoring 2014; 36: 689-91

L'objectif de cette étude est d'améliorer la robustesse de la méthode de détermination de l'activité ITPAsique précédemment publiée.

Suite à l'observation d'une perte de résolution des composés au cours de l'utilisation de la phase stationnaire Hypersil APS-2, une nouvelle phase stationnaire greffée par des groupements amino-propyl, Luna NH<sub>2</sub>, a été testée pour l'analyse des nucléotides IMP, IDP et ITP. Les conditions chromatographiques ont été optimisées. Les performances de la phase stationnaire Luna NH<sub>2</sub> ont été comparées à celles de la phase Hypersil APS-2 sur des échantillons de patients.

La méthode optimisée permet l'élution de l'IMP, l'IDP et l'ITP en moins de 14 minutes. Le domaine de linéarité de la méthode s'étend de 5 à 3000 µmol/L d'IMP et les coefficients de variations intra et inter-essais sont inférieurs à 10%. Plus de 700 injections ont été réalisées sans modification de la résolution chromatographique. La comparaison des activités mesurées dans 2 populations de sujets traités ou non par l'azathioprine (n=99 et n=126), analysées avec les deux méthodes, n'a montré aucune différence significative.

L'utilisation d'une nouvelle phase stationnaire avec une gamme d'utilisation de pH plus étendue a permis d'obtenir des performances chromatographiques similaires à celles initialement décrites mais avec une robustesse accrue. Cette méthode peut facilement être applicable en pratique clinique pour l'étude de l'activité de l'ITPA.







### 3. **Etude phénotypique de l'ITPA dans des populations pédiatriques et adultes traitées ou non par l'azathioprine**

## Publication 3

### **ITPA activity in adults and children treated or not by azathioprine: relationship to TPMT activity, thiopurine metabolites and co-medications**

Citterio-Quentin A, Moulisma M, Gustin MP, Bouliou R.

Version révisée soumise à British Journal of Clinical Pharmacology

Cette étude comporte deux objectifs 1/ réaliser une étude phénotypique de l'activité intra-érythrocytaire de l'ITPA dans une large population de sujets et 2/ étudier la relation entre l'activité de l'ITPA et le métabolisme des médicaments thiopuriques.

L'activité de l'ITPA a été déterminée chez 183 adultes et 138 enfants traités ou non par l'azathioprine. Les métabolites thiopuriques, 6-TGN et Me6-MPN, ainsi que les activités de la TPMT et de l'ITPA ont été mesurés dans les érythrocytes. Une approche par un modèle de mélange gaussien a été utilisée pour évaluer la distribution de l'activité de l'ITPA. Il s'agit d'un modèle statistique qui sert à estimer de façon paramétrique la distribution de variables aléatoires en les modélisant comme une somme de plusieurs variables gaussiennes. Cette méthode de classification non supervisée permet d'identifier des sous-populations dans une série de données. Le but étant de classer, dans des partitions, plusieurs échantillons provenant de populations distinctes. Une probabilité *a posteriori* d'appartenance à chacune des classes obtenues est calculée et chaque observation est affectée à la classe la plus probable. Tout ceci concourt à s'approcher le plus possible de la distribution recherchée. La variabilité intra-individuelle de l'ITPA ainsi que l'influence de l'âge, du sexe, du traitement par l'azathioprine et des médicaments généralement associés ont également été explorées.

Cette étude rétrospective montre une distribution quadrimodale de l'activité ITPAsique. Aucune influence de l'âge, du sexe, du traitement par AZA et des médicaments co-prescrits, n'a été retrouvée. Chez les adultes, l'activité de l'ITPA n'est pas corrélée aux concentrations en 6-TGN et Me6-MPN, tandis que chez les enfants une corrélation négative a été observée entre l'activité ITPAsique et la concentration en Me-6MPN ( $r_s = -0,261$  ;  $p = 0,024$ ). Une corrélation positive a également été observée entre les activités de la TPMT et l'ITPA dans la population pédiatrique ( $r_s = 0,289$  ;  $p = 0,001$ ).

Ces travaux montrent que l'activité de l'ITPA n'est pas influencée par les paramètres non génétiques étudiés et n'a pas d'influence sur les concentrations en 6-TGN et Me6-MPN dans la population adulte. Une faible corrélation avec les concentrations en Me-6MPN ainsi qu'avec l'activité de la TPMT a été observée dans la population pédiatrique. Ces résultats démontrent que l'ITPA n'est pas une enzyme limitante dans la formation des 6-TGN mais suggère que les enfants avec une activité ITPasique diminuée seraient plus à risque d'accumuler les dérivés méthylés (Me-6MPN).

















































#### 4. *Etude des liens entre activité de l'ITPA et effets indésirables dans une population pédiatrique traitée par l'azathioprine*

## Publication 4

### **ITPA activity in children treated by azathioprine: relationship to the occurrence of adverse events and inflammatory response**

Citterio-Quentin A, Moulsmas M, Gustin MP, Lachaux A, Bouliou R.

Soumise à British Journal of Clinical Pharmacology

Afin de répondre aux objectifs définis dans ce mémoire, nous avons réalisé une étude rétrospective à partir des données collectées sur les patients traités pour maladies auto-immunes et suivis au sein de notre structure. Nous proposons 1) d'étudier la relation entre l'activité de l'ITPA et la survenue d'effets indésirables chez des enfants atteints de maladies auto-immunes traités par l'AZA, 2) et évaluer le lien entre activité de l'ITPA et la réponse inflammatoire observée chez les enfants atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

106 enfants atteints de maladies auto-immunes traités par l'azathioprine ont été inclus dans l'étude. Les activités de l'ITPA et de la TPMT ainsi que les métabolites thiopuriques ont été déterminés. Des marqueurs de toxicité, hépatique, hématologique, pancréatique, de réponse inflammatoire ainsi que des effets indésirables tels que des intolérances digestives, des arthralgies, des syndromes pseudo-grippaux et des réactions dermatologiques, incluant rashes cutanés et alopecies, ont été collectés.

Les résultats obtenus ne montrent aucune association significative entre l'activité de l'ITPA, l'hépatotoxicité, les réactions dermatologiques, les arthralgies, les syndromes pseudo-grippaux et les intolérances digestives. Concernant la myélotoxicité, une association est mise en évidence entre l'activité de l'ITPA et le volume globulaire moyen érythrocytaire (VGM). Une relation est également observée entre une activité ITPasique élevée et une augmentation des gammaglobulines qui constitue un marqueur d'inflammation chez les enfants souffrant de MICI.

Ces observations démontrent que l'activité de l'ITPA n'est pas associée à l'apparition d'effets indésirables. La relation mise en évidence entre l'activité ITPasique et les marqueurs de l'inflammation nous incite à penser que la détermination de l'activité enzymatique de l'ITPA pourrait permettre d'identifier les enfants prédisposés à un syndrome inflammatoire persistant sous traitement par AZA. Ces résultats devront être confirmés par des investigations complémentaires.























































## 5. *Détermination de l'activité intra-érythrocytaire de l'IMPDH*

# Publication 5

### **Determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in red blood cells of thiopurine-treated patients using HPLC**

Beringer A, Citterio-Quentin A, Obenza-Otero R, Gustin R, Clarke R, Salvi JP, Bouliou R.

Version en cours de révision soumise à Journal of Chromatography B

L'IMPDH ayant une position centrale dans le métabolisme des thiopurines, nous avons souhaité développer une méthode de détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes afin de pouvoir disposer, des activités enzymatiques ainsi que des concentrations de nucléotides thiopuriques, déterminées à partir d'une même matrice biologique, à savoir la matrice érythrocytaire.

La détermination de l'activité de l'IMPDH est basée sur la transformation de l'IMP en XMP. L'XMP formée est quantifiée par CLHP sur une phase stationnaire LUNA NH<sub>2</sub> échangeuse d'ions présentant des propriétés ioniques et hydrophobes. Les échantillons sanguins provenant de 142 sujets adultes et enfants, traités ou non par médicaments thiopuriques, ont été analysés.

L'XMP est éluée en moins de 15 minutes. Les coefficients de variations intra et inter-essais sont inférieurs à 9% pour des lysats érythrocytaires surchargés avec 2, 40 et 80 µmol/L d'XMP. Une forte variabilité inter-individuelle de l'activité de l'IMPDH est observée. L'activité de l'IMPDH n'est pas significativement différente entre les sujets non traités, la population adulte et les enfants sous traitement. Une répartition bimodale de l'activité de l'IMPDH est suggérée au vu des données préliminaires obtenues pour l'ensemble des populations étudiées.

La méthode décrite devrait permettre de définir la distribution phénotypique de l'IMPDH sur une cohorte plus importante de patients traités par les médicaments thiopuriques et d'étudier le lien entre l'activité intra-érythrocytaire de l'IMPDH et les effets indésirables observés sous traitements thiopuriques.







































## 6. *Etude phénotypique de l'IMPDH dans des populations pédiatriques et adultes traitées ou non par l'azathioprine*

# Publication 6

### IMPDH activity in adults and children treated or not by azathioprine: relationship to thiopurine metabolites, ITPA and TPMT activities

Citterio-Quentin A, El Mahmoudi A, Perret T, Ryan A, Beringer A, Lachaux A, Bouliou R.

Publication en cours de rédaction

Dans cette partie, nous présentons les résultats préliminaires de l'étude du phénotype de l'IMPDH réalisée chez des patients adultes et enfants, sains et atteints de maladies auto-immunes, traités ou non par l'azathioprine.

#### **Objectifs**

1/ Réaliser une étude phénotypique de l'activité intra-érythrocytaire de l'IMPDH dans les populations précitées.

2/ Etudier la relation entre l'activité de l'IMPDH, le métabolisme des médicaments thiopuriques et les activités intra-érythrocytaires de l'ITPA et de la TPMT.

#### **Méthodes**

##### Sujets inclus

L'activité de l'IMPDH a été déterminée rétrospectivement chez des adultes et des enfants traités ou non par l'AZA. Les patients pour lesquels une demande de détermination de l'activité de la TPMT et/ou de STP des métabolites thiopuriques a été prescrite au laboratoire de Pharmacocinétique Clinique du CHU de Lyon ont été recrutés. Le recrutement s'est déroulé de janvier 2012 à juin 2016. Les sujets atteints de pathologies auto-immunes, avant mise sous traitement thiopurique (n=10), et ceux depuis au minimum 2 mois de traitement par l'AZA à posologie constante (n=124) ont été inclus. 30 patients sans traitement thiopurique, ni pathologie auto-immune ont également été inclus.

Les échantillons de patients traités par l'AZA pour lesquels une mauvaise observance a été confirmée par des valeurs de concentrations de 6-TGN + Me6-MPN inférieures à 150 pmol/8.10<sup>8</sup> cellules ont été exclus (148). De même, les patients ayant reçu une transfusion sanguine au cours des 3 derniers mois n'ont pas été inclus. Les informations cliniques (date de naissance, sexe, poids, pathologie, traitement (molécule, posologie, date de début de

traitement à posologie constante) et biologiques (activités intra-érythrocytaires de la TPMT, de l'ITPA, de l'IMPDH et les dosages des métabolites thiopuriques) ont été collectées.

