



HAL
open science

Etude des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité des médicaments anti-cancéreux : exemples de la trabectedine et des inhibiteurs de tyrosine kinases

Maud Maillard

► To cite this version:

Maud Maillard. Etude des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité des médicaments anti-cancéreux : exemples de la trabectedine et des inhibiteurs de tyrosine kinases. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30098 . tel-03560896

HAL Id: tel-03560896

<https://theses.hal.science/tel-03560896v1>

Submitted on 7 Feb 2022

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Maud MAILLARD

Le 19 octobre 2021

Etude des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité des médicaments anti-cancéreux : exemples de la trabectedine et des inhibiteurs de tyrosine kinases.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Fabienne THOMAS

Jury

M. Philippe POURQUIER, Rapporteur

Mme Geneviève UBEAUD-SEQUIER, Rapporteur

M. Etienne CHATELUT, Examineur

Mme Fabienne THOMAS, Directrice de thèse

Mme Cécile ARELLANO, Membre invité

Remerciements

Aux membres du jury,

À Madame le Professeur Geneviève Ubeaud-Sequier,

Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner cette thèse en tant que rapporteure et de porter un intérêt à ce travail. Vous me faites l'honneur d'être membre de ce jury, voyez ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Philippe Pourquoi,

Je vous remercie d'avoir accepté de rapporter cette thèse. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici la marque de ma profonde gratitude.

À Monsieur le Professeur Etienne Chatelut,

Etienne,

Je vous remercie infiniment de m'avoir acceptée au sein de votre laboratoire pour l'ensemble de mon internat et pour me faire l'honneur de participer à ce jury.

J'en profite pour vous avouer que j'ai dû chercher la définition du mot « opiniâtre » que vous m'avez lancé un lendemain de méthotrexate un peu coriace... Si je ne lâche rien c'est bien parce qu'on me l'a appris, et vous faites partie de ceux-là. Merci pour toute la confiance que vous m'avez accordée pendant ces années.

À Madame le Docteur Fabienne Thomas,

Fabienne,

Je te remercie infiniment de la confiance que tu m'as accordée pour tous ces projets. Je n'aurais pu imaginer mieux que toi pour m'accompagner et me guider pendant ces deux thèses et je te suis extrêmement reconnaissante de tout ce que tu m'as apporté. Je suis admirative de ta rigueur et de ta détermination qui te permettent de mener à bien tous ces projets. J'ai énormément appris auprès de toi, que ce soit sur les plans professionnel et scientifique, mais également personnel, car si aujourd'hui j'ai pu acquérir cette confiance en moi, c'est bien grâce à toi. Je te remercie vraiment pour tout. Trouve ici la marque de ma plus sincère gratitude.

À Madame le Docteur Cécile Arellano,

Cécile,

J'espère que ce travail sur les métabolites est à la hauteur de ce que tu attendais lorsque j'ai pris le relais. Je te remercie vraiment de ta bienveillance, d'avoir pris du temps pour moi et ce projet, de m'avoir aidé et soutenu dans les moments d'incertitude. Vois ici la marque de ma plus profonde reconnaissance.

À Madame le Docteur Chantal Barrin-Le Guellec et Monsieur le Professeur Olivier Fardel,

Je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir fait partie de mon comité de thèse et de m'avoir guidée pendant ces trois années. J'ai pu mener à bout ce travail et ce, en partie, grâce à vos conseils avisés. Veuillez trouver ici la marque de ma plus profonde reconnaissance.

À Madame le Docteur Christine Toulas et toute l'équipe du laboratoire d'Oncogénétique de l'Institut Universitaire du Cancer,

Laure, Emilie, Carine, Domy, Françoise, je ne vous remercierais jamais assez de votre aide et votre gentillesse lorsque je bataillais avec Paulo le séquenceur NGS (R.I.P.) ! Votre bonne humeur fait résonner les couloirs du 3^e étage, et même si parfois on n'a fait que se croiser, merci pour ces quatre années.

Au service de Bio-informatique de l'Institut Universitaire du Cancer,

Tout particulièrement à Manon C., à qui j'ai imposé mes fichiers Excel de 114 989 lignes (mon ex-PC s'en souvient encore) et à Julien P., qui en prenant la suite m'a apporté une aide précieuse.

À Caroline Delmas,

Caro,

Merci de m'avoir formée à mon arrivée, alors que je n'avais que très peu (voire presque jamais !) touché une pipette ! Les librairies NGS nous en auront fait voir de toutes les couleurs, mais ça en valait le coup. Merci pour tout.

À Christelle Vachoux,

Christelle,

Je te remercie grandement pour l'aide que tu m'as apportée sur le projet ITK. Vois ici la marque de ma plus sincère gratitude.

À Manon, Nathalie, Frédéric et Laëtitia du Pôle Technologique du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse,

Merci infiniment de votre gentillesse, votre aide, vos conseils et surtout de m'avoir accepté dans vos locaux pendant ces quatre années ! Je vous en suis extrêmement reconnaissante (et mes cellules aussi). Frédéric, je pense que tout ira mieux avec le spectro quand je serai partie ;-)...

À Madame le Docteur Anne Pradines,

Anne,

Je te remercie de m'avoir donné goût à la recherche à travers mon premier stage de M1 et de m'avoir transmis ta passion pour la cancéro ! Vois ici la marque de ma plus sincère reconnaissance.

À tous les membres du Laboratoire de Biologie Médicale Oncologique de l'Institut Universitaire du Cancer,

Aux techniciennes, techniciens, secrétaires, externes, internes de passage, qualitéciens, AHU, ingénieurs et biologistes, avec qui j'ai partagé un café, échangé des rires, des regards amusés, des soupirs, des banalités sur le temps qu'il fait (*il n'y a plus de saison*), des ragots, des conseils ou simplement quelques mots... Merci pour tout, à tous.

À tous les membres du Service de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Toulouse

À Sylvie, Isabelle, Aurélien, Bettina, Anthony, Sophie S. et Sophie S.-V.

Particulièrement à la Dream Team Génome ! Vous m'avez formée et mise sur le chemin de l'enseignement, j'espère pouvoir poursuivre cette voie et appliquer tout ce que vous m'avez appris et le transmettre à mon tour. Merci infiniment.

À Cathy et Coralie, pour tous ces moments passés en TP (à râler, mais surtout à bien se marrer) ! Je pense que certains étudiants se souviendront de nous...

À tous les membres du Laboratoire de Pharmacologie de l'Institut Universitaire du Cancer et de l'équipe 14/DIAD du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse,

Quatre années parmi vous c'était... 4 Noël à sortir le sapin et éviter la crise d'asthme... 78 start-ups sur le TQS-micro... du méthotrexate, de la DPD et des ITK... 2 cafés par jour pendant 329 jours x 4 (pas la peine de compter ça fait 2632 capsules) ... 8 (ou 12) fois des frites au self et trois repas de labos (fichu Covid, il en manque un !) ... Quatre années c'est trop court ou pile ce qu'il fallait pour me rendre compte que je suis sur la bonne voie !

À Madame le Docteur Mélanie White-Koning,

Mélanie, je suis admirative de tout ce que tu arrives à concilier en l'espace de 24 heures ! Je te remercie pour ta gentillesse, ton aide, tes conseils et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes sollicitations avec bienveillance. Merci pour tout !

À Monsieur le Docteur Ben Allal,

Ben, je te remercie pour toute ton aide et particulièrement pour m'avoir appris à apprivoiser le TQD3. Merci également pour tes conseils sur le post-thèse... que je vais mettre en pratique ;-).

À mes collègues techniciens et assistants ingés

Thierry, Sabrina, Isa L., Aurélie, Malika, Hélène. Il ne me faudra pas un paragraphe immense pour vous dire à quel point vous êtes formidables. J'ai adoré travailler avec vous en tant que collègue interne et doctorante et je n'aurais pas passé autant de temps au labo si je ne m'étais pas sentie aussi bien entourée. Merci infiniment pour ces quatre années à vos côtés !

À tous mes collègues étudiants du CRCT et de l'IUCT... devenus des amis !

Lorraine, tu resteras *the first one for ever* ; **Alicja, Fanny, Marine, Sotheara**, on s'est vu évoluer et grandir ensemble quelques années, et j'ai été ravie de partager un bout de chemin avec vous ; **Félicien**, on a été plus que des collègues, voisins même ! Merci pour ta gentillesse et ton aide dans les moments critiques (tu prendras goût à la génétique, un jour ;-)) ; **Aurélia et Marie ou Marie et Aurélia** [*car on sait Marie que tu vas râler parce que tu n'es pas la first one, mais c'est pas grave on t'aime quand même*]. Merci pour tous ces moments de gloire (souvent arrosés), il y en aura d'autres que ce soit à pied, à vélo ou à l'autre bout du monde ! **Soufyane**, merci pour ta bonne humeur, qui m'a vraiment aidée à ne pas sombrer dans la dépression habituelle de fin de thèse !

À mes amis de la Faculté de Pharmacie de Toulouse,

A Maryam, Marion L., Laura, Marion A., Aurélie, Doyeon, Thi Mai et Marie-Lou.

Huit ans, ça en fait un paquet d'années et je ne peux que vous être reconnaissante de vous avoir eu à mes côtés pendant tout ce temps ! Je vous attends de l'autre côté de l'Atlantique. Merci pour tout, les amis !

A tous ceux que j'oublie sur le moment, que j'ai croisé dans les couloirs de la Fac, de l'IUCT-O, du CRCT, merci à tous !

À ma famille,

À mon oncle Raynald,

Ça y'est, je crois que je viens de terminer le plus long marathon ! Merci de m'avoir entraînée dans ces aventures, de m'avoir donné le goût de l'effort et de la persévérance. Merci pour le soutien pendant toutes ces années !

À mes grands-parents,

Qui s'étonnent toujours d'où vient cette motivation... mais qui sûrement prend ses racines chez vous ! Je vous remercie infiniment d'avoir toujours été là pour moi.

À mes parents,

Papa, Maman, comment vous remercier assez ? Votre soutien et votre amour sont incommensurables ! Vous m'avez appris la rigueur, la détermination et c'est ce qui m'a amenée jusqu'ici. J'espère vous avoir rendus fiers. Je vous aime fort.

À mes sœurs Chloé et Emma, à Steve et Ilana

Vous me manquez tous les jours ! Merci pour tout votre soutien, les virées à Saint Naz', à Porto et à Toulouse ! Je sais que je pourrai toujours compter sur vous et l'inverse est aussi vrai. Je vous aime plus que tout.

Et enfin à Damien,

Je crois que l'on va se souvenir longtemps de l'année 2021 !

Elle n'a que renforcé mon envie d'aller plus loin avec toi, partir à l'aventure sur la route de Memphis et construire ensemble une vie qui nous ressemble. Je t'aime.

Sommaire

Remerciements	3
Liste des figures	15
Liste des tables	15
Glossaire	17
Introduction	19
Partie 1 : Métabolisme et toxicité hépatiques des médicaments	21
1. Généralités sur le métabolisme hépatique des médicaments	21
1.1. Anatomie et physiologie hépatiques	21
1.1.1. Le foie.....	21
1.1.2. Le lobule hépatique	23
1.1.3. Les hépatocytes.....	24
1.2. Acteurs du métabolisme et de l'élimination hépatiques des xénobiotiques	24
1.2.1. Effecteurs enzymatiques.....	25
a. Enzymes de phase I	25
b. Enzymes de phase II.....	28
1.2.2. Transporteurs membranaires hépatiques	29
a. Transporteurs SLC basolatéraux	30
b. Transporteurs d'efflux apicaux	32
c. ABC transporteurs basolatéraux.....	37
1.2.3. Régulation de l'expression des enzymes et transporteurs hépatiques	38
1.3. Variabilité pharmacogénétique appliquée au métabolisme des médicaments.....	40
1.3.1. Généralités et définitions	40
a. Instabilité génétique.....	40
b. Variants pharmacogénétiques.....	41
c. Notions d'haplotypes.....	42
d. Construction des études d'association pharmacogénétiques.....	44

1.3.2.	Variabilité pharmacogénétique des enzymes de phase I et II.....	45
a.	Enzymes de phase I	45
b.	Enzymes de phase II.....	52
c.	Variants de PXR/NR1I2	53
1.3.3.	Variabilité pharmacogénétique des transporteurs ABC	54
a.	MDR1/Pg-P	54
b.	MRP2.....	57
c.	BCRP	58
d.	MRP3.....	59
e.	MRP4.....	60
2.	Hépatotoxicité médicamenteuse	60
2.1.	Définitions et épidémiologie.....	60
2.2.	Mécanismes cellulaires et moléculaires des DILI	62
2.2.1.	Activation métabolique et conséquences intracellulaires.....	63
2.2.2.	Réponse au stress oxydant.....	64
2.2.3.	Effets délétères sur la mitochondrie et le réticulum endoplasmique	65
2.2.4.	Inhibition du transporteur d'acides biliaires BSEP	66
2.2.5.	Activation de la réponse immunitaire.....	66
2.3.	Susceptibilité individuelle à l'hépatotoxicité médicamenteuse	67
2.4.	Manifestations cliniques et biologiques des DILI	68
2.4.1.	Atteintes hépatocellulaires.....	69
2.4.2.	Cholestase médicamenteuse	69
2.4.3.	Atteintes hépatiques mixtes.....	70
2.5.	Diagnostic et traitement des DILI.....	70
2.6.	Modèles d'étude du métabolisme et de la toxicité hépatique	72
2.6.1.	Identification des voies de production des métabolites réactifs	72
2.6.2.	Évaluation de la toxicité hépatique.....	73
a.	Modèles cellulaires	74
b.	Modèles in vivo	77
c.	Méthodes in silico.....	78

Partie 2 : Hépatotoxicité des médicaments cytotoxiques, exemple de la trabectédine 81

1.	Généralités sur la trabectédine	81
1.1.	Origine, structure chimique et mécanisme d'action	81
1.2.	Biomarqueurs pharmacogénomiques associés à la trabectédine	84
1.3.	Indications cliniques	85
1.4.	Propriétés pharmacocinétiques et relations pharmacocinétique-pharmacodynamiques.....	87
1.5.	Métabolisme et élimination hépatique de la trabectédine.....	90
1.5.1.	Métabolisme par les cytochromes P450	90
1.5.2.	Interaction avec les mécanismes de régulation transcriptionnelle.....	94
1.5.3.	Élimination par les transporteurs ABC.....	94
1.6.	Effets indésirables.....	95
1.7.	Mécanisme d'hépatotoxicité de la trabectédine.....	96
2.	Article N°1	100
3.	Discussion et perspectives.....	134

Partie 3 : Hépatotoxicité des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase, exemples du pazopanib et du sunitinib 137

1.	Généralités sur les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase	137
1.1.	Récepteurs à activité tyrosine kinase : structure, activation oncogénique et inhibition	137
1.2.	Généralités sur le pazopanib	140
1.2.1.	Structure et relations structure-activité.....	140
1.2.2.	Propriétés physico-chimiques et stabilité	141
1.2.3.	Propriétés pharmacodynamiques	142
1.2.4.	Indications cliniques	143
1.2.5.	Effets indésirables.....	145
1.2.6.	Propriétés pharmacocinétiques	147
1.2.7.	Interactions médicamenteuses	151
1.2.8.	Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques.....	152
1.3.	Généralités sur le sunitinib	153
1.3.1.	Structure et relations structure-activité.....	153
1.3.2.	Propriétés physico-chimiques et stabilité	154

1.3.3.	Propriétés pharmacodynamiques	154
1.3.4.	Indications cliniques	155
1.3.5.	Effets indésirables.....	156
1.3.6.	Propriétés pharmacocinétiques	157
1.3.7.	Interactions médicamenteuses	159
1.3.8.	Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques.....	160
1.4.	Rôle des métabolites réactifs dans l'hépatotoxicité et les interactions médicamenteuses liés au pazopanib et au sunitinib.....	161
1.4.1.	Métabolisation du pazopanib et du sunitinib en métabolites réactifs.....	161
1.4.2.	Rôle des aldéhydes dans la toxicité des médicaments.....	166
1.4.3.	Mécanismes d'hépatotoxicité des ITK : dommages intracellulaires liés à la production de métabolites toxiques	168
2.	Article n°2	175
3.	Discussion et perspectives.....	216
	<i>Conclusion générale</i>	219
	<i>Travaux supplémentaires</i>.....	221
	<i>Références</i>	223

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des lobes et segments hépatiques et vascularisation hépatobiliaire, d'après Shin et al. ³	21
Figure 2 : Illustration du lobule hépatique (adaptée de <i>Histology : A Text and Atlas, With Correlated Cell and Molecular Biology</i> , 8 ^e édition ⁵).....	22
Figure 3 : Représentation schématique du métabolisme hépatocytaire des médicaments.....	25
Figure 4 : Structure de l'hème et cycle catalytique des CYP450, d'après Dubey et al. ¹¹	27
Figure 5 : Transporteurs membranaires hépatiques basolatéraux impliqués dans l'influx des médicaments .	31
Figure 6 : Structure et conformation de la P-gp et principaux polymorphismes, d'après Kim et Chen ⁶¹	34
Figure 7 : Structure des transporteurs membranaires d'efflux	35
Figure 8 : Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du métabolisme, d'après Wada et al. ⁸³ ...	39
Figure 9 : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les DILI idiosyncratiques, d'après Villanueva-Paz et al. ²²⁸	63
Figure 10 : Structure, conformation et réactivité de la trabectédine, d'après d'Incalci et al. ²⁷⁶	82
Figure 11 : Profil métabolique de la trabectédine proposé par Vermeir et al. ³¹¹	92
Figure 12 : Mécanisme d'activation d'un RTK, d'après Blume-Jensen ³⁵³	138
Figure 13 : Structure chimique du pazopanib ou 5-[[4-[(2,3-diméthylindazol-6-yl)-méthylamino]pyrimidin-2-yl]amino]-2-méthylbenzenesulfonamide (C ₂₁ H ₂₃ N ₇ O ₂ S)	141
Figure 14 : Voies de métabolisation du pazopanib d'après Wang et al. ³⁸⁰ et Paludetto et al. ³⁸¹	150
Figure 15 : Structure chimique du sunitinib SU11248 ou N-[2-(diéthylamino)-éthyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidène)méthyl]-2,4-diméthyl-1H-pyrrole-3-carboxamide (C ₂₂ H ₂₇ N ₄ O ₂)	153
Figure 16 : Voies de métabolisation du sunitinib tirées des travaux de Speed et al. ³⁹⁸ , Amaya et al. ³⁹⁷ et Paludetto et al. ³⁸¹	158
Figure 17 : Fonctionnement et évaluation de la respiration mitochondriale.....	169

Liste des tables

Table 1 : Principaux variants pharmacogénétiques des enzymes du métabolisme hépatique	46
Table 2 : Principaux variants pharmacogénétiques des transporteurs d'efflux hépatiques	55
Table 3 : Avantages et inconvénients des modèles cellulaires utilisés pour l'étude des DILI	76

Glossaire

ABC <i>ATP-binding cassette transporter</i>	GIST <i>tumeur gastro-intestinale stromale</i>
ABT <i>aminobenzotriazole</i>	GST <i>glutathion-S-transférase</i>
ADN <i>acide désoxyribonucléique</i>	HHP <i>hépatocyte humain primaire</i>
AINS <i>anti-inflammatoires non stéroïdiens</i>	HLA <i>human leukocyte antigen</i>
ALT <i>alanine aminotransférase</i>	HMGB1 <i>high mobility group box 1</i>
ARE <i>antioxydant response element</i>	HO-1 <i>hème oxygénase 1</i>
AST <i>aspartate aminotransférase</i>	HR <i>hazard ratio</i>
AUC <i>aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps</i>	HSP <i>heat shock protein</i>
BCRP <i>Breast Cancer Resistance protein</i>	HTA <i>hypertension artérielle</i>
BER <i>base excision repair</i>	ICH <i>International Conference on Harmonization guidelines</i>
BRCA <i>breast cancer protein</i>	ITK <i>inhibiteur de récepteur à activité tyrosine kinases</i>
BSEP <i>bile salt export pump</i>	K.-O. <i>knock-out</i>
BSO <i>L-buthionine-sulfoximine</i>	LD <i>linkage disequilibrium</i>
CAR <i>constitutive androstane receptor</i>	LMC <i>leucémie myéloïde chronique</i>
C_{max} <i>concentration plasmatique maximale</i>	MAF <i>minor allele frequency</i>
CMH <i>complexe majeur d'histocompatibilité</i>	MATE1 <i>multidrug and toxin extrusion protein 1</i>
CNV <i>copy number variation</i>	MMR <i>mismatch repair</i>
CV <i>coefficient de variation</i>	MSD <i>membrane spanning domain</i>
DAMPs <i>danger-associated molecular patterns</i>	NAPQI <i>N-acétyl benzoquinoneimine</i>
DILI <i>drug-induced liver injury</i>	NAT <i>N-acétyltransférase</i>
EMA <i>European Medicine Agency</i>	NBD <i>nucleotide-binding domain</i>
ERCC <i>excision repair 1, endonuclease non- catalytic subunit</i>	NCI-CTCAE <i>National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
FMO <i>flavine mono-oxygénase</i>	

NER <i>nucleotide excision repair</i>	ROS <i>reactive oxygen species</i>
NK <i>natural killer</i>	RUCAM <i>Roussel Uclaf Causality Assessment Method</i>
NQO-1 <i>NADPH quinone oxydoréductase 1</i>	RXR <i>retinoid X receptor</i>
NTCP <i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>	SCRH <i>sandwich-cultured primary rat hepatocytes</i>
OAT <i>organic anions transporter</i>	SDS <i>soins de support</i>
OATP <i>organic anion transporter polypeptide</i>	SH2 <i>Src-homology 2</i>
OCT <i>organic cations transporters</i>	SLC <i>solute carrier transporter</i>
OS <i>overall-survival</i>	SNP <i>single nucleotide polymorphism</i>
PAL <i>phosphatase alcaline</i>	SOD <i>superoxyde dismutase</i>
PD <i>pharmacodynamique</i>	STMA <i>sarcome des tissus mous avancés</i>
PFS <i>progression-free survival</i>	SULT <i>sulfotransférase</i>
PG <i>pharmacogénétique</i>	t_{1/2} <i>temps de demi-vie</i>
P-gp <i>permeability glycoprotein/glycoprotéine P</i>	TLR <i>toll-like receptor</i>
PK <i>pharmacocinétique</i>	TNF <i>tumor necrosis factor</i>
pO₂ <i>pression partielle en oxygène</i>	TRAIL <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
PRR <i>pattern-recognition receptor</i>	UGT <i>uridine diphosphoglucuronosyl-transférase</i>
PTB <i>phospho-tyrosine binding</i>	UPR <i>unfolded protein response</i>
PXR <i>pregnane-X-receptor</i>	UTR <i>untranslated region</i>
rCYP <i>CYP450 recombinant</i>	XPG <i>xeroderma pigmentosum complementation group G</i>
REL <i>réticulum endoplasmique lisse</i>	XRE <i>xenobiotic response element</i>
RER <i>réticulum endoplasmique rugueux</i>	γ-GT <i>gamma-glutamyl transférase</i>
RH <i>recombinaison homologue</i>	
RMN <i>résonance magnétique nucléaire</i>	

Introduction

Les DILI (*drug-induced liver injuries*), ou hépatotoxicités médicamenteuses, sont des événements indésirables caractérisés par des lésions affectant l'ensemble de la structure hépatique consécutives à la prise d'un médicament. Peu fréquentes, leur incidence est estimée entre 1/10 000 et 1/100 000 individus selon les molécules et elles sont la première cause de retrait des médicaments du marché. Parfois létales et à l'origine de près de 50% des cas d'hépatites fulminantes, les DILI sont un problème majeur en termes de sécurité du patient et de coût de prise en charge. Les mécanismes soutenant leur apparition ne sont pas encore entièrement élucidés et du fait de leur origine multifactorielle, elles n'ont pas de signature clinico-biologique spécifique. Par ailleurs, leur intensité peut être variable et se révéler confondante pour le diagnostic. Enfin, leur caractérisation est compliquée par la large variété de médicaments incriminables, à laquelle s'ajoutent les nombreux facteurs qui participent à la variabilité interindividuelle appliquée à la réponse aux médicaments.

En étant situé au carrefour de la circulation sanguine, le foie est l'organe privilégié pour le métabolisme et l'élimination des médicaments après leur absorption. Néanmoins, ce rôle central l'expose aussi au risque de lésions causées par les xénobiotiques ou leurs métabolites toxiques formés par des enzymes hépatiques et pris en charge par les transporteurs membranaires.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif la compréhension des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité médicamenteuse. Deux approches indépendantes ont été mises en place pour répondre à cet objectif : clinique, par la mesure de l'impact des variants génétiques dans la survenue de ces effets indésirables ; biologique, par l'étude *in vitro* des mécanismes fonctionnels hépatocytaires soutenant leur apparition.

Ce manuscrit est composé de trois parties. Un travail de synthèse bibliographique introduisant le métabolisme des médicaments et les mécanismes impliqués dans leur toxicité hépatique sera suivi de travaux personnels divisés en deux parties : la première correspond à une étude pharmacogénétique qui

a été menée dans l'objectif d'identifier des polymorphismes de gènes du métabolisme et de l'élimination de la trabectedine, une molécule cytotoxique utilisée pour le traitement des sarcomes des tissus mous avancés. Des variations des gènes codant pour les enzymes et les transporteurs hépatocytaires impliqués dans l'élimination de cette molécule et/ou la formation de métabolites toxiques pourraient contribuer à la variabilité interindividuelle appliquée à l'effet hépatotoxique. Les résultats obtenus s'inscrivent dans une démarche d'individualisation de traitement fondée sur l'utilisation de tests pharmacogénétiques.

La deuxième partie exposera les résultats d'une étude biologique des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité du pazopanib et du sunitinib, deux inhibiteurs de tyrosine kinase utilisées pour le traitement du carcinome rénal métastatique. Ces travaux reposent sur des résultats précédemment publiés par notre équipe et pour lesquels mener une étude *in vitro* constituait une suite cohérente et qui s'inscrit dans un projet global d'étude des métabolites issus de la biotransformation des ITK. A l'aide de modèles hépatocytaires, l'étude de la toxicité de deux métabolites réactifs de ces deux molécules a permis d'évaluer leur rôle dans l'apparition des effets indésirables mais également d'apporter des données pour la compréhension des mécanismes à l'origine des interactions médicamenteuses impliquant les cytochromes P450 décrites pour le pazopanib et le sunitinib.

Partie 1 : Métabolisme et toxicité hépatiques des médicaments

1. Généralités sur le métabolisme hépatique des médicaments

1.1. Anatomie et physiologie hépatiques

1.1.1. Le foie

Situé dans l'espace inférieur droit diaphragmatique, le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme et représente près de 2,5% du poids total d'un individu¹. Il est divisé anatomiquement par trois fissures qui définissent quatre lobes de taille et de forme variables (Figure 1) : le lobe droit (le plus large), le lobe gauche, le lobe carré et le lobe caudé eux-mêmes divisés en huit segments, chacun alimenté par une double irrigation sanguine responsable des apports en oxygène et nutritifs². Au repos, le foie est traversé par 1,4 L de sang par minute chez un adulte, soit 25% du flux sanguin total².

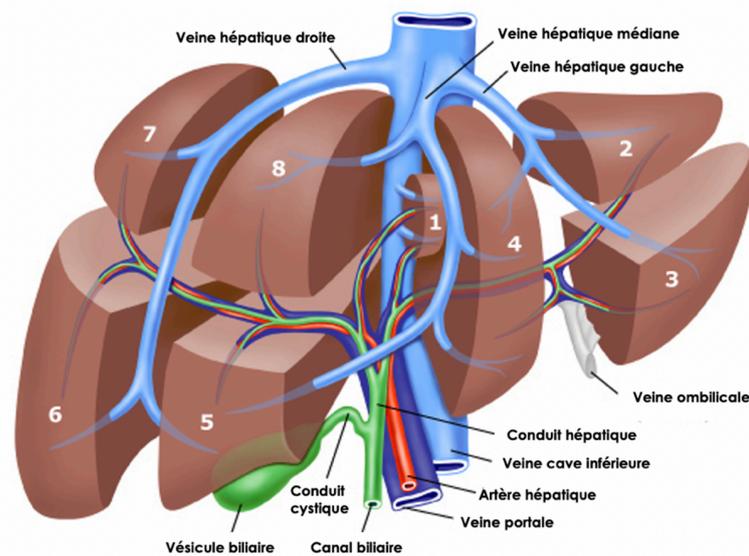


Figure 1 : Représentation des lobes et segments hépatiques et vascularisation hépatobiliaire, d'après Shin et al.³

Les échanges au sein des unités structurales et fonctionnelles, appelées lobules hépatiques (Figure 2), sont possibles grâce à un réseau de capillaires sinusoïdaux issus de la veine porte et de l'artère hépatique⁴. Parallèlement au flux sanguin, le foie contient un réseau de voies biliaires transportant la bile jusqu'au canal hépatique commun. Celui-ci forme, avec le canal cystique issu de la vésicule biliaire, le canal cholédoque qui débouche directement dans le duodénum pour l'élimination des déchets hépatobiliaires².

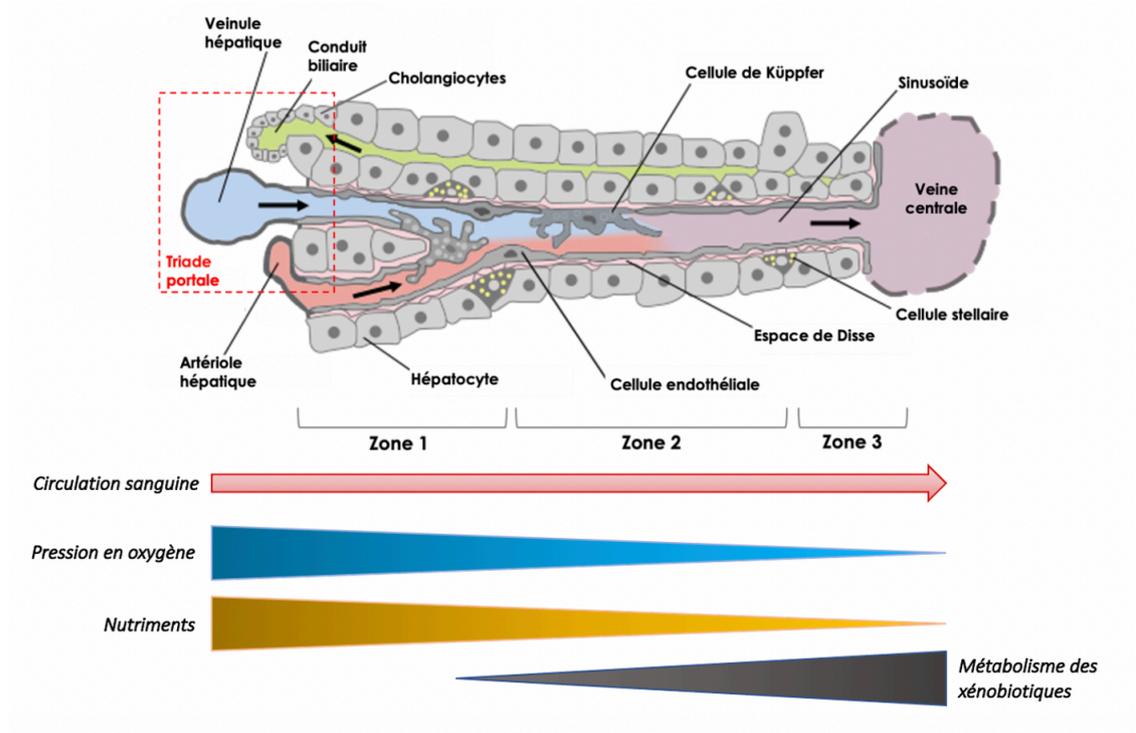


Figure 2 : Illustration du lobule hépatique (adaptée de *Histology : A Text and Atlas, With Correlated Cell and Molecular Biology*, 8^e édition⁵)

Cet organe polyvalent possède diverses fonctions essentielles de détoxification, de production et de sécrétion de composés sanguins et biliaires. Il est également impliqué dans le métabolisme des protéines, des stéroïdes et des lipides, et dans le stockage des vitamines, du fer et des glucides sous la forme de glycogène⁶. Le parenchyme hépatique est majoritairement composé d'hépatocytes (ils représentent 80% du volume hépatique) qui fonctionnent en étroite collaboration avec d'autres cellules engagées dans la structure, l'intégrité et la régulation des fonctions hépatiques (Figure 2)^{1,6} : les cholangiocytes, qui sont

des cellules épithéliales formant les canalicules biliaires et permettant le transport de la bile ; les cellules endothéliales, qui participent au contrôle du débit sanguin et à la formation des zones parenchymateuses du lobule hépatique ; les cellules sinusoïdales spécialisées dans les échanges entre les capillaires et les hépatocytes ; des macrophages résidents (ou cellules de Küpffer) ; et enfin les cellules stellaires impliquées dans la synthèse de la matrice extracellulaire entre autres⁶.

1.1.2. *Le lobule hépatique*

Le lobule hépatique est une structure hexagonale traversée verticalement par une veine centrale et dont chaque sommet est organisé autour d'une triade portale. Celle-ci est composée de branches interlobulaires issues de l'artère hépatique, de la veine porte et du canalicule biliaire^{4,6} (Figure 2). Les travées d'hépatocytes qui forment l'acinus hépatique sont irriguées par des capillaires sinusoïdaux reliant cette triade jusqu'à la veine centrale qui débouche sur la veine hépatique. Cet arrangement particulier des cellules autour de la microvascularisation sanguine ainsi que la bidirectionnalité des flux sanguins et biliaires créent des zones microenvironnementales uniques au sein des lobules⁶. Cette architecture complexe permet de former un gradient de concentration d'oxygène, de nutriments et d'autres composés le long des capillaires sinusoïdes. Ce phénomène de « zonation » permet de distinguer trois régions hépatocytaires issues des mécanismes de différenciation cellulaire liés à l'expression génique. Ainsi, la région périportale (zone 1, au niveau de la triade portale) est principalement impliquée dans le métabolisme énergétique oxydatif (avec une pression partielle en oxygène, pO_2 , élevée) puisque les hépatocytes sont en contact direct avec la circulation entéro-hépatique *via* la veine porte². Les hépatocytes de la zone 3 péricentrale ou périveineuse (pO_2 plus faible), constituent le principal lieu de métabolisation des xénobiotiques⁷. Enfin, la zone 2 correspond aux hépatocytes à fonction mixte situés dans la région intermédiaire lobulaire^{2,6}.

1.1.3. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules polarisées impliquées dans la plupart des fonctions hépatiques : la sécrétion biliaire, le métabolisme et le stockage des lipides, des glucides et enfin la détoxification de composés endogènes et exogènes qui traversent le foie^{1,4}. Leur membrane basolatérale est directement en contact avec les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques et permet les échanges avec la circulation sanguine, tandis que la membrane apicale permet l'élimination des composés vers le canalicule biliaire¹.

Au sein des travées hépatocytaires, l'hétérogénéité fonctionnelle entre les hépatocytes est liée à leur composition en organites intracellulaires⁶. La richesse en mitochondries dans les hépatocytes de la zone 1 leur apporte de forts taux d'énergie sous forme d'ATP essentiels aux processus métaboliques tels que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras⁶. La présence de réticulum endoplasmique de type rugueux riche en ribosomes (RER) dans le cytoplasme est corrélée à l'importante fonction de production et de sécrétion de protéines par l'hépatocyte⁶. Le réticulum endoplasmique lisse (REL) est quant à lui riche en microsomes contenant des enzymes de type CYP450 impliqués dans la détoxification des composés endogènes (comme la bilirubine ou les acides biliaires) et les xénobiotiques.

1.2. Acteurs du métabolisme et de l'élimination hépatiques des xénobiotiques

La polarisation, la composition et la fonction des différentes membranes hépatocytaires sont essentielles à l'absorption, au métabolisme et à l'élimination des xénobiotiques tels que les médicaments, qu'ils soient éliminés sous forme inactive ou bioactivés dans le cas de pro-drogues (10% des médicaments sur le marché⁸). Ces phases sont initiées par le transport de la molécule dans l'hépatocyte (phase 0) au travers de la membrane basolatérale suivi par deux phases de métabolisation impliquant des effecteurs spécifiques : les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation et les enzymes de phase II, dites

de conjugaison (Figure 3). La phase III correspond à l'élimination de ces métabolites plus hydrosolubles hors de la cellule, directement dans la bile ou dans la circulation sanguine⁹.

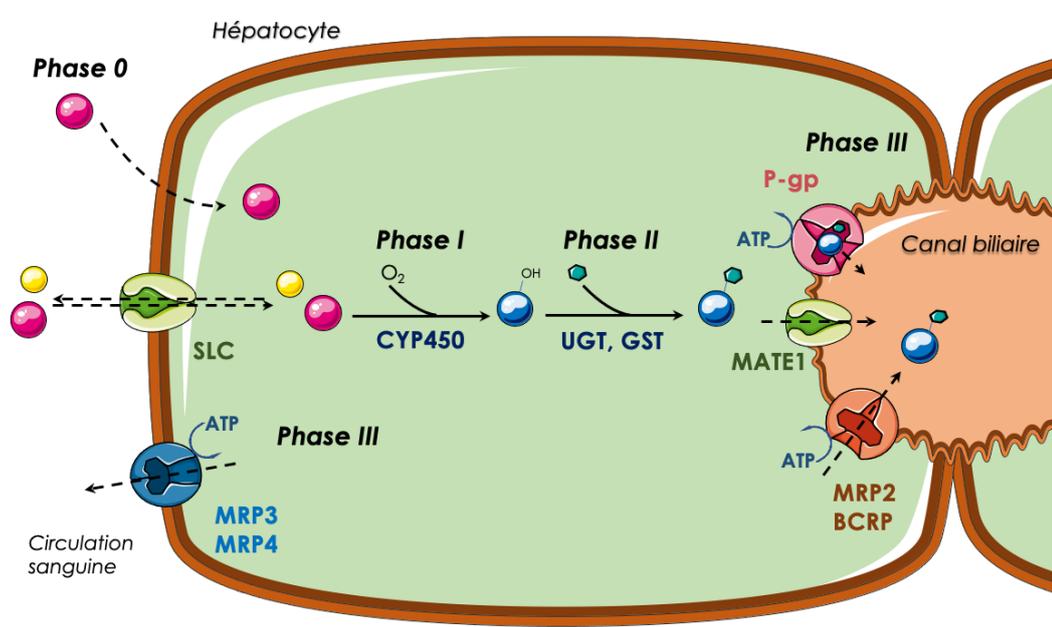


Figure 3 : Représentation schématique du métabolisme hépatocytaire des médicaments

ATP : adénosine triphosphate ; BCRP : *breast cancer resistance protein* ; CYP450 : cytochrome P450 ; GST : glutathion-S-transférase ; MATE : *multidrug and toxin extrusion protein* ; MRP : *multidrug resistance-associated protein* ; P-gp : glycoprotéine P ; SLC : *solute carrier transporter* ; UGT : UDP-glycosyltransférase

1.2.1. Effecteurs enzymatiques

a. Enzymes de phase I

La majorité des réactions de phase I, ou de fonctionnalisation des médicaments, sont catabolisées par la superfamille des cytochromes P450 (CYP450) qui comptent pour près de 70 à 80% des enzymes du métabolisme des xénobiotiques¹⁰. Exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de l'organisme,

les CYP450 sont des monooxygénases hémiques intégrées dans la bicouche phospholipidique du réticulum endoplasmique et qui fonctionnent grâce au transfert de deux protons et de deux électrons issus d'un NADPH par l'intermédiaire d'un coenzyme qui est la NADPH-CYP450 oxydoréductase¹¹. Ces enzymes sont alors capables d'incorporer un atome d'oxygène issue d'une molécule d'O₂, l'autre oxygène étant éliminé sous la forme d'une molécule d'eau. Ainsi, elles exercent des fonctions d'oxydoréduction sur des groupements aliphatiques ou aromatiques (hydroxylation et époxydation), mais également de dé-fonctionnalisation (N-, O-, S-déalkylations, et oxydations), de déméthylation, ou encore de déamination oxydative¹². Leur structure est composée d'un groupement prosthétique tétrapyrrolique relié à un atome central de fer ferrique Fe^{III} pentacoordonné au niveau du site catalytique¹¹ (Figure 4). En l'absence de substrat, les ligands de cet atome de Fe^{III} sont les quatre atomes d'azote de la porphyrine (protoporphyrine IX), un atome de soufre issu d'un résidu cystéine de l'apoprotéine et une molécule d'eau¹¹. Le cycle d'oxydation des CYP450 est initié lors de l'interaction entre le substrat (RH) le site actif de l'enzyme situé à proximité de l'hème. Cette interaction induit un changement de conformation de la protéine, la libération d'une molécule d'eau et la réduction de l'atome de fer en Fe^{II} qui se lie à l'oxygène moléculaire sous la forme Fe^{III} (Figure 4, étapes I à IV)¹³. Une seconde réduction mono-électronique (étape V) de ce complexe génère un intermédiaire Fe-O-O⁻, nucléophile, dont la double protonation (étapes VI et VII) élimine une molécule d'eau et permet à l'espèce très réactive Fe^{IV}=O d'interagir avec le substrat et de lui transférer un oxygène. Le Fe^{III} peut ainsi accepter une nouvelle molécule d'eau pour un retour à la configuration initiale (étape VIII)¹¹.

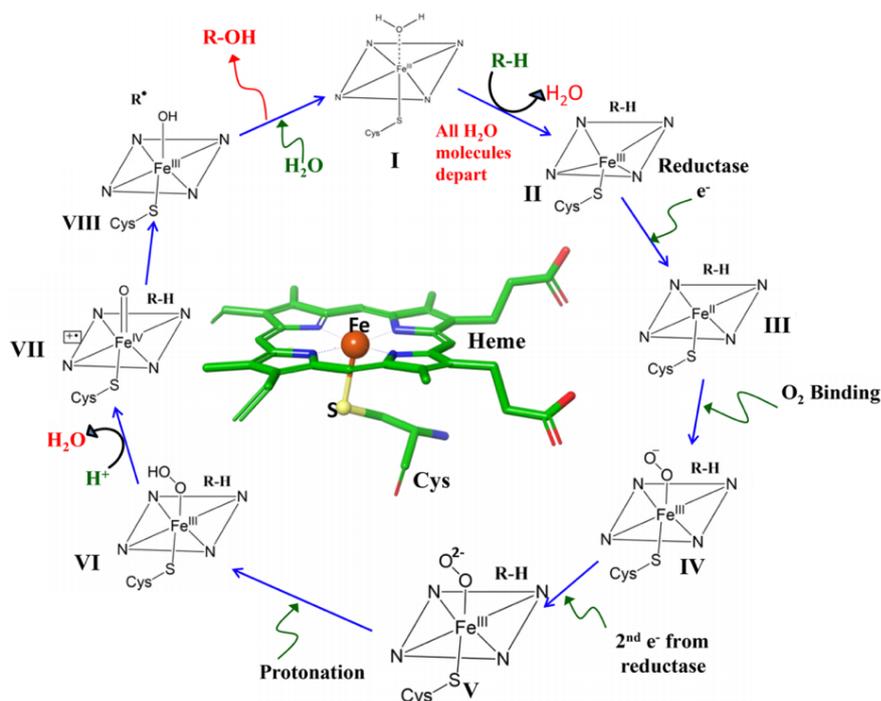


Figure 4 : Structure de l'hème et cycle catalytique des CYP450, d'après Dubey et al.¹¹

Les produits de ces réactions – plus polaires que la molécule mère grâce aux groupements oxygénés – peuvent être éliminés directement (phase III) ou subir une réaction de conjugaison à des groupements hydrophiles (comme l'acide β -glucuronique ou le glutathion) si la solubilité dans le cytosol est insuffisante, ou la réactivité des métabolites trop importante (phase II)¹⁴.

Près de 57 gènes sont impliqués dans l'expression des 18 familles et 42 sous-familles de CYP450¹⁵. Les enzymes appartenant aux sous-familles CYP1 à CYP4 sont majoritairement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et présentent une certaine redondance et un chevauchement de spécificité de substrat entre elles. Les autres cytochromes sont impliqués dans des fonctions multiples, comme la synthèse du cholestérol, des hormones corticostéroïdes et sexuelles, des acides biliaires ou encore de l'acide rétinoïque¹⁰. Proportionnellement, l'enzyme majoritairement impliquée dans la biotransformation des médicaments est le CYP3A4 (30%) suivi des CYP2C8/9 (18%), du CYP2D6 (2 à 6%), du CYP2C19 (1 à 10%), du CYP1A2 (1 à 13%), et du CYP2E1 (7%)¹⁵.