L'analyse de la relation entre l'activité de l'IMPDH et les concentrations en métabolites thiopuriques a été réalisée en normalisant ces concentrations par la dose quotidienne d'AZA ( $\text{pmol}/8.10^8$  cellules/mg d'AZA) pour les adultes ( $\geq 18$  ans) et par la dose quotidienne d'AZA par kilogramme ( $\text{pmol}/8.10^8$  cellules/(mg d'AZA/kg)) pour les enfants ( $< 18$  ans). Pour cette étude, seuls les sujets avec une activité de la TPMT normale ont été inclus.

### STP des métabolites thiopuriques et détermination de l'activité de la TPMT, de l'ITPA et de l'IMPDH

Les concentrations en métabolites thiopuriques, 6TGN et Me-6MPN ainsi que les activités de la TPMT, de l'ITPA et de l'IMPDH ont été déterminées dans les érythrocytes à l'aide des méthodes précédemment décrites (123, 156, 232, 233) et dans la publication 5 présentée dans ce travail (Beringer *et al.* 2016) (III,5).

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT® version 2013.4.08 (Addinsoft, NC, USA). Un test de corrélation de Spearman a été utilisé pour étudier le lien entre les différentes variables quantitatives. L'activité de l'IMPDH a été comparée entre les différents groupes par des tests de Mann et Whitney et entre plusieurs groupes indépendants par des tests de Kruskal-Wallis.

Pour l'étude de l'influence de l'âge sur l'activité de l'IMPDH, 4 groupes d'âges ont été identifiés dans la population pédiatrique (0-3, 3-6, 6-12 et 12-18 ans) et 2 groupes dans la population adulte (18-75 et  $\geq 75$  ans).

Un modèle de mélange gaussien a été utilisé pour évaluer la distribution de l'activité de l'IMPDH dans la population totale. Un test exact de Fisher a été mis en place pour la comparaison des distributions entre les différents groupes étudiés.

Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

## Résultats

### Sujets inclus

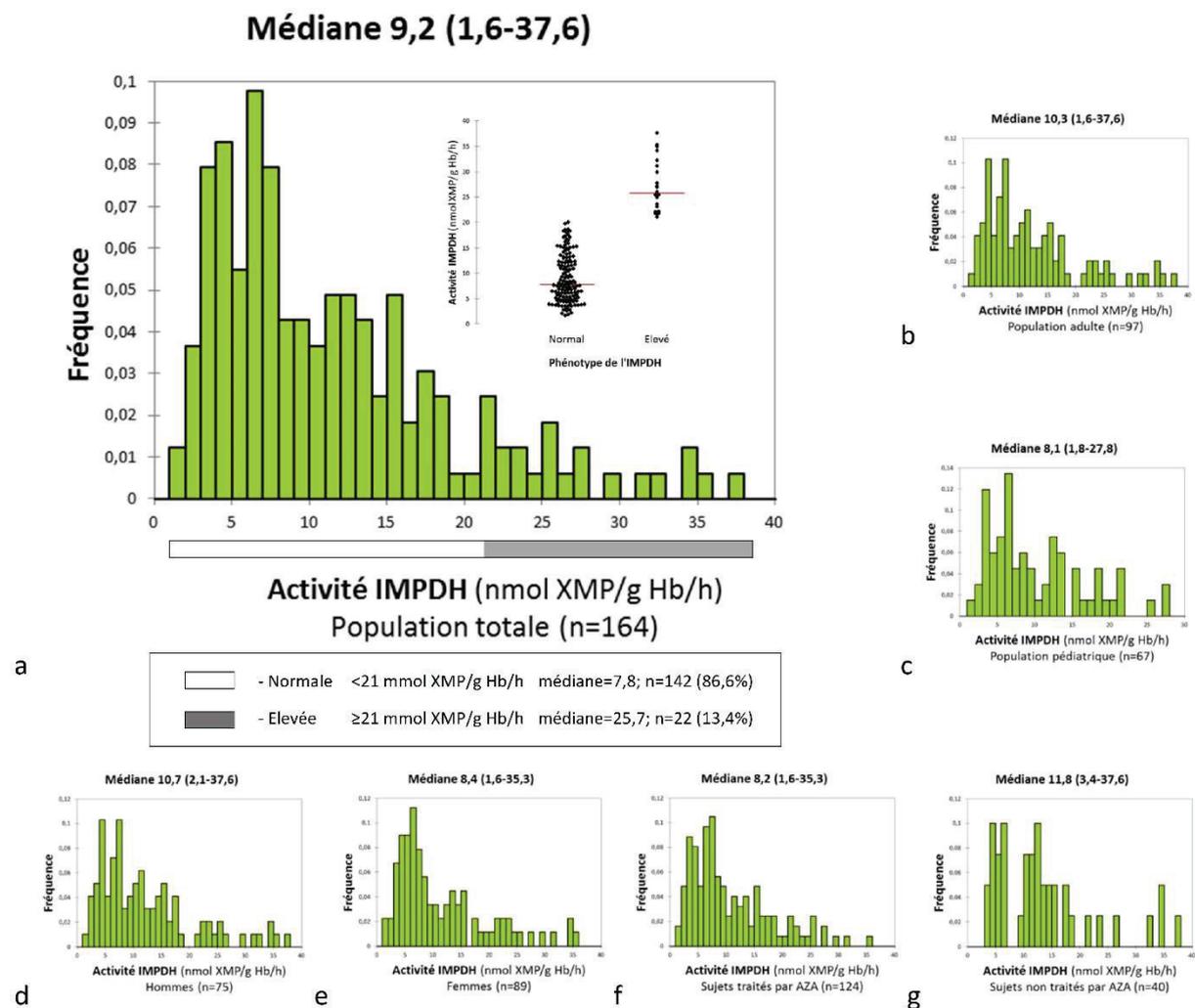
Les caractéristiques de la population étudiée sont présentées dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Caractéristiques de la population étudiée

	Population adulte	Population pédiatrique
Nombre de sujets, n (hommes/femmes)	97 (41/56)	67 (34/33)
Activité de l'IMPDH (nmol XMP/g Hb/h) (médiane; n (%))	10,3; 97 (100)	8,1; 67 (100)
Normale <21	7,9; 81 (83,5)	7,4; 61 (91,0)
Elevée ≥21	26,4; 16 (16,5)	23,6; 6 (9,0)
Activité de l'ITPA (µmol IMP/g Hb/h) (médiane; n (%))	48,2; 84 (100)	55,1; 63 (100)
Déficiente <5	/; 0 (/)	2,1; 1 (1,6)
Intermédiaire [5-34[	19,7; 19 (22,6)	22,3; 16 (25,4)
Normale [34-70[	50,7; 55 (65,5)	54,7; 28 (44,4)
Elevée ≥70	77,3; 10 (11,9)	80,0; 18 (28,6)
Non disponible	/; 13 (/)	/; 4 (/)
Activité de la TPMT (nmol/h/mL) (médiane; n (%))	19,7; 65 (100)	20,3; 64 (100)
Déficiente <5	/; 0 (0)	/; 0 (0)
Intermédiaire [5-16[	10,6; 6 (9,2)	11,8; 8 (12,5)
Normale [16-28[	19,9; 57 (87,7)	20,3; 49 (76,6)
Elevée ≥28	29,5; 2 (3,1)	32,1; 7 (10,9)
Non disponible	/; 32 (/)	/; 3 (/)
Sujets traités par azathioprine, n (%)	64 (66,0)	60 (89,6)
Sexe, n (%)		
Hommes	28 (43,7)	33 (55,0)
Femmes	36 (56,3)	27 (45,0)
Age (années), médiane; (min-max)	34,4; (18,0-79,3)	13,3; (3,0-17,7)
Pathologies, n (%)		
Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	41 (64,0)	48 (80,0)
Hépatite auto-immune	8 (12,5)	9 (15,0)
Lupus érythémateux disséminé	3 (4,7)	0 (0)
Associations de pathologies auto-immunes	3 (4,7)	0 (0)
Autres pathologies auto-immunes	9 (14,1)	3 (5,0)
Dose journalière d'azathioprine, médiane; (min-max)		
mg	100,0; (25-200)	/
mg/kg	/	1,88; (0,74-3,31)
6-TGN (pmol/8.10 <sup>8</sup> cellules), médiane; n (%)	374,5; 64 (100)	415,5; 60 (100)
<250	195,0; 14 (21,9)	174,5; 12 (20,0)
250-450	334,0; 28 (43,8)	352,0; 21 (35,0)
>450	742,0; 22 (34,3)	699,0; 27 (45,0)
Me6-MPN (pmol/8.10 <sup>8</sup> cellules), médiane; n (%)	477,0; 64 (100)	712,5; 60 (100)
<6000	422,5; 60 (93,7)	661,0; 59 (98,3)
>6000	7854,5; 4 (6,3)	6031,0; 1 (1,7)
Sujets non traités par azathioprine, n (%)	33 (34,0)	7 (10,4)
Sexe, n (%)		
Hommes	13 (39,4)	1 (14,3)
Femmes	20 (60,6)	6 (85,7)
Age (années), médiane; (min-max)	35,7; (21,3-80,9)	11,8; (4,7-16,8)

## Etude phénotypique de l'IMPDPH

La distribution de l'activité de l'IMPDPH a été évaluée sur les 164 sujets inclus. L'utilisation d'un modèle de mélange gaussien a permis d'identifier une distribution bimodale dans l'ensemble de la population étudiée (Figure 1). 6 individus (3,7%) présentent une activité très élevée (> à 30 nmol XMP/g Hb/h). Cette distribution bimodale se retrouve dans les 6 sous-groupes identifiés (Hommes/Femmes, Adultes/Enfants, Traités/Non traités par AZA (Test exact de Fisher :  $p=0,369$  ;  $p=0,243$  et  $p=0,182$  respectivement).



**Figure 1 :** Distribution de l'activité de l'IMPDPH, (a) dans la population totale (n=164) et scattergram de l'activité de l'IMPDPH en fonction du phénotype de l'IMPDPH, (b) chez les adultes (n=97), (c) chez les enfants (n=67), (d) chez les hommes (n=75), (e) chez les femmes (n=89), (f) chez les sujets traités par AZA (n=124), (g) chez les sujets non traités par AZA (n=40).

## Etude de l'influence de l'âge, du sexe, du traitement par l'AZA et de la pathologie sur l'activité de l'IMPDH

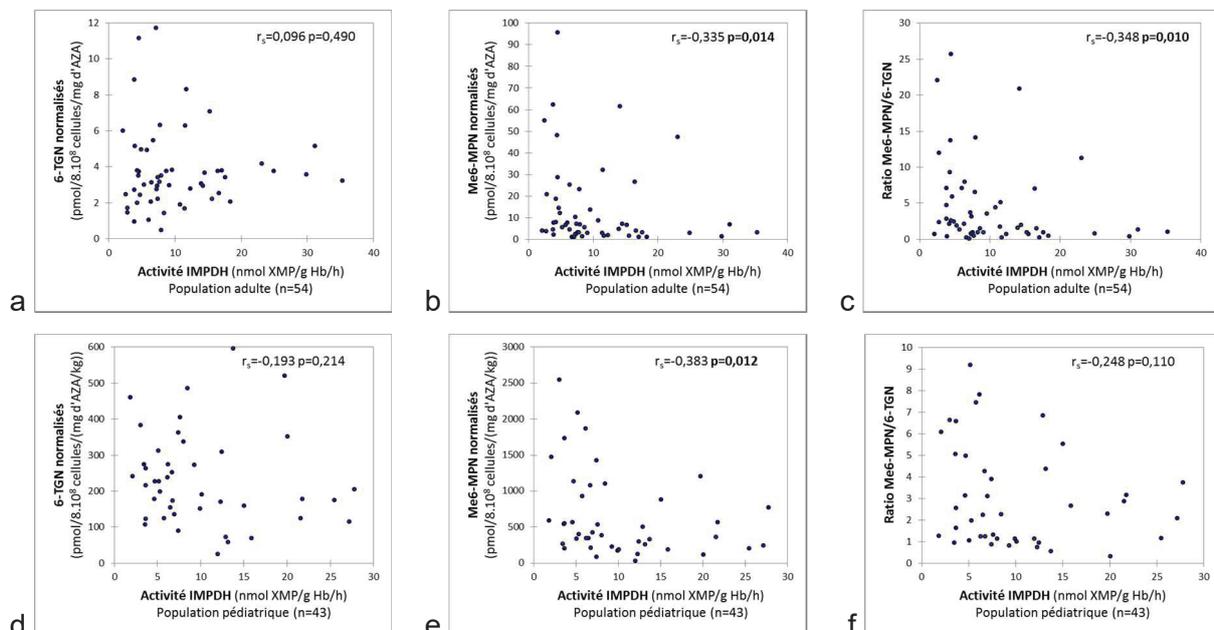
Aucune différence d'activité de l'IMPDH n'a été mise en évidence entre les adultes et les enfants ( $p=0,261$ ), les hommes et les femmes ( $p=0,692$ ) et entre les sujets traités ou non par AZA ( $p=0,095$ ). La comparaison de l'activité entre les différentes classes d'âge ne montre aucune différence significative ( $p=0,074$ ). Aucune différence d'activité de l'IMPDH n'a également été observée entre les différentes pathologies auto-immunes étudiées ( $p=0,122$ ).

## Lien entre les activités intra-érythrocytaires de l'IMPDH, de l'ITPA et de la TPMT

Aucune corrélation n'a été observée entre les 3 activités étudiées, aussi bien dans la population totale que chez les adultes ou chez les enfants étudiés séparément.

## Lien entre l'activité de l'IMPDH et les métabolites thiopuriques

Dans la population adulte et pédiatrique, aucun lien n'a été mis en évidence entre l'activité de l'IMPDH et les concentrations en 6-TGN normalisés (Figures 2a et 2d). Concernant les dérivés méthylés normalisés (Me-6MPN), une corrélation négative a été mise en évidence dans les 2 populations étudiées ( $r_s=-0,335$   $p=0,014$  et  $r_s=-0,383$   $p=0,012$  respectivement) (Figures 2b et 2e). Une corrélation négative est également retrouvée dans la population adulte entre l'activité de l'IMPDH et le ratio Me6-MPN/6-TGN ( $r_s=-0,348$   $p=0,010$ ) (Figure 2c).



**Figure 2 :** Concentrations en (a) 6-TGN normalisés, (b) Me6-MPN normalisés et ratio Me6-MPN/6-TGN en fonction de l'activité de l'IMPDH dans la population adulte, concentrations en (d) 6-TGN normalisés, (e) Me6-MPN normalisés et (f) ratio Me6-MPN/6-TGN en fonction de l'activité de l'IMPDH dans la population pédiatrique.

## Discussion

Ces données préliminaires révèlent une répartition bimodale de l'activité de l'IMPDH avec un phénotype d'activité normale majoritaire et un phénotype d'activité élevée. Quelques patients ont une activité très élevée. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur la distribution de l'activité de l'IMPDH intra-érythrocytaire. Seule une étude réalisée sur l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées sanguines rapporte une distribution non différente d'une distribution normale (50).

Aucune influence de l'âge, du sexe, du traitement par AZA et de la pathologie, n'a été retrouvée. Ces résultats confirment les résultats observés dans les travaux antérieurs (Publication 5) et sont en accord avec les travaux de Weigel *et al.* (214) basés sur la détermination de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire par une méthode radio-marquée et qui ne rapportent aucune différence entre l'activité de l'IMPDH intra-érythrocytaire déterminée chez des patients traités par l'AZA par rapport à des sujets sains. D'autres auteurs (49, 205) n'ont pas observé d'influence de l'âge ou du sexe sur l'activité de l'IMPDH mais dans ces études, l'activité de l'IMPDH a été mesurée dans les cellules mononucléées sanguines.

Peu d'études ont été rapportées sur l'influence de l'activité de l'IMPDH sur le métabolisme des médicaments thiopuriques (50, 51, 53) et aucune ne s'est intéressée à l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes dans le cadre de maladies auto-immunes. Bien que considérée comme l'enzyme limitante dans la formation des nucléotides de la 6-thioguanine (50), nous ne retrouvons pas d'association entre l'activité de l'IMPDH érythrocytaire et les 6-TGN et ceci quelle que soit la population étudiée. Dans des études antérieures réalisées sur des patients adultes atteints de MICI et traités par des médicaments thiopuriques, aucune relation entre les 6-TGN et l'activité de l'IMPDH déterminée dans les cellules mononucléées n'a été retrouvée (50, 51). Concernant les dérivés méthylés, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre l'activité érythrocytaire de l'IMPDH et les Me6-MPN. Ce résultat est en adéquation avec le schéma métabolique des thiopurines. Une relation entre l'activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées et les concentrations en Me-6TIMP, dérivés méthylés minoritaires des Me-6MPN (126-128), a été rapportée (50, 51). Enfin, nous avons retrouvé dans la population adulte un lien entre l'activité de l'IMPDH et le ratio Me-6MPN/6-TGN, ratio plusieurs fois décrit comme inversement corrélé à l'efficacité thérapeutique des médicaments thiopuriques (16, 80, 140, 147). Haglund *et al.* (51) rapportent une activité de l'IMPDH dans les cellules mononucléées plus basse chez les patients avec un ratio Me6-TIMP/6-TGN supérieur à 20 par rapport aux patients avec un ratio inférieur à 20. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activité de l'IMPDH érythrocytaire pourrait être le reflet de l'activité lymphocytaire. Ceci tend à confirmer que la matrice érythrocytaire pourrait constituer une excellente alternative à la matrice lymphocytaire, avec en particulier des méthodes d'isolement moins fastidieuses et

plus rapides. Nos résultats pourraient suggérer également que les patients traités par l'AZA et présentant une activité de l'IMPDH érythrocytaire plus faible seraient susceptibles d'avoir des dérivés méthylés plus élevés, potentiellement hépatotoxiques. Ces résultats méritent d'être confirmés par l'inclusion de patients supplémentaires afin d'essayer d'identifier un seuil en dessous duquel le risque d'hépatotoxicité est majoré.

D'autre part, aucun lien n'a été établi entre les 3 enzymes du métabolisme des thiopurines étudiées : ITPA, IMPDH et TPMT.

Pour conclure, la détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes pourrait être proposée pour le suivi thérapeutique de patients atteints de MICI et traités par les médicaments thiopuriques. Le choix de la matrice érythrocytaire comme matrice unique pour le suivi des métabolites thiopuriques ainsi que des enzymes polymorphiques impliquées dans le métabolisme des thiopurines apparaît pertinent et pourrait constituer une alternative intéressante à une matrice lymphocytaire.

L'ensemble de ces observations mérite d'être confirmé sur une cohorte de patients plus importante.

## IV. DISCUSSION GENERALE

La réponse clinique aux médicaments thiopuriques est sujette à une importante variabilité inter-individuelle. Cette variabilité, qui se manifeste aussi bien au niveau de l'efficacité (16) que dans l'apparition fréquente d'effets indésirables (12-15), pourrait être en partie expliquée par le polymorphisme des enzymes impliquées dans le métabolisme de ces médicaments. Parmi les nombreuses enzymes participant à ce métabolisme, le polymorphisme de la TPMT est tenu responsable de l'apparition d'une partie de la toxicité hématologique qui reste l'un des effets indésirables les plus sévères. Cependant, la variabilité génétique de la TPMT n'explique que 30 à 60% de l'ensemble des effets indésirables observés (19). A ce jour, une partie de ces effets indésirables survenant chez les patients sous médicaments thiopuriques reste donc inexpliquée. Les résultats des études précédemment réalisées sur les polymorphismes génétiques d'autres enzymes impliquées dans ce métabolisme sont discordants et n'ont pas permis d'associer de façon formelle mutation génétique et survenue d'effets indésirables. Une approche alternative par le versant phénotypique, reflet direct de l'activité enzymatique, prenant en compte l'ensemble des polymorphismes génétiques, connus ou non, ainsi que toutes les variations non génétiques, pourrait apporter de nouveaux éléments dans l'existence éventuelle d'une telle association. L'objectif de ce travail est donc d'étudier l'activité d'enzymes du métabolisme des médicaments thiopuriques dans le but d'optimiser les traitements thiopuriques en gastro-entérologie.

Les enzymes étudiées doivent occuper une position stratégique dans le métabolisme des médicaments thiopuriques, présenter une variabilité inter-individuelle sans retentissement clinique facilement identifiable et avoir été peu explorées d'un point de vue phénotypique. Parmi les nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments thiopuriques, deux, parmi d'autres, répondaient à ces critères et ont été sélectionnées dans ce travail : l'ITPA et l'IMPDH.

En pratique courante, les métabolites 6-TGN et Me-6MPN, utilisés pour le suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments thiopuriques, sont dosés dans les érythrocytes. L'activité de la TPMT est également déterminée dans cette même matrice. Le choix des érythrocytes pour la détermination de l'activité enzymatique de l'ITPA et de l'IMPDH permet donc de compléter l'exploration du métabolisme des thiopurines dans une matrice unique et de réaliser une étude globale de ce métabolisme intra-érythrocytaire. De plus, bien que reflétant moins directement l'action des médicaments thiopuriques qu'une matrice lymphocytaire, des transferts dynamiques intercellulaires des métabolites thiopuriques ont été décrits (234, 235), confirmant que la matrice érythrocytaire, aisément accessible, peut être une alternative intéressante à la matrice lymphocytaire.