Bien qu'ubiquitaire au sein de l'organisme, l'expression de ces protéines est tissu- et espèce-dépendante. Elle est également exposée à une forte variabilité interindividuelle qui dépend de plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, l'état physiopathologique, le patrimoine génétique, mais aussi environnementaux comme la prise d'alcool par exemple¹⁵. Des variations quantitatives et qualitatives ont notamment été relevées selon l'âge des individus et particulièrement lors du développement fœtal où les isoenzymes de la famille CYP2C sont absentes tandis que d'autres sont ensuite réprimées à l'âge adulte¹⁶. Bien que chez le rat d'importantes différences entre femelle et mâle aient déjà été relevées pour le métabolisme des médicaments¹⁷, l'extrapolation de ces observations chez l'Homme n'est pas aussi évidente¹⁸. Certaines données suggèrent que les activités du CYP2E1 et du CYP1A2 sont plus importantes chez les hommes que les femmes, alors que les isoformes CYP3A semblent être plus actives chez la femme¹⁹. Cependant, au vu de la complexité du métabolisme des xénobiotiques et des mécanismes de régulation qui lui sont associés, il n'est pas possible d'établir le genre comme unique déterminant de l'activité des CYP450. Certaines pathologies, liées ou non à la fonction hépatique (insuffisance hépatique, diabète, insuffisance thyroïdienne ou rénale) peuvent aussi affecter la quantité de CYP450 de l'organisme et chez les patients insuffisants hépatiques les enzymes CYP2C, CYP3A4 et 2E1 peuvent être totalement absentes et entraîner une diminution drastique de la capacité de métabolisation de l'organisme²⁰.

b. Enzymes de phase II

Les enzymes de phase II interviennent à la suite des CYP450 et sont pour la plupart des transférases ayant la capacité de fixer un groupement hydrophile sur leurs substrats afin de les rendre plus hydrosolubles²¹. Plusieurs familles de transférases existent, toutes caractérisées par la nature du groupement qu'elles fixent à partir de leur cofacteur. La conjugaison des xénobiotiques avec l'acide β -glucuronique est la plus fréquente des réactions de la phase II et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) sont co-exprimées dans le réticulum endoplasmique avec les CYP450, permettant ainsi la formation rapide des

dérivés conjugués à un groupement uridine-diphosphatidylglucuronyle. Les glutathion-S-transférases (GST) cytosoliques sont caractérisées par leur capacité à transférer une molécule de glutathion sur des dérivés aromatiques halogénés ou des groupements peroxydes. D'autres enzymes telles que les sulfotransférases (SULT) et les N-acétyltransférases (NAT) sont aussi impliquées dans la conjugaison des xénobiotiques²².

1.2.2. *Transporteurs membranaires hépatiques*

L'efficacité de transport au travers de la membrane hépatocytaire est étroitement liée aux caractéristiques physico-chimiques de la molécule et particulièrement à sa polarité. Les molécules non chargées et très hydrophobes traverseront cette bicouche phospholipidique aisément par diffusion passive⁶, tandis que les petites molécules ioniques pénétreront dans l'hépatocyte grâce à des canaux transmembranaires en fonction d'un gradient de concentration. Des transporteurs membranaires spécifiques permettent le transport facilité des xénobiotiques plutôt hydrophiles (Figure 3)⁶. Le transport actif est utilisé pour le transport de molécules volumineuses et deux catégories se distinguent selon leur mode de fonctionnement primaire ou secondaire⁶. Le transport primaire permet le passage (l'entrée ou l'excrétion) de molécules contre leur gradient de concentration en utilisant de l'énergie apportée sous la forme d'ATP : c'est le cas des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette transporters*)²³. Le transport actif secondaire, qui concerne les transporteurs de la famille des SLC (*solute carrier transporters*), correspond à un système de co-transport avec un ion ou un système de transport antiport qui permet l'élimination d'un composé intracellulaire en échange de l'entrée d'une molécule²³.

a. Transporteurs SLC basolatéraux

Les transporteurs d'influx hépatiques appartiennent majoritairement à la superfamille des SLC qui compte près de 65 familles de gènes et rassemble près de 458 protéines^{24,25}. Ces transporteurs sont classés selon la nature de leurs substrats (ions, acides aminés, xénobiotiques, macromolécules endogènes...) et sont situés sur les membranes de nombreux types cellulaires (hépatiques, rénaux, intestinaux...) et d'organites intracellulaires comme les mitochondries²⁴. Les familles SLC21/SLCO (ou transporteurs OATP *organic anion transporters polypeptides*) sont les protéines les plus abondamment exprimées au niveau de la membrane basolatérale. La famille SLC22 rassemble les transporteurs d'anions et de cations organiques OAT et OCT (*organic anions/cations and zwitterions transporters*) et le transporteur NTCP (*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*) appartient à la famille SLC10²⁴. Enfin, la sous-famille SLC47 (incluant MATE1, *multidrug and toxin extrusion protein 1*) est – contrairement aux autres transporteurs SLC hépatocytaires – exprimée au pôle canaliculaire des hépatocytes²⁶.

- Famille SLCO/OATP

Les transporteurs de la famille SLCO/OATP sont des protéines de 650 à 700 acides aminés et présentent près de 30% d'homologie entre les onze isoformes identifiées²⁷. Leur structure comporte 12 domaines transmembranaires dont les extrémités C- et N-terminales sont situées côté cytosolique (Figure 5). OATP1B1 (*SLCO1B1*) et OATP1B3 (*SCLCO1B3*) sont présents quasi-exclusivement au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes²⁸. Ils sont accompagnés d'OATP2B1 (*SLCO2B1*) qui exerce aussi sa fonction dans d'autres tissus tels que le placenta^{29,30}.

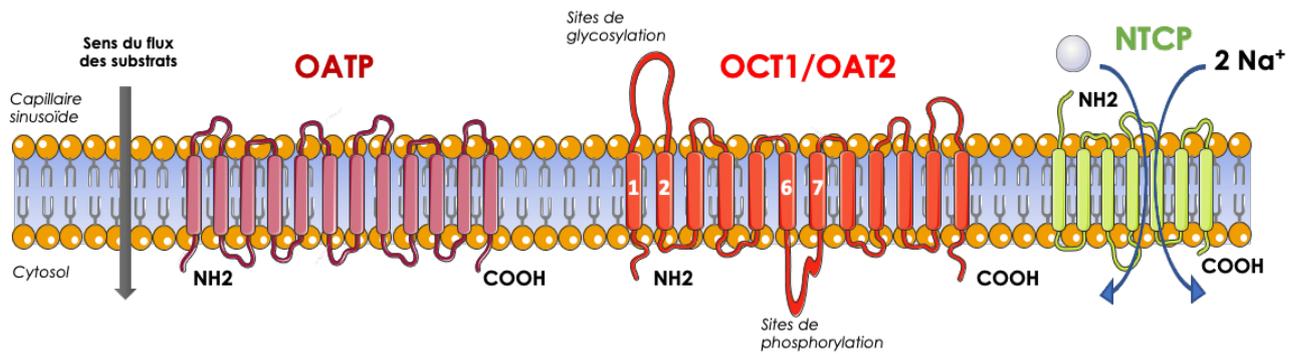


Figure 5 : Transporteurs membranaires hépatiques basolatéraux impliqués dans l'influx des médicaments

Ces transporteurs fonctionnent de manière bidirectionnelle et co-transportent des molécules volumineuses et amphiphiles, comme des anions organiques et un grand nombre de médicaments en échange de molécules endogènes éliminées hors de la cellule comme le glutathion ou des ions bicarbonates^{27,31}. La forte homologie de séquence protéique qui existe entre OATP1B1 et OATP1B3 leur permet de partager certains substrats conjugués comme la bilirubine, des acides biliaires, des hormones thyroïdiennes, certaines prostaglandines, ou des dérivés œstrogéniques^{27,29}. Les statines (molécules inhibitrices de l'HMG-CoA réductase) sont d'importants substrats de ces transporteurs³², tout comme le méthotrexate, un anticancéreux très utilisé en oncologie ou à doses plus faibles dans le cas de maladies inflammatoires auto-immunes^{31,33}.

- Famille SLC22/OCT, OAT

Les transporteurs d'ions organiques SLC22 sont exprimés sur la membrane sinusoidale des hépatocytes. Cette famille comprend les transporteurs d'anions organiques (OATs) et de cations (OCTs) qui sont des protéines complexes constituées de 12 hélices transmembranaires³⁴. Leur particularité réside dans la présence de larges boucles extra- et intracellulaires contenant des résidus d'acides aminés pouvant être glycosylés et phosphorylés^{34,35}. OAT2 (codé par le gène *SLC22A7*) est exprimé au niveau rénal

et hépatique et permet l'import de nombreuses molécules endogènes telles que des acides aminés, des dérivés de bases puriques, des hormones et des prostaglandines³¹. Il transporte également les formes anioniques de certains médicaments (salicylates, érythromycine, tétracyclines, 5-fluorouracile et capécitabine, paclitaxel, méthotrexate, allopurinol...^{31,36}). OCT1 (*SLC22A1*) permet le transport poly spécifique de nombreuses molécules endogènes neuromodulatrices (comme la sérotonine ou la dopamine) et des molécules exogènes comme la metformine, le tramadol, certains anti(rétro)viraux et certains anti-cancéreux comme l'oxaliplatine, l'irinotécan et le paclitaxel³⁶. Cependant, de nombreuses molécules sont à la fois substrats et inhibitrices du transporteur comme la fluoxétine, l'imatinib ou le vérapamil exposant à un risque important d'interactions médicamenteuses³⁷.

- Famille SLC10/NTCP

NTCP (*SLC10A1*) est un co-transporteur sodium/sels biliaires à 7 domaines transmembranaires situé sur la membrane basolatérale des hépatocytes³⁸. Peu de substrats ont été identifiés pour ce transporteur³⁹ mais des études ont montré qu'il pouvait être fortement inhibé par des hypolémiantes, des antihypertenseurs, ou des anti-inflammatoires dérivés de glucocorticoïdes, exposant l'organisme à un risque d'accumulation de sels biliaires toxiques⁴⁰.

b. Transporteurs d'efflux apicaux

- MDR1/Glycoprotéine P, P-gp

La protéine MDR1, appelée aussi glycoprotéine P ou P-gp (pour *Permeability glycoprotein*), est le transporteur le plus étudié de la famille ABC. Identifiée en 1976 par Juliano et Ling⁴¹, cette glycoprotéine transmembranaire a été caractérisée par sa capacité à procurer une résistance à la colchicine et à

d'autres macromolécules amphiphiles à des cellules épithéliales d'ovaire d'hamster chinois. Ce transporteur ATP-dépendant a la particularité d'être exprimé à la surface membranaire de nombreux types cellulaires soulignant l'importance de son rôle dans la distribution et l'élimination de ses substrats endogènes et des xénobiotiques^{42,43}.

Majoritairement retrouvée au niveau de l'épithélium intestinal, elle y est co-exprimée avec le CYP3A4, ce qui leur permet d'agir en synergie pour l'élimination de substances toxiques^{44,45}. Au niveau hépatique, son expression est soumise à une large variabilité interindividuelle pouvant modifier la biodisponibilité de nombreux médicaments⁴⁶. La P-gp agit également comme un protecteur du système nerveux central^{46,47}, diminue le risque d'exposition fœtale en étant fortement exprimée au niveau placentaire⁴⁸ et est également retrouvée à la surface des cellules endothéliales des tubules rénaux⁴⁹ et des précurseurs hématopoïétiques⁵⁰. De nombreuses études *in vitro* et cliniques ont permis de déterminer le rôle de la P-gp dans la résistance de certaines lignées cancéreuses⁵¹⁻⁵⁴ et des approches de co-administration de petites molécules inhibitrices de la P-gp avec des cytotoxiques ont été envisagées afin d'optimiser l'effet anti-tumoral de ces derniers^{55,56}.

Cette protéine de 170 kDa est composée de 2 domaines transmembranaires homologues comportant 6 hélices associées pour former un monomère unique⁵⁷ (Figure 6). La première boucle extracellulaire présente trois résidus d'aspartate glycosylés permettant de stabiliser la P-gp dans la membrane plasmique. Deux domaines cytoplasmiques de liaison à l'ATP ou NBD (*Nucleotide-Binding Domain*), très conservés entre les transporteurs ABC, sont fixés entre les hélices transmembranaires 6 et 7 et au niveau de la douzième hélice. Ces domaines fonctionnent de manière alternative et coopèrent pour l'efflux du substrat⁵⁸. Le cycle catalytique est initié par la fixation du substrat au niveau intracellulaire suivie par la liaison de deux molécules d'ATP au niveau des NBD, entraînant leur dimérisation⁵⁹. Le changement de conformation des deux domaines transmembranaires puis l'hydrolyse de l'ATP en ADP permettent la libération du substrat hors de la cellule par diminution de son affinité avec les résidus protéiques⁶⁰. La dissociation des NBD permet au transporteur de retrouver sa conformation initiale, prêt à recevoir un autre substrat⁶⁰.

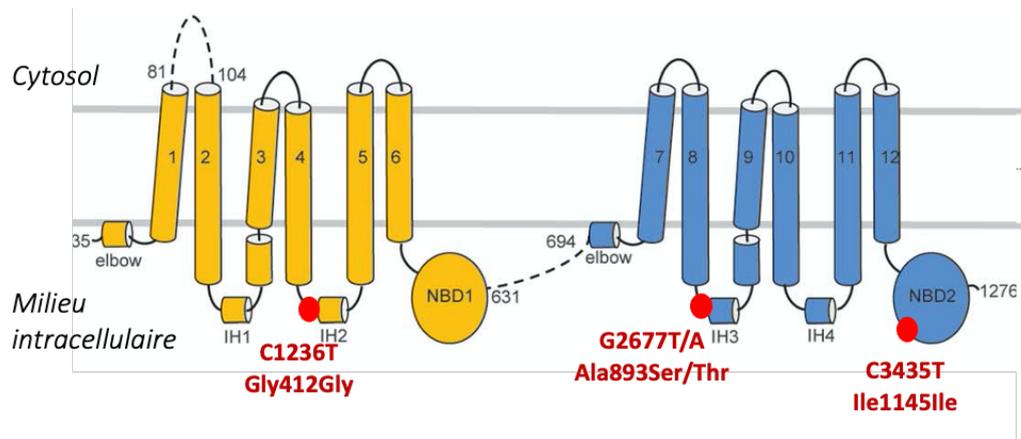


Figure 6 : Structure et conformation de la P-gp et principaux polymorphismes, d'après Kim et Chen⁶¹

La P-gp reconnaît plus de 100 substrats de nature amphiphiles ou hydrophobes et parfois volumineux (entre 330 et 4000 daltons) caractéristiques de la polyspécificité de cette protéine^{59,60,62}. De nombreuses molécules sont d'ailleurs impliquées dans les processus de son activation et son inhibition, et sont souvent associées à des interactions médicamenteuses⁶². L'expression d'*ABCB1* est sous le contrôle des récepteurs nucléaires PXR (*Pregnane-X-Receptor*) et CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), qui, lorsqu'ils sont activés peuvent induire l'expression de la P-gp⁴⁶. A l'opposé, des substrats à très forte affinité (comme le vérapamil) stimulent l'activité ATPasique à faible concentration mais inhibent son activité à forte concentration⁶³ et diminuent l'expulsion de molécules potentiellement toxiques (comme lors de l'utilisation concomitante de lopéramide et de vérapamil⁶⁴).

- MRP2 (ABCC2)

MRP2 est une pompe ATP-dépendante exprimée sur la membrane apicale des cellules polarisées comme les hépatocytes, les cellules épithéliales du tubule rénal proximal et l'épithélium intestinal⁶⁵. Ce transporteur hépatobiliaire appartient au groupe des « longs » MRP, du fait de sa large structure à 17 hélices transmembranaires formant trois domaines MSD (*membrane spanning domain*)⁶⁶ (Figure 7) et deux domaines de liaison à l'ATP.

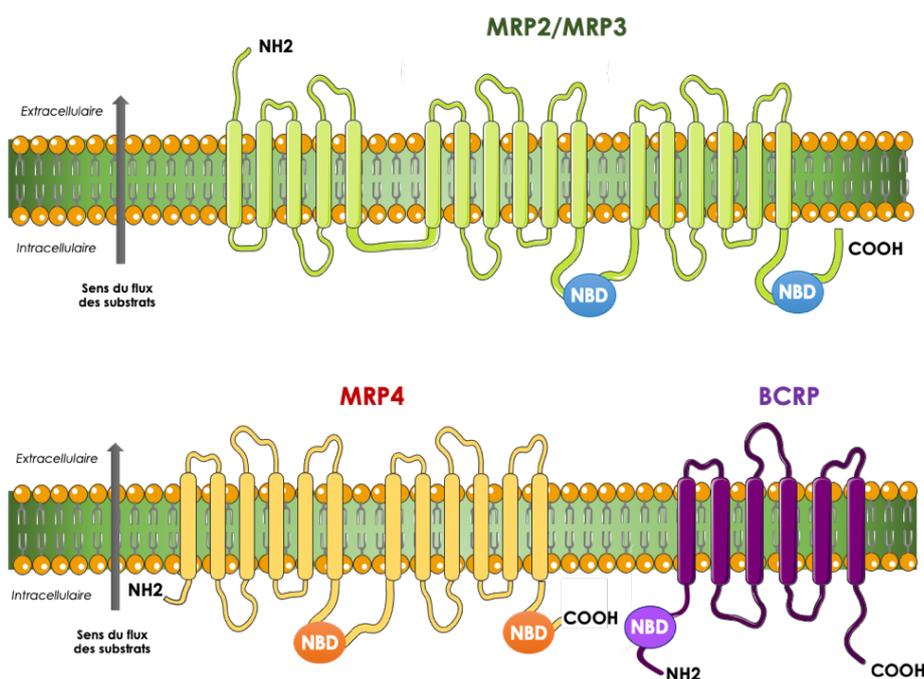


Figure 7 : Structure des transporteurs membranaires d'efflux

BCRP: *breast cancer resistance protein* ; MRP : *multidrug-resistance associated protein* ; NBD : *nucleotide binding domain*

Au niveau endogène, MRP2 est impliqué dans l'excrétion biliaire de glutathion^{65,66}. Il permet également la détoxification de composés glucurono- et sulfo-conjugués (bilirubine, stéroïdes, sels biliaires), des leucotriènes et de nombreux médicaments : anticancéreux (doxorubicine, méthotrexate, cisplatine, dérivés alcaloïdes...), antirétroviraux, antibiotiques (pénicillines, quinolones, azithromycine...), immunosuppresseurs (mycophénolate mofétil, etc.⁶⁶ Par ailleurs, des interactions entre le méthotrexate et les

anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou les inhibiteurs de la pompe à protons impliquant MRP2 ont été décrites. La diminution de la clairance du méthotrexate peut ainsi résulter en un risque d'insuffisance rénale aiguë ou une myélosuppression^{67,68}.

Des polymorphismes d'*ABCC2*, qui code pour MRP2, caractérisent (entre autres) le syndrome de Dubin-Johnson, une maladie bénigne rare et héréditaire qui est définie par l'accumulation de bilirubine conjuguée dans les canalicules biliaires hépatiques causée par la perte d'expression de ce transporteur⁶⁹. Ces variants incluent des délétions, des mutations non-sens, des variations en zone d'épissage ou encore l'apparition de codons stop. L'abolition de l'expression/la fonction de MRP2 a permis de mettre en évidence l'effet compensateur d'une surexpression de transporteur d'efflux au niveau basolatéral. En effet, chez des patients souffrant du syndrome de Dubin-Johnson, la surexpression d'*ABCC3*/MRP3 permet d'éliminer la bilirubine conjuguée dans les sinusoides hépatiques⁷⁰ ou en cas de cholestase lorsque l'élimination biliaire *via* la membrane canaliculaire est diminuée⁷¹. De la même manière, plusieurs auteurs ont montré que le transporteur MRP4 était près de deux fois plus exprimé chez des souris MRP2-K.-O.^{72,73}.

- **BCRP (*ABCG2*)**

La BCRP (*Breast Cancer Resistance protein*) a été décrite initialement dans des cellules tumorales résistantes à certains cytotoxiques⁷⁴. Composé uniquement de 6 domaines transmembranaires, ce transporteur nécessite d'être homodimérisé ou hétérodimérisé pour fonctionner (Figure 7) et prendre en charge ses substrats endogènes (comme les dérivés de l'estradiol) après leur conjugaison. Très exprimée au niveau des barrières hématoencéphalique, intestinale et placentaire, la BCRP tient un rôle majeur dans la protection des tissus contre l'accumulation de molécules toxiques, dont le méthotrexate, les statines ou les fluoroquinolones⁷⁵. De par sa forte implication dans l'élimination des médicaments, BCRP implique également d'importantes interactions médicamenteuses, particulièrement lors de la prise de molécules par voie orale⁷⁶.

c. ABC transporteurs basolatéraux

L'excrétion des xénobiotiques vers le compartiment sanguin est permise grâce à des transporteurs de la famille des ABC, et particulièrement MRP3 et MRP4. MRP3 (codé par *ABCC3*) est exprimé sur la membrane basolatérale des hépatocytes⁷⁷, et transporte un large panel de composés endogènes et de dérivés conjugués comme les acides biliaires, des hormones stéroïdiennes, des leucotriènes, des cytostatiques, des analogues de la morphine, des antiviraux, etc...

MRP4 est également une protéine d'efflux impliquée dans l'élimination par co-transport de molécules sulfoconjuguées (acides biliaires, stéroïdes, glutathion et prostaglandines) et de nucléotides cycliques (AMPc, GMPc) au travers de la membrane basolatérale des hépatocytes. Cette protéine est composée de deux domaines transmembranaires et deux domaines de liaison à l'ATP dont l'hydrolyse est nécessaire à son fonctionnement (Figure 7). En plus des hépatocytes, MRP4 est exprimé au niveau du système nerveux central, des reins et des cellules sanguines²³. Des agents antiviraux, anticancéreux (le méthotrexate et la 6-mercaptopurine notamment) ou des molécules du système cardiovasculaire (diurétiques de l'anse, antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2) font partie des substrats de ce transporteur. Au cours d'une étude préclinique chez le rat, l'expression d'*ABCC4*/MRP4 était augmentée quand l'activité des pompes d'efflux canaliculaires était abolie ou la sécrétion biliaire bloquée⁷⁸. En effet, l'effet protecteur de MRP4 contre l'accumulation de composés hépatotoxiques a été démontré par Mennone et al.⁷⁹ qui ont évalué l'impact de la cholestase induite par la rupture du canal biliaire chez des souris n'exprimant plus MRP4 (*Mrp4-knock-out*, K.-O., ou *Mrp4^{-/-}*). Les souris *Mrp4^{-/-}* présentaient des concentrations plus élevées d'acides biliaires et des signes d'hépatotoxicité plus importants que les souris sauvages elles aussi cholestatiques, soulignant l'importance de ce transporteur dans l'élimination des acides biliaires. Les auteurs ont également évalué l'expression d'autres transporteurs basolatéraux comme *Mrp3* en réponse à l'absence de *Mrp4* : bien que l'expression de *Mrp3* ait augmentée, elle ne parvient pas pour autant à contrebalancer totalement l'absence de *Mrp4*⁸⁰. MRP4 peut être inhibé par des molécules substrats ou non et être responsables d'interactions médicamenteuses importantes comme

c'est le cas lors de la prise concomitante de méthotrexate et d'AINS⁶⁷ ou d'acide mycophénolique et d'ibuprofène, ce dernier inhibant l'élimination du dérivé conjugué de l'immunosuppresseur⁸¹.

1.2.3. Régulation de l'expression des enzymes et transporteurs hépatiques

L'une des sources de variabilité d'expression des enzymes et transporteurs hépatiques dépend de leurs interactions avec les xénobiotiques. En effet, certains gènes (comme ceux codant pour le CYP3A4 ou le CYP2E1) sont inductibles par certaines molécules et ce mécanisme est à l'origine d'interactions médicamenteuses⁸². Cette activation transcriptionnelle dérive de l'interaction de récepteurs nucléaires avec des ligands qui agissent tels que des facteurs de transcription. Parmi ces récepteurs, PXR/NR1I2 et CAR/NR1I3 sont les mieux caractérisés dans la réponse aux xénobiotiques. Leur structure est composée d'un domaine de liaison au ligand et d'un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc. Pour être actifs, PXR et CAR nécessitent d'être hétérodimérisés avec le récepteur RXR (*retinoid X receptor*) pour se fixer sur une séquence particulière XRE (*xenobiotic response element*) du promoteur des gènes codant pour les CYP450, les UGTs, les SULTS ou les transporteurs MDR et MRPs et ainsi activer leur transcription (Figure 8).

Les interactions médicamenteuses impliquant la rifampicine ou la dexaméthasone reposent sur ce mécanisme. En effet, les ligands de PXR ont la capacité d'activer le CYP3A4 qui est majoritairement impliqué dans la métabolisation hépatique. L'induction de l'activité de cette enzyme peut entraîner de multiples conséquences PK-PD avec une augmentation de la clairance de la molécule normalement prise en charge, associée parfois à une diminution de l'exposition plasmatique. L'inhibition, à l'inverse, peut entraîner une accumulation de molécule mère, avec pour conséquence une augmentation de l'exposition du patient, potentiellement associée à une toxicité accrue.

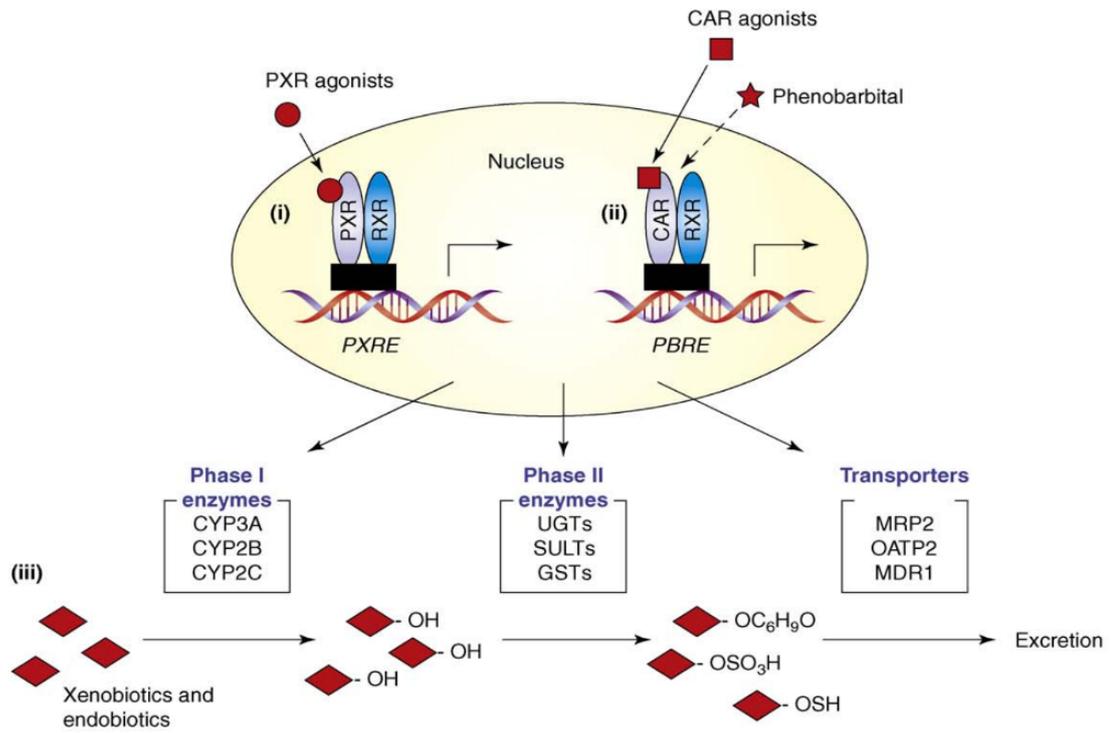


Figure 8 : Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du métabolisme, d'après Wada et al.⁸³

PXR : *pregnane-X-receptor* ; CAR : *constitutive androstane receptor* ; PXRE : *PXR-responsive element* ; PBRE : *phenobarbital-responsive element*

1.3. Variabilité pharmacogénétique appliquée au métabolisme des médicaments

1.3.1. Généralités et définitions

a. Instabilité génétique

La pharmacogénétique (PG), dont le terme a été introduit en 1959 par Friedrich Vogel⁸⁴ est définie par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) comme « *l'étude des variations de la séquence d'ADN impliquées dans la réponse à un médicament* »⁸⁵. Cette discipline s'intéresse principalement aux caractéristiques génétiques constitutionnelles (et donc héréditaires) de l'ADN qui peuvent influencer la variabilité interindividuelle de la réponse au médicament au sein de relations pharmacocinétiques (PK) et/ou pharmacodynamiques (PD).

Bien qu'il soit constamment exposé à des stress, des mécanismes subtils orchestrent le maintien de l'intégrité de l'ADN et permettent de le protéger de l'instabilité tout en autorisant la diversité génétique nécessaire à l'évolution des espèces et la variabilité moléculaire⁸⁶. Dans le noyau, la réplication de l'ADN est accompagnée de nombreux mécanismes de réparation finement coordonnés afin d'assurer la reproduction fidèle du génome avant la division cellulaire et la transmission du patrimoine génétique aux cellules filles⁸⁶.

L'instabilité génétique résulte des modifications de la séquence génique (mutations ponctuelles, délétions ou duplications de gènes, réarrangements chromosomiques, ...) provoquées par des mécanismes endogènes et exogènes⁸⁶. Les mutations comme les substitutions de bases, les micro-insertions ou les micro-délétions proviennent principalement d'erreurs de réplication. Elles peuvent être causées par l'altération des systèmes de réparation de l'ADN comme l'excision de bases (*base excision repair*, BER) ou la correction des mésappariements (*mismatch repair*, MMR) ou encore résulter d'erreurs causées lors de la synthèse translésionnelle, moins fidèle que la réplication⁸⁶. Des perturbateurs exogènes (radiations

UV, ionisantes, ou agents génotoxiques, ...) peuvent également être à l'origine de ces changements de la séquence nucléotidique. Ces modifications auront des conséquences phénotypiques plus ou moins délétères qui dépendent de leur type, de leur environnement génomique, et des mécanismes régulateurs de l'expression génique associés⁸⁷. Enfin, les mutations peuvent être héréditaires (si elles affectent la lignée germinale) ou non si elles concernent les cellules somatiques. Arbitrairement, les polymorphismes ont été distingués des mutations sur un critère de fréquence dans la population (ils doivent concerner plus d'1% des individus d'une population)⁸⁸.

b. Variants pharmacogénétiques

Un gène est composé de la succession de portions codantes (appelées exons) et non codantes (les introns) encadrées par des régions non traduites (5'UTR et 3'UTR) et séparées par des séquences intergéniques. Des modifications peuvent survenir au niveau de chacune de ces régions avec des conséquences variables sur la transcription de l'ADN, la traduction de l'ARN messager, ou la structure et la fonctionnalité des protéines⁸⁹. Parmi les différents types de mutations, les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ou mutations ponctuelles, sont caractérisées par l'addition, la délétion ou la substitution d'un seul nucléotide. L'insertion et la délétion d'une ou plusieurs bases (voire la délétion d'un gène entier) sont regroupées sous le nom d'*indels*, et l'amplification ou la réduction de l'expression d'un gène par l'augmentation ou la diminution du nombre de copies sont appelées des CNV (*Copy Number Variation*). Les modifications de la structure chromosomique par cassure, délétion, duplication ou translocation de brins auront des conséquences pathogéniques plus importantes que les seuls changements de la séquence génique⁸⁹.

L'aboutissement du projet de séquençage de la totalité du génome humain en 2004 et la finalisation du projet international *HapMap* ont permis l'identification d'un nombre important de variants dans le génome humain^{90,91}. Leur caractérisation suit une nomenclature spécifique permettant de les référencer dans des bases de données génétiques internationales, dont la référence est dbSNP

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Aujourd'hui, près de 88 millions de variants ont été recensés incluant une majorité de SNPs (>96%) et le reste étant constitué d'insertions et de délétions courtes et de variants structuraux⁹². La majorité des SNPs ne se trouvent pas dans la région codante des gènes (SNPs dits non codants) et sont situés dans les régions régulatrices de l'ADN comme les introns, les promoteurs, les régions intergéniques, les sites d'épissage ou les régions non traduites en 5' et 3'UTR⁸⁹. Parmi les variants situés dans la région codante (SNPs dits codants), seule une minorité induit un changement de la séquence d'acides aminés (appelés des SNPs non synonymes ou mutations faux-sens)⁸⁹. En entraînant le changement d'un acide aminé dans la séquence protéique, ces variants peuvent provoquer un dysfonctionnement de l'activité catalytique de la protéine, ou de l'affinité pour son substrat⁸⁹. L'apparition d'un codon STOP lors d'un changement de base, ou mutation non-sens, produira un ARNm plus court et une protéine tronquée, non fonctionnelle⁸⁹. Du fait de la dégénérescence du code génétique, les SNPs synonymes, ou « silencieux », n'entraînent pas de modification de la chaîne d'acides aminés mais peuvent induire une modification de l'expression génique et de sa régulation⁸⁹.

La majorité des SNPs ont deux allèles et l'allèle « majeur » est désigné comme étant le plus fréquemment représenté dans la population générale ; l'autre allèle sera appelé « mineur » et est également caractérisé par sa fréquence, MAF (*Minor Allele Frequency*) calculée par le rapport :
$$\frac{(\text{Nombre d'individus hétérozygotes} + (2 \times \text{Nombre d'individus homozygotes mutés}))}{2 \times \text{nombre d'individus génotypés}}$$
. Par ailleurs, du fait de la diploïdie des cellules somatiques humaines, les allèles correspondant à un SNP peuvent être identiques (homozygotie pour l'allèle majeur ou pour l'allèle mineur) ou différents (hétérozygotie)⁸⁹.

c. Notions d'haplotypes

Un haplotype est défini par la combinaison des allèles de différents SNPs, localisés dans la même région chromosomique (de moins de 50 kb), et hérités de manière groupée lors de la division cellulaire⁸⁹.

La construction des haplotypes repose sur l'étude du déséquilibre de liaison (LD pour *Linkage Disequilibrium*), caractérisé par l'association non aléatoire des allèles sur des *loci* différents pour former un bloc de variants ou *haploblock*.

En prenant l'exemple de deux *loci* mono-alléliques A et B ayant des fréquences alléliques f_A et f_B respectives, si ces deux *loci* sont indépendants, la fréquence attendue de l'haplotype serait égale à $f_A \times f_B$. Si dans une population la fréquence de cet haplotype AB est supérieure ou inférieure (signifiant ainsi que ces deux allèles semblent être transmis ensemble), ces deux *loci* sont dits en déséquilibre de liaison. La force d'un LD entre une paire de *loci* dépend de la distance qui existe entre ces deux marqueurs génétiques : plus ils sont proches, plus ils sont à-même d'avoir une origine généalogique commune et dont d'être dépendants, tandis que deux marqueurs plus éloignés auront une probabilité plus faible d'être associés, du fait de la recombinaison chromosomique⁹³.

Le LD s'exprime par différents paramètres que sont les coefficients D, D' et r^2 . D'après le principe d'Hardy-Weinberg (dans une population de taille infinie, panmictique, avec absence de mutation/migration/sélection génotypique, et répartition égale des sexes, la fréquence de transmission allélique dans une population reste constante, tout comme la fréquence génotypique⁹⁴) ces variants liés seraient transmis de manière équivalente entre les générations, et la fréquence des haplotypes resterait constante (en équilibre de liaison). Si à une génération donnée, l'association aléatoire est perturbée par des phénomènes de recombinaison méiotique, certains haplotypes auront leur fréquence modifiée (augmentée ou diminuée par rapport à celle attendue de l'équilibre) : la population n'est plus à l'équilibre et la fréquence de l'haplotype dépend donc de D un paramètre qui représente l'écart attendu aléatoire entre les fréquences gamétiques⁹³. D est une valeur relative prenant en compte les fréquences de chaque allèle de deux *loci* différents. Dans le cas de *loci* bi-alléliques situés sur le même chromosome, et ayant des allèles A, a, B et b, respectifs, les fréquences alléliques sont notées : f_A, f_a, f_B et f_b et les fréquences des haplotypes correspondant s'écrivent ainsi : f_{AB}, f_{Ab}, f_{aB} , et f_{ab} .

Le coefficient D est calculé ainsi⁹³ : $D = f_{AB} - f_A f_B$ et le coefficient de corrélation entre ces deux *loci* : $r^2 = \frac{(f_{AB} - f_A f_B)^2}{f_A f_a f_B f_b}$, soit $r^2 = \frac{D^2}{f_A f_a f_B f_b}$.

D' est un second paramètre qui correspond à la valeur maximale (D_{\max}) que D peut atteindre pour un lot de fréquence allélique donnée (telle que $D' = D/D_{\max}$), et r^2 estime le coefficient de corrélation de Pearson entre les fréquences d'haplotypes de deux *loci*⁹³. Ainsi, deux SNPs sont considérés en équilibre de liaison si D' est égal à 0 et plus D' tend vers 1 ou -1, plus les *loci* sont en déséquilibre de liaison. Par ailleurs, si r^2 est égal à 1 alors les *loci* sont en déséquilibre de liaison complet. En pratique, les valeurs seuil de r^2 et D' sont fixées à 0,8 pour les études d'association haplotypiques⁹⁵.

d. Construction des études d'association pharmacogénétiques

L'objectif des études d'association pharmacogénétiques est d'identifier la relation entre une variation génétique (un SNP ou un haplotype) et un phénotype en comparant les fréquences alléliques d'une population de cas (porteuse du phénotype d'intérêt) et d'une population témoin (non porteuse du trait phénotypique)⁹⁶.

Deux approches peuvent être utilisées pour mener ces études d'association. L'approche de « gène candidat » est basée sur l'identification au préalable de gènes décrits dans la littérature comme étant impliqués dans la variabilité PK et/ou PD de certains médicaments (cibles pharmacologiques, récepteurs, enzymes du métabolisme...) ⁹⁶. Les SNPs sélectionnés seront peu nombreux et la technique de génotypage consistera à cibler spécifiquement ces variants. Les perspectives de cette approche sont souvent mécanistiques et associées à l'étude fonctionnelle de l'impact des variants identifiés. La seconde approche, dont l'évolution des techniques de génotypage et la mise en place du séquençage haut-débit (NGS) a facilité le développement, consiste à étudier l'ensemble du génome (approche « génome entier »), sans émettre d'hypothèse au préalable. Néanmoins cette méthode nécessite un très grand nombre de patients afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour identifier les relations génotype-phénotype⁹⁷.

Les résultats de ces analyses s'interprètent selon des modèles statistiques générés par régression logistique entre l'effet étudié et les proportions génotypiques calculées à partir des fréquences alléliques du variant dans l'échantillon étudié. Parmi ces modèles, (i) le modèle codominant permet de considérer que les trois génotypes (homozygote sauvage, hétérozygote et homozygote muté) apportent chacun un effet sans relation multiplicative ou additive entre eux (il n'existe pas d'effet de proportionnalité entre le fait d'être hétérozygote et porteur de deux copies de l'allèle muté)⁹⁸ ; (ii) le modèle dominant regroupe tous les porteurs de l'allèle muté et les compare aux homozygotes sauvages, ce qui permet d'assurer que l'effet serait lié à la présence d'au moins une copie de l'allèle variant ; (iii) le modèle récessif compare les homozygotes mutés aux autres génotypes et décrit un effet nécessairement apporté par la présence de deux copies de l'allèle variant ; et enfin, (iv) le modèle additif qui correspond à la somme des effets phénotypiques individuels des allèles portés par l'individu⁹⁸.

Enfin, les études d'association haplotypiques correspondent à la comparaison des fréquences alléliques d'un haplotype entre une population de cas et une population témoin⁹⁵. Elles reposent sur le principe que l'effet de l'haplotype dépend de l'ensemble des SNPs en déséquilibre de liaison et dont l'analyse individuelle ne refléterait pas l'effet. A l'inverse, un effet porté par un haplotype où les SNPs ne seraient pas en déséquilibre de liaison total pourrait minorer l'effet d'un SNP individuel.

1.3.2. Variabilité pharmacogénétique des enzymes de phase I et II

a. Enzymes de phase I

De nombreux polymorphismes génétiques des gènes codant pour les CYP450 participeraient à la variabilité d'expression de ces enzymes. Ces variants alléliques sont recensés dans des bases de données internationales (comme PharmVar.org, *Pharmacogene Variation Consortium*) selon une nomenclature à étoile, dans laquelle l'allèle *1 correspond toujours à l'allèle de référence et à l'activité normale de

l'enzyme⁹⁹. Les variations alléliques sous leur forme hétérozygotes ou homozygotes associées à l'impact fonctionnel de la mutation permettent de distinguer des phénotypes métaboliseurs de patients : métaboliseurs lents (PM, *poor metabolizers*), métaboliseurs intermédiaires (IM, *intermediate metabolizers*), métaboliseurs rapides pour une activité normale (NM, *normal metabolizers*), et enfin métaboliseurs ultra rapides (UM, *ultra metabolizers*)⁹⁹. Enfin, l'importante quantité de substrats pris en charge par les CYP450 les exposent à un risque d'interactions médicamenteuses, causées par une compétition au niveau du site actif ou lors de l'utilisation de molécules inductrices et inhibitrices de l'activité de ces CYP⁹⁹. L'ensemble des variants pharmacogénétiques cités pour les différents membres des familles CYP450 sont présentés dans la Table 1.

Table 1 : Principaux variants pharmacogénétiques des enzymes du métabolisme hépatique

Enzymes	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (<i>Po-pulation caucasienne</i>)	Conséquences protéiques	Impacts fonctionnel et clinique	Réf.
Enzymes de phase 1 (CYP450)					
CYP2C9	<i>CYP2C9</i> *3 rs1057910 c.1075A>C	C : 0,066	p.Ile359Val	↓ activité du CYP2C9. Impact sur le métabolisme de la warfarine : AC 40% de réduction de la métabolisation ; CC : 80% de réduction (<i>poor metabolizers</i>).	100
CYP2C9	<i>CYP2C9</i> *2 rs1799853 c.430C>T	T : 0,152	p.Cys144Arg	↓ activité du CYP2C9. Impact sur le métabolisme de la warfarine et de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens : CT 20% de réduction de la métabolisation ; TT : 40% de réduction.	101
CYP2C19	<i>CYP2C19</i> *17 rs12248560 c.-806C>T	T : 0,222	Variant du promoteur	Associé à un phénotype métaboliseur ultra-rapide. Diminution de l'efficacité des inhibiteurs de la pompe à protons.	102
CYP2C19	<i>CYP2C19</i> *2 rs12769205 c.12662A>G	G : 0,131	Variant de l'intron 2.	CYP2C19 non fonctionnel par perte d'un site d'épissage. Phénotype <i>poor metabolizer</i> .	103
CYP2C19	rs3758581 c.991G>A	A : 0,066	p.Val331Ile	↓ activité du CYP2C19.	104
CYP2C19	<i>CYP2C19</i> *2 rs4244285 c.681G>A	A : 0,131	p.Pro227= Insertion dans un site d'épissage	Associé à un phénotype <i>poor metabolizer</i> . Baisse de l'efficacité du clopidogrel par la diminution de sa biotransformation en métabolite actif.	105
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *2 rs16947 c.2850C>T	T : 0,323	p.Arg296Cys/Ser	Amplification d'un locus du gène <i>CYP2D6</i> et associé à un phénotype métaboliseur ultra-rapide.	106

Table 1 : Principaux variants pharmacogénétiques des enzymes du métabolisme hépatique (suite)

Enzymes	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (Population caucasienne)	Conséquences protéiques	Impacts fonctionnel et clinique	Réf.
Enzymes de phase 1 (CYP450) (suite)					
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *10 rs1065852 c.100C>T	T : 0,242	p.Pro34Ser	Diminution ou perte d'activité du CYP2D6. Les porteurs de 2 copies mutées sont considérés comme faibles métaboliseurs.	107
CYP2D6	rs1135840 c.4180G>C	G : 0,434	p.Ser486Thr	Les patients GG sont exposés à un surrisque d'hépatotoxicité après la prise d'antituberculeux.	108
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *41 rs28371725 c.2988G>A	A : 0,121	p.Gly309Glu	Altération de l'épissage. Activité du CYP2D6 ↓.	109
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *3 rs35742686 c.2549delA	DelA : 0,020	-	Protéine non fonctionnelle.	110
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *6 rs5030655 c.454delA	DelA : 0,020	-	Diminution ou perte d'activité du CYP2D6. Les porteurs de 2 copies mutées sont considérés comme faibles métaboliseurs.	111
CYP2D6	<i>CYP2D6</i> *9 rs5030656 c.841_843delAAG	DelAAG : 0,020	p.Lys281del	Activité du CYP2D6 ↓.	112
CYP2E1	rs2515641 c.1263C>T	T : 0,141	p.Phe421=	Allèle T ↓ le risque d'hépatite toxique lors d'un traitement combinant anticorps monoclonaux et cytotoxiques.	113
CYP2E1	<i>CYP2E1</i> *5 rs2031920 c.-1053C>T	T : 0,061	Exon en région non traduite	Associé à un phénotype « métaboliseur rapide » impliqué dans la production intracellulaire de radicaux oxygénés responsables de l'hépatotoxicité de l'isoniazide	114
CYP2E1	<i>CYP2E1</i> *7 rs6413420 c.-71G>T	T : 0,086	Exon en région non traduite	↑ Transcription et l'activation du CYP2E1.	115
CYP3A4	<i>CYP3A4</i> *1G rs2242480 g.20239G>A	A : 0,056	Variant intronique	Activité du CYP3A4 ↓.	116
CYP3A4	<i>CYP3A4</i> *1B rs2740574 c.-392G>A	G : 0,015	Variant du promoteur	Activité du CYP3A4 ↓. Associé à un risque plus élevé de cancers de la prostate ou ovarien.	117
CYP3A4	<i>CYP3A4</i> *22 rs35599367 c.15389C>T	T : 0,045	Variant de l'intron 6	Altération de l'épissage des ARNm. ↓ de la transcription et de l'activité hépatiques du CYP3A4.	118,119
CYP3A5	<i>CYP3A5</i> *3 rs776746 c.6986A>G	A : 0,040	Insertion d'un site d'épissage	L'allèle G (*3, le plus fréquent) est associé à une perte d'activité du CYP3A5. Les porteurs de l'allèle *1 sont considérés comme métaboliseurs intermédiaires (1 copie) ou forts (2 copies).	120-123

Table 1 : Principaux variants pharmacogénétiques des enzymes du métabolisme hépatique (suite)

Enzymes	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (Population caucasienne)	Conséquences protéiques	Impacts fonctionnel et clinique	Réf.
Enzymes de phase 2					
UGT1A1	<i>UGT1A1</i> *28 rs8175347 (TA) ₇ TAA	Insertion : 0,320	Variant du promoteur (TATA box)	Perte de fonctionnalité de l'enzyme proportionnelle au nombre de TA insérés. Adaptation de dose basée sur le génotype nécessaire avant la mise en place d'un traitement par irinotécan. Augmente le risque d'hyperbilirubinémie chez les patients traités par sunitinib et pazopanib.	124,125
GST	<i>GSTP1</i> rs1695 (c.313A>G)	G : 0,394	p.Ile105Val	Allèle ancestral associé à une toxicité majorée aux sels de platine et au cyclophosphamide.	126–128
Mécanismes de régulation					
PXR	<i>NRI12</i> rs3814055 c.-25385C>T	T : 0,338	Variant du promoteur	Effets contradictoires sur l'hépatotoxicité induite par les médicaments.	129,130

- **Famille CYP3A**

La famille CYP3A est la plus impliquée dans les réactions de fonctionnalisation médicamenteuse. Parmi ses membres, le CYP3A4 et CYP3A5 prennent en charge près de 50% des molécules métabolisées par le foie¹¹⁶. CYP3A4 est l'enzyme la plus active et la plus abondante et prend en charge de nombreuses classes médicamenteuses (benzodiazépines, immunosuppresseurs, antibiotiques, opioïdes, ...) ¹³¹. Cette enzyme est très inductible, notamment par la rifampicine et les glucocorticoïdes *via* l'activation de PXR. Près de 40 variants sont recensés pour le gène *CYP3A4*¹¹⁶, mais le plus étudié est l'allèle *CYP3A4**22 (rs35599367, c.15389C>T, présent chez 5% des caucasiens) responsable d'une diminution d'activité de l'enzyme causée par la rétention de l'intron 6 lors de l'épissage de son ARNm¹¹⁸. En clinique, Wang et al.¹¹⁹, ont montré que l'expression et l'activité de l'enzyme était 1,7 et 2,5 fois plus élevées respectivement chez les patients CC que chez les patients porteurs d'une ou deux copies de l'allèle variant T respectivement. Par ailleurs, ces derniers avaient requis des doses significativement plus faibles de statines (dont l'élimination est dépendante du CYP3A4) que les patients sauvages (dose de statines chez les porteurs de l'allèle T égale à 0,27 fois celle des CC, $p = 0,019$).