### *Détermination de l'activité de l'ITPA dans les érythrocytes*

La mesure de l'activité intra-érythrocytaire de l'ITPA par méthode chromatographique est peu décrite dans la littérature (44, 188, 191, 194-196). La première étape de ce travail a consisté en la mise au point, l'optimisation et la validation d'une technique de détermination de l'activité de l'ITPA dans les érythrocytes humains (Publication N°1) (232). Le principe de la méthode repose sur le dosage de l'IMP formée par la conversion enzymatique de l'ITP par l'ITPA intra-érythrocytaire. Dans un premier temps, une méthode chromatographique permettant la séparation de l'IMP, l'ITP ainsi que l>IDP a été développée. Pour des raisons de simplicité et de praticabilité, un mode isocratique associé à une phase mobile constituée de tampon phosphate acidifié a été choisi. La phase stationnaire sélectionnée est une colonne Hypersil APS-2 (3  $\mu$ m, 4,6x150 mm, Thermo Scientific®) greffée avec des groupements amino-propyl. Cette phase stationnaire permet des échanges ioniques grâce aux fonctions amines ainsi que des interactions hydrophobes *via* ses groupements propyl. Une molarité de phase mobile à 400 mmol/L a été retenue pour permettre la séparation chromatographique des trois composés d'intérêt structurellement très proches. Nos essais ont montré que l'influence de la molarité de la phase mobile était plus importante que celle du pH sur les temps de rétention des trois nucléotides d'intérêt. Dans ces conditions de forte molarité, la séparation chromatographique de l'IMP, l>IDP et l'ITP est obtenue avec une excellente résolution en moins de 12,5 minutes et présente l'avantage par rapport à certaines méthodes publiées précédemment (44, 188, 191) de détecter également l>IDP, potentiel interférent chromatographique, et l'ITP pouvant servir de contrôle pour la réaction enzymatique, celle-ci étant consommée proportionnellement à la formation de l'IMP.

Dans un deuxième temps, nous avons optimisé la composition du milieu réactionnel (substrat (ITP), tampon TRIS, MgCl<sub>2</sub>, DL-dithiothréitol (DTT)) ainsi que les conditions d'incubation (pH, durée d'incubation et volume d'échantillon). Nos résultats ont montré que l'utilisation des fortes concentrations en DTT rapportées dans la littérature (44, 188) n'étaient pas nécessaires. De même, la concentration finale optimale en ITP est de 3 mmol/L. Enfin, la technique d'arrêt de la réaction enzymatique par la chaleur retenue, permet de s'affranchir des étapes d'acidification puis de neutralisation du milieu mises en place dans les techniques précédemment décrites (44, 188, 191, 194-196). La déprotéinisation par la chaleur évite ainsi de diluer l'échantillon et diminue le temps nécessaire à l'étape d'arrêt de la réaction.

Le choix de conditions opératoires appropriées a permis de proposer une méthode de détermination de l'activité ITPasique présentant de très bonnes performances analytiques. Dans l'objectif de tester cette méthode en conditions réelles, nous l'avons appliquée à 73 lysats érythrocytaires de patients traités ou non par l'AZA. Les résultats obtenus montrent que le domaine d'analyse proposé est parfaitement adapté aux activités mesurées dans une

population générale et aucune interférence chromatographique n'a été retrouvée. Cependant, en cours d'utilisation, la phase stationnaire initialement sélectionnée a présenté un manque de robustesse qui s'est manifesté par une perte plus ou moins rapide du pouvoir de rétention en fonction des lots de colonnes utilisés. Une autre phase stationnaire, Luna NH<sub>2</sub> : (3 µm, 4,6x150 mm, Phenomenex®), équipée d'une pré-colonne (SecurityGuard Cartridges, 4x3,0 mm, Phenomenex®), greffée également par des groupements amino-propyl, a été testée (Publication N°2) (233). Cette phase stationnaire se différencie principalement de la première par une gamme d'utilisation de pH plus étendue. Une optimisation des conditions chromatographiques a été réalisée et une validation complète de la méthode a été effectuée. Les performances chromatographiques obtenues sont comparables à celles précédemment décrites mais avec une robustesse accrue. Plus de 700 injections ont pu être ainsi réalisées sans modification des temps de rétention ou de l'aspect des pics chromatographiques. Une comparaison des activités mesurées dans une population analysée avec l'ancienne méthode et une population analysée avec la nouvelle n'a montré aucune différence significative.

#### *Etude phénotypique de l'ITPA*

Aucune étude portant sur une large population de patients n'a été conduite à ce jour sur la relation éventuelle entre l'activité de l'ITPA et le profil métabolique des médicaments thiopuriques. Une étude rétrospective portant sur 321 sujets adultes et enfants incluant 228 patients atteints de maladies auto-immunes traités par l'AZA a donc été mise en œuvre afin d'étudier l'influence de l'activité ITPasique sur le métabolisme des thiopurines (Publication N°3). Des patients traités par AZA depuis au minimum 2 mois, n'ayant pas eu de transfusion au cours des 3 derniers mois et dont l'observance a été évaluée par le STP des métabolites thiopuriques ont été inclus dans l'étude.

L'approche statistique basée sur un modèle de mélange gaussien nous a permis d'identifier 4 phénotypes d'activité de l'ITPA dans la population étudiée avec 1% de sujets déficitaires, 20% de sujets intermédiaires, 61% de sujets à activité normale et 18% à activité élevée. La distribution quadrimodale a également été observée dans les 6 sous-populations étudiées (hommes, femmes, adultes, enfants, traités et non traités par AZA) en particulier dans la population pédiatrique pour laquelle aucune donnée sur la distribution phénotypique de l'ITPA n'était disponible. Une distribution bimodale de l'activité ITPase a été rapportée dans la littérature dans des populations adultes (44, 188, 191, 195, 196), cependant l'évaluation de cette distribution a été réalisée uniquement sur la base d'une analyse visuelle des histogrammes. L'étude de l'influence de l'âge, du sexe, du traitement par l'AZA et des médicaments classiquement co-prescrits n'a pas montré de différence significative sur l'activité de l'ITPA. Enfin, la variabilité intra-individuelle de l'activité ITPasique, étudiée chez

32 sujets atteints de maladies auto-immunes traités ou non par l'AZA, s'est révélée très faible suggérant une influence négligeable des paramètres non génétiques sur l'ITPA. A notre connaissance, aucune donnée sur la variabilité intra-individuelle n'a été rapportée à ce jour.

#### *Relation entre l'activité de l'ITPA et le métabolisme des médicaments thiopuriques*

Peu de données ont été rapportées quant à l'influence de l'ITPA sur les concentrations en métabolites thiopuriques et l'activité de la TPMT. Certains auteurs (12, 37, 78) suggèrent que des patients avec une faible activité de l'ITPA présenteraient une concentration plus élevée de 6-TIMP conduisant à une accumulation de Me6-TIMP principal composant des Me6-MPN dans les érythrocytes (126-128). Les données que nous avons obtenues dans la population pédiatrique montrent qu'une activité ITPasique basse est significativement corrélée à des concentrations en Me6-MPN plus élevées qui pourraient être associées à un risque d'hépatotoxicité (16, 146-149). Ces résultats corroborent des données rapportées dans le cadre des études génotypiques sur des populations pédiatriques (37, 146). Dans la population pédiatrique, la détermination de l'activité ITPA avant traitement pourrait donc sensibiliser le clinicien sur le risque d'hépatotoxicité et l'inciter à renforcer le suivi des marqueurs hépatiques associé à une surveillance des concentrations en Me6-MPN. Nous observons également dans la population pédiatrique, un lien entre l'activité de l'ITPA et l'activité de la TPMT, cependant des investigations complémentaires sont requises pour expliciter ces résultats. Concernant la population adulte, aucun lien n'a été observé entre l'activité ITPasique et les métabolites thiopuriques ainsi que l'activité de la TPMT suggérant que l'ITPA ne serait pas une enzyme limitante dans la formation des métabolites thiopuriques intra-érythrocytaires.

#### *Relation entre l'activité de l'ITPA et les effets indésirables des médicaments thiopuriques*

Peu d'études ont été rapportées sur le lien entre le phénotype de l'ITPA et les effets indésirables observés chez des patients traités par l'AZA (12, 44). Dans la population adulte, une association entre une diminution de l'activité en ITPA et la survenue de leucopénie a été décrite (12) ainsi qu'une incidence plus élevée d'hépatotoxicité chez des patients présentant une très faible activité ITPasique (12). Dans une population pédiatrique atteinte de LAL sous 6-MP, une incidence plus élevée d'hépatotoxicité chez les sujets présentant une faible activité ITPA a également été décrite (38). Aucune étude n'ayant été réalisée sur une population pédiatrique atteinte de maladies auto-immunes, nous avons initié une étude rétrospective sur 106 enfants présentant une pathologie auto-immune traitée par l'AZA (Publication N°4). Cette étude avait pour objectif de rechercher l'implication éventuelle de l'activité de l'ITPA dans la survenue des effets indésirables observés sous AZA et d'étudier

l'impact de cette activité sur la réponse inflammatoire. Des marqueurs hématologiques, hépatiques, pancréatiques, ainsi que des signes cliniques tels que des intolérances digestives, des arthralgies, des syndromes pseudo-grippaux et des réactions dermatologiques incluant rashes cutanés et alopecies ont été collectés. Dans la population pédiatrique étudiée, aucun lien n'a été établi entre activité de l'ITPA et les marqueurs d'hépatotoxicité ainsi qu'avec les signes cliniques étudiés. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des populations pédiatriques atteintes de MICI dans le cadre d'études sur le génotype de l'ITPA (9, 25). Nos observations doivent cependant être modulées du fait du caractère rétrospectif de l'étude et du nombre très faible de certains effets indésirables observés en particulier hépatiques. Concernant les effets myélotoxiques, fréquemment rencontrés dans la population que nous avons étudiée, seule une association a été mise en évidence entre l'activité de l'ITPA et le volume globulaire moyen érythrocytaire (VGM). Une relation significative a également été observée entre une activité ITPasique élevée et une augmentation des gammaglobulines qui constitue un marqueur d'inflammation. Ces deux observations suggèrent que les enfants atteints de MICI, présentant une activité ITPasique élevée sous AZA, présenteraient plus fréquemment un syndrome inflammatoire, cause potentielle de rechute. La mesure de l'activité de l'ITPA dans cette population permettrait aux cliniciens d'anticiper un risque plus important d'inflammation persistante et d'élaborer ainsi une stratégie thérapeutique de suivi et si besoin de traitement de ce syndrome inflammatoire. Ces résultats devront être confirmés par d'autres études.

#### *Détermination de l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes*

L'IMPDH est une enzyme polymorphique impliquée dans la modulation de la formation des 6-TGN responsables des effets myélotoxiques de l'AZA. L'implication éventuelle de l'IMPDH dans la survenue des effets indésirables et dans la variabilité de la réponse observée sous traitements thiopuriques a été peu étudiée (50, 51) bien qu'un lien entre une mutation de l'IMPDH et un cas de résistance à l'AZA (52) ainsi que des relations entre des polymorphismes de l'IMPDH et un risque accru de myélotoxicité (9, 29) aient été rapportés. Sachant que l'activité de l'IMPDH est située majoritairement dans les érythrocytes (217) et que cette matrice est plus aisée à isoler que les cellules mononucléées, la détermination de l'activité de l'IMPDH a été mise au point dans les érythrocytes (Publication N°5). De plus, comme précisé précédemment, la détermination de l'activité de l'IMPDH dans la même matrice que celle utilisée pour le suivi des métabolites thiopuriques ainsi que pour le phénotypage de la TPMT et de l'ITPA nous apparaît pertinent.

Très peu d'études sur la mesure d'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes par techniques chromatographiques ont été décrites (215, 217, 231). Le principe de la méthode

est basé sur le dosage de l'XMP formée après incubation de lysats érythrocytaires en présence du substrat de l'enzyme (IMP) et de ses cofacteurs. L'XMP est analysée sur une phase stationnaire échangeuse d'ions, Luna NH<sub>2</sub> : (3 µm, 4,6x150 mm, Phenomenex®), équipée d'une pré-colonne (SecurityGuard Cartridges, 4x3,0 mm, Phenomenex®) et éluée par du tampon phosphate (280 mmol/L). Le milieu réactionnel et les conditions d'incubation ont été optimisés. Des concentrations finales de 5 mmol/L d'IMP, 0,3 mmol/L de β-NAD, 0,2 mol/L de KCl et 5 mmol/L d'EDTA se sont avérées optimales. Nous avons observé que des concentrations en β-NAD supérieures à 0,5 mmol/L sont associées à une diminution de l'activité de l'IMPDH. Nous avons également montré qu'un pH de 8,5 conduit à une augmentation de l'activité de l'IMPDH par rapport à un pH de 7,4 tel que décrit dans la littérature (215, 231).

L'application de cette méthode à 142 lysats érythrocytaires provenant de sujets adultes et enfants traités ou non par des médicaments thiopuriques a montré une importante variabilité inter-individuelle de l'IMPDH érythrocytaire. Aucune différence significative n'a été observée dans l'activité de l'IMPDH entre les sujets non traités par médicaments thiopuriques, la population adulte et les enfants sous traitement.

#### *Etude phénotypique de l'IMPDH*

Peu d'études ont été rapportées sur l'influence de l'activité de l'IMPDH sur le métabolisme des médicaments thiopuriques (50, 51, 53), et aucune ne s'est intéressée à l'activité de l'IMPDH dans les érythrocytes dans le cadre de maladies auto-immunes. Une étude phénotypique de l'IMPDH, associée à l'exploration du lien potentiel entre l'activité de l'IMPDH et le métabolisme des médicaments thiopuriques a été initiée dans ce travail (Publication N°6). L'activité de l'IMPDH a été déterminée rétrospectivement chez 97 adultes et 67 enfants traités ou non par l'AZA. Les modalités de recrutement ont été les mêmes que pour l'étude phénotypique réalisée sur l'ITPA. Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude rapportent une répartition bimodale de l'activité intra-érythrocytaire de l'IMPDH avec un phénotype à activité normale majoritaire (86,6%) et un phénotype d'activité élevée (13,4%). Quelques patients (3,7%) présentent une activité très élevée. Aucune influence de l'âge, du sexe, du traitement par AZA ainsi que de la pathologie n'a été retrouvée. A notre connaissance, aucune donnée sur la distribution de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire n'a été rapportée.

### *Relation entre l'activité de l'IMPDH et le métabolisme des médicaments thiopuriques*

Au vu des connaissances actuelles, et de par sa position centrale dans le métabolisme des thiopurines, une diminution de l'activité de l'IMPDH pourrait s'accompagner d'une diminution de la formation des 6-TGN et d'une augmentation des concentrations en dérivés méthylés. Aucune influence de l'activité de l'IMPDH sur les concentrations en 6-TGN dans les populations adultes et pédiatriques étudiées n'a été mise en évidence mais une corrélation négative avec les concentrations en Me-6MPN a été observée. Une corrélation négative entre le ratio 6-MeMPN/6-TGN, plusieurs fois décrit comme inversement corrélé à l'efficacité thérapeutique des médicaments thiopuriques (16, 80, 140, 147) et l'activité de cette enzyme a également été mise en évidence dans la population adulte. Ces résultats, en accord avec de précédents travaux réalisés sur l'activité de l'IMPDH mesurée dans des cellules mononucléées (50, 51), suggèrent que l'IMDPH ne soit pas une enzyme limitante dans la formation des 6-TGN mais confirment que les patients avec une activité de l'IMPDH diminuée seraient plus à risque d'avoir des dérivés méthylés plus élevés impliquant une potentielle hépatotoxicité.

## V. CONCLUSION

Les travaux rapportés dans cette thèse ont permis d'apporter des informations sur la distribution de l'activité de l'ITPA et de l'IMPDH, d'évaluer le lien entre ces activités et les métabolites thiopuriques chez des patients atteints de maladies auto-immunes traités par les médicaments thiopuriques et de suggérer une optimisation du suivi thérapeutique de ces traitements. Les points marquants sont les suivants :

- Le développement de la détermination de l'activité de l'ITPA et de l'IMPDH associée à celle de la TPMT sur une matrice unique de lysat érythrocytaire obtenue à partir d'un faible volume de sang total constitue un atout majeur en particulier pour le suivi de la population pédiatrique.
- L'approche du modèle de mélange gaussien a permis d'identifier une distribution quadrimodale de l'activité de l'ITPA avec un phénotype déficitaire, un phénotype intermédiaire, un phénotype normal et un phénotype à activité élevée chez les patients traités par AZA ainsi que chez les sujets non traités.
- Aucune influence de l'âge, du sexe, du traitement par l'AZA et des médicaments classiquement co-prescrits, sur l'activité de l'ITPA n'a été mise en évidence. Une faible variabilité intra-individuelle de l'activité ITPasique a été observée évoquant une influence négligeable des facteurs environnementaux sur l'ITPA.
- Dans la population pédiatrique, l'activité de l'ITPA basse est significativement corrélée à une augmentation des dérivés nucléotidiques méthylés suggérant un risque d'hépatotoxicité accru.
- La relation mise en évidence entre l'activité ITPasique et le volume globulaire moyen ainsi que les gammaglobulines dans la population pédiatrique atteinte de MICI nous incite à penser que la détermination de l'activité enzymatique de l'ITPA pourrait permettre d'identifier les enfants prédisposés à un syndrome inflammatoire persistant sous traitement par AZA.
- Une forte variabilité inter-individuelle de l'activité de l'IMPDH a été observée dans les différentes populations étudiées. L'étude de la répartition de l'activité de l'IMPDH érythrocytaire suggère une distribution bimodale avec quelques individus identifiés avec une activité élevée.

- L'âge, le sexe, la pathologie et le traitement par l'AZA n'ont pas d'influence sur l'activité de l'IMPDH.
- Une relation entre les Me-6MPN et l'activité de l'IMPDH a été détectée aussi bien dans la population adulte que pédiatrique. Concernant le ratio 6-MeMPN/6-TGN, une corrélation négative a été mise en évidence dans la population adulte. Ces observations nécessitent d'être confortées par des investigations complémentaires

## **VI. PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus dans la population pédiatrique sur l'implication de l'ITPA, dans les effets indésirables observés et sur la réponse inflammatoire lors de traitement par les médicaments thiopuriques, nous incitent à poursuivre l'analyse des données collectées sur la population adulte.

L'influence potentielle de l'activité de l'IMPDH, dans la survenue des effets indésirables imputés aux thiopurines, sera analysée dans la population adulte et la population pédiatrique.

Enfin, le métabolisme des thiopurines étant complexe, la variabilité d'une seule enzyme ne peut probablement pas expliquer l'ensemble des effets indésirables observés. L'étude de l'impact combiné des différentes enzymes étudiées, ITPA, IMPDH et TPMT, sur la variabilité de la réponse aux traitements thiopuriques sera donc envisagée.

## VII. REFERENCES

1. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Jan;35(1):15-36.
2. Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D, et al. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: a role for glutathione-S-transferase? *World J Gastroenterol.* 2014 Apr 7;20(13):3534-41.
3. Strassburg CP, Manns MP. Therapy of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 Dec;25(6):673-87.
4. Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, et al. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Oct;38(8):887-913.
5. Fumery M, Dauchet L, Vignal C, Gower-Rousseau C. [Epidemiology, risk factors and factors associated with disabling course in inflammatory bowel disease]. *Rev Prat.* 2014 Nov;64(9):1210-5.
6. Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, et al. Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2011 Jun 21;154(12):814-23, W-295-8.
7. Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(4):CD000545.
8. Kim MJ, Choe YH. Monitoring and safety of azathioprine therapy in inflammatory bowel disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013 Jun;16(2):65-70.
9. Lee MN, Kang B, Choi SY, Kim MJ, Woo SY, Kim JW, et al. Impact of Genetic Polymorphisms on 6-Thioguanine Nucleotide Levels and Toxicity in Pediatric Patients with IBD Treated with Azathioprine. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Dec;21(12):2897-908.
10. Tanida S, Ozeki K, Mizoshita T, Tsukamoto H, Katano T, Kataoka H, et al. Managing refractory Crohn's disease: challenges and solutions. *Clin Exp Gastroenterol.* 2015;8:131-40.
11. Yarur AJ, Abreu MT, Deshpande AR, Kerman DH, Sussman DA. Therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014 Apr 7;20(13):3475-84.
12. Shipkova M, Franz J, Abe M, Klett C, Wieland E, Andus T. Association between adverse effects under azathioprine therapy and inosine triphosphate pyrophosphatase activity in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Ther Drug Monit.* 2011 Jun;33(3):321-8.
13. Chaparro M, Ordas I, Cabre E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Penalva M, et al. Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Jun;19(7):1404-10.
14. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut.* 2002 Apr;50(4):485-9.
15. Moon W, Loftus EV, Jr. Review article: recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Feb 14.
16. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002 Apr;122(4):904-15.
17. Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002 Oct;16(10):1743-50.
18. Jharap B, Seinen ML, de Boer NK, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, et al. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Sep;16(9):1541-9.