Le CYP3A5 et le CYP3A4 ont un fort degré d'homologie dans leur séquence génique et partagent une grande partie de leurs substrats, si bien que le CYP3A5 n'est pas systématiquement actif chez les individus caucasiens : en effet, 96% de la population caucasienne est porteuse d'un variant inhibant l'activité de cette enzyme (*CYP3A5*3*). Kuang et al.¹³² ont montré à l'aide d'un essai luciférase que la surexpression du CYP3A5 diminuait l'activité du promoteur du gène *CYP3A4* ainsi que l'activité de l'enzyme vis-à-vis de ses substrats, mettant en évidence une interaction transcriptionnelle entre ces deux enzymes. Le variant *3 (rs776746, c.6986A>G), situé dans un site accepteur du mécanisme d'épissage est responsable d'une activité diminuée (si présent en une seule copie, génotype AG) ou abolie (si présent en deux copies, génotype GG) de l'enzyme^{120,121}. Cette mutation entraîne la formation d'un exon alternatif 3B contenant un codon stop prématuré et un ARN messager tronqué traduit en une protéine non fonctionnelle¹²⁰. Par conséquent, des réactions toxiques ont été rapportées chez des patients porteurs de l'allèle sauvage *CYP3A5*1* chez qui l'enzyme est active et potentiellement impliquée dans la synthèse de métabolites réactifs¹²². Par ailleurs, la surexpression de ce mécanisme de biotransformation peut aussi amener à une élimination trop importante des molécules. C'est notamment le cas du tacrolimus dont le faible index thérapeutique ajouté la forte variabilité interindividuelle impactant sa pharmacocinétique complique son usage clinique, les patients porteurs d'au moins un allèle *1 nécessitant des doses initiales plus importantes que les patients n'exprimant pas l'enzyme¹²¹.

L'impact fonctionnel de l'allèle *CYP3A4*22* est d'autant plus important chez les patients n'ayant pas d'activité du CYP3A5. Dans une étude s'intéressant au contrôle de la cholestérolémie chez des patients prenant des statines, la dose médiane était 40% plus faible chez les patients hétérozygotes *CYP3A4*1/*22* et n'exprimant pas le CYP3A5 que chez les patients métaboliseurs intermédiaires (*CYP3A5*3/*3* et *CYP3A4*1/*1* ou *CYP3A5*1/*1* et hétérozygotes ou homozygotes *CYP3A4*22*)^{133,134}. Enfin, seule la moitié de la dose était administrée chez les patients métaboliseurs extensifs (*CYP3A4*1/*1* et porteur d'au moins un allèle *CYP3A5*1*).

Le variant *CYP3A4*1B* (rs2740574, c.-392G>A) a été identifié comme impactant peu l'activité du CYP3A4¹³¹ et ses conséquences au niveau transcriptionnel ou traductionnel sont encore controversées. Des études ont rapporté qu'il était en déséquilibre de liaison avec le variant *CYP3A5*1*¹³⁵, expliquant

ainsi que les relations entre CYP3A4 et CYP3A5 pourraient impacter bien plus significativement la pharmacocinétique des médicaments. C'est le cas notamment de la ciclosporine pour laquelle les patients ayant un allèle fonctionnel du *CYP3A5* (*1) et un allèle *CYP3A4**1B nécessitaient des doses deux fois plus importantes que les patients porteurs des allèles les plus fréquents (*CYP3A4**1 ou *CYP3A5**3) pour atteindre les niveaux de concentrations plasmatiques cibles : 400,7±165,0 mg/jour vs 263,5±64,4 mg/jour chez les patients *CYP3A5**1/*3 et *CYP3A5**3/*3 ($p < 0,022$), respectivement, et 455,0±128,7 mg/jour vs 261,7±64,7 mg/jour chez les patients *CYP3A4**1B/*1B et *CYP3A4**1/*1, respectivement ($p < 0,001$)¹¹⁷.

- Famille CYP2C

La famille CYP2C compte le plus grand nombre de membres avec près de 16 enzymes. A elles seules, les enzymes CYP2C8/9 et CYP2C18/19 très homologues, métabolisent près de 40% des molécules sur le marché. Au niveau hépatique, CYP2C9 est la plus abondamment exprimée¹³¹ et prend en charge des médicaments acides faibles (warfarine, phénytoïne acide valproïque, certaines statines, et anti-inflammatoires non stéroïdiens)⁹⁹. Cette enzyme métabolise également des anticancéreux comme le busulfan, l'ifosfamide, le tamoxifène, et la trabectédine entre autres¹³⁶. Parmi les polymorphismes les plus étudiés du *CYP2C9*, *CYP2C9**2 (c.430C>T, rs1799853) et *CYP2C9**3 (c.1075A>C, rs1057910) sont présents chez environ 35% des individus caucasiens. Dans les études *in vitro*, l'effet de ces variants semblait substrat-dépendant⁹⁹ et les études d'association génotypes-toxicités ont montré qu'ils étaient associés à un risque de saignements accrus chez les patients traités par anti-inflammatoires non stéroïdiens¹³⁷ ou à une augmentation des concentrations plasmatiques de warfarine chez les porteurs des allèles *2 et *3¹³⁸, signes de l'accumulation de ces molécules sous la forme non métabolisées par la perte de fonction du CYP2C9.

Le gène *CYP2C19* est fortement polymorphe et plus de 25 variants alléliques sont recensés. Les mutations *CYP2C19**2 (c.12662A>G, rs12769205) et *CYP2C19**3 (c.681G>A, rs4986893 dans l'exon 5) entraînent l'apparition d'un site d'épissage génique et d'un codon stop, conduisant à une protéine

tronquée et non fonctionnelle, distinguant 4 catégories de patients (NM, PM, IM et UM). Plusieurs études ont montré que le variant *2 était un déterminant majeur de l'exposition et de la variabilité interindividuelle appliquée au clopidogrel, substrat-inhibiteur, qui nécessite d'être hydroxylé par le CYP2C19 pour être actif^{99,103-105}. Ces deux allèles sont associés à une diminution de la clairance du cyclophosphamide¹³⁶, et sont impliqués dans le métabolisme du voriconazole, dont la prescription est conditionnée par l'établissement du statut génotypique du gène *CYP2C19* puisque les patients PM sont près de 4 fois plus exposés à la molécule que les NM et les UM¹³⁹.

- Famille CYP2D

Même si le CYP2D6 ne compte que pour 5 % de l'ensemble des cytochromes hépatiques, il métabolise à lui seul près de 20-25% des médicaments pris en charge par le foie¹³¹. Parmi ces substrats, sont retrouvés les dérivés des opioïdes comme la codéine, certains bêta-bloquants, des antidépresseurs (comme la fluoxétine ou la paroxétine,) et des anticancéreux tels que le tamoxifène. La fluoxétine et la codéine sont de puissants inhibiteurs du CYP2D6¹³¹ et cette enzyme a la particularité de ne pas être inductible¹⁴⁰. Par ailleurs, le gène *CYP2D6* est très polymorphe et plus de 100 variants et sous-types de variants sont répertoriés¹⁴⁰. Les allèles les plus étudiés sont catégorisés en trois groupes établis en fonction de l'activité de l'enzyme : activité normale (*CYP2D6**1 et *2), activité diminuée (*9, *10, *17,*41) et activité abolie (*3,*4,*5,*6)^{141,142}. Ces allèles correspondent à des délétions, des duplications ou multiplications de bases, mais également à des variations du nombre de copies de gènes (CNV) associées à une augmentation de l'activité de l'enzyme (*CYP2D6**1N). L'arrangement des génotypes en diplotypes a permis d'établir des scores d'activité du CYP2D6 associé à un phénotype métaboliseur correspondant¹⁴³ et sur lesquelles sont notamment basées les recommandations d'adaptation de dose du tamoxifène¹⁴¹. Cependant, l'impact des polymorphismes génétiques sur cette molécule ne compterait que pour 11 à 16,8% de la variabilité des concentrations d'endoxifène, son métabolite actif majeur formé par N-déméthylation^{144,145}. En effet, de nombreux autres paramètres influenceraient les variabilités pharmacocinétiques inter et intraindividuelles, comme les génotypes d'autres enzymes du métabolisme (*CYP3A4*,

CYP2C19, et *CYP2B6*) ou la prise concomitante d'inhibiteurs enzymatiques¹⁴⁴. Finalement en raison de l'incohérence entre les études et la non reproductibilité de certains résultats, la prescription de tamoxifène n'est pas obligatoirement accompagnée d'un génotypage du *CYP2D6*.

- Famille CYP2E

Le CYP2E1 métabolise peu de médicaments, mais intervient dans la biotransformation du paracétamol en N-acétyl-*para*-benzoquinoneimine (NAPQI), métabolite extrêmement instable et réactif, immédiatement conjugué au glutathion pour être éliminé¹⁴⁶. L'utilisation d'inhibiteur du CYP2E1 (comme le disulfiram) et de modèles *in vivo* de souris K.-O. pour le gène *CYP2E1* ont contribué à l'établissement du rôle de l'enzyme dans l'hépatotoxicité létale au paracétamol¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Plusieurs variants de *CYP2E1* ont par ailleurs été incriminés dans le risque d'hépatotoxicité liée à l'isoniazide. Le variant intronique *5 (rs2031920 c.-1053C>T) est par ailleurs associé à un phénotype « métaboliseur rapide » impliqué dans la production intracellulaire de radicaux oxygénés responsables de l'hépatotoxicité de cet antituberculeux¹¹⁴.

b. Enzymes de phase II

L'irinotécan (Campto®), utilisé seul ou en association dans le traitement des cancers colorectaux de stade avancé, est un cytotoxique nécessitant d'être biotransformé pour être actif. Son métabolite SN-38, est près de 100 à 1000 fois plus cytotoxique et est majoritairement pris en charge par l'enzyme UGT1A1 pour son élimination dans les urines¹⁵⁰. Le variant *UGT1A1**28 ((TA)₇TAA, rs8175347) est considéré comme un biomarqueur majeur du risque d'hépatotoxicité de l'irinotécan, puisque l'insertion du motif TA dans la TATA box (une zone particulière située dans le promoteur génique et en amont du site d'initiation de la transcription), induit la perte de fonctionnalité de l'enzyme¹⁵⁰. De nombreuses

études ont confirmé le rôle de ce variant dans la toxicité exacerbée de cette molécule (neutropénie, diarrhée de grades sévères) et ont permis d'implémenter l'adaptation de dose basée sur la détermination du génotype d' *UGT1A1*^{124,151,152}. Enfin, Motzer et al.¹²⁵ ont montré que les patients porteurs de l'allèle *28 et traités par pazopanib ou sunitinib avaient un risque plus élevé d'hyperbilirubinémie ($p < 0,0001$ et $p = 0,0017$, respectivement) avec des odds-ratio correspondants de 9,97 (4,13–24,03) et 5,83 (2,04–16,68). En effet, le pazopanib est un puissant inhibiteur de l'UGT1A1 *in vitro*¹⁵³. Les auteurs suggèrent alors que cette hyperbilirubinémie apparaissant chez les patients traités par pazopanib résulte d'un effet combiné de l'inhibition de l'enzyme et de la perte de fonction causée par l'insertion de bases au niveau du promoteur, conduisant à une accumulation de bilirubine non conjuguée plasmatique.

Les glutathion-S-transférases sont des enzymes indispensables à la détoxification des xénobiotiques *via* la conjugaison au glutathion réduit. Seize gènes rassemblés en 6 sous-familles (*alpha* (*GSTA*), *mu* (*GSTM*), *oméga* (*GSTO*), *pi* (*GSTP*), *thêta* (*GSTT*) et *zêta* (*GSTZ*)) codent pour différentes enzymes réparties entre la membrane plasmique et le cytosol¹⁵⁴. Le variant non-synonyme rs1695 (*GSTP1**B, c.313A>G, p.Ile105Val) est situé dans l'exon 5 du gène *GSTP1* et conduit à une diminution de l'activité enzymatique de la protéine¹⁵⁵. Cependant, une étude a identifié une relation contradictoire entre l'allèle ancestral A et le risque d'hépatotoxicité associé à la prise d'antituberculeux : un risque plus élevé a été observé dans une cohorte rétrospective (OR = 2,10, IC95%: 1,17–3,76; $p = 0,012$)¹⁵⁶. Cette relation allèle ancestral/toxicité médicamenteuse a également été montrée chez des patients traités par cyclophosphamide (toxicité gastrointestinale majorée)¹²⁸ ou encore de l'oxaliplatine (neurotoxicité accrue)¹²⁷.

c. Variants de PXR/NR1I2

Une très grande variabilité interindividuelle s'applique à l'expression du CYP3A4 et de la P-gp au niveau hépatique et intestinal et ces deux protéines constituent les principales cibles transcriptionnelles de PXR. De nombreuses études se sont intéressées aux possibles conséquences des variations génétiques de *NR1I2* sur le métabolisme et l'élimination des médicaments puisque des polymorphismes de ce gène

régulateur pourraient impacter son expression, l'activation de PXR ou encore sa capacité de se fixer sur ses séquences cibles. Parmi les polymorphismes décrits dans la littérature, le variant rs3814055 (exon 1, c.-25385C>T) est associé à des effets contradictoires concernant l'apparition d'effets hépatotoxiques liés aux médicaments : un risque accru a été noté chez les patients porteurs de l'allèle T et traités par flucloxacilline¹²⁹ alors qu'une diminution du risque a été observée dans une cohorte de patients chinois traités par antituberculeux¹³⁰.

1.3.3. Variabilité pharmacogénétique des transporteurs ABC

a. MDR1/Pg-P

La P-gp est codée par le gène *ABCB1*, situé sur le chromosome 7 (7q21.12) et composé de 29 exons. Bien qu'un grand nombre de SNPs aient été identifiés pour *ABCB1*, trois variants sont principalement investigués dans les études pharmacogénétiques : c.3435C>T (rs1045642, p.Ile1145=), c.2677G>T,A (rs2032582, p.Ala893Ser/Thr) et c.1236C>T (rs1128503, p.Gly412=)⁷⁵ (Figure 6). De nombreuses relations PG/PK ou PG/PD ont été mises en évidence pour la mutation silencieuse c.3435C>T de l'exon 26. Cependant, des études contradictoires ont montré que ce variant pouvait augmenter l'exposition aux médicaments¹⁵⁷ ou au contraire n'avoir aucun effet sur la PK¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Moins étudié que le précédent, le variant tri-allélique c.2677G>T, A semble avoir des conséquences plus marquées sur la pharmacocinétique des médicaments puisque le variant T augmenterait l'efflux de certaines molécules en ayant une activité ATPasique plus importante que celle de la forme sauvage de la P-gp^{161,162}. Dans l'étude de Dulucq et al.¹⁶³, l'allèle sauvage de ce variant était associé à une moins bonne réponse clinique à l'imatinib chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) tandis que les variants T, A étaient associés à une diminution de la clairance de la molécule chez des patients atteints de tumeur gastro-intestinales stromales. Enfin, la mutation silencieuse c.1236C>T, située au niveau de l'exon 12, est en déséquilibre de liaison avec les deux variants précédents⁵⁰. Toujours dans l'étude de Dulucq et

al.¹⁶³, les patients porteurs du variant 1236T présentaient des concentrations plasmatiques plus élevées d'imatinib et une meilleure réponse par rapport aux patients porteurs de l'allèle sauvage. Plusieurs études ont rapporté des effets cliniques de l'haplotype composé de ces trois variants. Diekstra et al.¹⁶⁴ ont par exemple montré que la survie sans progression chez des patients traités par sunitinib étaient meilleure chez les porteurs de l'haplotype 3435T/2677G/1236C. L'ensemble des variants pharmacogénétiques les plus décrits pour la P-gp ainsi que les autres transporteurs de la famille ABC sont recensés dans la Table 2.

Table 2 : Principaux variants pharmacogénétiques des transporteurs d'efflux hépatiques

Transporteurs d'efflux (gène)	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (Population caucasienne)	Impact fonctionnel décrit	Impact clinique	Référence
Apicaux					
P-gp (ABCB1)	rs1045642 c.3435C>T p.Ile1145=	C : 0,434	↓ expression d' <i>ABCB1</i> . ↓ activité de la P-gp.	↓ risque d'hépatite toxique chez les patients porteurs de l'allèle C.	165,166
P-gp (ABCB1)	rs1128503 c.1236C>T p.Gly412=	T : 0,429	Bibliographie contradictoire. ↑ ou ↓ efflux extracellulaire.	Influence sur l'exposition et la toxicité de certains médicaments : ↑ concentrations plasmatiques d'imatinib et meilleure réponse par rapport aux patients porteurs de l'allèle C.	163,166-169
P-gp (ABCB1)	rs2032582 c.2677G>T, A p.Ser893Ala/Thr	T : 0,429 A : 0,018	Bibliographie contradictoire. ↑ ou ↓ activité de la P-gp et de l'efflux de ses substrats.	Allèle G ↓ réponse clinique à l'imatinib dans la LMC. Allèles variants T, A ↓ la clairance de l'imatinib chez des patients atteints de tumeur gastro-intestinales stromales.	163,170,171
P-gp (ABCB1)	rs2032583 g.87531245T >C	C : 0,136	Variant intronique. Pas de données fonctionnelles.	↑ risque d'effets indésirables liés à l'accumulation d'inhibiteurs de la recapture de sérotonine.	172
MRP2 (ABCC2)	rs17222723 c.3563T>A p.Val1188Glu	A : 0,066	Allèle A ↑ expression hépatique de MRP2. Activité ↑ dans des modèles de cellules Flp-In HEK293.		173
MRP2 (ABCC2)	rs2273697 c.1249G>A p.Val417Ile	A : 0,237	Bibliographie contradictoire. Expression normale ou ↑ de MRP2.	↓ de l'efflux de la carbamazépine.	174-176
MRP2 (ABCC2)	rs3740066 c.3972C>T p.Ile1324Met	T : 0,333	Semble impliqué dans le contrôle de l'épissage des ARN.	↑ du risque de neurotoxicité lié à la vincristine. Accumulation de MTX dans le plasma.	177

Table 2 : Principaux variants pharmacogénétiques des transporteurs d'efflux hépatiques (suite)

Transporteurs d'efflux (<i>gène</i>)	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (<i>Population caucasienne</i>)	Impact fonctionnel décrit	Impact clinique	Référence
Apicaux (suite)					
MRP2 (ABCC2)	rs717620 c.-24C>T	T : 0,207	Variant en 5'UTR. Bibliographie contradictoire. L'allèle T régulerait l'expression de MRP2.	Associé à une toxicité plus élevée du MTX, du diclofénac et de la trabectédine. ↓ exposition à l'irinotécan. Augmenterait le risque d'hépatite toxique lorsqu'il est présent en haplotype.	174,178-182
MRP2 (ABCC2)	rs8187707 c.4488C>T p.His1496=	T : 0,066	Pas de données fonctionnelles.	Révélaté chez le patient décédé d'une hépatotoxicité liée à la trabectédine.	178,183
MRP2 (ABCC2)	rs8187710 c.4544G>A p.Cys1515Tyr	A : 0,066	Pas de données fonctionnelles.	Identifié chez le patient décédé d'une hépatotoxicité liée à la trabectédine. ↑ risque de toxicité gastro-intestinale après traitement par cisplatine/taxanes. Associé à une ↓ de la clairance du carboplatine.	133
BCRP (ABCG2)	rs2231137 c.34G>A p.Val12Met	A : 0,035	Variant affectant l'épissage intronique. ↓ expression hépatique d' <i>ABCG2</i> . Modifie la localisation de BCRP sur la membrane hépatocytaire.	↓ de la dose d'imatinib chez les porteurs de l'allèle A. Associé à un risque élevé de diarrhée sévère après la prise d'irinotécan.	184-187
BCRP (ABCG2)	rs2231142 c.421C>A p.Glu141Lys	A : 0,116	↓ expression de BCRP au niveau de la membrane apicale.	↑ exposition de la rosuvastatine chez patients homozygotes AA vs CC.	188,189
BCRP (ABCG2)	rs7699188 c.-15994C>T	T : 0,172	↑ expression de BCRP dans le foie.	↑ La clairance orale d'imatinib. ↑ risque de toxicité non-hématologique après la prise d'irinotécan.	184,190
MATE-1 (SLC47A1)	rs2289669 c.922-158G>A	A : 0,449	Pas de données fonctionnelles.	Associé à une meilleure réponse à la metformine chez des patients atteints de diabète de type 2	191,192
MATE-1 (SLC47A1)	rs2252281 c.-66T>C	C : 0,434	Variant en 5'UTR	Associé à une meilleure réponse à la metformine chez des patients atteints de diabète de type 2	191,192
Basolatéraux					
MRP3 (ABCC3)	rs1051640 c.4509A>G p.Glu1503=	G : 0,183	Pas de données fonctionnelles.	↑ risque d'ototoxicité cumulative liée au cisplatine.	193
MRP3 (ABCC3)	rs4148416 c.3039C>T p.Gly1013=	T : 0,035	Pas de données fonctionnelles.	Allèle T associé à un sur-risque de décès après traitement d'ostéosarcome par cisplatine, cyclophosphamide, doxorubicine, MTX et vincristine.	194
MRP3 (ABCC3)	rs4793665 c.-211C>T	C : 0,470	↓ activité du promoteur. ↓ transcription du gène.	Associé à une ↓ de l'exposition au méthotrexate. ↑ risque d'ototoxicité cumulative liée au carboplatine.	75,195-197
MRP4 (ABCC4)	rs1059751 c.*879T>C	C : 0,444	Variant en 3'UTR.	Associé à une toxicité accrue après prise d'antirétroviraux.	198

Table 2 : Principaux variants pharmacogénétiques des transporteurs d'efflux hépatiques (suite)

Transporteurs d'efflux (<i>gène</i>)	Variant génétique	Fréquence de l'allèle mineur (<i>Population caucasienne</i>)	Impact fonctionnel décrit	Impact clinique	Référence
Basolatéraux (suite)					
MRP4 (ABCC4)	rs11568658 c.559G>T p.Gly187Trp	T : 0,010	Diminution de la fonction de MRP4	Associé à une toxicité accrue après prise d'antirétroviraux.	¹⁹⁹
MRP4 (ABCC4)	rs1678387 g.240795A>G	A : 0,051	Pas de données fonctionnelles.	Associé à risque accru d'ostéonécrose après la prise de bisphosphonates chez les patients porteurs de l'allèle G.	²⁰⁰
MRP4 (ABCC4)	rs17268282 g.33387C>A	A : 0,106	Pas de données fonctionnelles.	Modulation de la réponse au furosémide chez les patients traités pour une insuffisance cardiaque décompensée.	²⁰¹
MRP4 (ABCC4)	rs1751034 c.3348G>A p.Lys1116Lys	C : 0,141	Pas de données fonctionnelles.	↑ accumulation plasmatique d'antirétroviraux.	²⁰²
MRP4 (ABCC4)	rs2274407 c.912G>T p.Lys304Asn	T : 0,035	Altération du mécanisme d'épissage sans modification de la capacité de transport.	Allèle T associé à survie sans progression diminuée chez les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique.	²⁰³
MRP4 (ABCC4)	rs3742106 c.*38T>G	G : 0,460	Variant en 3'UTR.	↑ accumulation plasmatique d'antirétroviraux.	^{204,205}
MRP4 (ABCC4)	rs3765534 c.2269G>A p.Glu682Lys	A : 0,010	Pas de données fonctionnelles.	Risque ↑ de leucopénie chez les patients traités par azathioprine/6-mercaptopurine. ↑ Concentrations intracellulaires de 6-thioguanine.	²⁰⁶
MRP4 (ABCC4)	rs7317112 g.35178T>C	G : 0,259	Pas de données fonctionnelles.	Allèle T ↑ le risque de mucites chez des patients pédiatriques traités par MTX.	²⁰⁷
MRP4 (ABCC4)	rs9516519 c.*3261T>G	G : 0,132	Variant en 3'UTR. Allèle C induit la perte d'un site de fixation d'un micro-ARN, augmentant l'expression d'ABCC4.	L'allèle T est associé à des concentrations plasmatiques de MTX augmentées.	²⁰⁸
MRP4 (ABCC4)	rs9561765 g.275458C>T	T : 0,056	Pas de données fonctionnelles.	↑ la réponse à l'imatinib chez les patients CT traités pour des GIST.	²⁰⁹
MRP4 (ABCC4)	rs9561778 g.244986C>T	C : 0,096	Pas de données fonctionnelles.	↑ le risque d'hématotoxicité liée à la prise de cyclophosphamide.	²¹⁰

b. MRP2

Parmi les variants les plus étudiés d'*ABCC2* rs717620 (c.-24C>T), situé en région 5'UTR, est aussi l'un des plus controversés. Des études ont montré que le variant T affectait l'expression d'*ABCC2*, en diminuant notamment son taux d'ARNm. Ce résultat a par la suite été confirmé par l'utilisation d'un

gène rapporteur dans des cellules HepG2 où le variant induisait une diminution de l'activité de MRP2²¹¹. En clinique, Rau et al.²¹² ont montré que le variant -24C>T était associé à une aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (AUC) de méthotrexate deux fois plus élevée chez des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë par rapport à des enfants sains. Dans une autre étude le variant était associé à une augmentation de 25% des taux du métabolite glucuroconjugué de l'acide mycophénolique au niveau plasmatique²¹³, résultat contredit par d'autres n'ayant pu prouver l'existence d'une relation entre le variant et la pharmacocinétique de la molécule mère⁷⁵. D'autres molécules ont vu leur PK modifiée chez les patients porteurs du variant comme l'irinotécan²¹⁴. Dans l'étude de Choi et al.¹⁸², l'allèle T était associé à une diminution de l'activité du promoteur *d'ABCC2* et à un risque plus élevé d'hépatotoxicité induite par des composés phytothérapeutiques, à la fois seul et en haplotype. Enfin, Laurenty et al.¹⁷⁸ ont rapporté un cas d'hépatotoxicité létale chez un patient homozygote TT suite à la prise de trabectédine.

c. *BCRP*

De nombreux variants d'*ABCG2* ont été identifiés dont deux SNPs non synonymes rs2231142 (c.421C>A, p.Glu141Lys) et rs2231137 (c.34G>A, p.Val12Met). Le variant c.421C>A est responsable d'une diminution de l'expression de BCRP au niveau de la membrane apicale des hépatocytes¹⁸⁸. Par ailleurs dans une cohorte de patients traités par rosuvastatine, les patients homozygotes AA semblaient avoir une meilleure exposition – traduite par une AUC et une concentration plasmatique maximale (C_{max}) plus importantes – que les patients homozygotes sauvages CC (en moyenne 10,4 vs 5,3 ng.h.mL⁻¹, $p < 0,05$)²¹⁵. Récemment, ce variant a été associé à un risque plus élevé de toxicité hépatique chez des patients traités par un protocole combinant du docétaxel, de l'épirubicine et du cyclophosphamide²¹⁶. Le variant rs2231137 diminuerait l'expression hépatique du transporteur en affectant l'épissage intronique de l'ARNm de *ABCG2*¹⁸⁴. Il modifierait également la localisation de BCRP au niveau de la membrane

hépatocytaire¹⁸⁵. Dans une étude récente, Verboom et al.¹⁸⁶ ont observé que la réduction des doses d'imatinib était plus fréquente chez les patients porteurs de l'allèle A (34,8%) comparé aux patients sauvages (8,4%, OR 7,35, $p = 0,0002$), soulignant le rôle important du transporteur dans l'élimination de la molécule. Par ailleurs, ce variant a également été associé à un risque plus élevé de diarrhée sévère après la prise d'irinotécan¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Enfin, des variants situés au niveau du promoteur tels que -15622C>T et -15994C>T (rs7699188) ont été associés à un taux de réponse tumorale à l'irinotécan diminué^{184,190} et une expression augmentée^{187,190} de BCRP, respectivement.

d. MRP3

L'expression hépatique de MRP3 est extrêmement variable, inductible et soumise à de nombreux polymorphismes²¹⁷. Parmi eux, Lang et al.¹⁹⁵ ont étudié la fréquence du variant du promoteur d'*ABCC3* c.-211C>T (rs4793665) dans la population caucasienne et ont quantifié l'expression hépatique du transporteur. Les individus porteurs d'une ou deux copies de l'allèle muté avaient des taux d'ARNm plus faibles que les patients homozygotes sauvages. Les données *in vitro* ont permis de montrer que ce variant affectait la fixation de facteurs de transcription sur la région du promoteur, diminuant ainsi l'expression génique d'*ABCC3*^{75,195}. Ce variant est par ailleurs associé à une diminution significative de l'exposition au méthotrexate¹⁹⁶ et les porteurs de l'allèle T semblent avoir un risque plus élevé d'ototoxicité liée au carboplatine, possiblement liée à une accumulation de platine conjugué au glutathion dans les cellules de la cochlée à cause de l'absence de MRP3¹⁹⁷.

e. MRP4

De nombreux variants d'*ABCC4* ont été identifiés pour *ABCC4*. Billat et al.¹⁹⁹ ont démontré que le variant rs11568658 (c.559G>T, p.Gly187Trp) induisait probablement une perte de fonction du transporteur puisqu'il était associé à une accumulation de ganciclovir, comme l'avait précédemment montré Abla et al.²¹⁸ pour l'azithromycine. Les auteurs ont également montré que les patients hétérozygotes pour ce variant avaient un taux de neutrophiles significativement plus faible que les patients GG. Par ailleurs, le variant rs2274407 (c.912G>T, p.Lys304Asn) intervenant sur un site accepteur d'épissage 3' dans l'exon 8 a été décrit comme associé à une survie à 3 ans sans progression diminuée chez des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique²⁰³.

2. Hépatotoxicité médicamenteuse

2.1. Définitions et épidémiologie

L'hépatotoxicité causée par un médicament (ou *Drug-Induced Liver Injury*, DILI) est définie comme l'atteinte organique et/ou fonctionnelle du foie et dont le lien de causalité a été clairement établi²¹⁹. L'implication majeure du foie dans le métabolisme des médicaments l'expose constamment à de fortes concentrations de molécules et/ou de leurs dérivés toxiques. Plus de 1200 médicaments sont identifiés comme étant hépatotoxiques, auxquels s'ajoutent d'autres xénobiotiques comme les produits phytothérapeutiques²²⁰. Bien que les DILI soient des événements relativement rares et dont l'incidence est estimée entre 1/10 000 à 1/100 000 selon les molécules, elles sont la première cause du retrait des médicaments par la FDA et à l'origine de 50% des insuffisances hépatiques aiguës diagnostiquées chaque année aux Etats-Unis^{219,221}. En France, dans une étude prospective menée sur plus de 81 000 patients suivis pendant 3 ans, l'incidence de l'hépatotoxicité médicamenteuse était d'environ 14 cas pour 100

000 habitants et parmi les 34 cas diagnostiqués dans l'étude, 12% des patients ont été hospitalisés et deux patients sont décédés des suites de leur atteinte hépatique²²². Bien que les mécanismes complexes à l'origine des DILI ne soient pas totalement élucidés, deux modes d'hépatotoxicité sont distinguables selon des critères liés à l'individu et à la molécule incriminée, l'hépatotoxicité intrinsèque et l'hépatotoxicité idiosyncratique^{223,224}.

L'hépatotoxicité intrinsèque dépend directement des propriétés cytotoxiques de la molécule incriminée ou de ses métabolites. Ce mode d'hépatotoxicité est dose-dépendant, prévisible (elle peut être prévenue par un suivi des concentrations plasmatiques notamment²²³) et peut être reproduit chez des modèles animaux. Les lésions hépatiques surviennent souvent peu de temps après l'administration (entre quelques heures et quelques jours) et ce, chez la plupart des individus exposés à la molécule. Le paracétamol est l'exemple le plus connu d'hépatotoxicité intrinsèque et est responsable de près de la moitié des cas d'insuffisance hépatique aiguë en Europe et aux Etats-Unis²²⁴. Celle-ci est causée par l'accumulation de son métabolite toxique NAPQI qui, à partir d'une dose seuil de 150 mg/kg, ne peut plus être pris en charge par les systèmes de régénération du glutathion saturés par la forte quantité de molécule présente au niveau hépatocytaire²²⁵.

L'hépatotoxicité idiosyncratique est, quant à elle, individu-dépendante, dose-indépendante, multifactorielle et imprévisible. Les lésions hépatiques sont déterminées à la fois par les propriétés de la molécule et des facteurs individuels environnementaux. Elle compte pour près de 13 à 20% des cas de DILI, et son évolution est souvent grave (elle peut conduire à une transplantation hépatique) voire fatale si l'exposition est poursuivie après les premiers symptômes²²⁶. Cette réaction hépatique peut se manifester après une longue période de latence (de quelques jours à quelques mois) et ne présente pas de signature clinico-biologique spécifique. Le caractère idiosyncratique des lésions hépatiques se définit uniquement sur un grand nombre de patients, c'est-à-dire souvent après la mise sur le marché. Elle peut conduire au retrait du médicament ou à la restriction de son emploi, comme cela a été le cas pour plusieurs molécules entre 1997 et 2016²²⁷.

Les frontières distinguant ces types d'hépatotoxicité sont minces : les caractéristiques individuelles peuvent influencer le mécanisme intrinsèque des lésions hépatiques et pour certaines molécules à effet idiosyncratique, les dommages peuvent n'apparaître qu'à partir d'un certain seuil de concentration²²⁸. L'hépatotoxicité idiosyncratique est donc plus fréquemment représentée, mais également moins définie. Elle représente alors un challenge clinique important en termes de diagnostic et de prise en charge précoce. Le terme DILI, utilisé dans la suite de ce manuscrit, se réfère particulièrement aux toxicités d'origine idiosyncratique.

2.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires des DILI

Les mécanismes soutenant les DILI ne sont pas encore tout à fait connus du fait d'un manque de données appuyées par des modèles *in vitro* et *in vivo*. Les propriétés physicochimiques et toxicologiques sont les premiers paramètres impliqués dans les mécanismes de toxicité des médicaments. L'accumulation hépatocytaire de molécule mère ou de métabolites issus de sa biotransformation dépend d'une part de leur lipophilie mais également de la dose cumulée. Il a été démontré en effet que la sévérité des DILI étaient associées à un coefficient de partage octanol/eau (ou logP) supérieur ou égal à 3 et une dose journalière supérieure à 100 mg²²⁹. La nature multifactorielle de ces lésions résulte de l'interaction de multiples mécanismes de réponse cellulaire et moléculaire, ajoutés aux facteurs environnementaux et impliquant les caractéristiques de l'hôte (Figure 9)^{226,228}.

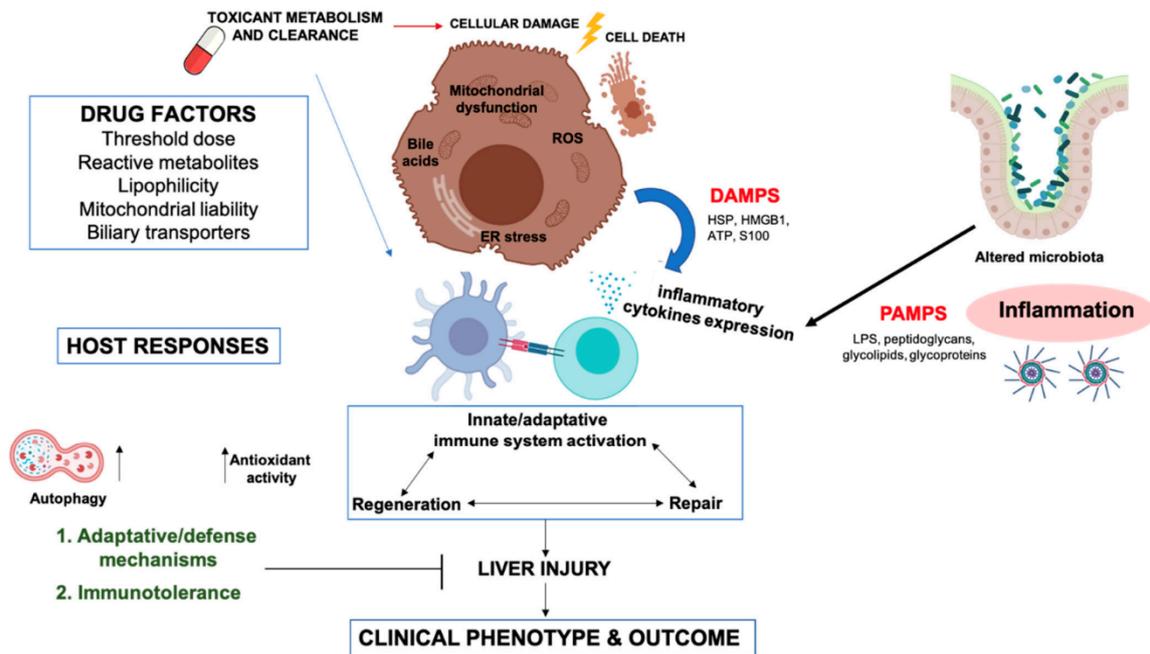


Figure 9 : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les DILI idiosyncratiques, d'après Villanueva-Paz et al.²²⁸

2.2.1. Activation métabolique et conséquences intracellulaires

La production de métabolites réactifs par les systèmes oxydatifs intracellulaires impliquant les enzymes de biotransformation constitue l'un des mécanismes impliqués dans la toxicité hépatique. La formation d'adduits covalents peut altérer directement ou indirectement les fonctions et la localisation protéiques. Ces modifications intracellulaires augmentent le stress oxydatif, première étape de l'activation des voies de signalisation menant à la dysfonction mitochondriale et au stress lié au réticulum endoplasmique^{224,230}. Les métabolites réactifs sont des espèces réactives électrophiles ou radicalaires issues de la bioactivation intrahépatocytaire de groupements fonctionnels initialement non réactifs (par exemples des noyaux pyrrole ou pyrazole méthylés, des furanes ou thiazole, etc...) appelés structures d'alerte²³¹. Ces structures d'alerte sont alors transformées par les enzymes du métabolisme en fonctions réactives telles que des quinones, des quinone-imines, des aldéhydes, des époxydes, etc... Le diclofénac,

par exemple, est un anti-inflammatoire dont les métabolites de type quinone-imines et arylglucuronides sont formés par le CYP3A4, le CYP2C9 et le CYP1A2. Ces dérivés réactifs ont la capacité de fixer les protéines hépatocellulaires et déclencher une réponse immunitaire menant à la destruction des hépatocytes²³². En général, la prise en charge de ces intermédiaires réactifs par des systèmes antioxydants (comme la conjugaison au glutathion, l'intervention de la superoxyde dismutase ou de la catalase) permet de limiter les effets hépatotoxiques de ces molécules. Néanmoins, la saturation de ces systèmes de détoxification ou leur dysfonctionnement peut endommager les organites hépatocytaires et générer un stress oxydant excessif. La présence d'intermédiaires réactifs est souvent suivie d'une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *reactive oxygen species*) en réponse à l'endommagement mitochondrial. Ces ROS, en grande quantité, peuvent endommager l'ADN, des protéines, des lipides ou des enzymes et altérer le fonctionnement des hépatocytes.

La destruction des hépatocytes libère également des motifs moléculaires de signalisation ou DAMPs (*danger-associated molecular patterns* comme HMGB1 (*high mobility group box 1* ou les protéines HSP *heat shock protein*) qui sont impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire innée *via* l'activation des récepteurs *Toll-like* (TLR) situés sur les cellules de l'immunité (macrophages, lymphocytes, polynucléaires, cellules dendritiques)^{224,233}. La sécrétion de cytokines telles que le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), le FasL (Fas ligand) ou le TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* présent sur les lymphocytes NK, *Natural Killer* et les neutrophiles) enclenche les voies de signalisation de mort cellulaire comme l'apoptose ou la nécrose dont l'activation entraîne une réponse inflammatoire exacerbée²³³.

2.2.2. Réponse au stress oxydant

Les ROS sont des espèces naturellement produites lors du métabolisme hépatocytaire et tiennent un rôle essentiel dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire. Cependant, l'accumulation de radicaux

anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyle (HO^{\cdot}) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) issus des réductions successives de l'oxygène moléculaire O_2 peuvent conduire à l'oxydation délétère des macromolécules biologiques (ADN, protéines, lipides...). La dérégulation de l'équilibre oxydatif intracellulaire entraîne le déclenchement d'une réponse anti-oxydante initiée par la libération du facteur de transcription Nrf2, réprimé en condition basale. La translocation de cette molécule dans le noyau lui permet de se fixer sur une séquence nucléotidique régulatrice ARE (*antioxidant response element*) ou élément de réponse antioxydant. L'activation de cette séquence déclenche la transcription des gènes de réponse au stress oxydant et la production d'enzymes impliquées dans la détoxification de ces ROS : les superoxyde dismutases (SOD1, SOD2), l'hème oxygénase 1 (HO-1), la glutathion-S-transférase et la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO-1)²³⁴.

2.2.3. Effets délétères sur la mitochondrie et le réticulum endoplasmique

La mitochondrie est une des cibles intracellulaires les plus impliquées dans les DILI. En effet, la dérégulation de sa fonction de production d'ATP *via* la chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative, est une source importante de production de radicaux oxygénés. Le découplage du transport d'électrons causé par certaines molécules peut causer un stress oxydatif mitochondrial massif conduisant à la nécrose ou l'apoptose des cellules²²⁸. La fixation aux complexes mitochondriaux, l'inhibition du métabolisme des acides gras ou l'altération de l'ADN mitochondrial font partie des mécanismes soutenant la dysfonction mitochondriale.

L'accumulation du métabolite réactif du paracétamol a été associée à une augmentation du stress au niveau du réticulum endoplasmique provoquées par l'accumulation intracellulaire d'espèces radicalaires. En conséquence, la dérégulation de l'homéostasie calcique altère le fonctionnement du mécanisme de réponse aux protéines mal conformées (ou UPR *unfolded protein response*) activant ensuite l'apoptose²²⁸.

2.2.4. Inhibition du transporteur d'acides biliaires BSEP

Le rôle des transporteurs hépatobiliaires dans l'élimination à la fois de composés toxiques endogènes comme les sels biliaires et de xénobiotiques implique que leur altération peut entraîner des dommages cellulaires importants. Il a été montré que l'inhibition du transporteur d'acides biliaires BSEP (*Bile Salt Export Pump*, codé par le gène *ABCB11*) par des médicaments, comme la ciclosporine ou le bosentan (utilisé dans le traitement de l'hypertension pulmonaire), était l'un des mécanismes impliqués dans la cholestase induite par des médicaments. L'accumulation de sels biliaires toxiques pour la mitochondrie augmente le stress intracellulaire et active la cascade pro-apoptotique²²⁴. Cependant, la seule perte de fonction de cette protéine ne peut être considérée comme unique cause de DILI mais elle pourrait potentialiser un dysfonctionnement intracellulaire mitochondrial ou la perte de fonctionnement d'autres transporteurs comme les ABC qui ne pourraient pas prendre le relais de l'élimination des acides biliaires.