19. Atanasova S, Shipkova M, Svinarov D, Mladenova A, Genova M, Wieland E, et al. Analysis of ITPA phenotype-genotype correlation in the Bulgarian population revealed a novel gene variant in exon 6. *Ther Drug Monit.* 2007 Feb;29(1):6-10.
20. Allorge D, Hamdan R, Broly F, Libersa C, Colombel JF. ITPA genotyping test does not improve detection of Crohn's disease patients at risk of azathioprine/6-mercaptopurine induced myelosuppression. *Gut.* 2005 Apr;54(4):565.
21. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, et al. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Oct 15;28(8):973-83.
22. Azimi F, Esmaeilzadeh A, Ramazani A. Clinical significance of ITPA rs67002563 polymorphism in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with 6-mercaptopurine. *Pharmacol Res.* 2015 Dec;102:61-2.
23. Azimi F, Mortazavi Y, Alavi S, Khalili M, Ramazani A. Frequency of ITPA gene polymorphisms in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia and prediction of its myelosuppressive effects. *Leuk Res.* 2015 Oct;39(10):1048-54.
24. Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005 Jul;11(7):826-33.
25. De Ridder L, Van Dieren JM, Van Deventer HJ, Stokkers PC, Van der Woude JC, Van Vuuren AJ, et al. Pharmacogenetics of thiopurine therapy in paediatric IBD patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Apr 15;23(8):1137-41.
26. Dorababu P, Nagesh N, Linga VG, Gundeti S, Kutala VK, Reddanna P, et al. Epistatic interactions between thiopurine methyltransferase (TPMT) and inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) variations determine 6-mercaptopurine toxicity in Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012 Apr;68(4):379-87.
27. Farfan MJ, Salas C, Canales C, Silva F, Villarroel M, Kopp K, et al. Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer.* 2014;14:299.
28. Gearry RB, Roberts RL, Barclay ML, Kennedy MA. Lack of association between the ITPA 94C>A polymorphism and adverse effects from azathioprine. *Pharmacogenetics.* 2004 Nov;14(11):779-81.
29. Hareedy MS, El Desoky ES, Woillard JB, Thabet RH, Ali AM, Marquet P, et al. Genetic variants in 6-mercaptopurine pathway as potential factors of hematological toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Pharmacogenomics.* 2015;16(10):1119-34.
30. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandebroek K, McCarthy A, Dempsey S, et al. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Oct;66(4):517-28.
31. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Soderkvist P, Strom M, Hjortswang H, et al. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2006 Oct;55(10):1423-31.
32. Kurzawski M, Dziewanowski K, Lener A, Drozdziak M. TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009 May;65(5):533-40.
33. Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, et al. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics.* 2004 Mar;14(3):181-7.
34. Odahara S, Uchiyama K, Kubota T, Ito Z, Takami S, Kobayashi H, et al. A Prospective Study Evaluating Metabolic Capacity of Thiopurine and Associated Adverse Reactions in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). *PLoS One.* 2015;10(9):e0137798.
35. Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Vecchi M, D'Inca R, Guagnozzi D, et al. Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPRT1 genes

polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Sep 1;26(5):737-45.

36. Steponaitiene R, Kupcinskas J, Survilaite S, Varkalaite G, Jonaitis L, Kiudelis G, et al. TPMT and ITPA genetic variants in Lithuanian inflammatory bowel disease patients: Prevalence and azathioprine-related side effects. *Adv Med Sci.* 2016 Dec 9;61(1):135-40.

37. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, et al. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Feb;85(2):164-72.

38. Tanaka Y, Manabe A, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, et al. The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children. *Leuk Res.* 2012 May;36(5):560-4.

39. Uchiyama K, Nakamura M, Kubota T, Yamane T, Fujise K, Tajiri H. Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment. *J Gastroenterol.* 2009;44(3):197-203.

40. van Dieren JM, van Vuuren AJ, Kusters JG, Nieuwenhuis EE, Kuipers EJ, van der Woude CJ. ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. *Gut.* 2005 Nov;54(11):1664.

41. von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, et al. Association of inosine triphosphatase 94C>A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2282-8.

42. Wan Rosalina WR, Teh LK, Mohamad N, Nasir A, Yusoff R, Baba AA, et al. Polymorphism of ITPA 94C>A and risk of adverse effects among patients with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *J Clin Pharm Ther.* 2012 Apr;37(2):237-41.

43. Wang TS, Chiu HY, Wu LSH, Chu CY, Tsai TF. Correlation of thiopurine methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphisms and adverse effects induced by azathioprine treatment in Taiwanese dermatology patients. *Dermatol Sin.* 2014;32:13-8.

44. Xiong H, Xin HW, Wu XC, Li Q, Xiong L, Yu AR. Association between inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency and azathioprine-related adverse drug reactions in the Chinese kidney transplant recipients. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Jun;24(3):393-400.

45. Zabala-Fernandez W, Barreiro-de Acosta M, Echarri A, Carpio D, Lorenzo A, Castro J, et al. A pharmacogenetics study of TPMT and ITPA genes detects a relationship with side effects and clinical response in patients with inflammatory bowel disease receiving Azathioprine. *J Gastrointest Liver Dis.* 2011 Sep;20(3):247-53.

46. Zelinkova Z, Derijks LJ, Stokkers PC, Vogels EW, van Kampen AH, Curvers WL, et al. Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jan;4(1):44-9.

47. Bierau J, Lindhout M, Bakker JA. Pharmacogenetic significance of inosine triphosphatase. *Pharmacogenomics.* 2007 Sep;8(9):1221-8.

48. Duley JA, Marinaki AM, Arenas M, Florin TH. Do ITPA and TPMT genotypes predict the development of side effects to AZA? *Gut.* 2006 Jul;55(7):1048.

49. Brouwer C, Vermunt-de Koning DG, Trueworthy RC, Ter Riet PG, Duley JA, Trijbels FJ, et al. Monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity in mononuclear cells of children with acute lymphoblastic leukemia: enzymological and clinical aspects. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Apr;46(4):434-8.

50. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Jan;65(1):69-77.

51. Haglund S, Vikingsson S, Soderman J, Hindorf U, Granno C, Danelius M, et al. The role of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in thiopurine metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Ther Drug Monit.* 2011 Apr;33(2):200-8.
52. Roberts RL, Geary RB, Barclay ML, Kennedy MA. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J.* 2007 Oct;7(5):312-7.
53. Wojtuszkiewicz A, Barcelos A, Dubbelman B, De Abreu R, Brouwer C, Bokkerink JP, et al. Assessment of mercaptopurine (6MP) metabolites and 6MP metabolic key-enzymes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):422-33.
54. Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J Biol Chem.* 1951 Oct;192(2):505-18.
55. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol.* 2010 May 1;79(9):1211-20.
56. Bean RH. The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. *Med J Aust.* 1962 Oct 13;49(2):592-3.
57. Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, Almer SH. Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Mar 15;29(6):654-61.
58. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit : Imurel. 2010 [updated 2010; cited 12/09/2016]; Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0168346.htm>.
59. HAS. Comité de la Transparence Avis 7 octobre 2015 : IMUREL. 2015 [updated 2015; cited 12/09/2016]; Available from: [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14538\\_IMUREL\\_PIS\\_RI\\_Avis2\\_CT14538.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14538_IMUREL_PIS_RI_Avis2_CT14538.pdf).
60. Bergan S, Bremer S, Vethe NT. Drug target molecules to guide immunosuppression. *Clin Biochem.* 2016 Mar;49(4-5):411-8.
61. Goldsmith D, Carrey EA, Edbury S, Smolenski RT, Jagodzinski P, Simmonds HA. Mycophenolate mofetil, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, causes a paradoxical elevation of GTP in erythrocytes of renal transplant patients. *Clin Sci (Lond).* 2004 Jul;107(1):63-8.
62. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit : Purinéthol. 2013 [updated 2013; cited 12/09/2016]; Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0223733.htm>.
63. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004 Jun;18(3):481-96.
64. Pineton de Chambrun G, Cortot A, Vignal C, Neut C, Body-Malapel M, Colombel JF, et al. Environnement : nouveaux facteurs associés au développement des MICI. In: Louis E, Marteau P, editors. *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.* Rueil-Malmaison, France: doin; 2010. p. 71-90.
65. Gower-Rousseau C, Verbier-Massouille G, Cortot A, Salomez JL, Colombel JF. Epidémiologie mondiale des MICI. In: Louis E, Marteau P, editors. *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.* Rueil-Malmaison, France: doin; 2010. p. 1-12.
66. Goel RM, Blaker P, Mentzer A, Fong SC, Marinaki AM, Sanderson JD. Optimizing the use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Chronic Dis.* 2015 May;6(3):138-46.
67. Thomas A, Lodhia N. Advanced therapy for inflammatory bowel disease: a guide for the primary care physician. *J Am Board Fam Med.* 2014 May-Jun;27(3):411-20.
68. Manns MP, Strassburg CP. Therapeutic strategies for autoimmune hepatitis. *Dig Dis.* 2011;29(4):411-5.
69. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2010 Jun;51(6):2193-213.
70. Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: new guidelines, new therapies. *Dig Dis.* 2012;30 Suppl 1:11-9.
71. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit : Azathioprine. 2013 [updated 2013; cited 12/09/2016]; Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0224362.htm>.

72. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Aug;64(8):753-67.
73. Jourdil N, Fonrose X, Boulieu R, Stanke-Labesque F. [Therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides in inflammatory bowel disease: interest and limits]. *Therapie*. 2010 May-Jun;65(3):177-86.
74. Bradford K, Shih DQ. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011 Oct 7;17(37):4166-73.
75. Elion GB. Nobel Lecture. The purine path to chemotherapy. *Biosci Rep*. 1989 Oct;9(5):509-29.
76. Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1122-4.
77. Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, et al. Thiopurine pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Sep;20(9):573-4.
78. Stocco G, Crews KR, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Jan;9(1):23-37.
79. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4):329-39.
80. Derijks LJ, Gilissen LP, Engels LG, Bos LP, Bus PJ, Lohman JJ, et al. Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Ther Drug Monit*. 2004 Jun;26(3):311-8.
81. Pozler O, Chladek J, Maly J, Hroch M, Dedek P, Beranek M, et al. Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2010 Dec;4(6):623-8.
82. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res*. 2001 Aug 1;61(15):5810-6.
83. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1133-45.
84. Tidd DM, Paterson AR. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res*. 1974 Apr;34(4):738-46.
85. Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA. *Mol Pharmacol*. 1999 Oct;56(4):841-8.
86. Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology*. 2000 Sep;61(3):136-46.
87. Ling YH, Chan JY, Beattie KL, Nelson JA. Consequences of 6-thioguanine incorporation into DNA on polymerase, ligase, and endonuclease reactions. *Mol Pharmacol*. 1992 Nov;42(5):802-7.
88. Haglund S. Interindividual differences in thiopurine metabolism - studies with focus on inflammatory bowel disease [Medical Dissertations]. Linköping, Sweden: Faculty of Health Sciences; 2011.
89. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, et al. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 1996 Aug 23;273(5278):1109-11.
90. You C, Dai X, Yuan B, Wang Y. Effects of 6-thioguanine and S6-methylthioguanine on transcription in vitro and in human cells. *J Biol Chem*. 2012 Nov 30;287(49):40915-23.
91. Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptopurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Apr 30;1181(2):189-94.

92. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Jul 15;24(2):331-42.
93. Gurwitz D, Rodriguez-Antona C, Payne K, Newman W, Gisbert JP, de Mesa EG, et al. Improving pharmacovigilance in Europe: TPMT genotyping and phenotyping in the UK and Spain. *Eur J Hum Genet.* 2009 Aug;17(8):991-8.
94. Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S, et al. Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):640-51.
95. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, et al. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb;312(2):537-45.
96. Costantino G, Furfaro F, Belvedere A, Alibrandi A, Fries W. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: response predictors, safety, and withdrawal in follow-up. *J Crohns Colitis.* 2012 Jun;6(5):588-96.
97. McLean LP, Cross RK. Adverse events in IBD: to stop or continue immune suppressant and biologic treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Mar;8(3):223-40.
98. Kennedy NA, Rhatigan E, Arnott ID, Noble CL, Shand AG, Satsangi J, et al. A trial of mercaptopurine is a safe strategy in patients with inflammatory bowel disease intolerant to azathioprine: an observational study, systematic review and meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Nov;38(10):1255-66.
99. Lees CW, Maan AK, Hansoti B, Satsangi J, Arnott ID. Tolerability and safety of mercaptopurine in azathioprine-intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Feb 1;27(3):220-7.
100. McGovern DP, Travis SP, Duley J, Shobowale-Bakre el M, Dalton HR. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology.* 2002 Mar;122(3):838-9.
101. Colonna T, Korelitz BI. The role of leukopenia in the 6-mercaptopurine-induced remission of refractory Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1994 Mar;89(3):362-6.
102. Nguyen TV, Vu DH, Nguyen TM, Lachaux A, Bouliou R. Exploring associations of 6-thioguanine nucleotide levels and other predictive factors with therapeutic response to azathioprine in pediatric patients with IBD using multilevel analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Oct;19(11):2404-10.
103. Gisbert JP, Gomollon F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol.* 2008 Jul;103(7):1783-800.
104. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut.* 1993 Aug;34(8):1081-5.
105. Wieser V, Gerner R, Moschen AR, Tilg H. Liver complications in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis.* 2013;31(2):233-8.
106. Dubinsky MC. Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2003 Dec;5(6):506-11.
107. Musumba CO. Review article: the association between nodular regenerative hyperplasia, inflammatory bowel disease and thiopurine therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Nov;38(9):1025-37.
108. Seksik P, Mary JY, Beaugier L, Lemann M, Colombel JF, Vernier-Massouille G, et al. Incidence of nodular regenerative hyperplasia in inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Feb;17(2):565-72.
109. Vernier-Massouille G, Cosnes J, Lemann M, Marteau P, Reinisch W, Laharie D, et al. Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut.* 2007 Oct;56(10):1404-9.

110. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lemann M, Cosnes J, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet*. 2009 Nov 7;374(9701):1617-25.
111. Dayharsh GA, Loftus EV, Jr., Sandborn WJ, Tremaine WJ, Zinsmeister AR, Witzig TE, et al. Epstein-Barr virus-positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):72-7.
112. Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut*. 2005 Aug;54(8):1121-5.
113. Kotlyar DS, Lewis JD, Beaugerie L, Tierney A, Brensinger CM, Gisbert JP, et al. Risk of lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine and 6-mercaptopurine: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 May;13(5):847-58 e4; quiz e48-50.
114. Bourrier A, Carrat F, Colombel JF, Bouvier AM, Abitbol V, Marteau P, et al. Excess risk of urinary tract cancers in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Jan;43(2):252-61.
115. Long MD, Martin CF, Pipkin CA, Herfarth HH, Sandler RS, Kappelman MD. Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2012 Aug;143(2):390-9 e1.
116. Peyrin-Biroulet L, Khosrotehrani K, Carrat F, Bouvier AM, Chevaux JB, Simon T, et al. Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1621-28 e1-5.
117. Ariyaratnam J, Subramanian V. Association between thiopurine use and nonmelanoma skin cancers in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014 Feb;109(2):163-9.
118. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology*. 2001 Nov;121(5):1080-7.
119. Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Habermann TM, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2000 Sep;95(9):2308-12.
120. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010 Mar;105(3):501-23; quiz 24.
121. Toruner M, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008 Apr;134(4):929-36.
122. Moussata D. Conseil de pratique : IMUREL (Azathioprine), PURINETHOL (6-mercaptopurine). SNFGE (Société Nationale Française de Gastro-Entérologie); 2015 [updated 2015; cited 12/09/2016]; Available from: <http://www.snfge.org/conseils-de-pratique>.
123. Dervieux T, Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem*. 1998 Mar;44(3):551-5.
124. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr*. 1992 Nov 27;583(1):83-90.
125. Dervieux T, Bouliou R. Identification of 6-methylmercaptopurine derivative formed during acid hydrolysis of thiopurine nucleotides in erythrocytes, using liquid chromatography-mass spectrometry, infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance assay. *Clin Chem*. 1998 Dec;44(12):2511-5.

126. Hofmann U, Heinkele G, Angelberger S, Schaeffeler E, Lichtenberger C, Jaeger S, et al. Simultaneous quantification of eleven thiopurine nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2012 Feb 7;84(3):1294-301.
127. Vikingsson S, Almer S, Peterson C, Carlsson B, Josefsson M. Monitoring of thiopurine metabolites - a high-performance liquid chromatography method for clinical use. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Mar 5;75:145-52.
128. Vikingsson S, Andersson D, Almer S, Peterson C, Hindorf U. Novel assay to improve therapeutic drug monitoring of thiopurines in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2014 Dec;8(12):1702-9.
129. Bergan S, Rugstad HE, Klemetsdal B, Giverhaug T, Bentdal O, Sodal G, et al. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Ther Drug Monit.* 1997 Jun;19(3):318-26.
130. Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Theoret Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996 May;74(5):580-5.
131. Garrat A. Pharmacogénétique des médicaments thiopuriques : implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1 [Thèse de Doctorat]. Lille, France: Université de Lille 2 - Droit et Santé; 2009.
132. Lancaster DL, Patel N, Lennard L, Lilleyman JS. Leucocyte versus erythrocyte thioguanine nucleotide concentrations in children taking thiopurines for acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Jul;50(1):33-6.
133. Achkar JP, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D, Lashner B. Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Jul;10(4):339-45.
134. Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 May;2(5):410-7.
135. Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Bouliou R, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin Chem.* 2005 Nov;51(11):2074-84.
136. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2000 Apr;118(4):705-13.
137. Moreau AC, Paul S, Del Tedesco E, Rinaudo-Gaujous M, Boukhadra N, Genin C, et al. Association between 6-thioguanine nucleotides levels and clinical remission in inflammatory disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Mar;20(3):464-71.
138. Gonzalez-Lama Y, Bermejo F, Lopez-Sanroman A, Garcia-Sanchez V, Esteve M, Cabriada JL, et al. Thiopurine methyl-transferase activity and azathioprine metabolite concentrations do not predict clinical outcome in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Sep;34(5):544-54.
139. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, et al. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2001 Nov;49(5):665-70.
140. Fakhoury M, de Beaumais T, Medard Y, Jacqz-Aigrain E. [Therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: interest and limits]. *Therapie.* 2010 May-Jun;65(3):187-93.
141. Gardiner SJ, Gearry RB, Burt MJ, Ding SL, Barclay ML. Severe hepatotoxicity with high 6-methylmercaptopurine nucleotide concentrations after thiopurine dose escalation due to low 6-thioguanine nucleotides. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Dec;20(12):1238-42.

142. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(4):1047-53.
143. Wright S, Sanders DS, Lobo AJ, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1123-8.
144. Stocco G, Cuzzoni E, De Iudicibus S, Favretto D, Malusa N, Martelossi S, et al. Thiopurine metabolites variations during co-treatment with aminosalicylates for inflammatory bowel disease: effect of N-acetyl transferase polymorphisms. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 28;21(12):3571-8.
145. Gearry RB, Barclay ML, Roberts RL, Harraway J, Zhang M, Pike LS, et al. Thiopurine methyltransferase and 6-thioguanine nucleotide measurement: early experience of use in clinical practice. *Intern Med J*. 2005 Oct;35(10):580-5.
146. Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, Azougagh S, Zhang D, Yakouben K, et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Apr;71(4):575-84.
147. Kopylov U, Amre D, Theoret Y, Deslandres C, Seidman EG. Thiopurine metabolite ratios for monitoring therapy in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Oct;59(4):511-5.
148. Nguyen TV, Vu DH, Nguyen TM, Lachaux A, Bouliou R. Relationship between azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric IBD patients: identification of covariables using multilevel analysis. *Ther Drug Monit*. 2013 Apr;35(2):251-7.
149. van Asseldonk DP, Seinen ML, de Boer NK, van Bodegraven AA, Mulder CJ. Hepatotoxicity associated with 6-methyl mercaptopurine formation during azathioprine and 6-mercaptopurine therapy does not occur on the short-term during 6-thioguanine therapy in IBD treatment. *J Crohns Colitis*. 2012 Feb;6(1):95-101.
150. Mosli MH, Sandborn WJ, Kim RB, Khanna R, Al-Judaibi B, Feagan BG. Toward a personalized medicine approach to the management of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2014 Jul;109(7):994-1004.
151. Reinshagen M, Schutz E, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, et al. 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin Chem*. 2007 Jul;53(7):1306-14.
152. Shaye OA, Yadegari M, Abreu MT, Poordad F, Simon K, Martin P, et al. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-MP) and Azathioprine (AZA) in adult IBD patients. *Am J Gastroenterol*. 2007 Nov;102(11):2488-94.
153. Goldenberg BA, Rawsthorne P, Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 Sep;99(9):1744-8.
154. Irving PM. Are we using and monitoring thiopurines and biologics optimally? *Dig Dis*. 2014;32(4):410-8.
155. Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, et al. Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics*. 2014 Apr;15(6):745-57.
156. Bouliou R, Sauviat M, Dervieux T, Bertocchi M, Mornex JF. Phenotype determination of thiopurine methyltransferase in erythrocytes by HPLC. *Clin Chem*. 2001 May;47(5):956-8.
157. Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, et al. Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B or TPMT\*3C. *Pharmacogenetics*. 1999 Oct;9(5):641-50.
158. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):651-62.
159. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics*. 2009 Nov;10(11):1753-65.

160. Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, et al. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Aug;68(2):210-9.
161. Roberts RL, Geary RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, et al. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 May;18(5):434-8.
162. Cooper SC, Ford LT, Berg JD, Lewis MJ. Ethnic variation of thiopurine S-methyltransferase activity: a large, prospective population study. *Pharmacogenomics.* 2008 Mar;9(3):303-9.
163. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, et al. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004 Apr;60(2):89-96.
164. Gisbert JP, Gomollon F, Cara C, Luna M, Gonzalez-Lama Y, Pajares JM, et al. Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig Dis Sci.* 2007 May;52(5):1262-9.
165. Corominas H, Domenech M, Gonzalez D, Diaz C, Roca M, Garcia-Gonzalez MA, et al. Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. *Am J Gastroenterol.* 2000 Sep;95(9):2313-7.
166. Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, Schmiegelow K. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Jan;17(1):65-8.
167. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Mar;89(3):387-91.
168. Burnett HF, Tanoshima R, Chandranipongse W, Madadi P, Ito S, Ungar WJ. Testing for thiopurine methyltransferase status for safe and effective thiopurine administration: a systematic review of clinical guidance documents. *Pharmacogenomics J.* 2014 Dec;14(6):493-502.
169. Fargher EA, Tricker K, Newman W, Elliott R, Roberts SA, Shaffer JL, et al. Current use of pharmacogenetic testing: a national survey of thiopurine methyltransferase testing prior to azathioprine prescription. *J Clin Pharm Ther.* 2007 Apr;32(2):187-95.
170. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Apr;93(4):324-5.
171. Coenen MJ, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJ, Vermeulen SH, Wong DR, et al. Identification of Patients With Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events During Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2015 Oct;149(4):907-17 e7.
172. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):940-87.
173. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol.* 2009 Feb;104(2):465-83; quiz 4, 84.
174. Evans WE. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit.* 2004 Apr;26(2):186-91.
175. Lennard L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase--optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monit.* 1998 Oct;20(5):527-31.
176. Dubinsky MC, Reyes E, Ofman J, Chiou CF, Wade S, Sandborn WJ. A cost-effectiveness analysis of alternative disease management strategies in patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol.* 2005 Oct;100(10):2239-47.
177. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, et al. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol.* 2001 Apr 15;19(8):2293-301.

178. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol*. 2010 Apr;63(4):288-95.
179. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Dec 1;91(23):2001-8.
180. van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML. High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 May;35(10):1181-9.
181. Ansari A, Patel N, Sanderson J, O'Donohue J, Duley JA, Florin TH. Low-dose azathioprine or mercaptopurine in combination with allopurinol can bypass many adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 Mar;31(6):640-7.
182. Gardiner SJ, Gearry RB, Burt MJ, Chalmers-Watson T, Chapman BA, Ross AG, et al. Allopurinol might improve response to azathioprine and 6-mercaptopurine by correcting an unfavorable metabolite ratio. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26(1):49-54.
183. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*. 1995 Apr;39(4):456-9.
184. de Boer NK, Wong DR, Jharap B, de Graaf P, Hooymans PM, Mulder CJ, et al. Dose-dependent influence of 5-aminosalicylates on thiopurine metabolism. *Am J Gastroenterol*. 2007 Dec;102(12):2747-53.
185. de Graaf P, de Boer NK, Wong DR, Karner S, Jharap B, Hooymans PM, et al. Influence of 5-aminosalicylic acid on 6-thioguanosine phosphate metabolite levels: a prospective study in patients under steady thiopurine therapy. *Br J Pharmacol*. 2010 Jul;160(5):1083-91.
186. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1025-30.
187. Dewit O, Moreels T, Baert F, Peeters H, Reenaers C, de Vos M, et al. Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin Biochem*. 2011 Sep;44(13):1062-6.
188. Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, von Ahsen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem*. 2006 Feb;52(2):240-7.
189. Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem*. 2001 Jun 1;276(22):18695-701.
190. Mohandas T, Sparkes RS, Passage MB, Sparkes MC, Miles JH, Kaback MM. Regional mapping of ADA and ITP on human chromosome 20: cytogenetic and somatic cell studies in an X/20 translocation. *Cytogenet Cell Genet*. 1980;26(1):28-35.
191. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet*. 2002 Oct;111(4-5):360-7.
192. Heller T, Oellerich M, Armstrong VW, von Ahsen N. Rapid detection of ITPA 94C>A and IVS2 + 21A>C gene mutations by real-time fluorescence PCR and in vitro demonstration of effect of ITPA IVS2 + 21A>C polymorphism on splicing efficiency. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):2182-4.
193. Maeda T, Sumi S, Ueta A, Ohkubo Y, Ito T, Marinaki AM, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab*. 2005 Aug;85(4):271-9.
194. Bierau J, Bakker JA, Lindhout M, van Gennip AH. Determination of ITPase activity in erythrocyte lysates obtained for determination of TPMT activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25(9-11):1129-32.

195. Duley JA, Simmonds HA, Hopkinson DA, Levinsky RJ. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in a kindred with adenosine deaminase deficiency. *Clin Chim Acta*. 1990 May;188(3):243-52.
196. van Waeg G, Niklasson F, Ericson A, de Verdier CH. Purine metabolism in normal and ITP-pyrophosphohydrolase-deficient human erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 1988 Feb 15;171(2-3):279-92.
197. Wroblowa K, Kolorz M, Batovsky M, Zboril V, Suchankova J, Bartos M, et al. Gene polymorphisms involved in manifestation of leucopenia, digestive intolerance, and pancreatitis in azathioprine-treated patients. *Dig Dis Sci*. 2012 Sep;57(9):2394-401.
198. Al-Judaibi B, Schwarz UI, Huda N, Dresser GK, Gregor JC, Ponich T, et al. Genetic Predictors of Azathioprine Toxicity and Clinical Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. 2016;23(1):e26-36.
199. Kerr KM, Cahoon M, Bosco DA, Hedstrom L. Monovalent cation activation in *Escherichia coli* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Mar 1;375(1):131-7.
200. Markham GD, Bock CL, Schalk-Hihi C. Acid-base catalysis in the chemical mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1999 Apr 6;38(14):4433-40.
201. Glesne D, Collart F, Varkony T, Drabkin H, Huberman E. Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). *Genomics*. 1993 Apr;16(1):274-7.
202. Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther*. 1999 Jun;65(6):640-8.
203. Gu JJ, Kaiser-Rogers K, Rao K, Mitchell BS. Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32). *Genomics*. 1994 Nov 1;24(1):179-81.
204. Zimmermann AG, Spychala J, Mitchell BS. Characterization of the human inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type II gene. *J Biol Chem*. 1995 Mar 24;270(12):6808-14.
205. Glander P, Braun KP, Hambach P, Bauer S, Mai I, Roots I, et al. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem*. 2001 Oct;34(7):543-9.
206. Bowne SJ, Liu Q, Sullivan LS, Zhu J, Spellacy CJ, Rickman CB, et al. Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Sep;47(9):3754-65.
207. Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Cepko CL, Blackshaw S, Birch DG, et al. Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*. 2002 Mar 1;11(5):559-68.
208. Bowne SJ, Sullivan LS, Mortimer SE, Hedstrom L, Zhu J, Spellacy CJ, et al. Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jan;47(1):34-42.
209. Kudo M, Saito Y, Sasaki T, Akasaki H, Yamaguchi Y, Uehara M, et al. Genetic variations in the HGPRT, ITPA, IMPDH1, IMPDH2, and GMPS genes in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24(6):557-64.
210. Wang J, Zeevi A, Webber S, Girnita DM, Addonizio L, Selby R, et al. A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Apr;17(4):283-90.
211. Wu TY, Peng Y, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Wieben ED, et al. Pharmacogenetics of the mycophenolic acid targets inosine monophosphate dehydrogenases IMPDH1 and IMPDH2: gene sequence variation and functional genomics. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec;161(7):1584-98.
212. Balzarini J, De Clercq E. Assay method for monitoring the inhibitory effects of antimetabolites on the activity of inosinate dehydrogenase in intact human CEM lymphocytes. *Biochem J*. 1992 Nov 1;287 ( Pt 3):785-90.
213. Langman LJ, LeGatt DF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression by measuring IMP dehydrogenase activity. *Clin Chem*. 1995 Feb;41(2):295-9.

214. Weigel G, Griesmacher A, Zuckermann AO, Laufer G, Mueller MM. Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;69(3):137-44.
215. Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AJ, et al. Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chim Acta.* 1995 Jul 14;238(2):169-78.
216. Glander P, Sombogaard F, Budde K, van Gelder T, Hambach P, Liefeldt L, et al. Improved assay for the nonradioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit.* 2009 Jun;31(3):351-9.
217. Albrecht W, Storck M, Pfetsch E, Martin W, Abendroth D. Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Ther Drug Monit.* 2000 Jun;22(3):283-94.
218. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, Tinelli C, Cosmai L, Valentini G, et al. Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Jan;69(1):38-50.
219. Daxecker H, Raab M, Muller MM. Influence of mycophenolic acid on inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Chim Acta.* 2002 Apr;318(1-2):71-7.
220. Devyatko E, Zuckermann A, Bohdjalian A, Roedler S, Dunkler D, Grimm M, et al. Activation of the purine salvage pathway in mononuclear cells of cardiac recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation.* 2006 Jul 15;82(1):113-8.
221. Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G, Muller MM. IMP-dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and lymphoblasts by mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide. *Clin Chem.* 1997 Dec;43(12):2312-7.
222. Kalsi K, Marinaki AM, Yacoub MH, Smolenski RT. HPLC/tandem ion trap mass detector methods for determination of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and thiopurine methyltransferase (TPMT). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2006;25(9-11):1241-4.
223. Laverdiere I, Caron P, Couture F, Guillemette C, Levesque E. Liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry based assay to evaluate inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells from stem cell transplant recipients. *Anal Chem.* 2012 Jan 3;84(1):216-23.
224. Li H, Mager DE, Sandmaier BM, Storer BE, Boeckh MJ, Bemer MJ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of inosine monophosphate dehydrogenase activity in hematopoietic cell transplantation recipients treated with mycophenolate mofetil. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Aug;20(8):1121-9.
225. Maiguma T, Yosida T, Otsubo K, Okabe Y, Sugitani A, Tanaka M, et al. Evaluation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity during maintenance therapy with tacrolimus. *J Clin Pharm Ther.* 2010 Feb;35(1):79-85.
226. Mitsuhashi S, Takenaka J, Iwamori K, Nakajima N, Ubukata M. Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010 Nov 15;18(22):8106-11.
227. Raggi MC, Siebert SB, Steimer W, Schuster T, Stangl MJ, Abendroth DK. Customized mycophenolate dosing based on measuring inosine-monophosphate dehydrogenase activity significantly improves patients' outcomes after renal transplantation. *Transplantation.* 2010 Dec 27;90(12):1536-41.
228. Rath T, Kupper M. Comparison of inosine-monophosphate-dehydrogenase activity in patients with enteric-coated mycophenolate sodium or mycophenolate mofetil after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2009 Jul-Aug;41(6):2524-8.

229. Storck M, Abendroth D, Albrecht W, Sollinger HW. IMPDH activity in whole blood and isolated blood cell fraction for monitoring of CellCept-mediated immunosuppression. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar;31(1-2):1115-6.
230. Vethe NT, Bergan S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit.* 2006 Oct;28(5):608-13.
231. Mino Y, Naito T, Otsuka A, Ozono S, Kagawa Y, Kawakami J. Inosine monophosphate dehydrogenase activity depends on plasma concentrations of mycophenolic acid and its glucuronides in kidney transplant recipients. *Clin Chim Acta.* 2009 Nov;409(1-2):56-61.
232. Citterio-Quentin A, Salvi JP, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase phenotype in human red blood cells using HPLC. *Ther Drug Monit.* 2012 Aug;34(4):477-80.
233. Citterio-Quentin A, Long S, Salvi JP, Moulisma M, Boulieu R. Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase in red blood cells using HPLC: an improved method. *Ther Drug Monit.* 2014 Oct;36(5):689-91.
234. Li F, Fridley BL, Matimba A, Kalari KR, Pelleymounter L, Moon I, et al. Ecto-5'-nucleotidase and thiopurine cellular circulation: association with cytotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2010 Dec;38(12):2329-38.
235. Vikingsson S. Development of new methodology for therapeutic drug monitoring of thiopurine treatment [Medical Dissertations]. Linköping, Sweden: Faculty of Health Sciences; 2012.