2.2.5. Activation de la réponse immunitaire

L'activation excessive des cellules de Küpffer au niveau des sinusoides hépatiques des régions périportale et centrolobulaire peut entraîner la sécrétion de molécules biologiquement actives impliquées dans les dommages hépatiques²³⁵. Cette réaction d'hypersensibilité provoque une réaction inflammatoire impliquant les réponses immunitaires innée et adaptative.

L'une des hypothèses du mécanisme d'induction de la réponse immunitaire repose sur la formation de complexes entre les métabolites réactifs et des résidus protéiques agissant comme des néo-antigènes, exposant un motif moléculaire hapténique. Ces néo-antigènes peuvent activer la réponse immunitaire adaptative par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Il a été montré, par

exemple, que l'hépatotoxicité de la combinaison amoxicilline-acide clavulanique était associée à certains haplotypes de gènes du système HLA²³⁶, codant pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces protéines, situées sur les hépatocytes (CMH de classe I) et les cellules présentatrices d'antigènes (CMH de classe II), permettent l'activation des lymphocytes T (CD8⁺ et CD4⁺, respectivement) par la présentation des adduits aux protéines. Ainsi, les individus porteurs des variants spécifiques de HLA seraient plus à risque de développer une réponse immunitaire adaptative, impliquant particulièrement la réponse *via* les T CD8⁺²²⁴. Une seconde hypothèse ou « *danger-hypothesis* » vient compléter la précédente. En effet, après l'endommagement de l'hépatocyte, les DAMPs peuvent aussi se fixer sur des récepteurs présents sur les CPA (les PRR, *pattern-recognition receptors*), initiant ensuite la réponse médiée par les lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺²²⁸.

2.3. Susceptibilité individuelle à l'hépatotoxicité médicamenteuse

En plus des caractéristiques et la dose des molécules administrées, des facteurs individuels propres à chaque patient peuvent affecter le métabolisme et l'élimination hépatiques et par conséquent augmenter le risque d'hépatotoxicité. Cette susceptibilité aux DILI est en partie attribuable aux polymorphismes génétiques affectant les acteurs du métabolisme hépatique. Les variants génétiques des enzymes et transporteurs peuvent provoquer la formation accrue de métabolites réactifs toxiques ou diminuer leur élimination. Par ailleurs, l'âge est un facteur prédisposant important puisque les adultes sont plus exposés au risque d'hépatotoxicité que les enfants²¹⁹. De la même manière, ce risque prédomine chez la femme avec un ratio de 2,62 (1,00-6,92) femmes pour 1 homme à partir de 50 ans²²². L'obésité, la malnutrition, le jeûne et la prise d'alcool font partie des facteurs de risque de DILI²³⁷. La grossesse, la prise concomitante de plusieurs médicaments hépatotoxiques ou de molécules inductrices ou inhibitrices des acteurs du métabolisme augmentent également le risque de toxicité hépatique²¹⁹. Enfin, les atteintes virales ou des antécédents de maladies hépatiques chroniques ne faciliteront pas la récupération hépatique en cas d'atteinte hépatotoxique²¹⁹.

2.4. Manifestations cliniques et biologiques des DILI

Les manifestations cliniques des DILI sont hétérogènes mais se traduisent généralement par une hépatite aiguë et/ou une cholestase²³⁸. Ces atteintes sont caractérisées par des symptômes aspécifiques qui peuvent être similaires à ceux d'atteintes hépatiques d'origine infectieuse, tels que de la fièvre, des nausées et des vomissements, un ictère, un prurit, des urines foncées ou des douleurs abdominales du quadrant supérieur droit. Elles peuvent également se manifester par des formes chroniques d'atteintes hépatiques comme la cirrhose, des atteintes sinusoïdales obstructives etc... ou ne pas être cliniquement observables et se manifester uniquement par des anomalies du bilan biologique hépatique. Dans une étude prospective, observationnelle rassemblant les biopsies hépatiques de 249 patients, Kleiner et al.²³⁹ ont défini différents aspects histologiques associés aux DILI induites par différents médicaments. Parmi ces phénotypes, d'apparition aiguë ou chronique, les atteintes hépatocellulaires, cholestatiques et mixtes étaient les plus fréquemment observées.

Plusieurs biomarqueurs sont utilisés lors des bilans de la fonction hépatique, telles que l'augmentation sérique des transaminases (aspartate aminotransférase AST et alanine aminotransférase ALT) et des phosphatases alcalines (PAL) – considérées comme des marqueurs spécifiques d'une lésion hépatique cytolytique. Souvent, ces enzymes sont accompagnées d'une élévation des taux de bilirubine totale et conjuguée, caractéristiques d'une atteinte hépatobiliaire cholestatique. Les γ -glutamyl transférases (γ -GT) sont également des biomarqueurs d'atteintes hépatiques mais moins spécifiques, puisqu'ils sont soumis à de fortes variabilités inter- et intraindividuelles (pathologie extra-hépatique, prise d'alcool, grossesse, etc...)²⁴⁰.

2.4.1. Atteintes hépatocellulaires

L'hépatite cytolytique aiguë résulte principalement de la toxicité directe du médicament et/ou de ses métabolites toxiques. Elle est caractérisée à la biopsie par un degré variable de nécrose et d'état inflammatoire, particulièrement dans la zone 3 de l'acinus hépatique²⁴¹. Au niveau biochimique, cette atteinte est caractérisée par de fortes élévations des transaminases, et particulièrement des ALT (≥ 5 fois la limite normale supérieure). Elles sont souvent accompagnées d'une élévation des PAL, pour un ratio ALT/PAL ≥ 5 , et de la bilirubine totale ($> 2\text{ULN}$)^{241,242}. L'évolution vers une hépatite fulminante est plus probable que vers une hépatite chronique et les symptômes peuvent s'atténuer rapidement après l'arrêt du traitement.

2.4.2. Cholestase médicamenteuse

La cholestase correspond à la diminution ou l'arrêt de l'écoulement biliaire suivie par une accumulation d'acides biliaires sériques²⁴³. Cliniquement, les patients présentent un prurit, souvent transitoire, des taux élevés de PAL sériques ($> 2\text{N}$, ALT/PAL ≤ 2), de γ -GT et de bilirubine conjuguée sérique. Deux types de cholestase sont à différencier selon la localisation de l'atteinte : la cholestase intrahépatique et la cholestase extra-hépatique. La cholestase intrahépatique aiguë peut être canaliculaire ou hépatocanaliculaire (associée à une hépatite). Les cholangiopathies sont des atteintes intrahépatiques chroniques qui peuvent être caractérisées par une élévation isolée des PAL ou des γ -GT. Enfin, les atteintes extracellulaires sont caractérisées par une lithiase ou une sclérose²⁴³. Des mécanismes variés peuvent être impliqués dans l'apparition d'une cholestase médicamenteuse : l'inhibition ou la perte de fonction des transporteurs hépatobiliaires et notamment de BSEP, la toxicité directe des molécules ou de leurs métabolites réactifs sur les cholangiocytes, enfin, des mécanismes « physiques » tels que la lithiase biliaire sont favorisés par certains médicaments²⁴⁴.

2.4.3. Atteintes hépatiques mixtes

Dans les hépatites mixtes, les signes clinico-biologiques sont intermédiaires aux types hépatocellulaire et cholestatique, avec possibilité de prédominance des caractéristiques de l'un ou l'autre. Chez les patients atteints d'hépatite médicamenteuse mixte, le ratio ALT/PAL sera moins élevé que lors des atteintes cytolytiques pures (généralement entre 2 et 5)²³⁸. Cette atteinte mixte est plus souvent caractéristique d'une hépatite médicamenteuse que d'une autre étiologie et le diagnostic doit s'orienter rapidement vers la prise récente d'une molécule potentiellement hépatotoxique²⁴¹.

2.5. Diagnostic et traitement des DILI

L'identification d'une DILI reste un défi clinique majeur pour les cliniciens en raison de l'absence de marqueurs fiables et d'une signature clinique hétérogène : d'une simple élévation transitoire des enzymes hépatiques à l'insuffisance hépatique aiguë, la sévérité et l'expression phénotypique sont très variées. Cependant, l'observation d'une atteinte hépatocellulaire est un signal nécessaire, mais non suffisant, de la possibilité de provoquer une DILI²⁴⁵. L'indicateur le plus spécifique étant la preuve d'une altération de la fonction hépatique accompagnant ou suivant de près les signes de lésions hépatocellulaires.

Le diagnostic nécessite un historique clinique détaillé, ainsi qu'une analyse des paramètres biochimiques hépatiques, de l'imagerie et, dans certains cas, une biopsie hépatique. Au regard de la temporalité de l'apparition des premiers signes cliniques, il convient d'écartier au préalable toute anomalie anatomique hépatobiliaire, d'éliminer les causes infectieuses virales et auto-immunes, la prise chronique d'alcool, une atteinte cardiovasculaire ou des anomalies métaboliques ou génétiques²¹⁹. Ce diagnostic d'exclusion s'appuie aussi sur des critères biochimiques définis par le *National Cancer Institute's Common*

Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE). Seul un paramètre anormal suffit pour décrire une atteinte hépatique de type DILI²²⁴, parmi lesquels sont retenus :

- une élévation d'ALT ou AST plus de 5 fois la limite normale supérieure ;
- des PAL augmentées de plus de 2 fois la limite normale supérieure ;
- la bilirubine totale augmentée à plus de 2 fois la limite normale supérieure associée à une augmentation des ALT plus de 3 fois la limite normale supérieure.

Il est important de noter que dans la majorité des cas, les atteintes hépatotoxiques liées aux médicaments sont cliniquement asymptomatiques et seulement caractérisées par une perturbation du bilan biologique hépatique. Ces élévations de transaminases, de PAL ou de la bilirubine sont souvent transitoires et réversibles lors de l'arrêt du médicament mais peuvent tout de même atteindre des niveaux très élevés (grades 3 ou 4 du CTCAE). La poursuite du traitement mènera alors à une atteinte plus sévère traduite par les caractéristiques cliniques précédemment décrites.

Des échelles d'aide au diagnostic ont été établies comme le RUCAM (*Roussel Uclaf Causality Assessment Method*) qui permet d'attribuer des points aux paramètres cliniques, biochimiques, sérologiques et radiologiques d'une lésion hépatique afin de refléter la probabilité de l'associer à un médicament donné. Cependant, les multiples causes impliquées dans les mécanismes d'hépatotoxicité ajoutées à la complexité de son utilisation limitent son objectivité et son imputabilité^{224,246}.

Enfin, la résolution clinique d'une DILI repose sur son diagnostic précoce et l'arrêt de la molécule incriminée dès les premiers signes cliniques et biochimiques. Aucun antidote spécifique n'existe, hormis la N-acétylcystéine pour les cas de toxicité au paracétamol. Des signes de gravité tels qu'une coagulopathie ou une encéphalopathie doivent mener au transfert du patient dans un centre de transplantation, cas qui concerne près de 10% des DILI²²⁶.

Les anomalies hépatiques étant finalement peu fréquentes, souvent transitoires, réversibles et résolutes sans nécessiter l'arrêt de traitement, cela explique que de nombreuses hépatotoxicités passent

inaaperçues. Cependant, certaines peuvent évoluer vers une atteinte hépatique sévère et létale si le traitement est poursuivi ou le diagnostic établi trop tardivement. La loi de Hy (*Hy's law*) est un des premiers remparts au risque d'hépatotoxicité et sert d'outil pour caractériser une atteinte hépatique lors des essais d'enregistrement^{245,247}. Les critères attendus pour définir un risque de DILI sont les suivants :

1. Augmentation des ALT ou AST > 3 fois la limite normale supérieure parmi les individus traités comparés au groupe contrôle (placébo ou traités par une molécule non hépatotoxique) ;
2. Observation d'une élévation des transaminases parmi les sujets, associée à une augmentation des taux de bilirubine sérique supérieure à 2 fois la limite normale supérieure sans signe prédictifs de cholestase (pas d'augmentation des phosphatases alcalines, pas d'obstruction biliaire observée) ;
3. Aucune autre raison pouvant expliquer l'augmentation combinée des transaminases et de la bilirubine totale (diagnostic d'exclusion) ou pas d'exposition à un autre médicament hépatotoxique.

L'observation de ces critères chez au moins un patient de l'essai clinique suffit pour évoquer le risque d'hépatotoxicité : l'observation d'un grand nombre de cas dans des cohortes réduites est hautement prédictive du potentiel à provoquer une DILI. Ces observations sont souvent suivies d'études complémentaires ou de l'abandon du projet de commercialisation.

2.6. Modèles d'étude du métabolisme et de la toxicité hépatique

2.6.1. Identification des voies de production des métabolites réactifs

Le métabolisme hépatique peut s'évaluer *in vitro* par l'utilisation de systèmes biologiques de synthèse ou directement issus du fractionnement cellulaire d'hépatocytes humains : les microsomes (fraction du réticulum endoplasmique très riche en enzymes CYP450), les surnagants de lysats hépatiques

homogénéisés (ou fractions S9), des fractions cytosoliques hépatiques, des enzymes recombinantes, ou encore des modèles cellulaires sont des outils indispensables lors des phases d'étude du métabolisme d'un médicament²⁴⁸. L'utilisation de ces systèmes, en présence d'inhibiteurs ou d'inducteurs de certaines enzymes, permet d'identifier les voies de synthèse des métabolites réactifs. L'inhibition enzymatique (signe d'une interaction avec le métabolite) peut également être un outil d'étude des interactions médicamenteuse.

La difficulté de l'étude des métabolites réactifs repose sur leur stabilité dans les milieux biologiques. En effet, ces structures réagissent fortement avec les groupements nucléophiles présents en nombre dans les matrices biologiques riches en protéines comme le plasma. Dans l'hépatocyte, ces intermédiaires réactifs peuvent être pris en charge par des enzymes de phase II et la recherche de molécules conjuguées peut être un outil d'identification des voies métaboliques impliquées dans la synthèse et l'élimination de ces molécules. *In vitro*, la dérivatisation de ces métabolites réactifs par des agents piègeurs nucléophiles (comme la méthoxylamine, le glutathion, ...) permet l'identification du produit non réactif par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Enfin, des modifications covalentes de macromolécules biologiques présentes dans les incubations microsomales ou cytosoliques peuvent être mise en évidence par l'utilisation de molécules marquées par analyse LC-MS après digestion protéolytique.

2.6.2. Évaluation de la toxicité hépatique

L'origine multifactorielle des DILI complexifie la compréhension des mécanismes impliqués dans leur origine. L'établissement de modèles pertinents (utilisés à terme pour prédire et prévenir les DILI), représente alors un challenge important pour l'ensemble des acteurs qui y sont confrontés (patients, cliniciens, entreprises pharmaceutiques, agences de régulation). Des systèmes sont alors mis en place pour mimer au mieux le métabolisme physiologique et la réponse après exposition à des molécules toxiques et le modèle *in vivo* est considéré comme le *gold-standard* pour l'évaluation de la toxicité

hépatique. Cependant, des divergences inter-espèces peuvent être observées car la transposition des résultats est dépendante de mécanismes cinétiques et toxiques propres au modèle. De plus, leur mise en place peut être longue et représente souvent un investissement financier non négligeable ; de plus, les règles concernant l'éthique animale (règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer²⁴⁹) ne favorisent pas leur utilisation en première intention. Ainsi, des méthodes *in vitro* se substituent à l'outil animal comme la culture d'hépatocytes primaires ou immortalisés, parfois recombinants ou l'usage de cellules souches pluripotentes, afin de n'utiliser le modèle animal qu'en dernier recours. Enfin, des méthodes computationnelles de modélisation de la toxicité, ou approches *in silico*, se développent depuis une dizaine d'années.

a. Modèles cellulaires

Les hépatocytes humains primaires (HHP) sont considérés comme la référence des modèles *in vitro*. Directement isolés d'une biopsie hépatique ou utilisés après cryoconservation, la manipulation de ces cellules est difficile et leur coût important limite leur utilisation systématique²⁵⁰. *In vitro*, les HHP ne conservent leurs caractéristiques hépatiques qu'à court terme (8-10 jours) : lorsqu'elles sont cultivées pendant de longues périodes, ces cellules manifestent une perte progressive du phénotype hépatocellulaire, tant en termes de morphologie que de fonctionnalité et ce processus de dé-différenciation commence dès le processus d'isolement. La cryopréservation de ces cellules permet de faciliter leur utilisation bien qu'une grande variabilité existe entre les pools de donneurs.

La lignée immortalisée HepG2 est issue d'un adénocarcinome humain et est largement utilisée pour évaluer le potentiel hépatotoxique d'une molécule. Facilement utilisables, ces modèles souffrent néanmoins d'une expression très faible voire abolie des enzymes du métabolisme hépatique de phase I et de phase II : dans les cellules HepG2, l'activité du CYP3A4 était 15 fois plus faible que celle d'hépatocytes humains primaires²⁵¹ et celle de l'UGT 47 fois plus faible que dans des hépatocytes cryopréservés provenant d'un pool de 10 donneurs²⁵². Ces taux rejoignent ceux établis par Wilkening et al.²⁵³ qui, en

établissant les ratios d'expression des gènes codant pour des CYP450 et des enzymes de phase II, ont montré une variation d'expression entre les deux types cellulaires allant de 13 (CYP1A1) à plus de 5000 fois plus (CYP2C9) dans les cellules primaires. De plus, le CYP3A4 était indétectable dans les cellules HepG2. Pour compenser cette faible capacité de métabolisation, des modèles de surexpression ont été conçus par transfection ou infection de vecteurs viraux permettant l'expression des enzymes CYP450 à des niveaux comparables aux hépatocytes humains, les rendant utilisables pour évaluer la toxicité de composés nécessitant d'être bioactivés^{254,255}. Malgré tout, les cellules HepG2 sont un outil facilement manipulable contrairement aux hépatocytes primaires et Westerink et al.²⁵¹ ont démontré que la pré-stimulation de cette lignée avec des activateurs des récepteurs nucléaires AhR, PXR et CAR avant d'effectuer les tests de cytotoxicité pourrait conduire à une meilleure prédiction de la toxicité.

La lignée HepaRG semble être un compromis entre les cellules immortalisées et les hépatocytes humains. Cette lignée, issue d'un hépatome, a la capacité de se différencier vers un phénotype hépatocytaire mais également en cellules épithéliales biliaires^{256,257}. Contrairement aux cellules HepG2, ces cellules ont conservés leur capacité de métabolisation à un niveau comparable à celui des hépatocytes primaires humains et ont démontré leur intérêt dans l'évaluation de composés nécessitant d'être transformés en métabolites réactifs toxiques et l'observation de toxicité hépatobiliaire²⁵⁸. Dans une étude comparative des trois modèles cellulaires (hépatocytes humains, lignées HepaRG et HepG2), Gerets et al.²⁵⁹ ont montré que les cellules HepaRG étaient adaptées aux études d'induction enzymatique puisqu'elles exprimaient les CYP450 de manière très similaire aux hépatocytes humains mais étaient comparables aux cellules HepG2 en termes de prédiction des effets toxiques de molécules : sensibilité de 30-50% pour les hépatocytes humains (dépendant du donneur) et 12,5% pour les HepaRG et 6,3% pour les HepG2. L'ensemble des avantages et inconvénients des différentes modèles *in vitro* sont répertoriés dans la Table 3.

Table 3 : Avantages et inconvénients des modèles cellulaires utilisés pour l'étude des DILI

	Avantages	Inconvénients
<i>Hépatocytes primaires frais</i>	- Expression totale des enzymes du métabolisme hépatique	- Procédure d'isolation, fragilité cellulaire - Variabilité interindividuelle - Standardisation complexe
<i>Hépatocytes primaires cryopréservés</i>	- Expression totale des enzymes du métabolisme hépatique	- Coût important - Variabilité inter-pools - Perte rapide du phénotype métaboliseur
<i>Lignée différenciée HepaRG</i>	- Double phénotype : différenciation en hépatocytes et en cellules épithéliales biliaires - Expression des enzymes du métabolisme comparable aux hépatocytes primaires	- Conditions de culture strictes pour la différenciation - Faible sensibilité de prédiction des effets hépatotoxiques
<i>Lignées immortalisées (ex : HepG2)</i>	- Utilisation à long terme - Peu coûteuse	- Perte quasi-totale de la capacité de métabolisation des xénobiotiques - Peu inductible - Faible sensibilité de prédiction des effets hépatotoxiques

Plusieurs méthodes expérimentales permettent d'évaluer la toxicité hépatocytaire et préciser les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement cellulaire. Parmi ces tests, la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire permet d'observer l'effet délétère d'un composé sur l'intégrité membranaire²⁶⁰. La production d'ATP intracellulaire, signe de viabilité cellulaire²⁶¹, est également un outil de prédiction de la toxicité mitochondriale d'un médicament. Les cellules HepG2 ont acquis cette capacité de varier les voies de production d'énergie, ce qui leur permet d'utiliser la glycolyse en plus de la phosphorylation oxydative afin de maintenir une croissance continue en condition anaérobie²⁶². La substitution du glucose dans le milieu de culture par du galactose leur permet ainsi de transférer la production d'ATP initialement issu de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative²⁶³. Cet usage forcé de la respiration mitochondriale rend les cellules plus sensibles aux composés mitotoxiques, puisqu'aucune voie de secours pour la production d'ATP n'est disponible. Kamalian et al.²⁶⁴ ont démontré que, malgré la faible capacité métabolique et bioénergétique des HepG2 et leur manque de polarisation, leur utilisation pour détecter les composés toxiques pour la mitochondrie est plus pertinente que celle des hépatocytes humains chez qui l'effet Warburg n'existe pas (c'est-à-dire un transfert du métabolisme bioénergétique aérobie vers l'utilisation excessive de la glycolyse dans les cellules cancéreuses)²⁶⁵.

D'autres modèles existent notamment afin d'évaluer la réponse au stress oxydant. La déplétion du glutathion intracellulaire, un agent majeur de détoxification par conjugaison, permet d'augmenter l'exposition des cellules et leur sensibilité aux radicaux oxygénés et aux métabolites réactifs. Afin d'évaluer la capacité des essais de cytotoxicité pour prédire le risque de DILI *via* une augmentation du stress oxydatif, Xu et al.²⁶⁶ ont exposé deux lignées hépatiques (HepG2 et HepaRG) à des composés connus pour leur effets hépatotoxiques après 24 heures de pré-incubation avec de la L-buthionine sulfoximine (BSO) à la concentration de 400 μ M. Cet inhibiteur de γ -glutamylcystéine synthétase bloque les étapes précoces de biosynthèse de glutathion. La sensibilité du test évaluant la concentration d'ATP dans les cellules HepG2 pré-incubées avec de la BSO était plus élevée que dans les cellules non pré-incubées (86% vs 79%, respectivement)²⁶⁶. La mesure de l'activité des caspases 3/7 (évaluant l'effet pro-apoptique) exposées à ces molécules dans les cellules HepaRG offrait également une spécificité de 75% en présence de BSO contre 69% sans inhibiteur. Enfin, l'utilisation des données de viabilité cellulaire issues des deux lignées pré-incubées permettait d'atteindre une sensibilité et une spécificité de 94% chacune.

b. Modèles in vivo

Bien que les modèles *in vitro* tiennent une place prépondérante dans les études précliniques pour prédire l'hépatotoxicité, ils ne représentent pas le fonctionnement hépatique à part entière, ni les interactions entre le système immunitaire ou ses relations avec les autres organes. De plus, la difficulté supplémentaire apportée par le mécanisme idiosyncratique de certaines molécules impose l'utilisation de modèles animaux prédisposés au risque de DILI : induction de l'inflammation avec l'administration de lipopolysaccharide (modèle inflammagène), suppression de la tolérance immunitaire (modèle Utrecht-Pohl), modification génétique du fonctionnement mitochondrial pour diminuer la réponse au stress oxydant (modèle de mitochondriopathie)²⁶⁷. Parmi ces modèles, l'inhibition des mécanismes de tolérance immunitaire apparaît être l'outil se rapprochant le plus de la physiopathologie humaine, puisqu'il a été démontré que le développement des formes graves de DILI idiosyncratique dépendait de la perte de la tolérance immunitaire²⁶⁷. Dans des modèles de souris PD-1/CTLA4-K.-O., Mak et al.²⁶⁸

reproduisaient la signature physiopathologique observée chez les patients exposés à la troglitazone. Malgré le fonctionnement prometteur de ce modèle récent, aucun cas d'insuffisance hépatique sévère n'a été observée chez la souris et l'altération totale du système immunitaire chez l'animal n'est souvent pas aussi extrême chez l'Homme. Enfin, des modèles de cholestase et d'hépatite mixte reste encore à développer.

c. Méthodes *in silico*

Prédire les effets hépatotoxiques est un enjeu majeur avant la mise sur le marché d'un médicament puisque c'est l'une des principales causes d'échec en phase clinique. L'utilisation des méthodes expérimentales est souvent limitée par la complexité et l'interrelation des mécanismes soutenant les DILI. La conception de modèles informatiques basés sur les relations entre structure chimique et activité biologique d'une molécule, ou QSAR pour *quantitative structure-activity relationships*, apparaît être une méthode alternative offrant un gain de temps et moins onéreuse pour identifier le risque de DILI d'une nouvelle molécule. Malgré ce besoin évident de prédiction, les approches computationnelles n'émergent que depuis une dizaine d'années. Deux méthodes *in silico* existent : une méthode statistique (*statistical-based approach*), intégrant des marqueurs moléculaires déjà identifiés *in vivo* ou *in vitro* comme associés aux DILI grâce au *machine learning*, pour créer un modèle quantitatif de prédiction de l'hépatotoxicité ; et une approche basée sur l'étude des structures d'alerte présentes sur la molécule mises en relation avec les effets biologiques déjà observés lors d'études toxicologiques approfondies (*expert-based approach*)²⁶⁹. Cette dernière méthode semble cependant moins pertinente puisque les modèles QSAR développés par cette approche n'ont jamais permis de prédire efficacement une toxicité et certains ont démontré que ces structures d'alerte n'étaient pas un outil efficace de prédiction de la toxicité. L'approche statistique bien que plus précise, souffre néanmoins d'une variabilité au niveau de la performance de prédiction et d'un nombre limité de structures chimiques étudiées (peu d'études ont intégré les données issues d'échantillons >1000). La performance prédictive d'un modèle est évaluée par sa

sensibilité (identifier correctement les composés hépatotoxiques), sa spécificité (prédire efficacement les composés non hépatotoxiques) et sa précision. L'un des derniers modèles QSAR publiés par He et al.²⁷⁰ incorporait les données de 1254 composés issus de la littérature dans la cohorte de *training* (636 composés positifs et 618 négatifs). Le modèle de prédiction construit à partir d'algorithmes a ensuite été testé sur des cohortes de validation externes (comportant un plus faible nombre de composés <100) et a atteint une précision de 78,3%, une sensibilité de 81,8%, une spécificité de 74,8%.

Partie 2 : Hépatotoxicité des médicaments cytotoxiques, exemple de la trabectédine

1. Généralités sur la trabectédine

1.1. Origine, structure chimique et mécanisme d'action

La trabectédine (ou ET-743) est un alcaloïde de synthèse commercialisé sous le nom de Yondelis® par le laboratoire PharmaMar (Madrid, Espagne). A l'origine, cette molécule était extraite de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, un animal marin du sous-embranchement des tuniciers retrouvé dans les mangroves caribéennes.

Dans les premiers essais *in vitro*, l'activité cytotoxique de la trabectédine sur des sous-types histologiques de sarcomes et de cancers ovariens débutait à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et était dépendante du temps d'exposition^{271,272}. Elle est donc utilisée pour le traitement des sarcomes des tissus mous avancés (STMA), pour lequel elle a reçu son autorisation européenne de mise sur le marché en 2007²⁷³. Cette molécule est également prescrite en association avec la doxorubicine pégylée pour le traitement des rechutes de cancer ovarien sensible aux dérivés de platine^{274,275}. La structure chimique de la trabectédine comprend trois noyaux tétrahydroisoquinolines A, B et C et est représentée en Figure 10A.

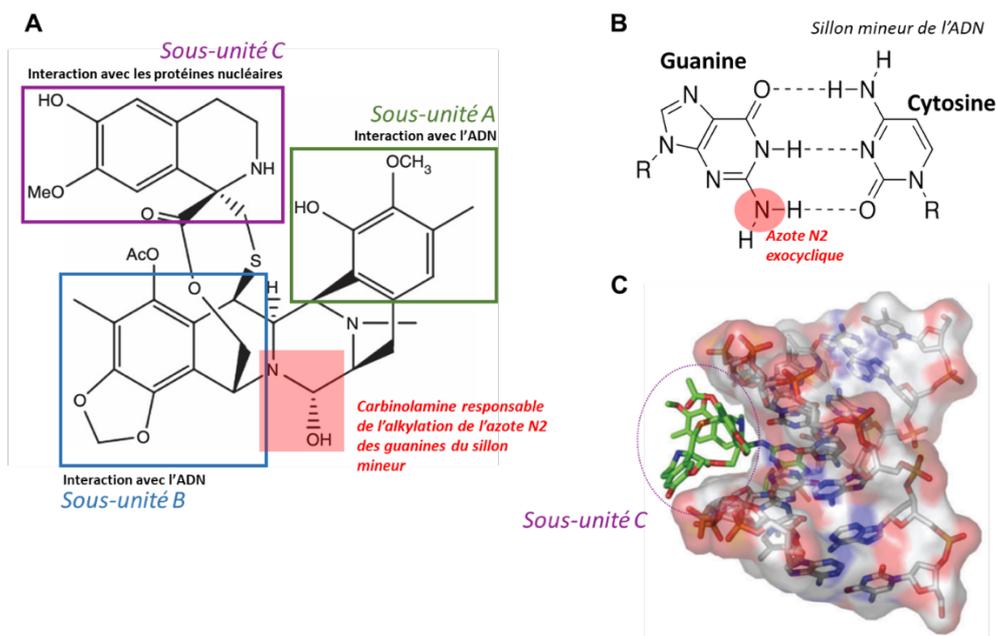


Figure 10 : Structure, conformation et réactivité de la trabectédine, d'après d'Incalci et al.²⁷⁶

(A) Sous-unités de la trabectédine et réactivité ; (B) couple guanine-cytosine du sillon mineur ; (C) interaction avec le sillon mineur de l'ADN.

Les sous-unités A et B forment un squelette pentacyclique et participent à la formation de liaisons covalentes avec les bases du sillon mineur de la double hélice d'ADN. La sous-unité C, reliée aux deux autres noyaux par un pont lactone et une liaison sulfure benzylique, est située à l'extérieur de la double hélice²⁷⁷.

La trabectédine est donc une isoquinoline de la classe des agents alkylants qui interagit avec l'azote exocyclique N2 des guanines du sillon mineur²⁷⁸. Ce mécanisme original diffère de celui des autres membres de cette classe qui ciblent préférentiellement l'azote N7 ou l'oxygène O6 des guanines situées dans le sillon majeur de l'ADN. La déshydratation *in situ* au niveau du noyau carbinolamine (essentiel à l'activité de la trabectédine) situé entre les sous-unités A et B, conduit à la formation d'un intermédiaire réactif de type imine réagissant avec l'azote primaire des guanines (Figure 10B)²⁷⁶. Cet adduit volumineux est stabilisé par des liaisons de faible énergie (de type liaisons hydrogène et forces de van der Waals) entre les noyaux A et B, mais également avec les nucléotides environnants du brin opposé, créant ainsi des liaisons interbrins²⁷⁹. La richesse en GC de la séquence d'ADN semble être déterminante pour la fixation de la trabectédine qui favorise les interactions avec des triplets de bases contenant une guanine

centrale de type 5'-purine-GC ou 5'-pyrimidine-GG²⁷⁶. Cette fixation provoque le repli de la double hélice d'ADN vers le sillon majeur par encombrement stérique et perturbe les mécanismes de transcription et de réparation de l'ADN²⁸⁰. En effet, ces changements structuraux empêchent la bonne reconnaissance des séquences de régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription (comme E2F ou les facteurs se fixant sur la séquence CAAT d'initiation de la transcription)²⁷⁶. De plus, la présence de l'adduit covalent sur l'un des deux brins d'ADN déstabilise la séparation de ces brins lors de l'élongation de la transcription et empêche la progression de l'ARN polymérase II sur le brin codant²⁸¹. La sous-unité C est, quant à elle, impliquée dans la perturbation des interactions entre l'ADN et les protéines nécessaires à son expression (facteurs de transcription, protéines de la réparation...) (Figure 10C).

Plusieurs études ont montré que l'activité antiproliférative de la trabectédine était dépendante des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN, tels que l'excision de nucléotide couplée à la transcription (TC-NER, *transcription-coupled nucleotide excision repair*) et la recombinaison homologue (RH)^{276,281,282}. De manière surprenante, et contrairement aux autres agents cytotoxiques fixant l'ADN comme le cisplatine, il a été observé que des cellules déficientes en TC-NER était 2 à 10 fois moins sensibles à la trabectédine que des cellules exprimant ce mécanisme de réparation²⁷⁶. En effet, des études d'interaction moléculaire menées *in vitro* chez des mutants de levure *Schizosaccharomyces pombe*, ont montré que la sous-unité C formait une liaison hydrogène avec un résidu arginine de la protéine de réparation Rad13, une protéine orthologue de XPG/ERCC5 (*Xeroderma pigmentosum complementation group G/ Excision Repair 5, endonuclease Non-Catalytic Subunit*). Ce complexe ternaire Rad13(XPG)-ADN-trabectédine induirait la cassure des brins d'ADN, responsable de la cytotoxicité²⁸². Il a été également observé que la trabectédine était 7 à 8 fois moins active sur des lignées cellulaires déficitaires en XPG/ERCC5 ou ERCC1²⁸³ et la surexpression de ces protéines dans des modèles déficients permettait de restaurer son mécanisme antiprolifératif²⁸¹. La RH, quant à elle, est impliquée dans la réparation des cassures double-brins et des liaisons interbrins et fait intervenir des protéines telles que Rad51, elle-même régulée par les protéines BRCA1 et BRCA2 (*Breast cancer 1 et 2*)²⁸⁴. Ce mode de réparation semble être un acteur majeur du mécanisme d'action de la trabectédine puisque la persistance des lésions

double-brins augmenterait de près de 100 fois la sensibilité à la molécule²⁸¹. En clinique, cette sensibilité accrue a été observée chez des patients traités par trabectedine et porteurs de mutations inactivatrices des gènes *BRCA1* et/ou *BRCA2*²⁸¹.

Enfin, la trabectedine aurait la capacité de moduler le microenvironnement tumoral, une structure complexe et dynamique composée de multiples types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, fibroblastes) intégrés au sein d'un stroma inflammatoire²⁸¹. Des études ont montré qu'elle pouvait causer une déplétion cellulaire macrophagique et monocyttaire et altérer le mécanisme d'angiogénèse²⁸¹. De plus, elle inhiberait la production *in vitro* de médiateurs pro-inflammatoires (comme des chemokines ou des interleukines) par les macrophages associés aux tumeurs²⁸⁵.

1.2. Biomarqueurs pharmacogénomiques associés à la trabectedine

Les sarcomes des tissus mous sont des tumeurs malignes très hétérogènes et dont les taux de survie après traitement sont faibles. La prédiction de la réponse thérapeutique grâce à des biomarqueurs permettrait d'optimiser la prise en charge clinique et contribuerait à élucider la part de la génétique dans les variabilités inter- et intraindividuelle appliquées à l'efficacité des traitements chez ces patients. Au vu de la capacité de la trabectedine à interagir avec différentes cibles de la cellule tumorale, de nombreux biomarqueurs génomiques ont été décrits concernant à la fois l'ADN germlinal et l'ADN somatique (tumoral). Des études ont indiqué que l'activité de la molécule serait dépendante de l'intégrité des systèmes de réparation par NER et RH suggérant que les protéines associées pourraient constituer une signature moléculaire de la réponse tumorale²⁸⁶. Italiano et al.²⁸⁷ ont génotypé les biopsies de tumeurs de 113 patients atteints de STMA et ont montré que les porteurs d'au moins une copie mutée de l'haplotype *BRCA1* AAAG (composé des variants rs16941, rs16942, rs1799966 et rs799917) présentaient une meilleure réponse après une chimiothérapie par trabectedine (médiane de 4 cycles) : la PFS était de 5,6 mois contre 2,5 mois pour les non mutés ($p = 0,03$) et la survie globale (ou *overall-survival*, OS) était de 14,1 mois contre 5 mois ($p = 0,0095$). Dans une étude récente, Moura et al.²⁸⁸ ont comparé les

taux d'expression tumoraux de gènes de la réparation tels que *CUL4A*, *ERCC1* et *ERCC5* chez des patients traités par trabectédine associée à de la doxorubicine vs des patients traités uniquement par doxorubicine. Les auteurs rapportent que dans le groupe ayant reçu les deux molécules, la survie était prolongée dans le cas où ces gènes étaient surexprimés ($p = 0,038$, $0,006$ et $0,039$, respectivement). Par ailleurs, *in vitro*, seule la surexpression de *ERCC1* était significativement associée à une sensibilité plus importante à la trabectédine dans différentes lignées cellulaires de sarcomes des tissus mous (exprimée en IC_{50} , $p < 0,001$), permettant de conclure quant à son potentiel en tant que biomarqueur chez les patients souffrant de STMA. Par ailleurs, les tumeurs exprimant faiblement *BRCA1* et fortement *ERCC5/XPG* seraient associées à une sensibilité plus élevée à la trabectédine ($p < 0,01$)²⁸⁹, formant ainsi une signature composite permettant d'identifier les sous-types de sarcomes les plus sensibles à la trabectédine.

1.3. Indications cliniques

En pratique clinique, la trabectédine est proposée en seconde ligne dans le cadre de la prise en charge des STMA lorsque les traitements de première intention tels que la doxorubicine ou l'ifosfamide n'apportent plus d'effets cliniques, ou lorsque le patient présente une contre-indication à l'usage de ces molécules^{273,290}. D'autres médicaments tels que le pazopanib, la dacarbazine, ou encore le cyclophosphamide peuvent faire l'objet d'une prescription pour le traitement des STMA²⁹⁰.

Les études de phase 1 ont établi la dose maximale tolérée de trabectédine à $1,8 \text{ mg/m}^2$ lors d'une administration continue pendant 24 heures^{291,292}. Le schéma d'administration recommandé pour le traitement d'un STMA est donc de $1,5 \text{ mg/m}^2$ administrés par perfusion intraveineuse à débit constant pendant une durée de 24 heures, ceci répété toutes les trois semaines^{273,293}. Dans un essai de phase IV, prospectif, observationnel, non interventionnel et multicentrique, Buonadonna et al.²⁹⁴ ont évalué l'efficacité de la trabectédine dans le contexte de son utilisation clinique courante (évaluation en « vie réelle ») chez des patients atteints de STMA. L'objectif principal était d'évaluer la PFS moyenne chez

218 patients traités par trabectédine à la dose standard de 1,5 mg/m². Les auteurs ont ainsi rapporté une PFS médiane de 5,9 mois (IC95% : 4.9-7.8 mois) avec près de 70% (63-95%) des patients ne présentant plus aucun signe de progression après 3 mois de traitement et 49% (42-55%) des patients après 6 mois.

Dans une étude rétrospective du Groupe Sarcomes Français incluant 804 patients atteints de STMA traités par dose standard et suivis pendant 22 mois, la PFS médiane était de 4,4 mois [3,9-4,9 mois] et les taux de PFS à 3 et 6 mois atteignaient 59 et 40%, respectivement²⁹⁵. Par ailleurs, la prise de trabectédine apportait un bénéfice clinique plus favorable lorsqu'elle était administrée en seconde ou troisième ligne que lorsqu'elle était prévue en 4^e ligne de traitement (PFS médiane de 4,8 mois, 4,5 mois et 3,8 mois, respectivement ; OS de 12,9 mois, 12,2 mois et 9,5 mois, respectivement). Finalement, après la période de suivi correspondant à 6 cycles de traitement, 304 patients avaient une maladie stable. Parmi eux, 227 ont reçu des cycles de chimiothérapie supplémentaires allongeant ainsi la PFS de 5 mois (11,7 vs 7,6 mois, $p < 0,003$) ainsi que la OS (24,9 vs 16,9 mois, $p < 0,001$) par rapport aux 77 patients ayant stoppé le traitement après la période de suivi prévue initialement²⁹⁵.

Récemment, Le Cesne et al.²⁹⁶ ont publié les résultats de leur étude de phase 3 comparative, prospective, multicentrique et randomisée, T-SAR (T-SAR, NCT02672527, Gustave Roussy, Villejuif, France). Les auteurs ont comparé les bénéfices en termes de PFS, d'OS et de qualité de vie apportés par la trabectédine contre les meilleurs soins de support (SDS) chez des patients atteints de sarcomes de tissus mous de stade avancé (récidivant). Dans le bras trabectédine, la PFS moyenne était de 3,1 mois (IC95% : 1,8-5,9) contre 1,5 mois (0,9-2,6) dans le bras SDS (*hazard ratio* HR : 0,39, IC95% : 0,24-0,64, $p < 0,001$). Une amélioration particulière a été observée dans le sous-groupe de patient atteints de STS de type L incluant les lipo et les léiomyosarcomes (5,1 vs 1,4 mois, $p = 0,0001$). Parmi ces patients, 7 d'entre eux appartenant au groupe trabectédine ont présenté une réponse partielle et aucune réponse objective n'a été observée dans le groupe SDS ($p = 0,004$).

Parmi ses indications, la trabectédine a également montré son efficacité dans le traitement du cancer ovarien récurrent et sensible aux dérivés du platine pour lequel elle est administrée en association avec de la doxorubicine pégylée. Le schéma d'administration comprend une perfusion intraveineuse de 1,1 mg/m² de trabectédine d'une durée de 3 heures, répétée toutes les 3 semaines immédiatement après l'administration de doxorubicine (30 mg/m²)^{273,274,297}. Casado et al.²⁷⁵ ont également montré que la trabectédine avait la capacité de re-sensibiliser les cellules tumorales initialement résistantes au platine en permettant d'atteindre une PFS et une OS de 5 mois (4,0-5,9 mois) et 14,7 mois (5,7-23,6 mois), respectivement après réexposition au platine.

1.4. Propriétés pharmacocinétiques et relations pharmacocinétique-pharmacodynamiques

La pharmacocinétique de la trabectédine est linéaire puisque l'AUC de la trabectédine est proportionnelle à la dose jusqu'à 1,8 mg/m² de surface corporelle^{291,292}. Son profil pharmacocinétique correspond à un modèle de distribution à compartiments multiples et après administration, le volume apparent de distribution peut atteindre 1000 à 6000L à l'équilibre^{292,298,299}. Ce phénomène est possible car la trabectédine présente un caractère lipophile important (log P = 3,4) et un fort taux de liaison aux protéines plasmatiques (94-98% de la trabectédine plasmatique est fixée à l'albumine)³⁰⁰. Dans l'étude pharmacocinétique de van Kesteren et al.²⁹², les concentrations maximales et l'AUC_{0-∞} déterminées chez 25 patients après un cycle à la dose standard étaient de 1,8 (±1,1) ng/mL et 55 (±25) ng.mL⁻¹.h, respectivement. La variabilité interindividuelle appliquée à l'exposition était importante chez les patients de l'étude puisque les coefficients de variation (CV) de l'AUC_{0-∞} et la clairance plasmatique étaient proches de 45% et de 49%, respectivement, résultats confirmés ensuite dans une autre étude³⁰¹ (45,1% pour la C_{max} et 41,5% pour l'AUC). Cependant, en explorant les caractéristiques des individus comme covariables (âge, sexe, poids, surface corporelle, fonction rénale et taux de protéines totales), aucune relation significative n'a pu être mise en évidence pour expliquer cette large variabilité. Par ailleurs, la variabilité

intra-individuelle mesurée entre deux cycles à la dose de 1,5 mg/m² chez un même patient était relativement faible (CV pour l'AUC_{0-∞} de 28%)²⁹². Enfin, l'élimination de la trabectedine est principalement extra-rénale puisque seule une très faible proportion de la dose est éliminée dans les urines (en moyenne 5,9%)²⁹⁸. Des études ont montré qu'après métabolisation hépatique la trabectedine est principalement éliminée sous forme de métabolites dans les selles (58%) dans lesquelles moins de 1% de la dose administrée éliminée y existe sous forme inchangée^{298,302} et la clairance d'élimination totale peut atteindre 35 L/h²⁹². Enfin, la demi-vie (t_{1/2}) de la trabectedine est très longue : elle atteignait 89 (±41) heures dans l'étude de van Kesteren et al.²⁹² et 180 (±61,4) heures dans l'étude de pharmacocinétique de population conduite par Perez-Ruixo et al.²⁹⁹ chez 603 patients.

Concernant son profil de toxicité, la majorité des événements indésirables rapportés dans les études de phase I étaient d'ordre hématologique : à la dose standard, la neutropénie et la thrombopénie de grade 3-4 concernaient 30 à 50% des cas^{291,303}. Dans l'étude de van Kesteren et al.²⁹², le taux de plaquettes était significativement abaissé chez les patients présentant une forte exposition à la trabectedine ($p = 0,002$), tout comme les taux de leucocytes et particulièrement de neutrophiles qui variaient en fonction de la dose cumulée et de la C_{max} ($p < 0,05$)²⁹². Cependant, la sévérité de la neutropénie et de la thrombocytopenie était seulement modérément corrélée à l'exposition ($r = 0,413$ et $0,495$, respectivement, $p = 0,001$)²⁹¹.

Une élévation transitoire des transaminases a également été relevée chez près de 30 à 40% des individus traités par trabectedine²⁹¹. Van Kesteren et al.²⁹² ont observé que les taux d'enzymes hépatiques avaient tendance à augmenter lorsque la dose était augmentée et la C_{max} élevée (résultats non significatifs) et l'AUC était la seule à être significativement associée à une élévation plus importante des transaminases ($p < 0,001$). Les relations PK/PD établies par Taamma et al.²⁹¹ ont montré que la cytolyse hépatique était corrélée à l'augmentation des doses et une exposition plus importante à la trabectedine. En effet, une relation modérée mais significative existe entre l'AUC et la gravité de l'élévation des transaminases ($r_{AST} = 0,580$, $p < 0,001$ pour les AST, et $r_{ALT} = 0,367$ pour les ALT, $p = 0,004$), mais seule une faible corrélation a été relevée pour la C_{max} ($r_{AST} = 0,415$, $p = 0,001$; $r_{ALT} = 0,362$, $p = 0,004$).

De nombreuses études ont évalué l'efficacité de la trabectédine en combinaison avec d'autres cytotoxiques. Bien qu'*in vitro*, l'association avec la doxorubicine ait permis d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales de sarcomes des tissus mous de manière additive³⁰⁴, ou synergique³⁰⁵, l'association entre les deux molécules n'est autorisée que dans le cadre du traitement du cancer de l'ovaire récurrent, sensibles aux sels de platine²⁷³. Cependant, une récente étude de phase 3 randomisée comptant près de 576 patientes atteintes de cancer de l'ovaire a montré que la survie globale n'était pas améliorée par la prise de doxorubicine avant la trabectédine : 23,8 mois vs 22,2 mois dans le groupe doxorubicine seule (HR 0,92, IC95% = 0,73–1,18, $p = 0,524$)^{306,307}.

Du fait de sa forte proportion à être éliminée par le foie, la fonction hépatique est un facteur de variabilité important pour la pharmacocinétique de la trabectédine. Dans l'étude de Calvo et al.³⁰⁸, l'exposition à la trabectédine était plus élevée chez les patients atteints d'insuffisance hépatique modérée. En effet, la C_{max} et l' AUC_{last} ajustées par la dose étaient augmentées respectivement d'un facteur 1,40 et 1,97 chez ces patients en opposition aux patients ayant une fonction hépatique normale. Puchalski et al.³⁰¹ ont démontré qu'une relation existait entre le taux d'ALT à l'inclusion et l' AUC ($r = 0,39$, $p < 0,01$), qui était 17% plus élevées que chez les patients à fonction hépatique normale (résultat non significatif). De plus, parmi les patients de leur cohorte ayant une fonction hépatique altérée, l'incidence des effets toxiques était de 80% vs 44% ($p = 0,02$)³⁰¹. Ainsi, comme indiqué dans son résumé des caractéristiques du produit, Yondelis® ne peut être prescrit chez des patients dont la bilirubinémie est élevée à l'inclusion et le traitement doit être accompagné d'un suivi renforcé du bilan hépatique²⁷³.

Du fait de la faible implication du rein dans l'élimination de la trabectédine, aucune contre-indication n'existe pour les patients atteints d'insuffisance rénale. Cependant, vu le manque de données concernant cette population, l'utilisation de la trabectédine en monothérapie est proscrite chez les patients dont la clairance de la créatinine est inférieure à 30 mL/min et inférieure à 60 mL/min si elle est utilisée en association²⁷³. Par ailleurs, chez des patients atteints d'insuffisance rénale terminale, la mise en place de système de dialyse péritonéale n'influence pas l'élimination de la trabectédine et n'induit pas plus d'effets toxiques^{309,310}.

1.5. Métabolisme et élimination hépatique de la trabectédine

1.5.1. Métabolisme par les cytochromes P450

Les principales études du métabolisme de la trabectédine ont démontré qu'elle était quasi-exclusivement prise en charge par le foie avant son élimination biologique. En effet, l'étude de bilan de masse menée par Beumer et al.²⁹⁸ chez 8 patients a montré que 55,5% de la dose totale de trabectédine radio-marquée au carbone 14 était retrouvée dans les fèces, et que moins de 1% y était éliminée sous forme inchangée.

La complexité du métabolisme oxydatif de la trabectédine explique que celui-ci ne soit pas encore totalement connu et que les effets potentiels de ces nombreux métabolites (toxiques ou actifs sur les cibles) ne soient pas clairement définis. En effet, la plupart des investigations *in vivo* n'ont apporté que peu de résultats concluants du fait de la difficulté à détecter ces composés. Plusieurs raisons s'ajoutent, notamment (i) la faible dose de trabectédine administrée aux patients ; (ii) la faible quantité de métabolites circulant au niveau plasmatique ; (iii) le faible taux d'extraction de ces métabolites au niveau fécal (environ 30-50%^{298,311}) ; et enfin (iv) la faible stabilité de la trabectédine et de ces potentiels métabolites réactifs dans les milieux biologiques^{302,312,313}.

Sparidans et al.³¹² ont été les premiers à incuber la trabectédine en présence de microsomes hépatiques humains, des systèmes biomimétiques très utilisés pour la caractérisation du métabolisme des xénobiotiques. Leurs expérimentations ont permis d'identifier quelques métabolites oxydés et glucuronidés *in vitro* mais qu'ils n'ont pu détecter dans les échantillons biologiques de patients (plasma, urine et bile). Reid et al.³¹⁴ ont étudié l'implication des CYP450 en incubant d'abord la trabectédine avec des enzymes recombinantes (rCYP) et des microsomes murins et humains, puis en administrant la trabectédine à des rats en présence d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques de ces enzymes. Les résultats ont

montré que le CYP3A4 était la principale enzyme impliquée dans l'oxydation de la trabectédine, accompagnée dans une moindre mesure du CYP2C9, du CYP2D6 et du CYP2E1. Par ailleurs, le métabolite majeur identifié était un analogue N-déméthylé de la trabectédine, ou ET-729, qui possède aussi une activité alkylante. En effet, Marco et al.³¹⁵ ont montré que l'absence de méthyle au niveau de l'azote 12 permettait à l'ET-729 de cibler les guanines de différents triplets de bases non fixés par la trabectédine (comme AGA ou CGA), dans laquelle ce groupement est en confrontation stérique avec la guanine centrale et l'adénine. D'autre part, dans l'étude de Reid et al.³¹⁴, l'excrétion biliaire de la trabectédine était plus importante chez les rats mâles que chez les rats femelles alors que l'inverse se produisait pour son métabolite ET-729. Ils expliquent ces différences entre genres d'espèces par le fait que les enzymes du métabolisme seraient plus abondantes chez les rats femelles³¹⁶. Cependant, cette variabilité d'expression des CYP450 liée au sexe n'a jamais pu être clairement établie chez l'Homme et ne permet pas de présager d'une production plus importante de métabolites de la trabectédine chez la femme^{317,318}. Brandon et al.³¹⁹ précisent par la suite que la part métabolique prise en charge par le CYP3A4 s'élève à près de 95% dans les modèles *in vitro*. Ils montrent également que la trabectédine est métabolisée par d'autres CYP450 (2E1, 2C9, 2D6 et 2C19) et par des enzymes de phase II, comme les UGT et les GST.

Après avoir collecté les urines et les selles de 8 patients pendant 24h et 120h, respectivement, Beumer et al.³⁰² ont analysé le profil métabolique de la trabectédine par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Les auteurs identifient alors près de 12 métabolites et produits de dégradation, suggérant que plusieurs voies métaboliques seraient impliquées dans l'élimination de la trabectédine, mais sans réussir à identifier ceux précédemment décrits dans la littérature et notamment l'ET-729. Plus tard, Vermeir et al.³¹¹ parviennent à identifier les principaux métabolites de la trabectédine (représentés en Figure 11) dans des fractions subcellulaires hépatiques humaines et simiennes résultant de réactions d'oxydation et de N-déméthylation. Ils y détectent cette fois l'analogue N-déméthylé de la trabectédine.

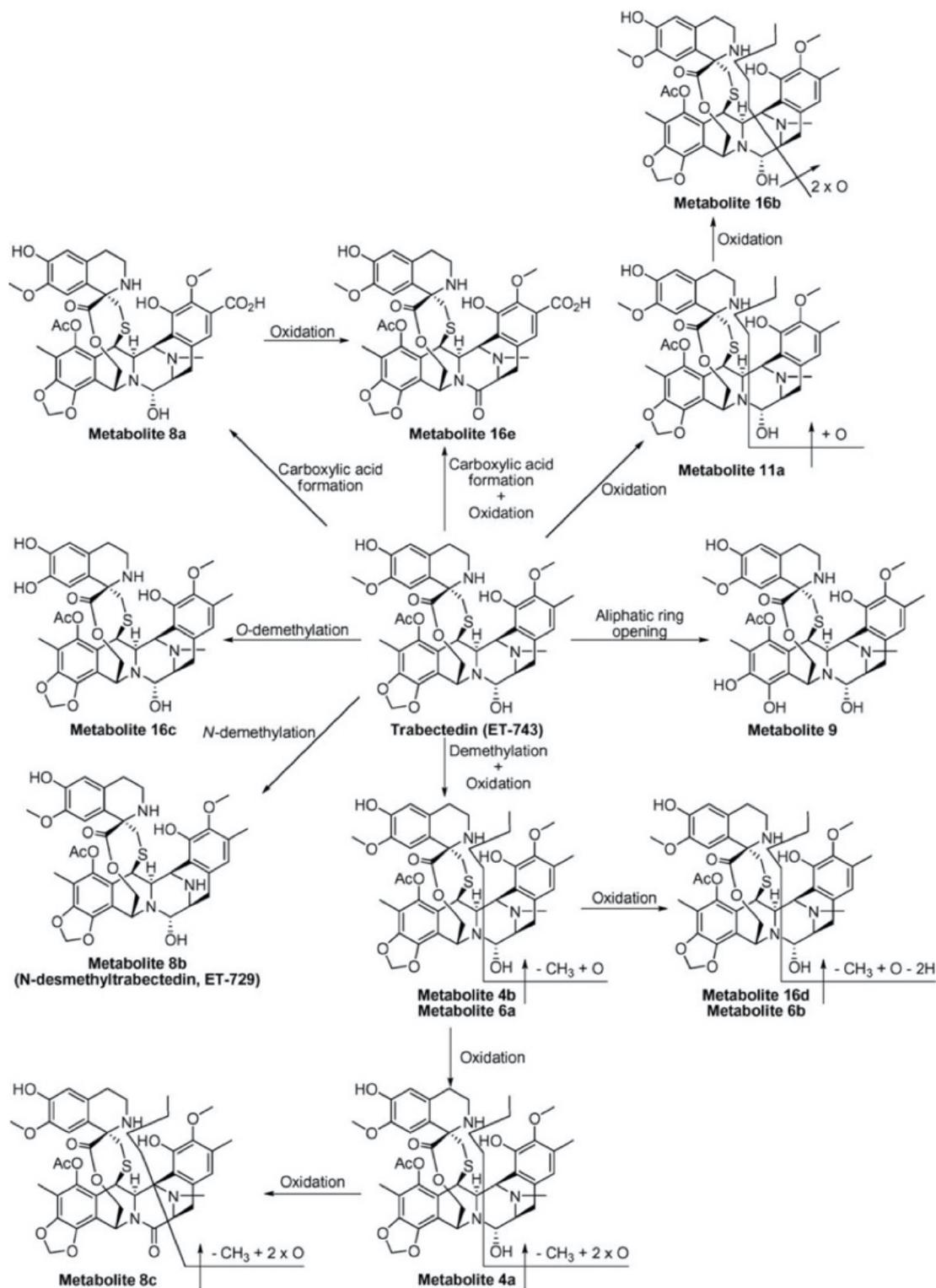


Figure 11 : Profil métabolique de la trabectédine proposé par Vermeir et al.³¹¹

L'implication majeure du CYP3A4 dans le métabolisme de la trabectédine expose les patients à un risque important d'interactions médicamenteuses lors de l'utilisation d'inhibiteurs (augmentation du risque toxique) ou d'inducteurs de l'enzyme (augmentation de la clairance d'élimination)^{311,320}. Des études de phase I ont montré que la prise de kétoconazole, un puissant inhibiteur des CYP3A, augmentait de 21% la C_{max} et de 66% l'AUC de la trabectédine, alors que la prise de rifampicine, les réduisait de 22% et 31%, respectivement³²¹. Ces résultats sont confirmés plus tard dans l'étude de Machiels et al.³²² qui montrent également que la clairance de la trabectédine est augmentée par la prise de rifampicine (de 39,6 à 59,8 L/h) et diminuée avec le kétoconazole (de 20,3 à 12,0 L/h). La trabectédine quant à elle n'est ni inductrice, ni inhibitrice des CYP450³²³. Par ailleurs, il n'existe pas de recommandations concernant l'utilisation des inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques lors d'une chimiothérapie à base de trabectédine, mais un suivi renforcé du profil de toxicité est recommandé³²⁴. A l'opposé, de nombreux essais ont souligné l'efficacité de la dexaméthasone (un autre puissant inducteur du CYP3A4) dans la réduction des risques d'hépatotoxicité et de myélosuppression, en diminuant l'exposition à la trabectédine chez le rat et l'Homme^{17,301,313}. Dans une étude de pharmacocinétique de population, Perez-Ruixo et al.²⁹⁹, s'attendaient à observer une augmentation très nette de la clairance de la trabectédine lors de sa co-administration avec la trabectédine. Cependant, l'effet de la dexaméthasone, incluse comme covariable de leur modèle, n'impactait pas significativement la pharmacocinétique de la trabectédine ($p = 0,007$ supérieur au seuil de significativité $\alpha = 0,005$ prédéfini par les auteurs). Ceci s'expliquerait par le petit nombre de patients n'ayant pas reçu de corticostéroïdes avant la chimiothérapie (58 contre 584). Les patients ayant reçu de la dexaméthasone au cycle 1 avaient tout de même une AUC médiane diminuée de 12% et une clairance systémique augmentée de 19,2% par rapport à ceux n'en n'ayant pas reçu. Malgré cette faible diminution de l'exposition, le bénéfice d'amélioration du profil de toxicité de la trabectédine et surtout l'effet hépatoprotecteur de la dexaméthasone appuient l'intérêt de son utilisation 30 minutes avant le début de la chimiothérapie²⁷³.

1.5.2. Interaction avec les mécanismes de régulation transcriptionnelle

Bien que la trabectédine n'ait pas d'effets activateurs ou inhibiteurs des enzymes et protéines du métabolisme, il a été démontré que cette molécule avait la capacité d'interagir avec le récepteur nucléaire PXR en exerçant une activité d'antagoniste et ce, uniquement en présence d'un agoniste.

En effet, Synold et al.³²⁵ ont montré que la trabectédine inhibait l'activation transcriptionnelle de PXR en présence d'agoniste ($IC_{50} \approx 3$ nM), résultant en l'extinction de l'expression des gènes cibles comme *CYP3A4* ou *MDRI/ABCB1*. Cette observation a été validée par Ekins et al.³²⁶ à l'aide d'une méthode *in silico* permettant de simuler les interactions moléculaires entre le récepteur et un pharmacophore identifié. Les conséquences de cet effet répressif sur PXR ont été décrites pour la P-gp dans une expérience de gène rapporteur dans des cellules de carcinome de colon humain SW620 exposées à des activateurs du promoteur d'*ABCB1* co-incubés avec de la trabectédine qui bloque ainsi l'activation du gène³²⁷. L'effet antagoniste a également été montré par Sparfel et al.³²⁸ sur l'activation du *CYP3A* dans des hépatocytes de rats : la trabectédine supprimait totalement l'induction du gène par un activateur carcinogène. Par ailleurs, les auteurs ont observé qu'elle bloquait l'*up*-régulation de MRP2, dont l'expression dépend aussi de PXR. Enfin, de nombreuses études ont montré que la surexpression de la P-gp était à l'origine de la résistance tumorale. En se basant sur les observations précédentes, certains ont émis l'hypothèse que l'activité antagoniste de la trabectédine sur PXR pourrait être un moyen de réprimer l'expression d'*ABCB1* et ainsi de potentialiser l'activité antitumorale³²⁹.

1.5.3. Elimination par les transporteurs ABC

Beumer et al.³³⁰ ont démontré que la P-gp était majoritairement impliquée dans l'élimination hépatobiliaire de la trabectédine grâce à des expériences de passage transmembranaire en présence d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques. Par la même occasion, ils ont montré que la protéine était impliquée

dans la résistance à la molécule dans différents modèles cellulaires⁵². Lee et al.¹⁷ ont par la suite modélisé les capacités hépatiques de transport et de métabolisme par l'utilisation d'hépatocytes primaires de rats cultivés en « sandwich » (SCRH, *sandwich-cultured primary rat hepatocytes*) en présence de dexaméthasone. Cette étude a été la première à montrer que le transporteur biliaire MRP2 était impliqué dans l'élimination biliaire de la trabectédine, tout comme le transporteur basolatéral MRP4, qui élimine la molécule vers le compartiment plasmatique. Les résultats de l'étude *in vivo* de van Waterschoot et al.³³¹ ont complété les travaux précédents. En effet, les auteurs ont observé une accumulation de trabectédine dans les hépatocytes de souris n'exprimant plus les transporteurs ABC des sous-familles B1, C2 et C3 et déficientes en enzymes de type CYP3A. Même si aucune étude n'a pu prouver l'impact d'une utilisation concomitante de trabectédine et d'inhibiteurs ou d'activateurs de la P-gp, leur usage doit être soumis à une surveillance renforcée. En effet, ils pourraient potentialiser les effets toxiques de la trabectédine liés à son accumulation, ou au contraire diminuer son efficacité à cause d'une élimination excessive.

1.6. Effets indésirables

De par son large spectre de cytotoxicité, des réactions indésirables liées à la trabectédine (tous types et grades confondus) sont observables chez 91% à 99% des patients (en monothérapie, ou thérapie combinée, respectivement)²⁷³ et des effets indésirables graves (de grades 3 ou 4 selon le *National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events*, NCI-CTCAE) sont observés chez moins d'un tiers des patients (10% en monothérapie et 25% en thérapie combinée)^{293,332}. Dans un essai rétrospectif analysant le profil d'efficacité et de sécurité de la trabectédine chez 1132 patients issus d'essais cliniques de phase 2 et traités entre 1999 et 2008, Le Cesne et al.³⁰³ ont observé que la molécule était relativement bien tolérée et les principaux effets indésirables sévères étaient d'ordres hématologique et hépatique. Dans ces essais cliniques, la myélosuppression était caractérisée par une neutropénie rapide et transitoire (47-52% des patients), et parfois accompagnée d'une thrombocytopénie (7-10%) ou d'une

anémie (3-8%)³³³. L'atteinte hépatique sévère quant à elle peut concerner 30 à 40% des patients^{291,301} et correspond à une élévation transitoire des transaminases (AST et/ou ALT) qui peut être létale^{178,334}. Cette toxicité n'est ni dose-limitante, ni cumulative^{291,320,335} mais peut entraîner un changement dans la programmation des cycles de chimiothérapie (décalage, report ou annulation)^{336,337}. Parmi les autres anomalies du bilan biochimique hépatique, des élévations de la bilirubine totale, des PAL ou des γ -GT ont été observées^{273,291,303}. Enfin, dans l'étude de Demetri et al.³³⁸ comparant les profils de sécurité de la trabectédine et de la dacarbazine, des élévations de créatine phosphokinase (CPK, signant une atteinte musculaire) ont été rapportées chez 5,3% des patients traités par trabectédine et 1,2% des patients ont subi une rhabdomyolyse.

1.7. Mécanisme d'hépatotoxicité de la trabectédine

Les premières lésions hépatiques causées par la trabectédine ont été observées lors d'études précliniques chez les rongeurs, le chien et le singe^{313,339,340}. Cependant, la variabilité qui existe entre les modèles complexifie la compréhension des mécanismes d'hépatotoxicité. Même s'il semblerait que l'ET-729 (trabectédine N-déméthylée au niveau du cycle A) soit l'un des métabolites majeurs de la trabectédine³¹¹, le manque de données reproductibles sur sa production chez l'Homme et son impact sur la fonction hépatique chez les rats ne permettent pas de valider son implication dans l'hépatotoxicité de la trabectédine. Reid et al.³⁴¹ ont montré chez des souris que l'ET-729 était 17 fois plus toxique que la trabectédine, et que son excrétion biliaire était près de 5 fois plus importante chez les souris Wistar femelles que chez les mâles³¹⁴. Cependant des études *in vitro* ont montré que le métabolite n'avait que peu d'effet toxique³¹³ et l'intérêt de considérer l'ET-729 comme responsable de la toxicité de la trabectédine a été questionné par Beumer et al.³⁰² qui n'ont pas réussi à détecter le métabolite dans les urines et les selles de patients traités par trabectédine.

Van Waterschoot et al.³³¹ ont étudié l'impact de l'absence de transporteurs ABC et d'enzymes du métabolisme en utilisant des modèles de souris *knock-out* (K.-O.) pour les gènes murins *Abcb1/P-gp*,

Abcc2/Mrp2, *Abcc3/Mrp3* et *Cyp3a/Cyp3a*. L'hépatotoxicité était évaluée par la mesure des paramètres biochimiques hépatiques (AST, ALT, PAL et bilirubine) après administration intraveineuse de trabectédine à la dose de 100 µg/kg. En comparant les différents modèles, les auteurs ont montré que l'absence de l'enzyme *Cyp3a* n'induit qu'un faible effet hépatotoxique retardé, apparaissant au 4^e jour après l'administration I.V. En revanche, l'absence combinée des protéines d'efflux P-gp et MRP2 a provoqué une élévation très marquée des transaminases (>100 fois la normale), des PAL (environ 6 fois) et de la bilirubine totale (>100 unités/L) par rapport aux souris sauvages. L'aspect hépatique nécrosé a confirmé le diagnostic d'hépatotoxicité très sévère. Par la suite, les auteurs ont évalué l'effet de l'absence combinée du *Cyp3a* et des transporteurs P-gp et *Mrp2*. Les souris n'ont alors présenté que de faibles taux d'AST/ALT, de PAL et de bilirubine bien inférieurs à ceux des souris *Abcb1^{-/-}* et *Abcc2^{-/-}*, et un aspect hépatique normal. Ce dernier résultat renforçait alors l'hypothèse que des métabolites toxiques seraient issus de la dégradation hépatique de la trabectédine par les enzymes de la famille des CYP450. Afin de corréler leurs résultats de toxicité à l'exposition, les auteurs ont dosé la trabectédine et son analogue radiomarqué dans le plasma et le foie des souris exposées. Les concentrations plasmatiques et hépatiques de trabectédine non radiomarquée chez les souris *Cyp3a-K.-O.* étaient largement supérieures (> 8 fois et >2,5 fois, respectivement) à celles des souris sauvages, mais étaient diminuées chez les souris *Abcb1/Abcc2 K.-O.* qui présentaient le plus fort taux d'hépatotoxicité et l'accumulation la plus importante de radioactivité dans le foie. Ces résultats suggèrent alors que la trabectédine elle-même n'était que peu responsable de l'effet hépatotoxique, contrairement à ses possibles métabolites formés par les CYP450 et éliminés par transporteurs ABC. En comparant les effets de la trabectédine dans les trois modèles *Abcb1-K.-O.* vs *Abcc2-K.-O.* vs *Abcc3-K.-O.*, les auteurs ont noté que les métabolites radiomarqués s'accumulaient de manière plus importante dans le foie des modèles n'exprimant pas *Abcc2*, et que l'absence d'*Abcc3* combinée à celle d'*Abcc2* exacerbe la toxicité de la trabectédine, soulignant le possible effet compensateur de la protéine MRP3 lorsque MRP2 est réprimé. Avec ces résultats, les auteurs démontrent le rôle important des enzymes CYP450 et des transporteurs ABC, particulièrement de MRP2, dans la détoxification de la trabectédine et de ses métabolites potentiellement hépatotoxiques.

Les recommandations sur l'utilisation de dexaméthasone en prévention des effets indésirables hépatiques reposent sur les travaux précliniques de Donald et al.^{342,343} qu'un pré-traitement aux glucocorticoïdes limitait l'effet hépatotoxique de la trabectédine chez les rats. Puissant inducteur du *CYP3A4* et d'*ABCC2*, van Watershoot et al.³³¹ suggèrent alors que l'activité hépatoprotectrice de cet anti-inflammatoire résulterait plutôt de l'induction du transporteur plutôt que de l'enzyme. En conséquence, chez les patients porteurs de mutation inactivatrices d'*ABCC2* (par exemple dans le syndrome de Dubin-Johnson), la perte de fonction de MRP2 couplée à l'induction des CYP3A par la dexaméthasone pourrait augmenter de manière significative l'hépatotoxicité de la trabectédine plutôt que de la réduire puisque l'élimination hépatique de la trabectédine et/ou de ses métabolites serait abolie.

Ce mécanisme de protection de la dexaméthasone n'est pas totalement connu mais il a été montré qu'elle avait la capacité d'activer le récepteur nucléaire PXR à de fortes concentrations. Le co-traitement trabectédine/dexaméthasone entraînerait alors l'inhibition par l'effet antagoniste de la première sur l'expression des gènes inductibles par la seconde (CYP450 et ABC transporteurs inclus), permettant d'envisager des inducteurs puissants tels que la rifampicine en prévention du risque d'hépatotoxicité³²⁹.

A l'inverse de l'étude précédente, Brandon et al.³²¹ ont montré que le métabolisme hépatique n'était pas responsable de la toxicité de la trabectédine. En effet, en traitant des hépatocytes immortalisés de type HepG2 avec des fractions métaboliques de trabectédine obtenues après incubation avec des microsomes hépatiques humains, les auteurs n'ont pas observé de différence de cytotoxicité entre la molécule mère et les incubations métaboliques. Cependant, la faible quantité de métabolites formés dans les incubations microsomales, ajoutées au fait que l'utilisation de la lignée HepG2 pour des études de métabolisme hépatique soit controversée car elle sous-exprime la plupart des enzymes métaboliques, diminue l'interprétation de cette étude^{344,345}.

Grâce à des hépatocytes cultivés en sandwich (SCRH), Lee et al.¹⁷ avaient pour objectif de prédire l'effet hépatoprotecteur de la dexaméthasone contre l'hépatotoxicité médiée par la trabectédine et d'évaluer le rôle de MRP2 dans l'élimination hépatique de la trabectédine. Les premiers résultats ont montré

que Mrp2 était exprimé de manière plus importante dans les cellules prétraitées avec de la dexaméthasone, validant ainsi l'hypothèse de van Watershoot sur le mécanisme hépatoprotecteur de la molécule. Ensuite, la quantité de trabectedine recueillie au niveau biliaire dans des organes isolés et perfusés était largement inférieure (environ 75%) chez les rats déficitaires en transporteur Mrp2 (rats TR-) que chez les rats sauvages, validant le rôle indispensable de Mrp2 dans son élimination hépatobiliaire. Cependant, et de manière très surprenante, la trabectedine seule était moins toxique sur les SCRH issus de rats TR-, remettant en question la production de métabolites toxiques couplée à l'élimination *via* Mrp2. Enfin, l'induction d'*Abcc4*/Mrp4 en réponse à la déplétion en glutathion causée par la L-buthionine-sulfoximine (BSO) a atténué la cytotoxicité même en présence de fortes concentrations de trabectedine. Les auteurs concluent alors sur l'importance des transporteurs MRP2 et MRP4 et leur possible redondance dans l'élimination de la trabectedine.

Enfin, cliniquement, Grosso et al.³⁴⁶ ont comparé le profil de toxicité de 32 patients prétraités par dexaméthasone (groupe 1) au préalable d'une chimiothérapie à base de trabectedine avec celui de 22 patients non prétraités (groupe 2). L'incidence d'effets toxiques sévères (\geq grade 3-4) était significativement abaissée dans le groupe de patients ayant reçu l'inducteur comparé au groupe témoin : cytolysse 2% vs 34% respectivement, leucopénie 2% vs 24% et thrombocytopénie 0% vs 25%. Par ailleurs, la dose-intensité reçue entre les deux groupes (400 mg vs 404 mg, respectivement) ainsi que la survie sans progression (PFS de 19% à 6 mois) étaient équivalentes, leur permettant de conclure que la dexaméthasone n'impactait pas l'efficacité de la trabectedine. Cependant, malgré l'utilisation des corticostéroïdes en prévention, les patients restent exposés au risque de cytolysse. De la même manière, Grisanti et al.³⁴⁷ ont démontré que l'utilisation de N-acétylcystéine, un précurseur du glutathion, était accompagnée d'une diminution du taux de transaminases chez des patients développant une toxicité hépatique, suggérant que son utilisation concomitante pourrait permettre la poursuite du traitement malgré l'atteinte hépatique.

2. Article N°1

Étude pharmacogénétique de l'hépatotoxicité induite par la trabectedine chez des patients atteints de sarcome des tissus mous avancé.

Ces travaux de thèse ont porté sur l'analyse de données génétiques collectées par séquençage haut débit (ou séquençage de nouvelle génération, *Next-Generation Sequencing*, NGS) dans une cohorte de patients traités par trabectedine dans le cadre de la prise en charge de sarcomes de tissus mous avancés. L'objectif était d'identifier des variants pharmacogénétiques associés à l'hépatotoxicité de cette molécule. Ils ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Cancers (Basel)* en décembre 2020.

La métabolisation hépatique de la trabectedine dépend de l'intégrité des enzymes et transporteurs impliqués dans sa biotransformation et son élimination. Des modifications ponctuelles des séquences géniques codant ces effecteurs hépatiques pourraient expliquer une partie de la variabilité interindividuelle appliquée à la toxicité hépatique, qui se manifeste par une cytolyse sévère chez près de 40% des patients. Cette hypothèse repose sur l'étude de Laurenty et al.¹⁷⁸ qui, en 2013, exposent le cas d'un sujet âgé de 60 ans traité par trabectedine à la dose standard de 1,5 mg/m² pour un sarcome pléomorphe de la crête tibiale. Après deux cycles de trabectedine, les transaminases du patient ont augmenté de près de six fois leurs valeurs biologiques normales, tout en conservant des niveaux de bilirubine totale normaux. Malgré l'arrêt de la chimiothérapie et la mise en place de soins de support, la fonction hépatique du patient a continué de se dégrader et il est décédé un an plus tard de cette défaillance hépatique majeure et irréversible. L'enquête pharmacogénétique conduite *a posteriori* a révélé que le patient présentait certains polymorphismes des gènes *ABCC2* et *ABCB1*. Il était, par ailleurs, porteur homozygote de la mutation du promoteur d'*ABCC2* c.-24C>T (rs717620), dont les conséquences décrites dans la littérature sont controversées mais semblent montrer une diminution de l'expression de la protéine²¹¹. Trois ans plus tard, Rathinamanickam et al.³³⁴ signalent un deuxième cas d'insuffisance hépatique chronique suivant une chimiothérapie par trabectedine. Leur patient de 66 ans, traité pour un léiomyosarcome

pléomorphe métastatique, avait développé un ictère après deux cycles de trabectedine sans normalisation de ses paramètres biochimiques hépatiques après l'arrêt du traitement. Malheureusement, aucune investigation pharmacogénétique n'avait été menée chez ce patient.

L'effet des polymorphismes des gènes codant pour les transporteurs et les enzymes du métabolisme de la trabectedine n'est que peu renseigné dans la littérature. Ainsi, cette étude pharmacogénétique, ancillaire à un essai clinique prospectif (T-SAR, NCT02672527, Gustave Roussy, Villejuif, France), a été menée afin de recenser des potentiels variants génétiques de gènes codant pour certains CYP450 et transporteurs ABC impliqués dans l'apparition des effets indésirables hépatiques. Soixante-trois patients traités par trabectedine pour un sarcome des tissus mous avancé ont été génotypés par NGS et leurs génotypes ont été mis en regard des effets hépatotoxiques qu'ils ont pu présenter au cours des deux premiers cycles de traitement. Les résultats issus de cette étude s'inscrivent dans une perspective d'adaptation individuelle du traitement basée sur les caractéristiques génétiques des patients dans l'objectif de prévenir le risque de toxicité inhérent à l'usage de la molécule et d'optimiser son utilisation clinique.

Article

Pharmacogenetic Study of Trabectedin-Induced Severe Hepatotoxicity in Patients with Advanced Soft Tissue Sarcoma

Maud Maillard ^{1,2,3}, Christine Chevreau ³, Félicien Le Louedec ^{1,2,3} , Manon Cassou ³, Caroline Delmas ^{1,3}, Laure Gourdain ^{1,3}, Jean-Yves Blay ⁴, Didier Cupissol ⁵, Emmanuelle Bompas ⁶, Antoine Italiano ⁷, Nicolas Isambert ⁸, Corinne Delcambre-Lair ⁹, Nicolas Penel ¹⁰ , François Bertucci ¹¹, Cécile Guillemet ¹², Julien Plenecassagnes ³, Stéphanie Foulon ^{13,14}, Étienne Chatelut ^{1,2,3}, Axel Le Cesne ¹⁵ and Fabienne Thomas ^{1,2,3,*} 

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Inserm UMR1037, 31059 Toulouse, France; maillard.maud@iuct-oncopole.fr (M.M.); lelouedec.felicien@iuct-oncopole.fr (F.L.L.); Delmas.Caroline@iuct-oncopole.fr (C.D.); gourdain.laure@iuct-oncopole.fr (L.G.); Chatelut.Etienne@iuct-oncopole.fr (É.C.)

² Université Paul Sabatier—Toulouse III, 31400 Toulouse, France

³ Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer (IUCT)—Oncopole, 31059 Toulouse, France; chevreau.christine@iuct-oncopole.fr (C.C.); manon.cassou@gmail.com (M.C.); Plenecassagnes.Julien@iuct-oncopole.fr (J.P.)

⁴ Medical Oncology Department, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; jean-yves.blay@lyon.unicancer.fr

⁵ Medical Oncology Department, Institut Régional du Cancer Val d'Aurelle, 34090 Montpellier, France; Didier.Cupissol@icm.unicancer.fr

⁶ Medical Oncology Department, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Saint-Herblain, France; Emmanuelle.Bompas@ico.unicancer.fr

⁷ Medical Oncology Department, Institut Bergonié, 33000 Bordeaux, France; a.italiano@bordeaux.unicancer.fr

⁸ Medical Oncology Department, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France; nicolas.isambert@chu-poitiers.fr

⁹ Medical Oncology Department, Centre François Baclesse, 14000 Caen, France; c.delcambre@baclesse.fr

¹⁰ Medical Oncology Department, Centre Oscar Lambret—Université de Lille, 59000 Lille, France; n-penel@o-lambret.fr

¹¹ Medical Oncology Department, Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France; bertuccif@ipc.unicancer.fr

¹² Medical Oncology Department, Centre Henri Becquerel, 76038 Rouen, France; cecile.guillemet@chb.unicancer.fr

¹³ Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy, University Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France; STEPHANIE.FOULON@gustaveroussy.fr

¹⁴ Oncostat U1018, Inserm, University Paris-Saclay, Labeled Ligue Contre le Cancer, 94805 Villejuif, France

¹⁵ Medical Oncology Department, Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; axel.lecesne@gustaveroussy.fr

* Correspondence: thomas.fabienne@iuct-oncopole.fr; Tel.: +33-(0)531-155-219

Received: 27 October 2020; Accepted: 2 December 2020; Published: 4 December 2020



Simple Summary: Trabectedin is a cytotoxic drug used for the treatment of advanced soft tissue sarcoma. One of the most frequent side effects is hepatotoxicity, which occurs in nearly 40% of patients. In this pharmacogenetic study, we aimed to identify genetic polymorphisms that could impair the functionality of liver proteins—as metabolic enzymes or membrane transporters—involved in the production and the elimination of trabectedin and/or its metabolites from hepatocytes. In a prospective cohort of 63 patients, we showed that some variants of P-gp and MRP2 transporters and the well-known *CYP3A5**3 variant were associated with hepatotoxicity. With these findings, we provide new biomarkers that might be useful to prevent the risk of hepatotoxicity in patients treated with trabectedin. However, this study is limited by the low number of patients included and should be validated on larger cohorts before any clinical application.

Abstract: Hepatotoxicity is an important concern for nearly 40% of the patients treated with trabectedin for advanced soft tissue sarcoma (ASTS). The mechanisms underlying these liver damages have not yet been elucidated but they have been suggested to be related to the production of reactive metabolites. The aim of this pharmacogenetic study was to identify genetic variants of pharmacokinetic genes such as CYP450 and ABC drug transporters that could impair the trabectedin metabolism in hepatocytes. Sixty-three patients with ASTS from the TSAR clinical trial (NCT02672527) were genotyped by next-generation sequencing for 11 genes, and genotype–toxicity association analyses were performed with R package SNPAssoc. Among the results, *ABCC2* c.1249A allele (rs2273697) and *ABCG2* intron variant c.-15994T (rs7699188) were associated with an increased risk of severe cytolysis, whereas *ABCC2* c.3563A allele had a protective effect, as well as *ABCB1* variants rs2032582 and rs1128503 (p -value < 0.05). Furthermore, *CYP3A5**1 rs776746 (c.6986A > G) increased the risk of severe overall hepatotoxicity ($p = 0.012$, odds ratio (OR) = 5.75), suggesting the implication of metabolites in the hepatotoxicity. However, these results did not remain significant after multiple analysis correction. These findings need to be validated on larger cohorts of patients, with mechanistic studies potentially being able to validate the functional consequences of these variants.

Keywords: ABC transporters; advanced soft tissue sarcoma; CYP450; hepatotoxicity; next-generation sequencing; pharmacogenetic; trabectedin

1. Introduction

Trabectedin (Yondelis, PharmaMar, Madrid, Spain) is a synthetic alkaloid drug originally isolated from the Caribbean ascidian *Ecteinascidia turbinata*. This multitarget antineoplastic agent has the ability to alkylate the exocyclic nitrogen-2-position of guanines of the DNA's minor groove and to disrupt the interactions between nuclear proteins and DNA [1]. Trabectedin can also interact with tumor microenvironment and repair processes [2], making it a complex molecule with a unique spectrum of cytotoxicity on various cell lines including sarcomas [3,4]. In clinical practice for the treatment of advanced soft tissue sarcoma (ASTS), Yondelis is given after a first-line chemotherapy composed of anthracyclines or ifosfamide, or if patient presents a contraindication to their use [5,6].

Soft tissue sarcomas (STSs) are a group of rare and heterogeneous malignancies. For trabectedin, pharmacogenomic biomarkers have been previously described such as germline and somatic variants of *BRCA1/2* or repair process-associated genes encoding for excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) and 5 (ERCC5) [7]. A haplotype of *BRCA1* has been associated with better treatment outcomes in terms of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) [8]. Moreover, patients with high expression of the functional proteins ERCC1/5 may have an improved PFS and OS compared to low expressers, being even more so if *BRCA1* or *BRCA2* are lacking [9,10].

Trabectedin is extensively metabolized in the liver into several compounds that are further eliminated mainly in the urine and feces [11–13]. Mass balance studies showed that the eliminated part predominantly consisted in metabolites principally eliminated in feces and that less than 1% of the unchanged form of trabectedin is retrieved both in urine and feces, confirming the high contribution of hepatic metabolism in its elimination [14].

The main adverse effects of trabectedin reported in phase 1 clinical trials were myelosuppression; liver toxicity; nausea; emesis; asthenia; and, more rarely, severe rhabdomyolysis [15,16]. In these trials, 30–40% of the patients experienced liver toxicity, mainly consisting of serious (grade ≥ 3 of the National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events, NCI-CTCAE) but transient elevation of transaminases (aspartate aminotransferases (AST) and alanine aminotransferases (ALT)). Because of the reversibility of the increase of the transaminases, biochemical hepatic toxicity was not considered dose-limiting [17], but instead considered schedule-dependent [18]. Subsequently, other liver abnormalities have been reported in patients, such as elevation of bilirubin,

alkaline phosphatases (AP), and gamma-glutamyl transferases (γ -GT), confirming that hepatotoxicity remains the main adverse event of trabectedin [19].

The first observations of hepatic damages related to trabectedin were made during preclinical studies on rodents [20,21]. However, it was unclear as to whether they were related to the production of toxic metabolites or the drug itself. Reid et al. [22] showed that trabectedin is degraded in human microsomes by phase I enzymes from the cytochrome P450 (CYP450) family, mainly by CYP3A4, and also by CYP3A5, 2C9, 2C19, 2D6, and 2E1 but in lesser extent [23]. To date, no study has clearly identified the major metabolites involved in toxicity, mostly because of their very low concentrations in plasma associated with a lack of sensitivity of the detection methods [11,12]. Elimination pathways involving ATP-binding cassette (ABC) transporters were also widely studied in order to understand if the accumulation of trabectedin and/or its metabolites may be responsible for hepatic damages. In preclinical studies, hepatic toxicity was increased in *Abcb1*/P-glycoprotein (P-gp), *Abcc2*/Mrp2, or *Abcc3*/Mrp3 knock-out mice [24,25]. Importantly, this toxic effect was worsened when CYP3A enzymes were overexpressed [24], reinforcing the hypothesis of toxic metabolites involved in trabectedin hepatotoxicity.

Adversely, Brandon et al. [26] showed in an in vitro study that HepG2 cells treated with CYP-derived metabolites were less affected than by trabectedin itself. Furthermore, the use of a high dose of dexamethasone in clinical care, a potent CYP3A4 and P-gp inducer, decreases the risk of toxicity when administered 24 h before trabectedin without compromising its efficacy [27]. Furthermore, Lee et al. [28] demonstrated that the biliary excretion of trabectedin was impaired in *Abcc2*/Mrp2-deficient rat, and that the induction of *Abcc4*/Mrp4 by L-buthionine-sulfoximine decreased the cytotoxicity even with high-concentrations of trabectedin. These mechanisms of trabectedin disposition in hepatocyte are strongly dependent on the integrity of these hepatic proteins, and nonfunctional enzymes or transporters due to genetic variants could lead to an increased toxicity.

In 2013, Laurenty et al. [29] presented a case of lethal hepatotoxicity in a patient treated with trabectedin. After only two cycles, the patient's transaminases increased six times over the upper normal limit (UNL), with no normalization after stopping the treatment. The patient died of this major and irreversible liver toxicity one year later. The pharmacogenetic exploration of the patient's DNA revealed that he carried some deleterious genetic variants of *ABCC2*/MRP2 and *ABCB1*/P-gp. Three years later, Rathinamanickam et al. [30] reported a second case of irreversible but non-lethal hepatotoxicity. Unfortunately, no pharmacogenetic investigation was performed.

On the basis of these case-reports, and the fact that the role of pharmacogenetics on trabectedin-related toxicity was poorly documented, we hypothesized that genetic variations of hepatic transporters of hepatic transporters and metabolism enzymes may influence the disposition of trabectedin and consequently increase the risk of liver toxicity. Thus, this ancillary pharmacogenetic study of the TSAR clinical trial (NCT02672527, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) was conducted to prospectively investigate the role of the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of CYP450 and ABC drug transporters on the incidence of trabectedin-related severe hepatotoxicity.

2. Results

2.1. Patients' Characteristics and Toxicity Data

Table 1 summarized the demographic and clinical characteristics of the 63 patients included in this ancillary pharmacogenetic study. In the TSAR clinical trial, patients were divided in two comparative groups, resulting in 31 patients treated with trabectedin vs. 32 who received best supportive care (BSC). As a cross-over was allowed between the two arms, every patient of the pharmacogenetic cohort was treated with at least one cycle of trabectedin. Treatment was delayed because of hepatotoxicity for six patients (9.5%) and associated with a dose reduction of the following courses for four of the patients. In total, trabectedin dose was reduced for 17 patients (27%). Furthermore, treatment was stopped because of acute hepatotoxicity for two patients of the trabectedin arm that occurred during the two first cycles.

Table 1. Patient characteristics and toxicity data.

Demographical Characteristics at Baseline		n (%) or (Range)
Total patients included in the pharmacogenetic study		63
Gender	Male	31 (49.2%)
	Female	32 (50.8%)
Age	Median (years)	65 (21.5–82.3)
Initial arm before crossover	Trabectedin	31 (49%)
	Best supportive care	32 (51%)
Baseline ECOG performance status	0	30 (47.6%)
	1	32 (50.8%)
	2	1 (1.6%)
Tumor characteristics at baseline		
Histological subtype of soft tissue sarcoma	STS-L: liposarcoma or leiomyosarcoma	35 (55.6%)
	STS-non L: other subtype	28 (44.4%)
Hepatic metastasis at baseline	Yes	13 (20.6%)
	No	50 (79.4%)
Prior anticancer treatment before inclusion		
Chemotherapy	Yes	63 (100%)
	No	0 (0%)
Neoadjuvant and/or adjuvant chemotherapy	Yes	21 (33.3%)
	No	42 (66.7%)
Lines of prior chemotherapy in advanced setting	Median	1 (0; 3)
	0	7 (11.1%)
	1	29 (46%)
	2	22 (34.9%)
Common prior chemotherapies in advanced setting	3	5 (7.9%)
	Anthracyclines	62 (98.4%)
	Ifosfamide	34 (54%)
	Gemcitabine	17 (27%)
	Dacarbazine	15 (23.8%)
	Pazopanib	10 (15.9%)
Cyclophosphamide	5 (7.9%)	
	Other	8 (12.7%)
Trabectedin treatment after inclusion		
Number of cycles administered per patient	Median	7 (1–33)
Total dose administered	Mean (mg)	2.25 (1.35–3.24)
Treatment modification because of hepatotoxicity		
Administration delay	Yes	6 (10%)
	No	57 (90%)
Dose reduction	Yes	17 (27%)
	No	46 (73%)
Stop of treatment	Yes	2 (3%)
	No	61 (97%)
Hepatic side effects recorded during the two first courses of trabectedin		
Cytolysis	Grades 0, 1, 2	36 (57%)
	Grades 3, 4	27 (43%)
Cholestasis	Grades 0, 1, 2	60 (95%)
	Grades 3, 4	3 (5%)
Isolated elevation of γ -GT	Grades 0, 1, 2	56 (89%)
	Grades 3, 4	7 (11%)
Overall hepatotoxicity	Grades 0, 1, 2	27 (43%)
	Grades 3, 4	36 (57%)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance status; STS: soft tissue sarcoma; γ -GT: gamma-glutamyl transferases.

Occurrences of hepatic side effects after cycle 1 and cycle 2 of trabectedin were considered as two classes: severe (grade 3 (G3) and grade 4 (G4)) vs. not severe (grades 0, 1, or 2), as shown in Table 1. Forty-three percent (27/63) of the patients experienced a severe cytolysis during the two first courses of trabectedin at a dose of 1.5 mg/m². For most of them (23/27, 85.2%), this elevation was transient, and AST/ALT normalized after the second cycle of treatment. In the cohort, 4.7% (3/63) patients experienced a severe cholestasis with elevation of γ -GT associated with AP and total plasma bilirubin. Isolated elevation of γ -GT with normal transaminases was reported in seven patients (11.1%). In order to evaluate the impact of SNPs on overall hepatotoxicity, we grouped AST/ALT, γ -GT, total plasma bilirubin, and AP. Thus, a total of 36 out of 63 patients (57.1%) experienced at least one severe hepatotoxic event after two courses of trabectedin.

Since trabectedin is a third-line treatment, each patient had already undergone prior adapted chemotherapy or targeted therapy for their STS. Among these, doxorubicin and dacarbazine were the most likely to induce mild and transient liver abnormalities [31]. In our cohort, 98.4% of the patients received doxorubicin before trabectedin, and 15/63 were previously treated with dacarbazine (Table 1). Ten patients were previously treated with pazopanib, which is commonly associated with transaminase elevation [31]. However, there was no significant association between prior treatment and the occurrence of severe hepatotoxicity (data not shown). Of note, every patient had normal serum values of the biological hepatic parameters before trabectedin initiation.

2.2. Evaluation of the NGS Data Quality and Building of the Genetic Database

DNA was successfully extracted from the whole blood samples for 63 patients. Quality was sufficient for library conception and subsequent Next-Generation Sequencing (NGS) analysis. Then, sequencing chips were loaded with pooled libraries at a rate higher than 90%, with the mean of the total reads being near 3 million per chip. As genomic DNA was analyzed, minimal sequencing depth was fixed to 20X and variant with inferior depth was considered as not covered [32]; thereby, mean total sequence read depth reached 500X. Overall, the total mean sequencing coverage of the 276 amplicons was 86.9%. Mean alignment to reference human genome (hg19) was > 99%.

After applying a filter according to the cohort minor allele frequency (MAF) fixed at the threshold of 0.01, we collected a total of 276 genetic variants. Among these, 44 were excluded because of a genotyping rate less than 80%, or a variant frequency of 100% (i.e., monomorphic allele). Fourteen variants were not considered because of deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) with $p < 0.05$. The final database contained 208 SNPs that were visually checked with the Alamut software. Among them, 206 were referenced in the Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) and 2 were unknown. Variants included 203 single-nucleotide variations and 5 deletions. MAFs of collected SNPs were compared to those of the Caucasian population, and no strong deviance was observed.

Among the 47 candidate SNPs selected after a literature review, 39 were correctly genotyped (genotyping rate > 80%), but 3 variants were further eliminated because of deviation from HWE (rs1135840, rs1065852, and rs2740574) and 1 was found to be monomorphic (rs3765534). Finally, 35 SNPs were selected for primary analysis.

2.3. Pharmacogenetic Association Studies

2.3.1. Primary Analysis Based on Literature-Selected SNPs

The significant results (on the basis of p -value) of the association analysis restricted to the 35 selected SNPs are presented in Table 2. None of the variants remained significant after multiple testing correction (all variants presented a false discovery rate (FDR) > 0.05). However, the variants with the lowest p -values and FDR may be considered as interesting leads to explain inter-patient variability regarding hepatotoxicity occurrence. First, the variant T allele of *ABCB1* rs1128503 (c.1236C > T, a synonymous variant, p.Gly412=) was associated with a lower risk of severe AST/ALT elevation. Indeed, the dominant model revealed that only 35% (14/40) of the allele T carriers did experience a severe cytolysis (T/C-T/T

vs. C/C, $p = 0.015$, odds ratio (OR) = 0.25, 95% confidence interval = (0.08–0.80)), whereas 68.4% (13/19) of patients carrying the C/C genotype, considered as the most frequent, developed a severe cytolysis during the two first cycles of trabectedin.

Additionally, *ABCB1* missense variant rs2032582 (c.2677G > T, A p.Ala893Thr/Ser) had a protective effect against the risk of overall hepatotoxicity (T/T vs. GG-G/T,A, OR = 0.22 (0.05–0.91), $p = 0.027$), supported by the large amount of homozygous GG patients in the group of toxicity (12/18, 67%) and the fact that the majority of the carriers of two copies of variant allele T did not experience a hepatotoxic event (8/11, 72.7%).

Three variants of the *ABCC2* gene significantly influenced the variation of transaminases. Missense variant rs2273697 (c.1249G > A, p.Val417Ile) was found in 14 cases patients, including 13 heterozygous patients and 1 homozygous patient. Carriers of the A allele showed an increased risk of undergoing a severe ALT/AST elevation (G/A-A/A vs. G/G, OR = 3.63 (1.22–10.83), $p = 0.018$).

The analysis also revealed that carriers of at least one variant allele of rs17222723 (c.3563T > A, p.Val1188Glu) had a significantly decreased risk of severe cytolysis (OR = 0.11 (0.01–0.91), $p = 0.010$). Indeed, severe cytolysis occurred for 51% of the T/T genotyped patients (26/51), whereas only 1 heterozygous patient out of 10 carrying the A allele developed a severe cytolysis. Finally, *ABCC2* synonymous variant rs8187707 (c.4488C > T, p.His1486=) was modestly associated with a protective role against severe cytolysis (C/T vs. C/C, OR = 0.15 (0.02–1.35), $p = 0.045$, but FDR = 0.371). The minor allele of the *ABCG2* rs7699188 intron 2 variant (c.-15994C > T) was significantly associated with an increased risk of severe cytolysis (C/T-T/T vs. C/C, OR = 3.41 (1.07–10.87), $p = 0.034$). Indeed, among the 23 patients experiencing cytolysis, 56.5% (13/23) were carriers of at least one T allele.

Since the incidence of severe cholestasis was limited to three patients, association between genetic variants and cholestasis was not evaluated.

Among the patients, seven presented an isolated severe elevation of γ -GT. Genetic association analysis revealed that *ABCC2* rs2273697 was associated with γ -GT isolated increase with a protective role of the variant allele (G/A-A/A vs. G/G, $p = 0.044$), as no patient carried this allele in the case group. However, the FDR for this variant was high, indicating a risk of misinterpretation of this association.

Finally, every patient treated with one or two cycles of trabectedin and who experienced at least one severe hepatic adverse effect were grouped. Interestingly, the analysis revealed that the wild-type allele A of *CYP3A5* rs776746 (c.6986A > G) coding for the *CYP3A5**1 genotype was associated with this overall hepatotoxicity. The incidence of severe hepatic toxicity was higher in heterozygous *1/*3 patients (A/G vs. A/A vs. G/G, $p = 0.012$, OR = 5.75 (1.16–28.55)). Indeed, 85.7% of the heterozygous patients (12/14) had at least one severe elevation of their hepatic enzymes. In the cohort, two patients were homozygous *1/*1 (A/A) but did not experience any hepatotoxic event.

ABCC4 rs9516519 (c.*3261A > G, 3' untranslated region (3'UTR) variant) was also associated with severe overall hepatotoxicity, revealing a protective role of the variant allele G (T/G-G/G vs. T/T, OR = 0.31, $p = 0.048$).

These results were confirmed with the cross-validation procedure. The ORs generated with the k-fold procedure (presented in Table S1) remained significant (i.e., strictly higher or lower than 1) and included the ORs reported in the univariate analysis (presented in Table 2), confirming the robustness of the statistical results. Moreover, the 95% CI for AUCs (area under the receiver operating characteristic curve) were superior to 0.5 (see Table S1), which indicated a putative predictive effect for the selected variants.

Table 2. Significant results ($p < 0.05$) of the univariate analysis conducted on 35 candidate single-nucleotide polymorphisms (SNPs) selected in the literature.

Gene	SNP	Genotype (n)	Severe HAE	% Severe HAE per Genotype	Genotype Comparison ¹	p-Value	OR	95% CI	FDR
ABCB1	rs1128503 c.1236C > T	CC (19) CT (26) TT (14) GG (18)	Cytolysis	68.4/34.6/35.7	CT-TT vs. CC	0.015	0.25	0.08–0.80	0.147
ABCB1	rs2032582 c.2677G > T,A	GT/A (34) TT (11)	Overall hepatotoxicity	66.7/61.7/27.3	TT vs. GG-GT	0.027	0.22	0.05–0.91	0.705
ABCC2	rs17222723 c.3563T > A	TT (51) TA (9) AA (1)	Cytolysis	50.9/11.1/0	TA-AA vs. TT	0.010	0.11	0.01–0.91	0.147
ABCC2	rs2273697 c.1249G > A	GG (40) GA (21) AA (1)	Cytolysis	32.5/61.9/100	GA-AA vs. GG	0.018	3.63	1.22–10.83	0.147
ABCC2	rs2273697 c.1249G > A	GG (40) GA (21) AA (1)	Isolated elevation of γ -GT	17.5/0/0	GA-AA vs. GG	0.044	N/C	/	0.811
ABCC2	rs8187707 c.4488C > T	CC (50) CT (8) TT (0)	Cytolysis	48/12.5/0	CT vs. CC	0.045	0.15	0.02–1.35	0.371
ABCC4	rs9516519 c.*3261A > G	TT (42) TG (16) GG (1)	Overall hepatotoxicity	69/43.8/0	TG-GG vs. TT	0.048	0.31	0.10–1.01	0.444
ABCG2	rs7699188 c.-15994C > T	CC (31) CT (19) TT (2)	Cytolysis	32.3/63.2/50	CT-TT vs. CC	0.034	3.41	1.07–10.87	0.212
CYP3A5	rs776746 c.6986A > G	AA (2) AG (14) GG (47)	Overall hepatotoxicity	0/85.7/51.1	AA vs. GA vs. GG	0.012	5.75	1.16–28.55	0.403

¹ Genotype in bold is considered as the reference for odds ratio comparison. FDR: false discovery rate; HAE: hepatic adverse effects; N/C: not calculable if compared to other genotypes, 100% of the patients carrying the variant allele experienced HAE in the cohort; OR: odds ratio; SNP: single-nucleotide polymorphism; 95% CI: 95% confidence interval.

2.3.2. Exploratory Analysis

In order to expand the analysis to rare and poorly or never described variants, we analyzed the totality of the 208 SNPs revealed by the NGS. The significant results are summarized in Table S2. In addition to the SNPs previously revealed during the primary analysis, 18 SNPs were significantly associated with severe cytolysis, 9 with severe isolated elevation of γ -GT, and 16 with severe overall hepatotoxicity. Those SNPs mainly concerned genes of the ABC transporters families such as *ABCB* (i.e., *ABCB1*), *ABCC* (i.e., *ABCC2*, *C3*, and *C4*), and *ABCG* families (i.e., *ABCG2*), but also those encoding for *CYP2D6* and *CYP2E1*.

Among the total of 51 significant genotype–toxicity associations, none remained significant after multiple testing with FDR correction. Therefore, only the most significant results ($p < 0.01$), which mainly consisted of *ABCC* variants, were examined, and are presented in Table 3.

ABCC2 rs17216282 intron variant (c.4146 + 11G > C) was found to decrease the risk of severe cytolysis (G/C vs. G/G vs. C/C, $p = 0.009$, OR = 0.1 (0.01–0.87)). Similarly, carriers of at least one variant allele of the *ABCC4* rs1751005 (c.1727 + 91G > A) experienced a lower risk of severe cytolysis than wild-type carriers (G/A-A/A vs. G/G, OR = 0.18 (0.05–0.74), $p = 0.009$). On the other hand, frequency of severe cytolysis was higher in patients carrying two copies of the 3'UTR variant of *ABCC4* rs4148553 (c.*694G > A) compared to G/G and G/A patients ($p = 0.006$).

The analysis of the overall hepatotoxicity revealed 18 significant SNPs, including 8 concerning *ABCC4*. Among the most significant ones with a p -value < 0.01 and low FDR, rs1751005 variant was revealed and, as previously described in severe cytolysis analysis, carriers of at least one minor allele A were found to be less likely to have a severe overall hepatotoxicity (OR = 0.18 (0.05–0.61), $p = 0.004$). Furthermore, results showed that a single base deletion of *ABCC4* (rs11568647 c.2213 + 108delC) was significantly associated with a decreased risk of overall hepatotoxicity, and no carrier of this deletion presented any hepatic adverse event (C/del vs. C/C, $p = 0.003$). In addition, heterozygous patients for *ABCC3* rs2072365 (c.2714 + 29C > T) had a 5.92-fold higher risk (1.83–19.20) of severe overall hepatotoxicity compared to C/C wild-type patients ($p = 0.003$), as well as the heterozygous patients for *ABCC3* rs4148415 (c.2600-123C > T, C/T vs. C/C vs. T/T, OR = 8.36 (2.26–31), $p = 0.001$).

In the analysis of the patients with isolated elevation of γ -GT, we found six variants of the *CYP2E1* gene (rs2249694, rs2249695, rs2480256, rs2480258, and rs2480259), two variants for *ABCC2* (rs2273697 and rs4148395), one for *ABCC3* (rs72837544), and one for *ABCC4* (rs2274408) to be significant in this analysis; however, the p -values were > 0.01 and FDR was high, suggesting that these results have a low predictive value.

As mentioned in the previous analysis, the cross-validation procedure provided confirmation of the consistency of these results, as presented in Table S1.

Table 3. Most significant results ($p < 0.01$) of the univariate analysis conducted on the whole database of 208 SNPs genotyped by NGS (Next-Generation Sequencing).

Gene	SNP	Genotype (n)	Severe HAE	% Severe HAE per Genotype	Genotype Comparison ¹	p-Value	OR	95% CI	FDR
ABCC2	rs17216282 c.4146 + 11G > C	GG (50)	Cytolysis	52/10/0	GC vs. GG	0.009	0.1	0.01–0.87	0.698
		GC (10)							
		CC (0)							
ABCC3	rs2072365 c.2714 + 29C > T	CC (28)	Overall hepatotoxicity	39.2/79.3/33.3	CT vs. CC vs. TT	0.003	5.92	1.83–19.20	0.242
		CT (29)							
		TT (6)							
ABCC3	rs4148415 c.2600-123C > T	CC (27)	Overall hepatotoxicity	40.7/85.2/40	CT vs. CC vs. TT	0.001	8.36	2.26–31	0.242
		CT (27)							
		TT (5)							
ABCC4	rs11568647 c.2213 + 108delC	CC (53)	Overall hepatotoxicity	66/0/0	Cdel vs. CC	0.003	N/C	-	0.242
		Cdel (6)							
		DelDel (0)							
ABCC4	rs1751005 c.1727 + 91G > A	GG (43)	Cytolysis	55.8/14.3/50	GA-AA vs. GG	0.009	0.18	0.05–0.74	0.385
		GA (14)							
		AA (2)							
ABCC4	rs4148553 c.*694C > T	CC (23)	Overall hepatotoxicity	72/28.6/50	GA-AA vs. GG	0.004	0.18	0.05–0.61	0.240
		CT (31)							
		TT (6)							

¹ Genotype in bold is considered as the reference for odds ratio comparison. FDR: false discovery rate; HAE: hepatic adverse effects; N/C: not calculable if compared to other genotypes, 100% of the patients carrying the variant allele experienced HAE in the cohort; OR: odds ratio; SNP: single-nucleotide polymorphism; 95% CI: 95% confidence interval.

2.3.3. Haplotype Analysis

According to the results of exploratory analysis, *ABCC2* gene was highly represented in the severe cytotoxicity group (Table S2); thus, a haplotype analysis was conducted on this gene with significant SNPs.

The linkage disequilibrium (LD) map was generated with Haploview and is shown in Figure 1. A block of seven SNPs was highlighted, covering a large region of 19 kb: rs41318031, rs17222723, rs17216177, rs17216282, rs1137968, rs8187707, and rs17216212.

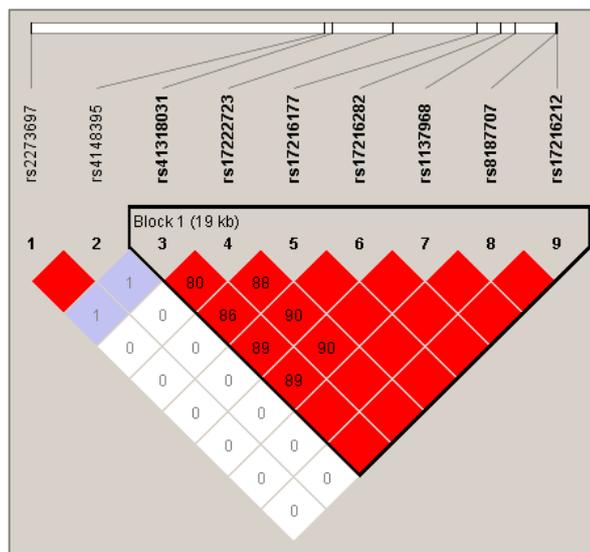


Figure 1. Linkage disequilibrium map of *ABCC2* SNPs. The color of the lozenge represents the $|D'|$ parameter and is filled with R^2 value. The redder the lozenge and higher the value, the stronger the linkage between two SNPs. Absence of R^2 value within the lozenge means $R^2 = 100\%$ = complete linkage disequilibrium (LD).

Association between these polymorphisms and severe cytotoxicity was assessed by performing score tests with a fixed number of SNPs (from seven to two) situated at different positions in the block. Results are shown in Figure S3. According to these results, the most significant regions within block 1 associated with severe cytotoxicity contained two SNPs—rs1137968 and rs8187707 ($p = 0.013$ for dominant model). Since they are in complete LD ($R^2 = 100\%$), haplotype analysis would not bring any advantage over single SNP consideration. In order to evaluate the effect of the association of SNPs included in the haploblock 1 and SNPs outside the haploblock 1, we selected rs8187707 as a tag-SNP using the tagger option of Haploview. We then performed an analysis between rs8187707 and rs2273697. Results showed that AC genotype (i.e., variants allele of rs2273697 associated with wild-type allele of rs8187707) was associated with an increased risk of severe cytotoxicity in the cohort (frequency 17%, OR = 3.72 (1.15–11.99), $p = 0.028$, additive model).

3. Discussion

To our knowledge, this study is the first to assess the association between trabectedin-induced hepatotoxicity and the polymorphisms of some pharmacogenes encoding for CYP450 enzymes or drug transporters in a prospective cohort of patients suffering from ASTS.

In phase 1 clinical studies, transient cytotoxicity was the main liver abnormality reported [15,17,19], which was confirmed in our cohort with 43% of the patients suffering from severe AST/ALT increase (\geq grade 3, CTCAE) following early cycles of trabectedin.

In our primary analysis, five genetic variants belonging exclusively to the ABC transporter gene family were associated with severe cytotoxicity, including three variants of *ABCC2* encoding for the

multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). First, variant alleles of rs17222723 (c.3563T > A, exon 25, p.Val1188Glu) and rs8187707 (c.4488C > T, exon 31, p.His1486=) were significantly associated with a decreased risk of cytolysis (OR < 0.2, FDR = 0.15 and 0.37, respectively). Functional and clinical studies reported that c.3563A allele was associated with an increased expression and activity of MRP2 both in vitro [33] and in samples collected from patients undergoing liver resection [34]. The subsequent haplotype analysis on *ABCC2* showed that these two variants were in complete LD and belonged to a haploblock of seven SNPs, all associated with a decreased risk of cytolysis in the exploratory analysis. Taken together, these data suggest that the c.3563T > A variant may be responsible for the protective effect observed for the other SNPs of the haploblock (including c.4488C > T) and might be linked with an increased efflux of trabectedin to the bile through MRP2 [35]. Of note, the haplotype association tests did not identify any combination of SNPs that displayed a stronger effect than single locus markers.

On the contrary, *ABCC2* rs2273697 (c.1249G > A, exon 10, p.Val417Ile) was found to increase the risk of severe cytolysis 3.6-fold in patients carrying the A allele ($p = 0.018$). This variant was also found significant in the genetic association of these polymorphisms with the isolated increase of γ -GT ($p = 0.044$). However, the OR was not calculable because no patient carried the variant allele in the case group, and the high FDR may indicate a risk of misinterpretation of this association between variant and increase of these hepatic enzymes, which are not exclusively biomarkers of liver damage [36]. Functional studies showed that this variant was associated with a decrease of the substrate-dependent activity of MRP2 [33], caused by the replacement of a valine in the recognition and binding site of conjugated xenobiotics [37]. Oppositely, Deo et al. [38] observed a significantly higher expression of MRP2 in the liver of c.1249A carriers vs. wild-type livers and hypothesized that this SNP would increase the expression of MRP2 while reducing its activity. In our study, a decreased efflux of trabectedin or its metabolites may be responsible for the higher cytolysis severity in patients carrying the variant 1249A allele, as it has already been demonstrated for carbamazepine, whose accumulation exposed patients to neurological toxicity [39].

Finally, the haplotype analysis performed on the nine SNPs that were significant in the exploratory analysis revealed that seven SNPs belonged to the same haploblock, whereas rs4148395 and rs2273697 were both in LD but outside the block 1. Within the haploblock 1, the haplotype association tests did not identify any combination of SNPs that displayed a stronger effect than single locus markers.

In the present study, the T allele of the well-described *ABCB1* rs1128503 (c.1236T > C, exon 16, p.Gly412=) was associated with a significant reduced risk of severe cytolysis after trabectedin treatment ($p = 0.015$, OR = 0.25 (0.08–0.80)). As a result of a synonymous mutation, the consequences of rs1128503 on the P-gp functionality are controversial [40]. Consistently with some previous studies, we found that this variant provided a protective effect, whether it was present in one or two copies. In a retrospective clinical study, Beuselinck et al. [41] demonstrated that T/T patients needed less dose reduction of sunitinib compared to C/C or C/T individuals. Conversely, Salama et al. [42] showed that this variant was associated with an intracellular accumulation of P-gp substrates because of a decreased efflux function.

Interestingly, *ABCB1* rs2032582 T allele (c.2677G > T, A) was associated with a lower risk of overall hepatotoxicity ($p = 0.027$, OR = 0.22 (0.05–0.91)). However, this controversial variant has previously been described for increasing or decreasing the P-gp activity, or having no change in drug exposure and drug effects [43]. The ability of P-gp to transport trabectedin has previously been validated in preclinical and clinical studies [24,25,27], and an enhanced biliary efflux could decrease the risk of cytotoxicity in hepatocytes.

Overall, these results highlight the importance of functional biliary transporters, such as P-gp and MRP2, in the elimination of trabectedin, as has been previously suggested [24,28]. Polymorphisms of their encoding genes could be considered as important biomarkers for the prevention of the risk of hepatotoxicity.

By using NGS as a high-throughput tool of sequencing, we reported new intron variants for *ABCC3*/MRP3, including rs2072365 (c.2714 + 29C > T) and rs4148415 (c.2600-123C > T). *ABCC3* rs2072365 strongly increased the risk of overall hepatotoxicity ($p = 0.003$, OR = 5.92 (1.83–19.20), FDR = 0.242), and especially severe cytolysis ($p = 0.046$, OR = 2.99 (1.01–8.84)). In Bai et al.'s [44] recent study, variant allele of rs4148415 was not associated with a risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. However, in our study, this variant importantly increased the risk of trabectedin-related liver toxicity ($p = 0.001$, OR = 8.36 (2.26–31), FDR = 0.24). Of note, all the *ABCC3* variants identified in the exploratory analysis were associated with an increased risk of hepatotoxicity, confirming the previously suggested role of MRP3 in the detoxification of trabectedin or related bioproducts from the liver directly in the bloodstream [24,28].

Nine SNPs of *ABCC4*/MRP4 were identified in our exploratory analysis, but most of them were not previously described. Yet, we found that rs9516519 (c.*1372A > C), which leads to the loss of a microRNA (miRNA) binding site in the 3' untranslated region (3'UTR) [45], was associated with a decreased occurrence of overall hepatotoxicity ($p = 0.048$, OR = 0.31 (0.10–1.01)). Removing the inhibition caused by miRNA may induce a higher expression of MRP4 protein to the basolateral membrane of hepatocytes and decrease the liver toxicity, as previously suggested for MRP3.

In the cohort, 30% of the patients were found to be heterozygous for the *ABCG2* intron 1 promoter variant rs7699188 (c.-15994C > T) among them, 63.2% had a severe increase of their AST/ALT. Genotype toxicity analysis revealed that T allele carriers had a 3.4-fold enhanced risk of toxic cytolysis when treated with trabectedin ($p = 0.034$). Poonkuzhali et al. [46] found that carriers of the rs7699188 T allele had a higher expression of liver BCRP (breast cancer-resistant protein; encoded by *ABCG2*) due to the gain of a transcription factor-binding site. Moreover, the C/T and T/T patients in their clinical cohort had a higher apparent clearance of imatinib compared to C/C individuals, suggesting that its elimination relies on a functional BCRP. On the contrary, De Mattia et al. [47] demonstrated that this variant was significantly associated with grade 3–4 non-hematological toxicity of irinotecan ($p = 0.0012$), suggesting that a gastrointestinal accumulation of its active but toxic metabolite SN38 may result in a local increased toxicity.

Gathering every patient who had experienced a hepatotoxic event in the early cycles of trabectedin allowed us to highlight the well-described variant *3 of *CYP3A5* gene (rs776746 c.6986A > G). In our cohort, heterozygous carriers (*1/*3) had a 5.75-fold higher risk to present a grade 3/4 hepatic event when treated with trabectedin ($p = 0.012$) in comparison with other genotypes.

This splice site acceptor variant was first described by Kuehl et al. [48], who demonstrated that the most frequent G allele (or *3) abolished the activity of the *CYP3A5* enzyme by generating a variant exon 3B containing a premature stop codon. Carriers of one or two copies of the ancestral allele *1 are then considered as two categories: moderate metabolizers and high metabolizers, respectively [49]. Therefore, numerous examples of toxicant metabolism involving *CYP3A5**1 can be found in the literature, such as acetaminophen-related liver failure caused by the accumulation of its toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) [50].

The involvement of a possible activating metabolism through *CYP3A5* supports the hypothesis of the formation of toxic metabolites from trabectedin [22]. Van Waterschoot et al. [24] initiated these assertions by noticing that the knock-out of transporters such as P-gp, Mrp2, and Mrp3 in transgenic mice drastically increased the trabectedin hepatic toxicity, whereas it was decreased when *Cyp3A* was also lacking. These results meant that *CYP3A* enzymes were involved in the formation of toxic metabolites then eliminated by membrane transporters, as demonstrated by Beumer et al. [25].

Although Lee et al. [28] showed that the biliary excretion of trabectedin occurred through MRP2, the interaction of trabectedin and/or its metabolites with MRP3 and MRP4 remains to be elucidated. However, the same study showed that trabectedin toxicity could be attenuated when Mrp3 and/or Mrp4 expression is upregulated in sandwich-cultured primary rat hepatocytes [28].

Thus, these previous results obtained *in vitro* or *in vivo*, taken together with our findings in clinical samples, support the essential role of ABC transporters (and especially MRP2, MRP3, and MRP4) in the detoxification of trabectedin toxic metabolites.

In the clinical case reported by Laurenty et al. [29], the variant *ABCC2* c.-24C > T (rs717620) was hypothesized to be part of the trabectedin-induced liver damage, since the patient was carrying the homozygous variant genotype. However, in the present pharmacogenetic study, this variant was not significantly associated with any hepatic side effects. It should be acknowledged that the pharmacogenetic investigation in the case report only focused on a very limited number of SNPs, contrary to the larger analysis presented here.

The wide variety of the metabolites [13] produced by the numerous enzymes and eliminated by transporters complicates the interpretation of interindividual variability applied to trabectedin metabolism in liver. In addition to this, the complexity of trabectedin mechanism of action and its potential effects on liver remain to be elucidated. Recent findings showed that it may modulate the tumor microenvironment by activating the production and the release of cytokines [51,52]. It is known that deregulation of pro-inflammatory factor production may result in the downregulation of CYP450s and other enzymes involved in drug metabolism [53]. This observation adds a supplementary level of complexity in understanding the mechanism of hepatotoxicity of trabectedin, for which its ability to regulate its own metabolism via a host-mediated reaction may cover up the role of polymorphisms.

The main limitation of our study is the non-significance of these statistical analyses after multiple testing correction (all variants presented as FDR > 0.05). However, the variants discussed above may be considered to be interesting leads representing pharmacogenetic biomarkers associated with a higher risk of hepatotoxicity. In absence of external dataset for validation, the robustness of these significant associations was confirmed with a k-fold cross validation.

Besides its originality, one of the strengths of our study is the use of clinical samples collected within a prospective clinical trial. However, the results are limited by the low number of patients that may induce an over- or underrepresentation of the genetic variants in a small cohort. ASTS are a group of rare tumors, and the use of trabectedin is constantly reconsidered as authorities have argued that it does not bring benefit in terms of global survival compared to dacarbazine treatment or best supportive care [54,55]. However, considering the poor alternatives existing for ASTS, trabectedin is still a part of the therapeutic arsenal, particularly for the treatment of lipo- and leiomyosarcomas [55]. Moreover, trabectedin may also be used for the treatment of recurrent ovarian cancer [56], exposing a large number of patients to the risk of hepatotoxicity [57]. Overall, our results need to be validated in larger independent cohorts, but the potential of these pharmacogenetic biomarkers is high since they could help to identify patients susceptible to undergoing severe hepatotoxicity during the first cycles of treatment.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

This pharmacogenetic study is an ancillary study of the French clinical trial TSAR (NCT02672527, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) [58]. This study was a phase III open-label randomized trial, investigating the benefit of trabectedin vs BSC. A total of 103 patients with ASTS were randomly distributed into two comparative groups, and a cross-over was possible if patients from the BSC arm showed signs of tumor progression (according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours, RECIST). For both groups, treatment was maintained until tumor progression or non-tolerable toxicity, or according to the patient's desire to stop the treatment.

At the inclusion for TSAR trial, an EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) whole blood sample was collected for every patient who gave their written informed consent for genotyping. Thus, a total of 63 patients were included in this pharmacogenetic study. Initially, 31 patients (49%) belonged to the

trabectedin arm and 32 patients (51%) received BSC. After the cross-over, all the patients were treated with trabectedin at the starting dose of 1.5 mg/m² adjusted with body surface area.

4.2. SNP Selection and Genotyping

4.2.1. SNP Selection

A thorough bibliographic research was carried out to select the most relevant genes involved in trabectedin disposition and the candidate SNPs for each gene. Eleven genes were retained: CYP450 genes: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, and *CYP2E1*, and ABC transporters: *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, and *ABCG2*.

SNPs were collected from international biomedical databases such as Medline (PubMed), PharmaGKB, PharmVar, and the NCBI SNP database (dbSNP). Only SNPs with MAF \geq 0.01 in the Caucasian population were retained. Thus, a total of 47 variants of CYP450 and ABC transporter families were selected for the primary analysis, which are summarized in Table S4.

As the genotyping method was the use of next-generation sequencing targeting the coding sequences and untranslated regulation regions of the 11 selected genes, we also conducted a larger exploratory analysis using all the variants provided by the NGS in order to explore never or poorly described variants.

4.2.2. Customized Ion Ampliseq Panel for Gene Targeting

An Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel primers panel for NGS was designed with Ion Ampliseq Designer (<https://www.ampliseq.com>, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). These couples of primers targeted coding sequences and untranslated regulation regions of 11 genes previously described as involved in trabectedin metabolism and elimination. Additional relevant SNPs described for these genes located outside coding and UTR regions were added in the *.bed* file with a range of 200 base pairs (bp) around the position of the variant.

4.2.3. Libraries Preparation and Amplification for Next-Generation Sequencing

Patient genomic DNA was extracted from whole blood samples with the EZ1 DNA extraction kit for EZ1 Advanced instrument (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), and quantified by spectrophotometry with Nanodrop ND-8000 (ThermoFisher Scientific). Library construction was performed using 10 ng of DNA amplified with primers contained in the custom-designed panel mentioned above and the Ion AmpliSeq Library Kit Plus (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after amplification and digestion, amplicons were barcoded and purified in a two-step procedure with Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) containing magnetic beads, and eluted in 50 μ L of Tris-EDTA (Low-TE) buffer, composed of 10 mM of Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1 mM of EDTA. Sizing and quantification of the libraries were evaluated with the Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) for Agilent bioanalyzer and with a Qubit 2.0 fluorometer using the Qubit dsDBNA HS Assay (Life Technologies), according to the manufacturer's indications. The samples were then stored at -20 °C until subsequent sequencing.

4.2.4. PGM Sequencing

The libraries previously prepared were pooled at 27 pM. Template preparation, ion sphere enrichment, and chip loading of an Ion 316 Chip Kit V2 were automatically set by an Ion Torrent Ion Chef system (ThermoFisher Scientific). High-throughput sequencing was based on the ion semi-conduction principle and operated by an Ion Personal Genome Machine (Ion PGM, ThermoFisher Scientific), using Ion PGM Hi-Q View Chef Reagents kits and Ion PGM Hi-Q Chef solutions kits. Raw data were analyzed with BD-NGS (Bioinformatics department, Institut Universitaire du Cancer IUCT, Oncopole, Toulouse, France), a software for the treatment and visualization of NGS data developed in our institute. The fastq primary files corresponding to each sample were generated by

the sequencer. Then, BAM files were generated by aligning the reads to the hg19 human genome reference (GRCh37), and variant calling and annotations were performed by two variant callers in the pipeline: VarScan2 (2.3.7, Genome Institute, Washington University, Saint Louis, MO, USA) and HaplotypeCaller of the Genome Analysis Toolkit GATK (v.3.3.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA). Finally, the annotation step for VCF files was conducted with snpEff (v.4.3), snpSift (v.4.3), and the Ensembl variant predictor (VEP v.95.1) used as prediction tools for variant functional effect. The annotation databases used were Cosmic (v.87), Clinvar (v.20181028), GnomAD exomes (v.2.1), and dbSNP (v.151). After sorting the sequencing data according to the cohort minor allele frequency (MAF) ≥ 0.01 , we visually inspected the remaining SNPs of interest using the Alamut software (v.2.11, Sofia Genetics, Boston, MA, USA).

4.3. Assessment of Liver Toxicity

In the TSAR trial, endpoints of toxicity were assessed and graded according to NCI-CTCAE v.4.0, including liver toxicity characterized by the measurement of biochemical liver parameters. Blood concentrations of AST/ALT, total plasma bilirubin, AP, and γ -GT, were recorded the first and fourth days of the treatment for cycles 1 and 2, and day 15 and day 21 for every cycle. Only variations of biological markers during cycles 1 and 2 were considered reflective of acute hepatotoxicity, for which severity was assessed as follows: elevations of AST/ALT, AP, and γ -GT over 5 times the upper limit normal (5x ULN) corresponded to a grade 3 adverse event and over 20x ULN reflected a grade 4 adverse event. Total blood bilirubin increased over 3x ULN was considered as a grade 3 elevation, and over 10x ULN as a grade 4 elevation. Severe cytolysis was considered for patients experiencing an AST/ALT increase \geq grade 3. Cholestasis was assessed by grouping γ -GT, AP, and total plasma bilirubin elevations. Patients with isolated elevation of γ -GT were analyzed separately. Finally, overall hepatotoxicity was considered when patients presented at least one variation \geq grade 3 of the hepatic biochemical parameters.

4.4. Statistical Analyses

Genetic analyses were performed with the package SNPassoc (v.1.9.2) of the R software (v.3.5.3) [59]. For each SNP, exact statistic tests were conducted to evaluate the deviation of the genotype frequencies from those expected under Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), according to the method described by Wigginton et al. [60]. Only SNPs with HWE ≥ 0.05 and a genotyping rate higher than 80% were retained for the analysis. Population MAFs of the referenced SNPs were statistically compared with those of the Caucasian CEU (CentralEurope, Utah residents CEPH (Centre d’Etude du Polymorphisme Humain) with Northern and Western European ancestry) population.

Preliminary to genotype/toxicity association statistical analyses, we performed chi-squared tests in order to evaluate the putative impact of prior treatment in hepatotoxicity. If significant, prior treatment would be included as an influencing variable in our subsequent genotype/toxicity association tests.

The univariate association analyses were performed between genotypes and the severe hepatic events previously detailed. For each genetic association, three logistic regression models were tested: (i) a codominant model assuming a per-allele effect that places heterozygous genotype midway between the two others homozygous genotypes (i.e., wild-type and variant), (ii) a dominant model grouping all carriers of the variant allele vs. wild-type carriers, and (iii) a recessive model comparing carriers of at least one wild-type allele and homozygous carriers of the variant [61]. Odds ratios (ORs) were calculated and the model with a significant raw p -value (i.e., $p < 0.05$) was retained as the most reliable result. Multiple test comparisons were conducted with the method of false discovery rate (FDR) according to the Benjamini–Hochberg (BH) procedure [62]. Finally, a haplotype study was performed, using Haploview software (v.4.2, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) to visualize the patterns of linkage disequilibrium (LD) between SNPs and to select the haplotype blocks [63]. This step was followed by an analysis of regression models for binomial trait with Haplostats package (v.1.7.7)

implemented in R. Regression coefficients and *p*-values for individual haplotype effects were estimated with the haplotype-specific generalized linear model (haplo.glm) function of Haplostats.

The findings were validated with a *k*-fold cross-validation procedure. A logistic regression was performed on two-thirds of the cohort (training dataset), and the obtained model was applied to the remaining third (validation dataset). Predictions were compared to observations by computation of the ROC's (receiver operating characteristic curve) AUC. This procedure was repeated 10 times to obtain mean OR and AUC, as well as 95% confidence intervals assuming a Student's *t* distribution with nine degrees of freedom.

5. Conclusions

This pharmacogenetic study is the first to describe the potential variants of interest involved in the trabectedin-related risk of severe hepatotoxicity in patients suffering from ASTS. In accordance with previous studies, this work provides assertions on the importance of functional ABC transporters and CYP450 in the disposition of trabectedin and/or its metabolites. Identification of deleterious variants of *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, and *CYP3A5* brings new arguments in favor of the production of toxic metabolites that could be accumulated in the hepatocytes and have a toxic effect in situ.

The benefits of a pharmacogenetic investigation, which is a non-invasive and easy-to-perform approach, are consequent in terms of prevention of the risk of toxicity inherent in the use of trabectedin. Above all, even though ASTSs are rare diseases, predictive pharmacogenetic biomarkers could play an important role in the improvement of the prevention of the trabectedin-induced adverse drug reactions. This emphasizes the importance of validating these findings on larger cohorts of patients treated with trabectedin. If the role of these variants is confirmed in independent datasets, a prospective study—in which patients carrying these risk variants would have a more individualized treatment (reduced starting dose, enhanced surveillance of hepatic function)—could be conducted to evaluate the benefit in terms of reducing hepatic severe adverse events.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3647/s1>: Table S1. Results of the *k*-fold cross-validation performed on significant SNPs presented in Tables 2 and 3. Table S2. Significant results (*p* < 0.05) of the univariate analysis conducted on 208 SNPs genotyped by NGS. Figure S3. Association between haplotypes of seven SNPs in *ABCC2* gene and severe cytotoxicity. Table S4: Literature-based selection of candidate SNPs for primary analysis.

Author Contributions: Conceptualization, F.T., C.C., E.C., and A.L.C.; methodology, F.T., M.M., and S.F.; software, M.M., M.C., and J.P.; formal analysis, M.M., F.T., F.L.L., M.C., C.D., L.G., and S.F.; investigation, C.C., J.-Y.B., D.C., E.B., A.I., N.I., C.D.-L., N.P., F.B., and C.G.; data curation, S.F., M.M., M.C., and J.P.; writing—original draft preparation, M.M., F.T., J.P., É.C., F.B., N.P., and F.T.; writing—review and editing, M.M., F.L.L., and F.T.; supervision, F.T. and A.L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: J.Y.B. and N.P. declare having received research support and honoraria from Pharmamar. All other authors declare no conflict of interest.

References

1. Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K.W. DNA Sequence- and Structure-Selective Alkylation of Guanine N2 in the DNA Minor Groove by Ecteinascidin 743, a Potent Antitumor Compound from the Caribbean Tunicate Ecteinascidia turbinata. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13303–13309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Herrero, A.B.; Martín-Castellanos, C.; Marco, E.; Gago, F.; Moreno, S. Cross-Talk between Nucleotide Excision and Homologous Recombination DNA Repair Pathways in the Mechanism of Action of Antitumor Trabectedin. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8155–8162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Larsen, A.K.; Galmarini, C.M.; D'Incalci, M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemother. Pharm.* **2016**, *77*, 663–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Izbicka, E.; Lawrence, R.; Raymond, E.; Eckhardt, G.; Faircloth, G.; Jimeno, J.; Clark, G.; Von Hoff, D.D. In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **1998**, *9*, 981–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. EMEA Yondelis@INN-trabectedin—Summary of Product Characteristics. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yondelis-epar-product-information_en.pdf (accessed on 21 December 2019).
6. Le Cesne, A. Making the Best of Available Options for Optimal Sarcoma Treatment. *Oncology* **2018**, *95*, 11–20. [[CrossRef](#)]
7. Caruso, C.; Garofalo, C. Pharmacogenomics Biomarkers of Soft Tissue Sarcoma Therapies. *Front. Oncol.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Italiano, A.; Laurand, A.; Laroche, A.; Casali, P.; Sanfilippo, R.; Cesne, A.L.; Judson, I.; Blay, J.-Y.; Ray-Coquard, I.; Bui, B.; et al. ERCC5/XPG, ERCC1, and BRCA1 gene status and clinical benefit of trabectedin in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* **2011**, *117*, 3445–3456. [[CrossRef](#)]
9. Schöffski, P.; Taron, M.; Jimeno, J.; Grosso, F.; Sanfilippo, R.; Casali, P.G.; Le Cesne, A.; Jones, R.L.; Blay, J.-Y.; Poveda, A.; et al. Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: A retrospective multicentric study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **2011**, *47*, 1006–1012. [[CrossRef](#)]
10. Miolo, G.; Viel, A.; Canzonieri, V.; Baresic, T.; Buonadonna, A.; Santeufemia, D.A.; Lara, D.P.; Corona, G. Association of the germline BRCA2 missense variation Glu2663Lys with high sensitivity to trabectedin-based treatment in soft tissue sarcoma. *Cancer Biol.* **2016**, *17*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
11. Beumer, J.H.; Rademaker-Lakhai, J.M.; Rosing, H.; Hillebrand, M.J.X.; Bosch, T.M.; Lopez-Lazaro, L.; Schellens, J.H.M.; Beijnen, J.H. Metabolism of trabectedin (ET-743, Yondelis™) in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharm.* **2007**, *59*, 825–837. [[CrossRef](#)]
12. Sparidans, R.W.; Rosing, H.; Hillebrand, M.J.; López-Lázaro, L.; Jimeno, J.M.; Manzanares, I.; van Kesteren, C.; Cvitkovic, E.; van Oosterom, A.T.; Schellens, J.H.; et al. Search for metabolites of ecteinascidin 743, a novel, marine-derived, anti-cancer agent, in man. *Anticancer Drugs* **2001**, *12*, 653–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vermeir, M.; Hemeryck, A.; Cuyckens, F.; Francesch, A.; Bockx, M.; Van Houdt, J.; Steemans, K.; Mannens, G.; Avilés, P.; De Coster, R. In vitro studies on the metabolism of trabectedin (YONDELIS®) in monkey and man, including human CYP reaction phenotyping. *Biochem. Pharm.* **2009**, *77*, 1642–1654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Beumer, J.H.; Rademaker-Lakhai, J.M.; Rosing, H.; Lopez-Lazaro, L.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. Trabectedin (Yondelis™, formerly ET-743), a mass balance study in patients with advanced cancer. *Investig. New Drugs* **2005**, *23*, 429–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Demetri, G.D.; Chawla, S.P.; von Mehren, M.; Ritch, P.; Baker, L.H.; Blay, J.Y.; Hande, K.R.; Keohan, M.L.; Samuels, B.L.; Schuetze, S.; et al. Efficacy and Safety of Trabectedin in Patients With Advanced or Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Prior Anthracyclines and Ifosfamide: Results of a Randomized Phase II Study of Two Different Schedules. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4188–4196. [[CrossRef](#)]
16. Grosso, F.; D’Incalci, M.; Cartoafa, M.; Nieto, A.; Fernández-Teruel, C.; Alfaro, V.; Lardelli, P.; Roy, E.; Gómez, J.; Kahatt, C.; et al. A comprehensive safety analysis confirms rhabdomyolysis as an uncommon adverse reaction in patients treated with trabectedin. *Cancer Chemother. Pharm.* **2012**, *69*, 1557–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Taamma, A.; Missset, J.L.; Riofrio, M.; Guzman, C.; Brain, E.; Lopez Lazaro, L.; Rosing, H.; Jimeno, J.M.; Cvitkovic, E. Phase I and Pharmacokinetic Study of Ecteinascidin-743, a New Marine Compound, Administered as a 24-hour Continuous Infusion in Patients With Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 1256–1265. [[CrossRef](#)]
18. Villalona-Calero, M.A.; Eckhardt, S.G.; Weiss, G.; Hidalgo, M.; Beijnen, J.H.; Kesteren C, v.a.n.; Rosing, H.; Campbell, E.; Kraynak, M.; Lopez-Lazaro, L.; et al. A Phase I and Pharmacokinetic Study of Ecteinascidin-743 on a Daily × 5 Schedule in Patients with Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 75–85.
19. Le Cesne, A.; Yovine, A.; Blay, J.-Y.; Delaloge, S.; Maki, R.G.; Missset, J.-L.; Frontelo, P.; Nieto, A.; Jiao, J.J.; Demetri, G.D. A retrospective pooled analysis of trabectedin safety in 1,132 patients with solid tumors treated in phase II clinical trials. *Investig. New Drugs* **2012**, *30*, 1193–1202. [[CrossRef](#)]
20. D’Incalci, M.; Jimeno, J. Preclinical and clinical results with the natural marine product ET-743. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 1843–1853. [[CrossRef](#)]

21. Donald, S.; Verschoyle, R.D.; Edwards, R.; Judah, D.J.; Davies, R.; Riley, J.; Dinsdale, D.; Lazaro, L.L.; Smith, A.G.; Gant, T.W.; et al. Hepatobiliary Damage and Changes in Hepatic Gene Expression Caused by the Antitumor Drug Ecteinascidin-743 (ET-743) in the Female Rat. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4256–4262.
22. Reid, J.M.; Kuffel, M.J.; Ruben, S.L.; Morales, J.J.; Rinehart, K.L.; Squillace, D.P.; Ames, M.M. Rat and Human Liver Cytochrome P-450 Isoform Metabolism of Ecteinascidin 743 Does Not Predict Gender-dependent Toxicity in Humans. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2952–2962. [PubMed]
23. Brandon, E.F.A.; Sparidans, R.W.; Guijt, K.-J.; Löwenthal, S.; Meijerman, I.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. In vitro characterization of the human biotransformation and CYP reaction phenotype of ET-743 (Yondelis®), Trabectedin, a novel marine anti-cancer drug. *Investig. New Drugs* **2006**, *24*, 3–14. [CrossRef] [PubMed]
24. van Waterschoot, R.A.B.; Eman, R.M.; Wagenaar, E.; van der Kruijssen, C.M.M.; Rosing, H.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. ABCC2, ABCC3, and ABCB1, but not CYP3A, Protect against Trabectedin-Mediated Hepatotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7616–7623. [CrossRef] [PubMed]
25. Beumer, J.H.; Franke, N.E.; Tolboom, R.; Buckle, T.; Rosing, H.; Lopez-Lazaro, L.; Schellens, J.H.M.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. Disposition and toxicity of trabectedin (ET-743) in wild-type and *mdr1* gene (*P-gp*) knock-out mice. *Investig. New Drugs* **2010**, *28*, 145–155. [CrossRef] [PubMed]
26. Brandon, E.F.A.; Meijerman, I.; Klijn, J.S.; den Arend, D.; Sparidans, R.W.; Lázaro, L.L.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. In-vitro cytotoxicity of ET-743 (Trabectedin, Yondelis), a marine anti-cancer drug, in the Hep G2 cell line: Influence of cytochrome P450 and phase II inhibition, and cytochrome P450 induction. *Anticancer. Drugs* **2005**, *16*, 935–943. [CrossRef]
27. Donald, S.; Verschoyle, R.D.; Greaves, P.; Gant, T.W.; Colombo, T.; Zaffaroni, M.; Frapolli, R.; Zucchetti, M.; D’Incalci, M.; Meco, D.; et al. Complete Protection by High-Dose Dexamethasone against the Hepatotoxicity of the Novel Antitumor Drug Yondelis (ET-743) in the Rat. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5902–5908.
28. Lee, J.K.; Leslie, E.M.; Zamek-Gliszczynski, M.J.; Brouwer, K.L.R. Modulation of trabectedin (ET-743) hepatobiliary disposition by multidrug resistance-associated proteins (Mrps) may prevent hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2008**, *228*, 17–23. [CrossRef]
29. Laurenty, A.-P.; Thomas, F.; Chatelut, E.; Bétrian, S.; Guellec, C.L.; Hennebelle, I.; Guellec, S.L.; Chevreau, C. Irreversible hepatotoxicity after administration of trabectedin to a pleiomorphic sarcoma patient with a rare *ABCC2* polymorphism: A case report. *Pharmacogenomics* **2013**, *14*, 1389–1396. [CrossRef]
30. Rathinamanickam, H. Trabectedin Induced Irreversible Hepatotoxicity: 1863. *Am. J. Gastroenterol.* **2016**, *111*, S893. [CrossRef]
31. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda, MD, USA, 2012.
32. EMEA Good Pharmacogenomic Practice. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/good-pharmacogenomic-practice> (accessed on 15 October 2020).
33. Wen, X.; Joy, M.S.; Aleksunes, L.M. In Vitro Transport Activity and Trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic Variants. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1637–1647. [CrossRef]
34. Meier, Y.; Pauli-Magnus, C.; Zanger, U.M.; Klein, K.; Schaeffeler, E.; Nussler, A.K.; Nussler, N.; Eichelbaum, M.; Meier, P.J.; Stieger, B. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)–transporter expression in human liver. *Hepatology* **2006**, *44*, 62–74. [CrossRef] [PubMed]
35. Jedlitschky, G.; Hoffmann, U.; Kroemer, H.K. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2*, 351–366. [CrossRef] [PubMed]
36. Boige, V.; Buffet, C. Diagnostic strategy in case of isolated increase in serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **1997**, *21*, 8.
37. Megaraj, V.; Zhao, T.; Paumi, C.M.; Gerk, P.M.; Kim, R.; Vore, M. Functional Analysis of Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2; ABCC2). *Pharm. Genom.* **2011**, *21*, 506–515. [CrossRef]
38. Deo, A.K.; Prasad, B.; Balogh, L.; Lai, Y.; Unadkat, J.D. Interindividual Variability in Hepatic Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2/ABCC2): Quantification by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 852–855. [CrossRef]
39. Kim, W.-J.; Lee, J.H.; Yi, J.; Cho, Y.-J.; Heo, K.; Lee, S.H.; Kim, S.W.; Kim, M.-K.; Kim, K.H.; In Lee, B.; et al. A nonsynonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy. *Pharm. Genom.* **2010**, *20*, 249–256. [CrossRef]

40. Wolking, S.; Schaeffeler, E.; Lerche, H.; Schwab, M.; Nies, A.T. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin. Pharm.* **2015**, *54*, 709–735. [[CrossRef](#)]
41. Beuselinck, B.; Lambrechts, D.; Van Brussel, T.; Wolter, P.; Cardinaels, N.; Joniau, S.; Lerut, E.; Karadimou, A.; Couchy, G.; Sebe, P.; et al. Efflux pump ABCB1 single nucleotide polymorphisms and dose reductions in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Acta Oncol.* **2014**, *53*, 1413–1422. [[CrossRef](#)]
42. Salama, N.N.; Yang, Z.; Bui, T.o.t.; Ho, R.J.Y. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2293–2308. [[CrossRef](#)]
43. Hodges, L.M.; Markova, S.M.; Chinn, L.W.; Gow, J.M.; Kroetz, D.L.; Klein, T.E.; Altman, R.B. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharm. Genom.* **2011**, *21*, 152–161. [[CrossRef](#)]
44. Bai, H.; Wu, T.; Jiao, L.; Wu, Q.; Zhao, Z.; Song, J.; Liu, T.; Lv, Y.; Lu, X.; Ying, B. Association of ABCC Gene Polymorphism With Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity in Western Han Patients With Tuberculosis. *J. Clin. Pharm.* **2020**, *60*, 361–368. [[CrossRef](#)]
45. Lopez-Lopez, E.; Ballesteros, J.; Piñan, M.; Toledo, J.S.; de Andoin, N.G.; de Garcia-Miguel, P.; Navajas, A.; Garcia-Orad, A. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: A new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharm. Genom.* **2013**, *23*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Poonkuzhali, B.; Lamba, J.; Strom, S.; Sparreboom, A.; Thummel, K.; Watkins, P.; Schuetz, E. Association of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2 Phenotypes and Novel Promoter and Intron 1 Single Nucleotide Polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 780–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. De Mattia, E.; Toffoli, G.; Polesel, J.; D'Andrea, M.; Corona, G.; Zagonel, V.; Buonadonna, A.; Dreussi, E.; Cecchin, E. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharm. Genom.* **2013**, *23*, 549–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kuehl, P.; Zhang, J.; Lin, Y.; Lamba, J.; Assem, M.; Schuetz, J.; Watkins, P.B.; Daly, A.; Wrighton, S.A.; Hall, S.D.; et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 383–391. [[CrossRef](#)]
49. Birdwell, K.; Decker, B.; Barbarino, J.; Peterson, J.; Stein, C.; Sadee, W.; Wang, D.; Vinks, A.; He, Y.; Swen, J.; et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin. Pharm.* **2015**, *98*, 19–24. [[CrossRef](#)]
50. Court, M.H.; Peter, I.; Hazarika, S.; Vasiadi, M.; Greenblatt, D.J.; Lee, W.M. The Acute Liver Failure Study Group Candidate Gene Polymorphisms in Patients with Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 28–32. [[CrossRef](#)]
51. Povo-Retana, A.; Mojena, M.; Stremtan, A.B.; Fernández-García, V.B.; Gómez-Sáez, A.; Nuevo-Tapióles, C.; Molina-Guijarro, J.M.; Avendaño-Ortiz, J.; Cuezva, J.M.; López-Collazo, E.; et al. Specific Effects of Trabectedin and Lurbinectedin on Human Macrophage Function and Fate—Novel Insights. *Cancers* **2020**, *12*, 3060. [[CrossRef](#)]
52. Banerjee, P.; Zhang, R.; Ivan, C.; Galletti, G.; Clise-Dwyer, K.; Barboglio, F.; Scarfò, L.; Aracil, M.; Klein, C.; Wierda, W.; et al. Trabectedin Reveals a Strategy of Immunomodulation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 2036–2051. [[CrossRef](#)]
53. Mallick, P.; Taneja, G.; Moorthy, B.; Ghose, R. Regulation of drug-metabolizing enzymes in infectious and inflammatory disease: Implications for biologics–small molecule drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2017**, *13*, 605–616. [[CrossRef](#)]
54. Demetri, G.D.; von Mehren, M.; Jones, R.L.; Hensley, M.L.; Schuetz, S.M.; Staddon, A.; Milhem, M.; Elias, A.; Ganjoo, K.; Tawbi, H.; et al. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 786–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yondelis. Avis de la Commission de Transparence–Haute Autorité de Santé. Available online: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16827_YONDELIS_sarcomes_PIC_REEV_Avis2_CT16827.pdf (accessed on 16 June 2020).
56. Casado, A.; Callata, H.R.; Manzano, A.; Marquina, G.; Alonso, T.; Gajate, P.; Sotelo, M.; Cabezas, S.; Fernández, C.; Díaz-Rubio, E. Trabectedin for reversing platinum resistance and resensitization to platinum in patients with recurrent ovarian cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* **2019**, *15*, 271–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Monk, B.J.; Herzog, T.J.; Wang, G.; Triantos, S.; Maul, S.; Knoblauch, R.; McGowan, T.; Shalaby, W.S.W.; Coleman, R.L. A phase 3 randomized, open-label, multicenter trial for safety and efficacy of combined trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin therapy for recurrent ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **2020**, *156*, 535–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Le Cesne, A.; Blay, J.-Y.; Cupissol, D.; Italiano, A.; Delcambre, C.; Penel, N.; Isambert, N.; Chevreau, C.; Bompas, E.; Bertucci, F.; et al. Results of a prospective randomized phase III T-SAR trial comparing trabectedin (T) vs. best supportive care (BSC) in patients with pretreated advanced soft tissue sarcoma (ASTS): A French Sarcoma Group (FSG) trial. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 11508. [[CrossRef](#)]
59. Gonzalez, J.R.; Armengol, L.; Sole, X.; Guino, E.; Mercader, J.M.; Estivill, X.; Moreno, V. SNPpass: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 654–655. [[CrossRef](#)]
60. Wigginton, J.E.; Cutler, D.J.; Abecasis, G.R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *76*, 887–893. [[CrossRef](#)]
61. Minelli, C.; Thompson, J.R.; Abrams, K.R.; Thakkinstian, A.; Attia, J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int. J. Epidemiol.* **2005**, *34*, 1319–1328. [[CrossRef](#)]
62. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
63. Gabriel, S.B. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science* **2002**, *296*, 2225–2229. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Appendix A

Table S1. Results of the k-fold cross-validation performed on significant SNPs presented in Table 2 and Table 3. Predictions were compared to observations by computation of the ROC curve's AUC. This procedure was repeated 10 times (K = 10) to obtain mean OR and AUC, as well as 95% confidence intervals assuming a Student's t-distribution with 9 degrees of freedom.

Gene	SNP	Hepatotoxicity end-point	P value of the univariate analysis	OR of the univariate analysis	IC95 OR after K-cross	IC95 AUC after K-cross	K
ABCB1	rs1128503	Cytolysis	0.015	0.249	0.186 - 0.386	0.565 - 0.716	10
ABCB1	rs2032582	Overall hepatotoxicity	0.027	0.216	0.122 - 0.39	0.551 - 0.674	10
ABCC2	rs17222723	Cytolysis	0.01	0.107	0.073 - 0.228	0.578 - 0.677	10
ABCC2	rs2273697	Cytolysis	0.018	3.635	2.849 - 5.511	0.569 - 0.709	10
ABCC2	rs8187707	Cytolysis	0.045	0.155	0.118 - 0.359	0.569 - 0.651	10
ABCC4	rs9516519	Overall hepatotoxicity	0.048	0.314	0.22 - 0.455	0.541 - 0.688	10
ABCG2	rs7699188	Cytolysis	0.034	3.412	2.246 - 4.529	0.622 - 0.749	10
CYP3A5	rs776746	Overall hepatotoxicity	0.012	5.75	5.016 - 8.954	0.569 - 0.67	10
ABCC2	rs17216282	Cytolysis	0.009	0.1	0.073 - 0.191	0.603 - 0.668	10
ABCC3	rs2072365	Overall hepatotoxicity	0.003	5.92	4.984 - 6.574	0.674 - 0.748	10
ABCC3	rs4148415	Overall hepatotoxicity	0.001	8.36	6.574 - 8.752	0.737 - 0.802	10
ABCC4	rs11568647	Overall hepatotoxicity	0.003	N/C	N/C	N/C	10
ABCC4	rs1751005	Cytolysis	0.009	0.18	0.096 - 0.277	0.56 - 0.71	10
ABCC4	rs1751005	Overall hepatotoxicity	0.004	0.18	0.117 - 0.263	0.593 - 0.749	10
ABCC4	rs4148553	Cytolysis	0.006	N/C	N/C	N/C	10

AUC: area under the receiver operating curve (ROC); IC95: 95% confidence interval; N/C: non calculable as no OR could

be determined in the previous analyses (see Table 2 and Table 3); OR: odds-ratio; SNP: single-nucleotide polymorphism.

Appendix B

Table S2. Significant results ($p < 0.05$) of the univariate analysis conducted on 208 SNPs genotyped by NGS.

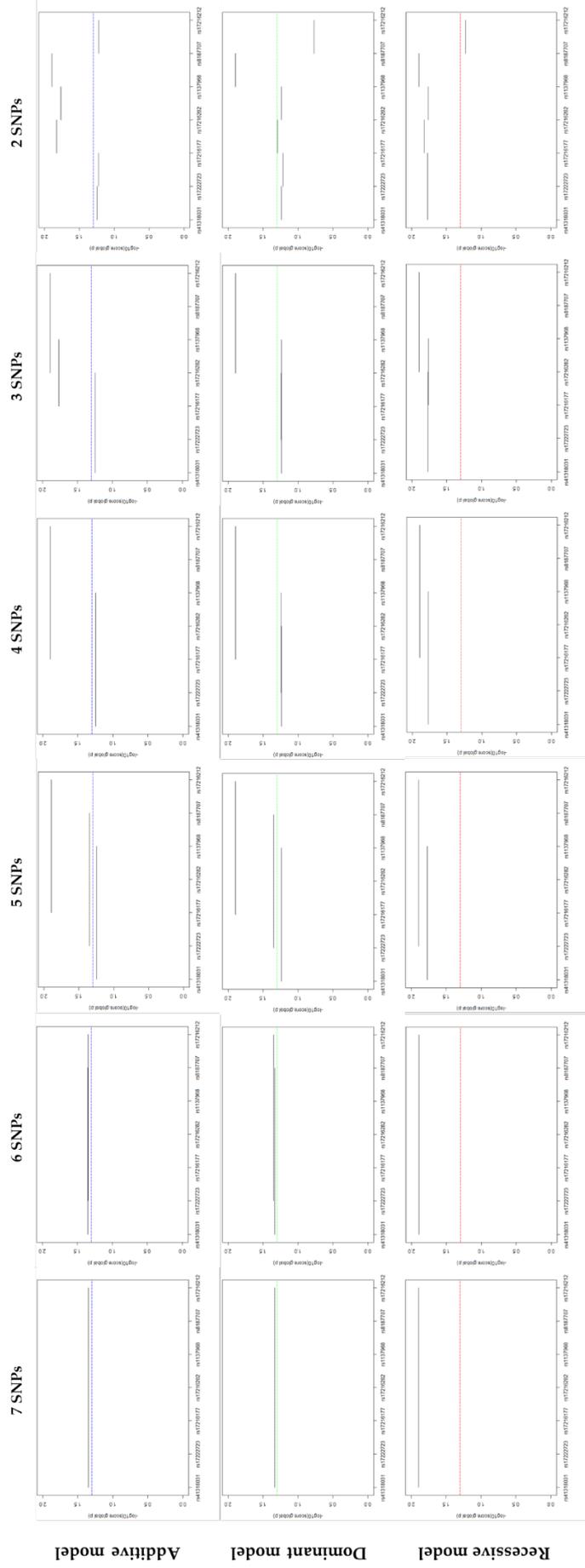
Gene	SNP	Variant	Transcript and protein variation	Genotype (n)	Severe HAE	% Severe HAE per genotype	Genotype comparison ¹	P value	O R	95%CI	FD R
ABCB1	rs102760	c.1000-44T>C	Intron variant	TT (20) / CT (26) / CC (13)	Cytolysis	65/34.6/38.5	CC>CT vs. TT	0.033	0.3	0.10-0.93	0.41
ABCB1	rs112850	c.1236C>T	p.Gly412=	CC (19) / CT (26) / TT (14)	Cytolysis	68.4/34.6/35.7	CT>TT vs. CC	0.015	0.2	0.08-0.80	0.38
ABCB1	rs203258	c.2677C>T	p.Ala893Thr	GG (18) / CT (34) / TT (11)	Overall hepatotoxicity	66.7/61.7/27.3	TT vs. GG>GT	0.027	0.2	0.05-0.91	0.90
ABCB1	rs223501	c.1725+38C>T	Intron variant	CC (16) / CT (29) / TT (14)	Cytolysis	37.5/37.9/71.4	TT vs. CC>CT	0.026	4.1	1.11-	1
ABCB1	rs223503	c.1554+24A>G	Intron variant	AA (16) / AG (27) / GG (15)	Cytolysis	37.5/37/66.7	GG vs. AG>GG	0.048	3.3	0.98-	1
ABCB1	rs223504	c.2064+73T>C	Intron variant	CC (18) / CT (26) / TT (13)	Cytolysis	66.7/34.6/38.5	TC>TT vs. CC	0.029	0.2	0.09-0.91	0.41
ABCB1	rs472869	c.2320-88T>C	Intron variant	TT (57) / CT (4) / CC (0)	Overall hepatotoxicity	63.2/0/0	CT vs. TT	0.024	0	-	0.84
ABCC2	rs13796	c.4290G>T	p.Val1430=	GG (51) / GT (10) / TT (0)	Cytolysis	50.9/10/0	GT vs. GG	0.010	0.1	0.01-0.91	0.69
ABCC2	rs172161	c.3742-34T>C	Intron variant	TT (50) / TC (8) / CC (0)	Cytolysis	52/12.5/0	TC vs. TT	0.027	0.1	0.02-1.15	0.69
ABCC2	rs172162	c.4508+12C>A	Intron variant	GG (48) / GA (8) / AA (0)	Cytolysis	50/12.5/0	GA vs. GG	0.036	0.1	0.02-1.25	0.69
ABCC2	rs172162	c.4508+12C>A	Intron variant	GG (48) / GA (8) / AA (0)	Overall hepatotoxicity	62.5/25/0	GA vs. GG	0.046	0.2	0.04-1.1	0.90
ABCC2	rs172162	c.4146+11C>C	Intron variant	GG (50) / GC (10) / CC (0)	Cytolysis	52/10/0	GC vs. GG	0.009	0.1	0.01-0.87	0.69
ABCC2	rs172227	c.3563T>A	p.Val1188Glu	TT (51) / TA (9) / AA (1)	Cytolysis	50.9/11.1/0	TA>AA vs. TT	0.010	0.1	0.01-0.91	0.69
ABCC2	rs227369	c.1249G>A	p.Val417Ile	GG (40) / GA (21) / AA (1)	Cytolysis	32.5/61.9/100	GA>AA vs. GG	0.018	3.6	1.22-	0.38
ABCC2	rs227369	c.1249G>A	p.Val417Ile	GG (40) / GA (21) / AA (1)	Isolated elevation of gamma-GT	17.5/0/0	GA>AA vs. GG	0.044	0	-	0.60
ABCC2	rs413180	c.2883+11C>T	Intron variant	CC (51) / CT (9) / TT (0)	Cytolysis	50.1/11.1/0	CT vs. CC	0.018	0.1	0.01-1.03	0.69
ABCC2	rs414839	c.2621-139G>A	Intron variant	GG (38) / GA (20) / AA (1)	Cytolysis	34.2/65/100	GA>AA vs. GG	0.016	3.8	1.24-	0.38
ABCC2	rs414839	c.2621-139G>A	Intron variant	GG (38) / GA (20) / AA (1)	Isolated elevation of gamma-GT	18.4/0/0	GA>AA vs. GG	0.043	0	-	0.60
ABCC2	rs181770	c.4488C>T	p.His1496=	CC (50) / CT (8) / TT (0)	Cytolysis	48/12.5/0	CT vs. CC	0.045	0.1	0.02-1.35	0.69
ABCC3	rs207236	c.2714+29C>T	Intron variant	CC (28) / CT (29) / TT (6)	Cytolysis	32/58.6/16.7	CT vs. CC vs. TT	0.046	2.9	1.01-8.84	0.69
ABCC3	rs207236	c.2714+29C>T	Intron variant	CC (28) / CT (29) / TT (6)	Overall hepatotoxicity	39.2/79.3/33.3	CT vs. CC vs. TT	0.003	5.9	1.83-	0.24

ABCC3	rs414841	c.2600-123C>T	Intron variant	CC (27) / CT (27) / TT (5)	Cytolysis	33.3/63/20	0.041	3.4	1.11-10.40	0.69
ABCC3	rs414841	c.2600-123C>T	Intron variant	CC (27) / CT (27) / TT (5)	Overall hepatotoxicity	40.7/85.2/40	0.001	8.3	2.26-31	0.24
ABCC3	rs728375	c.612>73C>A	Intron variant	CC (58) / CA (3) / AA (0)	Isolated elevation of gamma-GT	8.6/66.7/0	0.018	21	1.62-	1
ABCC4	rs115686	c.2213+108de IC	Intron variant	CC (53) / Cdel (6) / DelDel (0)	Cytolysis	51/0/0	0.027	0	-	0.69
ABCC4	rs115686	c.2213+108de IC	Intron variant	CC (53) / Cdel (6) / DelDel (0)	Overall hepatotoxicity	66/0/0	0.003	0	-	0.24
ABCC4	rs118943	c.2536-60T>G	Intron variant	TT (51) / TG (7) / GC (0)	Overall hepatotoxicity	54.9/100/0	0.035	0	-	0.90
ABCC4	rs118946	c.2844G>A	p.Phe948=	GG (52) / GA (7) / AA (0)	Overall hepatotoxicity	55.8/100/0	0.036	0	-	0.90
ABCC4	rs175100	c.1727+91G>A	Intron variant	GG (43) / GA (14) / AA (2)	Cytolysis	55.8/14.3/50	0.009	0.1	0.05-0.74	0.38
ABCC4	rs175100	c.1727+91G>A	Intron variant	GG (43) / GA (14) / AA (2)	Overall hepatotoxicity	72/28.6/50	0.004	0.1	0.05-0.61	0.24
ABCC4	rs227440	c.911+80T>C	Intron variant	TT (15) / TC (29) / CC (8)	Isolated elevation of gamma-GT	6.7/6.9/37.5	0.030	8.2	1.29-52.16	1
ABCC4	rs227440	c.911+80T>C	Intron variant	TT (15) / TC (29) / CC (8)	Overall hepatotoxicity	33.3/65.5/75	0.024	4.1	1.16-14.91	0.42
ABCC4	rs229665	c.1727+118A>G	Intron variant	AA (16) / GA (27) / GG (16)	Cytolysis	62.5/48.1/25	0.046	0.2	0.08-1.04	1
ABCC4	rs229665	c.1727+118A>G	Intron variant	AA (16) / GA (27) / GG (16)	Overall hepatotoxicity	81.3/59.3/43.8	0.044	0.2	0.07-1.07	0.42
ABCC4	rs414855	c.*694C>T	3'UTR variant	CC (23) / CT (31) / TT (6)	Cytolysis	34.8/41.9/100	0.006	N/	-	0.64
ABCC4	rs665028	c.*168A>G	3'UTR variant	AA (11) / AG (32) / GG (14)	Cytolysis	21.4/50/63.6	0.031	4.2	1.03-17.28	0.41
ABCC4	rs665028	c.*168A>G	3'UTR variant	AA (11) / AG (32) / GG (14)	Overall hepatotoxicity	35.7/65.6/72.7	0.037	3.7	1.05-13.22	0.42
ABCC4	rs951651	c.*3261T>G	3'UTR variant	TT (42) / TG (16) / GG (1)	Overall hepatotoxicity	69/43.8/0	0.048	0.3	0.10-1.01	0.42
ABCC2	rs769918	c.-15994C>T	Intron variant	CC (31) / CT (19) / TT (2)	Cytolysis	32.3/63.2/50	0.034	3.4	1.07-10.87	0.41
CYP2D	rs290016	c.180-90G>A	Intron variant	GG (55) / GA (5) / AA (1)	Cytolysis	40/80/100	0.038	7.5	0.83-68.63	0
CYP2E	rs224969	c.1298-131G>A	Intron variant	GG (30) / GA (23) / AA (3)	Isolated elevation of gamma-GT	20/0/0	0.025	0	-	0.55
CYP2E	rs224969	c.1298-131G>A	Intron variant	GG (30) / GA (23) / AA (3)	Overall hepatotoxicity	70/43.5/33.3	0.036	0.3	0.10-0.95	0.42
CYP2E	rs224969	c.1298-116C>T	Intron variant	CC (30) / CT (24) / TT (3)	Isolated elevation of gamma-GT	20/0/0	0.025	0	-	0.55
CYP2E	rs224969	c.1298-116C>T	Intron variant	CC (30) / CT (24) / TT (3)	Overall hepatotoxicity	70/45.8/33.3	0.050	0.3	0.12-1.02	0.42

CYP2E1	rs248025	c.*46G>A	3'UTR variant	GG (35) / GA (20) / AA (4)	Isolated elevation of gamma-CT	20/0/0	AG-AA vs. GG	0.035	0	-	0.60
CYP2E1	rs248025	c.*46G>A	3'UTR variant	GG (35) / GA (20) / AA (4)	Overall hepatotoxicity	71.4/50/25	AG-AA vs. GG	0.048	0.3	0.11-1	0.42
CYP2E1	rs248025	c.*41T>A	3'UTR variant	TT (33) / TA (0) / AA (0)	Isolated elevation of gamma-CT	21.2/0/0	TA-AA vs. TT	0.014	0	-	0.55
CYP2E1	rs248025	c.1298-184C>T	Intron variant	CC (30) / TC (23) / TT (3)	Isolated elevation of gamma-CT	20/0/0	TC-TT vs. CC	0.025	0	-	0.55
CYP2E1	rs248025	c.1298-184C>T	Intron variant	CC (30) / TC (23) / TT (3)	Overall hepatotoxicity	70/43.5/33.3	TC-TT vs. CC	0.036	0.3	0.10-0.95	0.42
CYP2E1	rs248025	c.1298-208G>A	Intron variant	GG (30) / GA (23) / AA (3)	Isolated elevation of gamma-CT	20/0/0	AG-AA vs. GG	0.025	0	-	0.55
CYP2E1	rs248025	c.1298-208G>A	Intron variant	GG (30) / GA (23) / AA (3)	Overall hepatotoxicity	70/43.5/33.3	AG-AA vs. GG	0.036	0.3	0.10-0.95	0.42
CYP3A4	rs776746	c.6986A>G	Splicing acceptor variant	AA (2) / AG (14) / GG (47)	Overall hepatotoxicity	0/85.7/51.1	TC vs. CC vs. TT	0.012	5.7	1.16-28.55	0.60

¹Genotype in bold is considered as the reference for odds ratio comparison. FDR: false-discovery rate; HAE: hepatic adverse effects; N/C: not calculable if compared to other genotypes, 100% of the patients carrying the variant allele experienced HAE in the cohort; OR: odds ratio; SNP: single-nucleotide polymorphism; 95%CI: 95% confidence interval.

Figure S3. Association between haplotypes of seven SNPs in *ABCC2* gene and severe cytolytic. Three models are described (additive, dominant, recessive). The dot line represents the significant p-value threshold of global score test expressed in negative logarithm ($\log(p) = 1.3$).



Appendix D

Literature-based selection of candidate SNPs for primary analysis. HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; N/I: not indicated; SNP: single nucleotide polymorphism; Ref.: references; ↓: decreased; ↑: increased

Gene and variant	Genetic sequence variation	Transcript and protein variation	Functional impact	HWE P > 0.05	Genotyping rate >80%	Candidate SNP for primary analysis	Ref.
ABCB1							
rs1045642	c.3435C>T	p.Ile1145=	↓ ABCB1 expression. ↓ P-gp activity. ↓ liver toxicity in patients carrying the wild-type allele.	Yes	Yes	*	[1,2]
rs1128503	c.1236C>T	p.Gly412=	Conflicting results. ↑ or ↓ extracellular efflux and may influence exposure to drug and toxicity.	Yes	Yes	*	[2-5]
rs2032582	c.2677G>T,A	p.Ser893Ala/Thr	↑ activity of P-gp and efflux of its substrates.	Yes	Yes	*	[6-8]
rs2032583	g.87531245T>C	Intron variant	Associated with a higher frequency of adverse-effects probably due to a specific-serotonergic reuptake inhibitors accumulation.	Yes	Yes	*	[9]
ABCC2							
rs17222723	c.3563T>A	p.Val1188Glu	Allele A ↑ MRP2 expression in liver of patients undergoing liver resection. Functional study in transfected Flp-In HEK293 cells showed increased activity of MRP2.	Yes	Yes	*	[10,11]
rs2273697	c.1249G>A	p.Val417Ile	Conflicting results. Normal or ↑ expression of MRP2 in A-allele carriers <i>versus</i> wild-type individuals. ↓ efflux transport of MRP2 substrates and carbamazepine.	Yes	Yes	*	[10, 12-14]
rs3740066	c.3972C>T	p.Ile1324Met	Probable effect in splicing control. ↑ the risk of vincristine-induced neurotoxicity. ↑ methotrexate plasma concentrations.	Yes	No		[15]
rs717620	c.-24C>T	5'UTR variant	Conflicting results. T allele may up regulate the expression of MRP2. ↑ methotrexate, diclofenac and trabectedin toxicities. ↓ exposure to irinotecan. In haplotype, associated with a higher risk of toxic hepatitis.	Yes	Yes	*	[14,16-20]
rs8187707	c.4488C>T	p.His1496=	Identified in the lethal-case following trabectedin chemotherapy. Associated with a ↓ creatinine clearance during tenofovir treatment.	Yes	Yes	*	[16,21]
rs8187710	c.4544G>A	p.Cys1515Tyr	Identified in the lethal-case following trabectedin chemotherapy. ↑ gastrointestinal toxicity of cisplatin when combined with taxanes. Variant associated with a ↓ efflux of lopinavir in kidney cells and a decreased clearance of carboplatin.	Yes	Yes	*	[22,23]
ABCC3							
rs1051640	c.4509A>G	p.Glu1503=	↑ the risk of cisplatin cumulative ototoxicity.	Yes	Yes	*	[24]

rs4148416	c.3039C>T	p.Gly1013=	No functional study for this variant. Allele T ↑ the risk of death when treated with cisplatin, cyclophosphamide, doxorubicin, methotrexate and vincristine in people with osteosarcoma.	Yes	Yes	*	[25]
rs4793665	c.-211C>T	Promoter variant	↓ promoter activity. ↓ gene transcription in mRNA.	Yes	Yes	*	[26-29]
ABCC4							
rs1059751	c.*879T>C	3'UTR variant	↑ the risk of antiretroviral drug toxicity.	Yes	Yes	*	[30]
rs11568658	c.559G>T	p.Gly187Trp	↑ the risk of antiretroviral drug toxicity.	Yes	Yes	*	[31]
rs1678387	g.240795A>G	Intron variant	↑ the risk of osteonecrosis in G patients treated with biphosphonates.	N/I	N/I		[32]
rs17268282	g.33387C>A	Intron variant	Modulation of furosemide response in patients with decompensated heart failure.	N/I	N/I		[33]
rs1751034	c.3348G>C/A	p.Lys1116Lys	↑ antiretroviral drugs plasma concentration.	Yes	No		[34]
rs2274407	c.912G>T	p.Lys304Asn	Impaired splicing of ABCC4 mRNA. Transport function not altered. T allele associated with worse disease-free survival in patients with acute lymphoblastic leukemia.	Yes	Yes	*	[35]
rs3742106	c.*38T>G	3'UTR variant	↑ antiretroviral drugs plasma concentration.	Yes	Yes	*	[36,37]
rs3765534	c.2269G>A	p.Glu682Lys	↑ risk of leukopenia in patients treated with azathioprine/6-mercaptopurine. ↑ 6-thioguanine intracellular concentrations.	Mono-morphic	Yes		[38]
rs7317112	g.35178T>C	Intron variant	Wild-type allele ↑ the risk of mucositis in methotrexate-treated pediatrics.	N/I	N/I		[39]
rs9516519	c.*3261T>G	3'UTR variant	Allele C induces the loss of a micro-RNA binding site, resulting in an increased expression of ABCC4 mRNA. Wild-type allele T ↑ plasma concentrations of methotrexate in pediatric ALL patients.	Yes	Yes	*	[40]
rs9561765	g.275458C>T	Intron variant	↑ response to imatinib in CT genotype patients treated for gastrointestinal stromal tumors.	N/I	N/I		[41]
rs9561778	g.244986C>T	Intron variant	↑ risk of cyclophosphamide-induced hematotoxicity and digestive toxicity.	N/I	N/I		[42]
ABCG2							
rs2231137	c.34G>A	p.Val12Met	Aberrant splicing variant. ↓ ABCG2 expression in liver. Impaired BCRP localization in hepatocyte membrane. ↓ dose of imatinib for A carriers. ↑ irinotecan-induced severe diarrhea.	Yes	Yes	*	[43-46]
rs2231142	c.421C>A	p.Glu141Lys	↓ expression of BCRP in apical cell membrane.	Yes	Yes	*	[47]
rs7699188	c.-15994C>T	Intron variant	↑ BCRP mRNA in liver. ↑ oral clearance of imatinib. ↑ risk of irinotecan-related non-hematological toxicity.	Yes	Yes	*	[43,48]
CYP2C9							
rs1057910	c.1075A>G (*3)	p.Ile359Val	↓ CYP2C9 activity.	Yes	Yes	*	[49]
rs1799853	c.430C>T (*2)	p.Cys144Arg	↓ CYP2C9 activity.	Yes	Yes	*	[50]
CYP2C19							
rs12248560	c.-806C>T (*17)	Intron variant	Associated with ultra-fast metabolizer phenotype.	Yes	Yes	*	[51]
rs12769205	c.332-23A>G (*2)	Intron variant	Nonfunctional CYP2C19 caused by splicing defect.	Yes	Yes	*	[52]

rs3758581	c.991G>A	p.Val331Ile	↓ CYP2C19 function.	Yes	Yes	*	[53]
rs4244285	c.681G>A (*2)	p.Pro227=	Aberrant splice site insertion; associated with poor metabolizer phenotype.	Yes	Yes	*	[54]
CYP2D6							
rs16947	c.2850C>T,A (*2)	p.Arg296Cys/Ser	Amplification of <i>CYP2D6</i> locus associated with ultra-fast metabolizer phenotype.	Yes	Yes	*	[55]
rs1065852	c.100C>T (*10)	p.Pro34Ser	Nonfunctional variant. ↓ or abolishment of CYP2D6 activity. Having two copies defines the poor metabolizer phenotype.	No	Yes		[56]
rs1135840	c.4180G>C	p.Ser486Thr	GG genotype ↑ the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity.	No	Yes		[57]
rs28371725	c.2988G>A (*41)	p.Gly309Glu	Splicing defect. ↓ CYP2D6 activity.	Yes	Yes	*	[58]
rs35742686	c.2549delA (*3)	Frameshift variant	Nonfunctional variant.	Yes	Yes	*	[59]
rs5030655	c.454delA (*6)	Frameshift variant	Nonfunctional variant. ↓ or abolishment of CYP2D6 activity. Having two copies defines the poor metabolizer phenotype.	N/I	N/I		[60]
rs5030656	c.841_843delAAG (*9)	p.Lys281del	↓ CYP2D6 activity.	Yes	Yes	*	[61]
CYP2E1							
rs2515641	c.1263C>T	p.Phe421=	T allele ↓ the hepatotoxicity of various anticancer drugs.	Yes	Yes	*	[62]
rs6413420	c.-71G>T (*7)	Non coding variant	↑ transcription and activation of <i>CYP2E1</i> .	Yes	Yes	*	[63]
CYP3A4							
rs2242480	g.20239G>A (*1G)	Intron variant	↓ CYP3A4 activity.	Yes	Yes	*	[64]
rs2740574	c.-392G>A (*1B)	Promoter variant	↑ CYP3A4 activity.	No	Yes		[65]
rs35599367	c.15389C>T	Intron variant	Altered RNA splicing. ↓ gene transcription and activity of the CYP3A4 in liver.	Yes	Yes	*	[66,67]
CYP3A5							
rs776746	c.6986A>G	Splicing acceptor variant	Aberrant splice site insertion. Allele G (*3, most frequent) is associated with a nonfunctional enzyme. Carriers of *1 allele have an active enzyme and may be exposed to an increased metabolism and drug-related toxicity.	Yes	Yes	*	[68,70]

Additional references

1. Kimchi-Sarfaty, C.; Marple, A.H.; Shinar, S.; Kimchi, A.M.; Scavo, D.; Roma, M.I.; Kim, I.-W.; Jones, A.; Arora, M.; Gripar, J.; et al. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics* 2007, 8, 29–39, doi:10.2217/14622416.8.1.29.
2. Salama, N.N.; Yang, Z.; Bui, T. o. t.; Ho, R.J.Y. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 2293–2308, doi:10.1002/jps.20717.
3. Wolking, S.; Schaeffeler, E.; Lerche, H.; Schwab, M.; Nies, A.T. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin. Pharmacokinet.* 2015, 54, 709–735, doi:10.1007/s40262-015-0267-1.
4. Beuselinck, B.; Lambrechts, D.; Van Brussel, T.; Wolter, P.; Cardinaels, N.; Joniau, S.; Lerut, E.; Karadimou, A.; Couchy, G.; Sebe, P.; et al. Efflux pump ABCB1 single nucleotide polymorphisms and dose reductions in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Acta Oncol.* 2014, 53, 1413–1422, doi:10.3109/0284186X.2014.918276.
5. Giacomelli, A.; Riva, A.; Falvella, F.S.; Oreni, M.L.; Cattaneo, D.; Cheli, S.; Renisi, G.; Cristo, V.D.; Lupo, A.; Clementi, E.; et al. Clinical and genetic factors associated with increased risk of severe liver toxicity in a monocentric cohort of HIV positive patients receiving nevirapine-based antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.* 2018, 18, 1–8, doi:10.1186/s12879-018-3462-5.
6. Hodges, L.M.; Markova, S.M.; Chinn, L.W.; Gow, J.M.; Kroetz, D.L.; Klein, T.E.; Altman, R.B. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet. Genomics* 2011, 21, 152–161, doi:10.1097/FPC.0b013e3283385a1c.
7. Kim, R.B.; Leake, B.F.; Choo, E.F.; Dresser, G.K.; Kubba, S.V.; Schwarz, U.I.; Taylor, A.; Xie, H.-G.; McKinsey, J.; Zhou, S.; et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001, 70, 189–199, doi:10.1067/mcp.2001.117412.
8. Llaudó, I.; Colom, H.; Giménez-Bonafé, P.; Torras, J.; Caldes, A.; Sarrias, M.; Cruzado, J.M.; Oppenheimer, F.; Sánchez-Plumed, J.; Gentil, M.Á.; et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl. Int.* 2013, 26, 177–186, doi:10.1111/tri.12018.
9. de Klerk, O.L.; Nolte, I.M.; Bet, P.M.; Bosker, F.J.; Snieder, H.; den Boer, J.A.; Bruggeman, R.; Hoogendijk, W.J.; Penninx, B.W. ABCB1 gene variants influence tolerance to selective serotonin reuptake inhibitors in a large sample of Dutch cases with major depressive disorder. *Pharmacogenomics J.* 2013, 13, 349–353, doi:10.1038/tpj.2012.16.
10. Wen, X.; Joy, M.S.; Aleksunes, L.M. In Vitro Transport Activity and Trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic Variants. *Pharm. Res.* 2017, 34, 1637–1647, doi:10.1007/s11095-017-2160-0.
11. Meier, Y.; Pauli-Magnus, C.; Zanger, U.M.; Klein, K.; Schaeffeler, E.; Nussler, A.K.; Nussler, N.; Eichelbaum, M.; Meier, P.J.; Stieger, B. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006, 44, 62–74, doi:10.1002/hep.21214.
12. Megaraj, V.; Zhao, T.; Paumi, C.M.; Gerk, P.M.; Kim, R.; Vore, M. Functional Analysis of Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2; ABCC2). *Pharmacogenet. Genomics* 2011, 21, 506–515, doi:10.1097/FPC.0b013e328338c786.
13. Kim, W.-J.; Lee, J.H.; Yi, J.; Cho, Y.-J.; Heo, K.; Lee, S.H.; Kim, S.W.; Kim, M.-K.; Kim, K.H.; In Lee, B.; et al. A non-synonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy. *Pharmacogenet. Genomics* 2010, 1, doi:10.1097/FPC.0b013e328338073a.
14. Deo, A.K.; Prasad, B.; Balogh, L.; Lai, Y.; Unadkat, J.D. Interindividual Variability in Hepatic Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2/ABCC2): Quantification by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40, 852–855, doi:10.1124/dmd.111.043810.
15. Lopez-Lopez, E.; Gutierrez-Camino, A.; Astigarraga, I.; Navajas, A.; Echebarria-Barona, A.; Garcia-Miguel, P.; Garcia de Andoin, N.; Lobo, C.; Guerra-Merino, I.; Martin-Guerrero, I.; et al. Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 2016, 17, 731–741, doi:10.2217/pgs-2016-0001.
16. Laurenty, A.-P.; Thomas, F.; Chatelut, E.; Bétrian, S.; Guellec, C.L.; Hennebelle, I.; Guellec, S.L.; Chevreau, C. Irreversible hepatotoxicity after administration of trabectedin to a pleiomorphic sarcoma patient with a rare ABCC2 polymorphism: a case report. *Pharmacogenomics* 2013, 14, 1389–1396, doi:10.2217/pgs.13.124.

17. Barraclough, K.A.; Lee, K.J.; Staatz, C.E. Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy. *Pharmacogenomics* 2010, 11, 369–390, doi:10.2217/pgs.10.9.
18. Franke, R.; Lancaster, C.; Peer, C.; Gibson, A.; Kosloske, A.; Orwick, S.; Mathijssen, R.; Figg, W.; Baker, S.; Sparreboom, A. Dependence of erythromycin metabolism on ABCC2 (MRP2) transport function. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011, 89, 693–701, doi:10.1038/clpt.2011.25.
19. Nguyen, T.D.; Markova, S.; Liu, W.; Gow, J.M.; Baldwin, R.M.; Habashian, M.; Relling, M.V.; Ratain, M.J.; Kroetz, D.L. Functional characterization of ABCC2 promoter polymorphisms and allele specific expression. *Pharmacogenomics J.* 2013, 13, 396–402, doi:10.1038/tpj.2012.20.
20. Choi, J.H.; Ahn, B.M.; Yi, J.; Lee, J.H.; Lee, J.H.; Nam, S.W.; Chon, C.Y.; Han, K.; Ahn, S.H.; Jang, I.; et al. MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet. Genomics* 2007, 17, 403–415, doi:10.1097/01.fpc.0000236337.41799.b3.
21. Dahlin, A.; Wittwer, M.; de la Cruz, M.; Woo, J.M.; Bam, R.; Scharen-Guivel, V.; Flaherty, J.; Ray, A.S.; Cihlar, T.; Gupta, S.K.; et al. A Pharmacogenetic Candidate Gene Study of Tenofovir-Associated Fanconi Syndrome. *Pharmacogenet. Genomics* 2015, 25, 82–92, doi:10.1097/FPC.0000000000000110.
22. Elens, L.; Tyteca, D.; Panin, N.; Courtoy, P.; Lison, D.; Demoulin, J.-B.; Haufroid, V. Functional defect caused by the 4544G>A SNP in ABCC2: potential impact for drug cellular disposition. *Pharmacogenet. Genomics* 2011, 21, 884–893, doi:10.1097/FPC.0b013e32834d672b.
23. Gao, B.; Lu, Y.; Nieuweboer, A.J.M.; Xu, H.; Beesley, J.; Boere, I.; de Graan, A.-J.M.; de Bruijn, P.; Gurney, H.; J. Kennedy, C.; et al. Genome-wide association study of paclitaxel and carboplatin disposition in women with epithelial ovarian cancer. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1508, doi:10.1038/s41598-018-19590-w.
24. Pussegoda, K.; Ross, C.J.; Visscher, H.; Yazdanpanah, M.; Brooks, B.; Rassekh, S.R.; Zada, Y.F.; Dubé, M.-P.; Carleton, B.C.; Hayden, M.R. Replication of TPMT and ABCC3 Genetic Variants Highly Associated With Cisplatin-Induced Hearing Loss in Children. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013, 94, 243–251, doi:10.1038/clpt.2013.80.
25. Caronia, D.; Patiño-García, A.; Pérez-Martínez, A.; Pita, G.; Moreno, L.T.; Zalacain-Díez, M.; Molina, B.; Colmenero, I.; Sierrasesúmagua, L.; Benítez, J.; et al. Effect of ABCB1 and ABCC3 Polymorphisms on Osteosarcoma Survival after Chemotherapy: A Pharmacogenetic Study. *PLoS ONE* 2011, 6, e26091, doi:10.1371/journal.pone.0026091.
26. Lang, T.; Hitzl, M.; Burk, O.; Mornhinweg, E.; Keil, A.; Kerb, R.; Klein, K.; Zanger, U.; Eichelbaum, M.; Fromm, M. Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics* 2004, 14, 155–164, doi:10.1097/00008571-200403000-00003.
27. Hegyi, M.; Arany, A.; Semsei, A.F.; Csordas, K.; Eipel, O.; Gezsi, A.; Kutszegi, N.; Csoka, M.; Müller, J.; Erdelyi, D.J.; et al. Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget* 2016, 8, 9388–9398, doi:10.18632/oncotarget.11543.
28. Bruhn, O.; Cascorbi, I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014, 10, 1337–1354, doi:10.1517/17425255.2014.952630.
29. Errasti-Murugarren, E.; Pastor-Anglada, M. Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics* 2010, 11, 809–841, doi:10.2217/pgs.10.70.
30. Likanonsakul, S.; Suntasuklappon, B.; Nitiyanontakij, R.; Prasithsirikul, W.; Nakayama, E.E.; Shioda, T.; Sangsajja, C. A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection. *PLOS ONE* 2016, 11, e0147724, doi:10.1371/journal.pone.0147724.
31. Billat, P.-A.; Ossman, T.; Saint-Marcoux, F.; Essig, M.; Rerolle, J.-P.; Kamar, N.; Rostaing, L.; Kaminski, H.; Fabre, G.; Otyepka, M.; et al. Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) controls ganciclovir intracellular accumulation and contributes to ganciclovir-induced neutropenia in renal transplant patients. *Pharmacol. Res.* 2016, 111, 501–508, doi:10.1016/j.phrs.2016.07.012.
32. Nicoletti P.; Cartsos V.M.; Palaska P.K.; Shen Y.; Floratos A.; Zavras A.I. Genomewide Pharmacogenetics of Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw: The Role of RBMS3. *The Oncologist* 2012, 17, 279–287, doi:10.1634/theoncologist.2011-0202.
33. de Denus, S.; Rouleau, J.L.; Mann, D.L.; Huggins, G.S.; Cappola, T.P.; Shah, S.H.; Keleti, J.; Zada, Y.F.; Provost, S.; Bardhadi, A.; et al. A pharmacogenetic investigation of intravenous furosemide in decompensated heart failure: a meta-analysis of three clinical trials. *Pharmacogenomics J.* 2017, 17, 192–200, doi:10.1038/tpj.2016.4.
34. Kiser, J.J.; Aquilante, C.L.; Anderson, P.L.; King, T.M.; Carten, M.L.; Fletcher, C.V. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 2008, 47, 298–303, doi:10.1097/qai.0b013e31815e7478.
35. Mesrian Tanha, H.; Rahgozar, S.; Mojtavavi Naeini, M. ABCC4 functional SNP in the 3' splice acceptor site of exon 8 (G912T) is associated with unfavorable clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2017, 80, 109–117, doi:10.1007/s00280-017-3340-7.
36. Anderson, P.L.; Lamba, J.; Aquilante, C.L.; Schuetz, E.; Fletcher, C.V. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 2006, 42, 441–449, doi:10.1097/01.qai.0000225013.53568.69.

37. Rungtivasuwan, K.; Avihingsanon, A.; Thammajarak, N.; Mitruk, S.; Burger, D.M.; Ruxrungtham, K.; Punnawudho, B.; Pengsuparp, T. Influence of ABC2 and ABC4 Polymorphisms on Tenofovir Plasma Concentrations in Thai HIV-Infected Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 3240–3245, doi:10.1128/AAC.04930-14.
38. Ban, H.; Andoh, A.; Imaeda, H.; Kobori, A.; Bamba, S.; Tsujikawa, T.; Sasaki, M.; Saito, Y.; Fujiyama, Y. The multi-drug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 2010, 45, 1014–1021, doi:10.1007/s00535-010-0248-y.
39. den Hoed, M.A.H.; Lopez-Lopez, E.; te Winkel, M.L.; Tissing, W.; de Rooij, J.D.E.; Gutierrez-Camino, A.; Garcia-Orad, A.; den Boer, E.; Pieters, R.; Pluijm, S.M.F.; et al. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 2015, 15, 248–254, doi:10.1038/tpj.2014.63.
40. Lopez-Lopez, E.; Ballesteros, J.; Piñan, M.; Toledo, J.S. de; Andoin, N.G. de; Garcia-Miguel, P.; Navajas, A.; Garcia-Orad, A. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* 2013, 23, 53–61, doi:10.1097/FPC.0b013e32835c3b24.
41. Angelini, S.; Pantaleo, M.A.; Ravegnini, G.; Zenesini, C.; Cavrini, G.; Nannini, M.; Fumagalli, E.; Palassini, E.; Saponara, M.; Di Battista, M.; et al. Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol. Res.* 2013, 68, 1–6, doi:10.1016/j.phrs.2012.10.015.
42. Low, S.-K.; Kiyotani, K.; Mushiroda, T.; Daigo, Y.; Nakamura, Y.; Zembutsu, H. Association study of genetic polymorphism in ABC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J. Hum. Genet.* 2009, 54, 564–571, doi:10.1038/jhg.2009.79.
43. Poonkuzhali, B.; Lamba, J.; Strom, S.; Sparreboom, A.; Thummel, K.; Watkins, P.; Schuetz, E. Association of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2 Phenotypes and Novel Promoter and Intron 1 Single Nucleotide Polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* 2008, 36, 780–795, doi:10.1124/dmd.107.018366.
44. Mizuarai, S.; Aozasa, N.; Kotani, H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int. J. Cancer* 2004, 109, 238–246, doi:10.1002/ijc.11669.
45. Verboom, M.C.; Kloth, J.S.L.; Swen, J.J.; Sleijfer, S.; Reyners, A.K.L.; Steeghs, N.; Mathijssen, R.H.J.; Gelderblom, H.; Guchelaar, H.-J. Genetic polymorphisms in ABCG2 and CYP1A2 are associated with imatinib dose reduction in patients treated for gastrointestinal stromal tumors. *Pharmacogenomics J.* 2019, 19, 473–479, doi:10.1038/s41397-019-0079-z.
46. Han, J.-Y.; Lim, H.-S.; Park, Y.H.; Lee, S.Y.; Lee, J.S. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009, 63, 115–120, doi:10.1016/j.lungcan.2007.12.003.
47. Hira, D.; Terada, T. BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. *Biochem. Pharmacol.* 2018, 147, 201–210, doi:10.1016/j.bcp.2017.10.004.
48. De Mattia, E.; Toffoli, G.; Polesel, J.; D’Andrea, M.; Corona, G.; Zagonel, V.; Buonadonna, A.; Dreussi, E.; Cecchin, E. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenet. Genomics* 2013, 23, 549–557, doi:10.1097/FPC.0b013e328364b6cf.
49. Steward, D.J.; Haining, R.L.; Henne, K.R.; Davis, G.; Rushmore, T.H.; Trager, W.F.; Rettie, A.E. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* 1997, 7, 361–367, doi:10.1097/00008571-199710000-00004.
50. King, B.P.; Khan, T.I.; Aithal, G.P.; Kamali, F.; Daly, A.K. Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. *Pharmacogenetics* 2004, 14, 813–822, doi:10.1097/00008571-200412000-00004.
51. Sim, S.; Risinger, C.; Dahl, M.; Aklillu, E.; Christensen, M.; Bertilsson, L.; Ingelman-sundberg, M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 79, 103–113, doi:10.1016/j.clpt.2005.10.002.
52. Chaudhry, A.S.; Prasad, B.; Shirasaka, Y.; Fohner, A.; Finkelstein, D.; Fan, Y.; Wang, S.; Wu, G.; Aklillu, E.; Sim, S.C.; et al. The CYP2C19 Intron 2 Branch Point SNP is the Ancestral Polymorphism Contributing to the Poor Metabolizer Phenotype in Livers with CYP2C19*35 and CYP2C19*2 Alleles. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 2015, 43, 1226–1235, doi:10.1124/dmd.115.064428.
53. Zhang, L.; Sarangi, V.; Moon, I.; Yu, J.; Liu, D.; Devarajan, S.; Reid, J.M.; Kalari, K.R.; Wang, L.; Weinshilboum, R. CYP2C9 and CYP2C19: Deep Mutational Scanning and Functional Characterization of Genomic Missense Variants. *Clin. Transl. Sci.* 2020, 13, 727–742, doi:10.1111/cts.12758.
54. Morais, S.M. de; Wilkinson, G.R.; Blaisdell, J.; Nakamura, K.; Meyer, U.A.; Goldstein, J.A. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 15419–15422, doi:n/a.
55. Johansson, I.; Lundqvist, E.; Bertilsson, L.; Dahl, M.L.; Sjoqvist, F.; Ingelman-Sundberg, M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90, 11825–11829, doi:10.1073/pnas.90.24.11825.
56. Yang, X.; Zhang, B.; Molony, C.; Chudin, E.; Hao, K.; Zhu, J.; Gaedigk, A.; Suver, C.; Zhong, H.; Leeder, J.S.; et al. Sys-

tematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res.* 2010, 20, 1020–1036, doi:10.1101/gr.103341.109.

57. Hu, X.; Zhang, M.; Bai, H.; Wu, L.; Chen, Y.; Ding, L.; Zhao, Z.; Peng, W.; Liu, T.; Song, J.; et al. Antituberculosis Drug-Induced Adverse Events in the Liver, Kidneys, and Blood: Clinical Profiles and Pharmacogenetic Predictors. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2018, 104, 326–334, doi:10.1002/cpt.924.

58. Kubo, M.; Koue, T.; Maune, H.; Fukuda, T.; Azuma, J. Pharmacokinetics of Aripiprazole, a New Antipsychotic, following Oral Dosing in Healthy Adult Japanese Volunteers: Influence of CYP2D6 Polymorphism. *Drug Metab. Pharmacokin.* 2007, 22, 358–366, doi:10.2133/dmpk.22.358.

59. Roco, Á.; Quiñones, L.; Agúndez, J.A.G.; García-Martín, E.; Squicciarini, V.; Miranda, C.; Garay, J.; Farfán, N.; Saavedra, I.; Cáceres, D.; et al. Frequencies of 23 Functionally Significant Variant Alleles Related with Metabolism of Antineoplastic Drugs in the Chilean Population: Comparison with Caucasian and Asian Populations. *Front. Genet.* 2012, 3, doi:10.3389/fgene.2012.00229.

60. Saito, T.; Gutiérrez Rico, E.M.; Kikuchi, A.; Kaneko, A.; Kumondai, M.; Akai, F.; Saigusa, D.; Oda, A.; Hirasawa, N.; Hiratsuka, M. Functional characterization of 50 CYP2D6 allelic variants by assessing primaquine 5-hydroxylation. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2018, 33, 250–257, doi:10.1016/j.dmpk.2018.08.004.

61. Leathart, J.B.; London, S.J.; Steward, A.; Adams, J.D.; Idle, J.R.; Daly, A.K. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics* 1998, 8, 529–541, doi:10.1097/00008571-199812000-00010.

62. Iacobucci, I.; Lonetti, A.; Candoni, A.; Sazzini, M.; Papayannidis, C.; Formica, S.; Ottaviani, E.; Ferrari, A.; Michelutti, A.; Simeone, E.; et al. Profiling of drug-metabolizing enzymes/transporters in CD33+ acute myeloid leukemia patients treated with Gemtuzumab-Ozogamicin and Fludarabine, Cytarabine and Idarubicin. *Pharmacogenomics J.* 2013, 13, 335–341, doi:10.1038/tpj.2012.13.

63. Fairbrother, K.S.; Grove, J.; de Waziers, I.; Steimel, D.T.; Day, C.P.; Crespi, C.L.; Daly, A.K. Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics* 1998, 8, 543–552, doi:10.1097/00008571-199812000-00011.

64. Werk, A.N.; Cascorbi, I. Functional Gene Variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014, 96, 340–348, doi:10.1038/clpt.2014.129.

65. Żochowska, D.; Wyzgał, J.; Pączek, L. Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann. Transplant.* 2012, 17, 36–44, doi:10.12659/aot.883456.

66. Wang, D.; Sadee, W. CYP3A4 intronic SNP rs35599367 (CYP3A4*22) alters RNA splicing. *Pharmacogenet. Genomics* 2016, 26, 40–43, doi:10.1097/FPC.0000000000000183.

67. Wang, D.; Guo, Y.; Wrighton, S.A.; Cooke, G.E.; Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 2011, 11, 274–286, doi:10.1038/tpj.2010.28.

68. Kuehl, P.; Zhang, J.; Lin, Y.; Lamba, J.; Assem, M.; Schuetz, J.; Watkins, P.B.; Daly, A.; Wrighton, S.A.; Hall, S.D.; et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* 2001, 27, 383–391, doi:10.1038/86882.

69. Birdwell, K.; Decker, B.; Barbarino, J.; Peterson, J.; Stein, C.; Sadee, W.; Wang, D.; Vinks, A.; He, Y.; Swen, J.; et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2015, 98, 19–24, doi:10.1002/cpt.113.

70. Court, M.H.; Peter, I.; Hazarika, S.; Vasiadi, M.; Greenblatt, D.J.; Lee, W.M.; The Acute Liver Failure Study Group Candidate Gene Polymorphisms in Patients with Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Drug Metab. Dispos.* 2014, 42, 28–32, doi:10.1124/dmd.113.053546.

3. Discussion et perspectives

Ces travaux originaux avaient pour objectif de décrire des biomarqueurs génétiques prédictifs de la toxicité hépatique de la trabectedine. Pour cela, une étude pharmacogénétique a été menée sur une cohorte de soixante-trois patients atteints de sarcomes des tissus mous avancés et inclus dans un essai clinique prospectif (T-SAR, Gustave Roussy).

L'analyse des données cliniques de toxicité hépatique a permis d'évaluer la représentativité de notre cohorte : en effet, 40% de nos patients ayant reçu de la trabectedine ont présenté des élévations sévères de transaminases, conformément aux proportions observées lors des essais cliniques^{293,303}. L'utilisation du séquençage par NGS nous a permis d'obtenir un nombre important de variants exploratoires de manière rapide et fiable. Les résultats de la première analyse d'association génotype-toxicité nous ont permis d'identifier des polymorphismes dont l'impact fonctionnel protéique ou les conséquences cliniques étaient déjà décrits dans la littérature. Ces résultats ont souligné le rôle majeur des transporteurs ABC et des cytochromes dans l'élimination de la trabectedine. Celle-ci repose majoritairement sur la métabolisation hépatique qui pourrait être à l'origine de métabolites toxiques. Parmi les polymorphismes majeurs relevés dans notre étude, la forme fonctionnelle *1 du *CYP3A5* (c.6986A>G, rs776746, qui ne concerne que 4% de la population caucasienne) a été associée à un risque accru de toxicité hépatique. En effet, les patients porteurs d'au moins une copie de l'allèle ancestral ont présenté plus d'anomalies du bilan biochimique hépatique que les autres patients porteurs du génotype le plus fréquent *3/*3 (85,7% vs 51,1%). Ces résultats appuient les observations *in vitro* et précliniques ayant identifié les enzymes de la famille CYP3A comme majoritairement impliquées dans les voies de métabolisation de la trabectedine. En partageant un large spectre de substrats, CYP3A5 et CYP3A4 peuvent se substituer en cas d'activité impactée par la présence de polymorphismes non fonctionnels : dans notre cohorte, 50% des patients hétérozygotes porteurs de l'allèle non fonctionnel *CYP3A4**22 (activité diminuée) ayant fait une cytoanalyse sont également porteurs d'une copie de l'allèle *1 du *CYP3A5* (activité modérée voire normale).

Par ailleurs, l'unique patient porteur du génotype *3/*3 (CYP3A5 inactif) et *22/*22 (CYP3A4 inactif) n'a présenté aucun effet indésirable hépatique au cours de sa chimiothérapie.

Parmi les trois variants exoniques rapportés pour le gène *ABCC2* (c.3563T>A, c.4488C>T et c.1249G>A), les deux premiers étaient associés à un risque diminué d'hépatotoxicité tandis que le dernier à un risque majoré. Ces résultats, parfois contradictoires avec leurs conséquences fonctionnelles décrites dans la littérature, renforcent l'implication du transporteur MRP2 dans l'élimination de la trabectédine. Par ailleurs, notre étude statistique n'a pas montré d'association significative pour le variant c.-24C>T du promoteur d'*ABCC2* identifié chez le patient de Laurenty et al.¹⁷⁸. La faible fréquence de ce variant dans la population caucasienne (fréquence allélique T de 17%, fréquences génotypiques CT de 33% et TT de 1%) limite la composition de la cohorte : seulement 3 patients étaient homozygotes TT (4,8%), dont 2 ont présenté des signes de toxicité et parmi les hétérozygotes (17/63, 27%), seuls 9 ont présenté des signes d'atteinte hépatique. Ceci n'exclue cependant pas la possibilité que cette dégradation brutale et létale de la fonction hépatique puisse être causée par une origine génétique.

Parmi les autres transporteurs, notre étude a permis d'évoquer l'implication de la BCRP dans le transport de la trabectédine avec l'identification d'un variant intronique c.-15994C > T associé à de la cytolyse. A l'opposé, les nombreux variants que nous avons observés pour *ABCC4* et qui code pour le transporteur MRP4 ont confirmé qu'il est très polymorphe. Par ailleurs, les polymorphismes étaient majoritairement impliqués dans la diminution du risque d'atteinte hépatique. Cependant, peu d'études fonctionnelles ont caractérisé ces variants et il est difficile d'établir la véritable raison de cet effet protecteur : une surexpression du transporteur à la membrane, la perte des mécanismes de régulation... pourraient être associées à une augmentation de l'efflux de trabectédine et diminuer l'exposition hépatique. Concernant son homologue basolatéral MRP3, un nouveau variant intronique a été identifié : rs4148415 (c.2600-123C>T) était associé à un risque plus élevé de toxicité hépatique, avec un *odd-ratio* important (8,36 [2,26-31]) et une *p value* très significative (0,001), une des plus faibles de notre étude.

Notre étude, ancillaire à un essai clinique à faible inclusion, s'est limitée à une cohorte de petite taille qui nous a permis de mener une analyse exploratoire dont les résultats (qui n'ont pas franchi le seuil de significativité imposé par la correction pour tests multiples) sont à considérer comme des pistes d'investigation. Du fait de la faible fréquence des sarcomes des tissus mous (ils représentent entre 1-2% des cancers de l'adulte, avec une incidence de 1,5 à 3/100 000 cas par an³⁴⁸), la trabectedine est indiquée dans des situations extrêmes (2^e voire 3^e ou 4^e ligne) dans lesquelles toutes les autres options ont déjà été envisagées. Ainsi, une validation de nos résultats serait seulement envisageable à large échelle (inclusion multicentrique voire internationale). La seconde indication de la trabectedine est également restreinte à un faible nombre de patientes atteintes d'un cancer ovarien récidivant et sensible aux dérivés du platine. Même si la dose utilisée n'est pas identique (1,5 mg/m² pour les STMA contre 1,1 mg/m² pour le cancer de l'ovaire) ces patientes sont également exposées au risque d'hépatotoxicité et le génotypage, même ciblé, d'un panel de gènes et de polymorphismes (*CYP3A5*, *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *ABCC4* et *ABCC3*) dans une cohorte prospective composée des deux types de cancers (avant la mise en place du traitement) pourrait confirmer leur utilisation comme des marqueurs prédictifs de la toxicité hépatique.

Enfin, puisque l'exposition à la trabectedine dépend de sa métabolisation tant pour sa toxicité que pour son efficacité, les données cliniques de réponse au traitement et de survie (sans progression et globale) obtenues à la fin de l'essai clinique T-SAR vont permettre de mener des analyses d'association génotype-efficacité. L'adaptation de la dose ou le changement de thérapie (quand il est encore possible) pourraient être ainsi des réponses au résultat apporté par le génotypage, dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité de cette chimiothérapie, tout en s'inscrivant dans une démarche de personnalisation du traitement.

Partie 3 : Hépatotoxicité des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase, exemples du pazopanib et du sunitinib

1. Généralités sur les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase

1.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase : structure, activation oncogénique et inhibition

Les tyrosines kinases sont une grande famille composée de 90 protéines³⁴⁹. Elles ont la capacité de transférer le groupement γ -phosphate issu de l'hydrolyse de l'ATP (ou du GTP) sur l'hydroxyle des résidus tyrosyls présents au sein de substrats protéiques variés. Ces phosphorylations sont impliquées dans les interactions protéines/protéines initiatrices de voies de signalisation à l'origine du fonctionnement de la cellule : métabolisme, cycle cellulaire, prolifération, différenciation, mort cellulaire, communication intercellulaire, etc...³⁵⁰

Parmi les tyrosines kinases, 58 sont des récepteurs transmembranaires et 32 correspondent à des kinases cytosoliques ou nucléaires^{351,352}. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont en majorité des glycoprotéines transmembranaires monomériques composées de domaines très conservés : une région intra-cytoplasmique à activité tyrosine-kinase intrinsèque, une partie transmembranaire hydrophobe, et un domaine extracellulaire plus variable à l'origine de la spécificité de l'interaction avec le ligand activateur.

Lorsqu'ils ne sont pas stimulés par un ligand, les RTK sont présents dans la membrane cellulaire sous la forme de monomères ou de dimères inactifs. Cette conformation inactive (qui correspond à un

mécanisme de régulation physiologique) est permise par des interactions intra-monomériques qui entraînent une auto-inhibition de l'activité catalytique du site actif et l'extrémité C-terminale qui bloque le site actif en étant repliée vers le site de fixation du substrat (Figure 12)³⁵³.

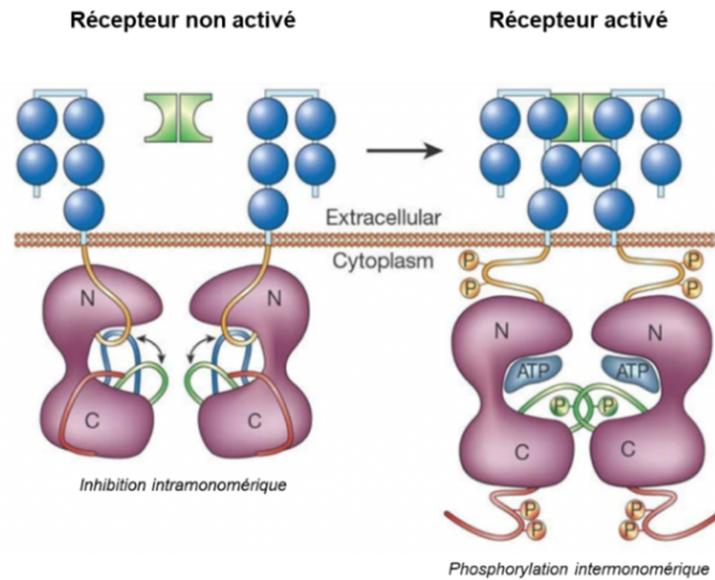


Figure 12 : Mécanisme d'activation d'un RTK, d'après Blume-Jensen³⁵³

A gauche : récepteur non activé, équilibre entre conformation non accessible au substrat ATP (en bleu, portion intracellulaire) et prête à accepter le substrat (en vert). Le domaine juxtamembranaire (en orange) et la région en C-terminal (en rouge) interfèrent avec le lobe N-terminal, bloquant l'accès au substrat. A droite : dimérisation du récepteur et autophosphorylation des domaines kinases, poche ATP accessible.

Lors de la fixation d'un ligand, l'oligomérisation du RTK permet à un ou plusieurs résidus tyrosine de la boucle d'activation d'être *trans*-phosphorylés par le monomère partenaire. Les résidus tyrosines phosphorylés de la région juxtamembranaire jusqu'au domaine kinase permettent de recruter les protéines effectrices possédant des domaines d'interaction avec les phosphotyrosines comme les domaines SH2 (*Src-homology 2*) ou PTB (*phospho-tyrosine binding*), initiant ainsi la cascade de signalisation menant à la réponse cellulaire.

Les RTK activent principalement les voies métaboliques constituées de kinases cytosoliques impliquées dans le contrôle du métabolisme, du cycle, de la prolifération, la différenciation, la migration ou encore la signalisation intracellulaire. L'altération, la surexpression ou la dérégulation de l'activité des RTK peut être à l'origine de la perturbation de la communication cellulaire et mener à un état hyperprolifératif et donc au développement de cancers^{352,353}. Les mutations des gènes codant pour les RTK impactent particulièrement le domaine kinase et les régions régulatrices : souvent dominantes et activatrices (ou mutations « gain-de-fonction »), elles permettent l'activation constitutive et « aberrante » des récepteurs malgré l'absence de ligand. L'amplification génique peut amener à une surexpression de RTK, causant ainsi l'augmentation des capacités de recrutement des protéines adaptatrices et donc un emballement de la voie de signalisation. Des translocations chromosomiques peuvent mener à la formation de gènes chimériques et de protéines de fusion (par exemple, la translocation tr(9;22) pour former le chromosome Philadelphie (Ph) et le gène de fusion *BCR-ABL* à l'origine de la leucémie myéloïde chronique).

Ces dérégulations moléculaires sont un point clé de l'acquisition des caractéristiques phénotypiques des cancers (les « *Hallmarks of Cancer* »³⁵⁴). Le diagnostic des anomalies moléculaires spécifiques des tumeurs permet d'orienter la stratégie thérapeutique (ou théranostique) vers les thérapies ciblées et le développement des inhibiteurs de kinases dont la sélectivité a permis une amélioration de la prise en charge et du profil de tolérance des patients atteints de cancer.

En 2020, 28 inhibiteurs de récepteur à activité tyrosine kinases (ITK) étaient autorisés par la FDA³⁵⁵. L'imatinib a été le premier ITK mis sur le marché, pour le traitement de la LMC puisqu'il cible spécifiquement la protéine de fusion Bcr-Abl. Depuis, plusieurs générations d'ITK ont été développées et s'orientent vers un ciblage multivarié, adapté aux mutations acquises en cours de traitement (par exemple, la mutation T790M de l'EGFR qui apparaît dans 50% des patients recevant un ITK de première ou seconde génération). Cependant des résistances apparaissent aussi pour ces inhibiteurs de troisième génération et de nouveaux ITK sont en cours d'investigation.

L'administration des ITK se fait par voie orale et ils pénètrent dans les cellules cibles tumorales par diffusion passive ou par l'intermédiaire de transporteurs d'influx. Il existe différents types d'ITK³⁵⁶ : la majorité interagissent de manière compétitive et réversible au niveau de la poche ATP par mimétisme structural en possédant une structure phénylaminopyrimidine similaire à la partie aminopyrimidine de l'adénine. Leur sélectivité est acquise en ciblant des résidus faiblement conservés ce qui leur permet de se fixer sur un nombre limité de kinases et ainsi éviter des effets « *off-target* ». Les inhibiteurs de type I (dasatinib, erlotinib, géfitinib) ciblent les conformations actives de RTK sur des résidus présents au niveau de la région charnière entre les lobes du domaine kinase. Les inhibiteurs de type II (sunitinib, lapatinib, pazopanib...) ciblent les récepteurs en conformation inactive. Les inhibiteurs de type III agissent en se fixant sur un site allostérique adjacent à la poche ATP et les inhibiteurs de type IV sur un site éloigné. Enfin, les inhibiteurs covalents de type V se fixent de manière irréversible sur le site actif et ont la capacité de réduire les effets *off-targets* (comme l'osimertinib qui cible la version mutée T790M de l'EGFR)³⁵⁶.

1.2. Généralités sur le pazopanib

1.2.1. Structure et relations structure-activité

Le pazopanib (ou 5-[[4-[(2,3-diméthylindazol-6-yl)-méthylamino]pyrimidin-2-yl]amino]-2-méthylbenzènesulfonamide, C₂₁H₂₃N₇O₂S) est mis à disposition depuis 2009, initialement par le laboratoire GlaxoSmithKline, puis par le laboratoire Novartis sous le nom de Votrient® (Figure 13).

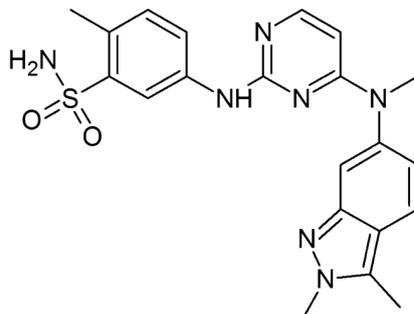


Figure 13 : Structure chimique du pazopanib ou 5-[[4-[(2,3-diméthylindazol-6-yl)-méthylamino]pyrimidin-2-yl]amino]-2-méthylbenzenesulfonamide (C₂₁H₂₃N₇O₂S)

Il appartient à la classe des phénylaminopyrimidines et 2*H*-indazolylpyrimidines. Il a la capacité de se fixer au niveau de la poche ATP des RTK grâce à son groupement 2,3-diméthylindazole qui forme des liaisons hydrogène avec les résidus d'acides aminés polaires (tyrosine, arginine, aspartate, lysine ou thréonine). Cette molécule synthétique résulte du *screening* à haut débit d'une chimiothèque dont l'objectif était d'identifier des inhibiteurs du VEGFR2³⁵⁷. Les premières structures évaluées avaient des propriétés pharmacocinétiques peu satisfaisantes et l'ajout séquentiel de fonctions comme l'indazole diméthylé a permis d'augmenter la biodisponibilité du pazopanib par voie orale et diminuer sa clairance plasmatique (en réduisant son potentiel d'inhibition des CYP450)³⁵⁸. Le groupement sulfonamide (SO₂NH₂) et les amines tertiaires permettent d'augmenter l'activité du pazopanib.

1.2.2. Propriétés physico-chimiques et stabilité

Le pazopanib est produit sous forme d'une poudre cristalline de sel de chlorhydrate (C₂₁H₂₃N₇O₂S, HCl) et est disponible sous la forme de comprimés pelliculés à libération immédiate. Sa masse moléculaire sous forme de base est de 437,52 g/mol. Le pazopanib possède trois pK_A au niveau des amines situées sur le noyau indazole (pK_A = 2,1), la pyrimidine (pK_A = 6,4) et la fonction sulfonamide (pK_A =

10,2)³⁵⁹. Il a un log du coefficient de partage octanol/eau (logP) de 3,65 et est très peu soluble en solution aqueuse (solubilité de 0,65 mg/ml à pH = 1,1 et pratiquement insoluble à pH > 4)³⁶⁰. Sa solubilité est plus importante dans les solvants organiques comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le diméthylformamide (DMF) (solubilité proche de 17 mg/ml). Lors de son développement, l'utilisation de la lignée cellulaire Caco-2 cultivée en monocouche a permis de montrer que le pazopanib était une molécule très perméable³⁶⁰, ce qui lui permet d'être classé en tant que composé de classe II (peu soluble mais très perméable) du BCS (*Biopharmaceutic Classification System*). Sa faible biodisponibilité plasmatique (environ 20%) résulte de son absorption limitée par sa faible solubilité et sa faible vitesse de dissolution³⁶¹. Les comprimés de Votrient®, pelliculés et à libération immédiate sont disponibles en deux dosages (200 mg et 400 mg) et conservables 2 ans entre 15 et 30°C.

Dans une étude de stabilité, Patel et al.³⁶² ont identifié par LC/MS des produits de transformation issus de la dégradation forcée du pazopanib en conditions d'hydrolyse (à pH acide, basique et neutre), d'oxydation, de photolyse (forte exposition à la lumière) et de stress thermique selon les recommandations de l'ICH (*International Conference on Harmonization guidelines*). Seule l'oxydation photolytique (qui consistait à exposer le pazopanib sous forme de solution et sous forme solide à 1,2.10⁶ lux/h de lumière fluorescente et 200 W.h.m⁻² de lumière UV pendant 3 jours) leur a permis de détecter et caractériser six produits de dégradation non toxiques.

1.2.3. Propriétés pharmacodynamiques

Le pazopanib est un ITK multi-cible qui a la capacité d'inhiber de manière réversible et par mécanisme compétitif le fonctionnement des récepteurs des familles du VEGFR (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3), et du PDGFR (PDGFR- α et PDGFR- β) ainsi que le récepteur au facteur de cellules souches

c-KIT³⁶³. Le VEGFR est impliqué dans les voies activatrices de l'angiogénèse critique pour la progression des tumeurs malignes : sa surexpression est souvent associée à un faible pronostic et une moins bonne réponse aux traitements. Dès les essais *in vitro*, le pazopanib a montré une activité importante d'inhibition de l'autophosphorylation des récepteurs VEGFR2, VEGFR1 et VEGFR3 (IC₅₀ respectives de 0,03 μM, 0,01 μM et 0,047 μM)³⁶⁴. Il a également une activité sur les récepteurs PDGFR-α, PDGFR-β et c-KIT (0,071, 0,084 et 0,074 μM, respectivement). Ce multi-ciblage permet au pazopanib de potentialiser son efficacité d'inhibition de l'angiogénèse et de la lymphangiogénèse et ainsi d'augmenter son pouvoir anti-tumoral. Par ailleurs, les études *in vivo* ont montré qu'après administration par voie orale à des souris immunodéprimées, le pazopanib avait la capacité de diminuer de manière concentration dépendante le volume tumoral de différents types de xénogreffes tumorales (colon, mélanome, rein, sein et poumon) avec une efficacité dépendante d'une concentration résiduelle à l'état d'équilibre (*steady-state* C_{min}) supérieure à 17,5 μg/mL ou 40 μM³⁶⁴.

1.2.4. Indications cliniques

Le premier essai clinique de phase I évaluant le profil de sécurité du pazopanib a été mené en 2009 chez 43 patients atteints de tumeurs solides variées³⁶⁵. Les analyses pharmacocinétiques ont montré qu'à partir d'une administration journalière de 800 mg en une prise, 93% des patients avaient une concentration résiduelle (C_{min}) supérieure à 15 μg/mL qui semblait corrélée à une activité clinique favorable au moins chez les patients atteints de carcinome à cellules rénales métastatique (mRCC). Au 22^e jour de traitement, les concentrations plasmatiques de VEGF avaient triplé chez la moitié des patients et une réduction de plus de 50% du flux sanguin tumoral était observée chez 91% d'entre eux. Le profil de toxicité du pazopanib était directement lié à son mécanisme d'action puisque l'hypertension de grades 3-4 affectait 25% des patients (33% tous grades confondus). Suivaient la diarrhée (incidence des grades 3-4 de 5%), la protéinurie (3%), les nausées et la fatigue (2% chacune). Au niveau biologique, ont été

observées une perturbation du bilan hématologique (leucopénies et thrombocytopénies de grades 1-2 principalement), des anomalies de la coagulation, des hypocalcémies et hyperglycémies, ou encore des élévations non sévères des transaminases et de la bilirubine. Ces résultats indiquent que le pazopanib est une molécule relativement bien tolérée avec une efficacité dans le cancer du rein métastatique pour lequel de nombreux essais cliniques ont montré sa supériorité par rapport au placebo ou d'autres ITK en termes de contrôle de la maladie et de survie^{366,367}.

L'essai randomisé en double aveugle de phase III VEG105192³⁶⁶ a montré que le pazopanib *versus* placebo prolongeait significativement la survie sans progression (PFS) des patients atteints de mRCC (médiane de 9,2 vs 4,2 mois, HR = 0,46 [IC95% : 0,34-0,62], $p < 0,0001$) et améliorait le taux de réponse (30% vs 3%). Aucun bénéfice n'a cependant été mis en évidence en termes de survie globale (médiane de 22,9 vs 20,5 mois, HR = 0,91 [0,71-1,16], $p = 0,224$) mais après un *cross-over* le pazopanib avait tout de même réduit de moitié la mortalité par rapport au placebo (HR = 0,50 [0,315-0,762], $p = 0,002$)³⁶⁶.

Dans l'essai COMPARZ (VEG108844)³⁶⁷, 1110 patients ont été répartis aléatoirement en deux groupes : traitement par pazopanib (800 mg/jour, 557 patients) ou par sunitinib (50 mg/jour), un autre antiangiogénique approuvé pour les mRCC en première ligne. La comparaison de l'efficacité des deux molécules a permis de conclure quant à la non-infériorité du pazopanib (HR de PFS = 1,05 [0,90-1,22]) puisque la borne supérieure de l'intervalle de confiance n'a pas atteint le seuil de non-infériorité préétabli ($< 1,25$). Les résultats ont également montré qu'à efficacité similaire, le profil de sécurité du pazopanib et la préservation de la qualité de vie étaient plus favorables par rapport au sunitinib.

Ces résultats établissent alors le pazopanib comme la molécule de référence utilisée en première ligne de traitement de cancer du rein avancé et chez les patients au stade avancé et traités auparavant par des cytokines³⁶⁸. La dose recommandée pour le traitement du mRCC est fixée à 800 mg une fois par jour, ajustable par paliers de 200 mg selon la tolérance du patient.

Le pazopanib est également prescrit dans le cadre du traitement des sarcomes des tissus mous avancés. Son efficacité a notamment été démontrée dans l'essai de phase III PALETTE (VEG110727)³⁶⁹, randomisé, multicentrique, organisé en double aveugle contrôlé *versus* placebo, au décours duquel la PFS des patients atteints de STMA était prolongée par le pazopanib (médianes de 4,6 vs 1,6 mois, HR = 0,31 [0,24-0,40], p < 0,0001), mais sans effet bénéfique observable sur la survie globale. L'utilisation du pazopanib a également été explorée dans d'autres types de tumeurs comme les tumeurs gastro-intestinales stromales (ou GIST) et les cancers ovariens^{370,371}.

1.2.5. Effets indésirables

Le pazopanib est une molécule relativement bien tolérée et sa prise est suivie majoritairement d'événements indésirables de grade 1 ou 2. Dans l'essai clinique de phase III VEG105192³⁶⁶, les effets indésirables (tous grades confondus) les plus fréquemment rapportés étaient la diarrhée (52%), l'hypertension artérielle (HTA, 40%), la dépigmentation capillaire (38%) et les troubles digestifs (nausées, anorexie et vomissements dans 20-25% des cas). L'HTA et la diarrhée atteignaient un grade sévère (≥ 3) chez seulement 4% des patients. Au niveau du bilan biologique étaient observées le plus souvent (tous grades confondus) : des élévations transitoires des transaminases dans 53% des cas, des hyperglycémies (41%), des leucopénies (37%) et des hyperbilirubinémies (36%). Ces anomalies pouvaient atteindre un grade sévère pour l'élévation des ALT (11%), des AST (7%) et pour l'hyperbilirubinémie (3%). Cette atteinte hépatique observée lors de la prise de pazopanib est souvent résolue par l'arrêt du traitement mais des cas d'insuffisance hépatique sévère voire létale ont été rapportés dans la littérature³⁷². Ces événements ont conduit les autorités de santé européennes et la FDA à publier une mise en garde renforcée dans la notice du pazopanib avec l'inscription d'un encart « *black-box warning* ».

Dans les études s'intéressant à l'hépatotoxicité du pazopanib, l'élévation des transaminases était isolée, souvent asymptomatique, transitoire et résolutive dès la diminution de la dose, l'interruption ou l'arrêt du traitement. Dans une méta-analyse compilant les résultats de 10 essais cliniques de phases II ou III, Kapadia et al.³⁷³ ont rapporté des incidences (tous grades confondus) d'élévations d'ALT, AST et de bilirubine de 41,4% [34,1-49,0%], 39,6% [31,2-48,6%] et 24,8% [16,3-35,3%], respectivement. Ces risques étaient de 9,4% [7,8-11,4%], 6,9% [5,5-8,6%] et 3,4% [2,4-5,0%] lorsque seuls les événements de grades 3-4 étaient considérés. Les risques relatifs de développer une élévation sévère (de grade ≥ 3) des transaminases par rapport au placebo s'élevaient à 4,33 [1,88-10,0] ($p = 0.001$) pour les ALT et 6,56 [2,04-21,07] ($p = 0,002$) pour les AST.

Dans une autre étude, Powles et al.³⁷⁴ ont observé que l'hépatotoxicité était majoritairement cytolytique (60%) ou mixte (30%) et réversible dans 90% des cas. Le délai médian d'apparition de ces anomalies biochimiques hépatiques était de 42 jours et il était d'autant plus court que l'atteinte était sévère. Chez les patients ayant stoppé le traitement pour cause d'hépatotoxicité, la réintroduction du pazopanib (ou *rechallenge*) est suivie d'une récurrence rapide de la toxicité dans 38% des cas, quelle que soit la dose (identique ou avec concession).

Ces données illustrent l'importance de suivre la fonction hépatique dès l'initiation du traitement. Par ailleurs, le pazopanib est à proscrire en cas d'atteinte sévère hépatique et doit être envisagé prudemment chez les patients présentant une atteinte légère (dose normale, surveillance renforcée) à modérée (réduction de dose de 75% et surveillance renforcée)³⁶⁸.

En cas d'anomalie du bilan hépatique, des modifications de doses, le report ou l'arrêt du traitement doivent être envisagés et adaptés à la sévérité de l'atteinte. Lorsque les transaminases s'élèvent entre 3 et 8 fois la limite supérieure normale (LSN), le traitement peut être poursuivi avec un contrôle renforcé de la fonction hépatique jusqu'à un retour à des valeurs de grade 1 ou normales³⁶⁸. Une élévation supérieure à 8 x LSN doit être suivie d'un arrêt de traitement jusqu'à normalisation et la reprise du traitement

doit être considérée uniquement si le bénéfice potentiel est considéré comme supérieur au risque d'hépatotoxicité : la dose est alors diminuée de 50% et la fonction hépatique surveillée étroitement. En cas de non-retour à la normale, le traitement doit être arrêté définitivement. Enfin si l'élévation des transaminases est accompagnée d'une augmentation de la bilirubine ($> 3 \times \text{LSN}$ et $> 2 \times \text{LSN}$ respectivement), le pazopanib doit être arrêté définitivement.

1.2.6. Propriétés pharmacocinétiques

La pharmacocinétique du pazopanib est complexe et caractérisée par une large variabilité interindividuelle. Dans l'étude de phase I de Hurwitz et al.³⁶⁵, 63 patients atteints de tumeurs solides métastatiques réfractaires ont reçu différents schémas de doses comprises entre 50 et 2000 mg de pazopanib. Les premiers résultats ont montré que la pharmacocinétique n'était pas linéaire entre 200 mg et 800 mg puisque l'augmentation des AUC était non proportionnelle à la dose ($\text{AUC}_{0 \rightarrow 24\text{h}, \text{J1}, 400\text{mg}} = 142,8$ (CV de 89,2%) $\mu\text{g.h/mL}$ vs $\text{AUC}_{0 \rightarrow 24\text{h}, \text{J1}, 800\text{mg}} = 275,1$ (202,6%) $\mu\text{g.h/mL}$). De plus, l'exposition plasmatique était maximale à la plus forte dose (2000 mg) mais atteignait un plateau dès 800 mg. Cette cinétique dose-dépendante s'explique par le fait que seule la fraction dissoute du pazopanib (qui est très limitée car dépendante du pH) peut être absorbée au niveau du tube digestif. En conséquence, la C_{max} est rapidement atteinte dans les liquides digestifs (plutôt alcalins) et à partir de la dose de 800 mg, le milieu est saturé et l'absorption n'augmente plus aux paliers supérieurs. La dose journalière recommandée a donc été fixée à 800 mg. Cliniquement, le pazopanib avait montré une efficacité chez les patients atteints de carcinome à cellules rénales à partir d'une C_{min} à J22 supérieure à 15 $\mu\text{g/mL}$, similaire aux concentrations observées dans les modèles pré-cliniques (17,5 $\mu\text{g/mL}$).

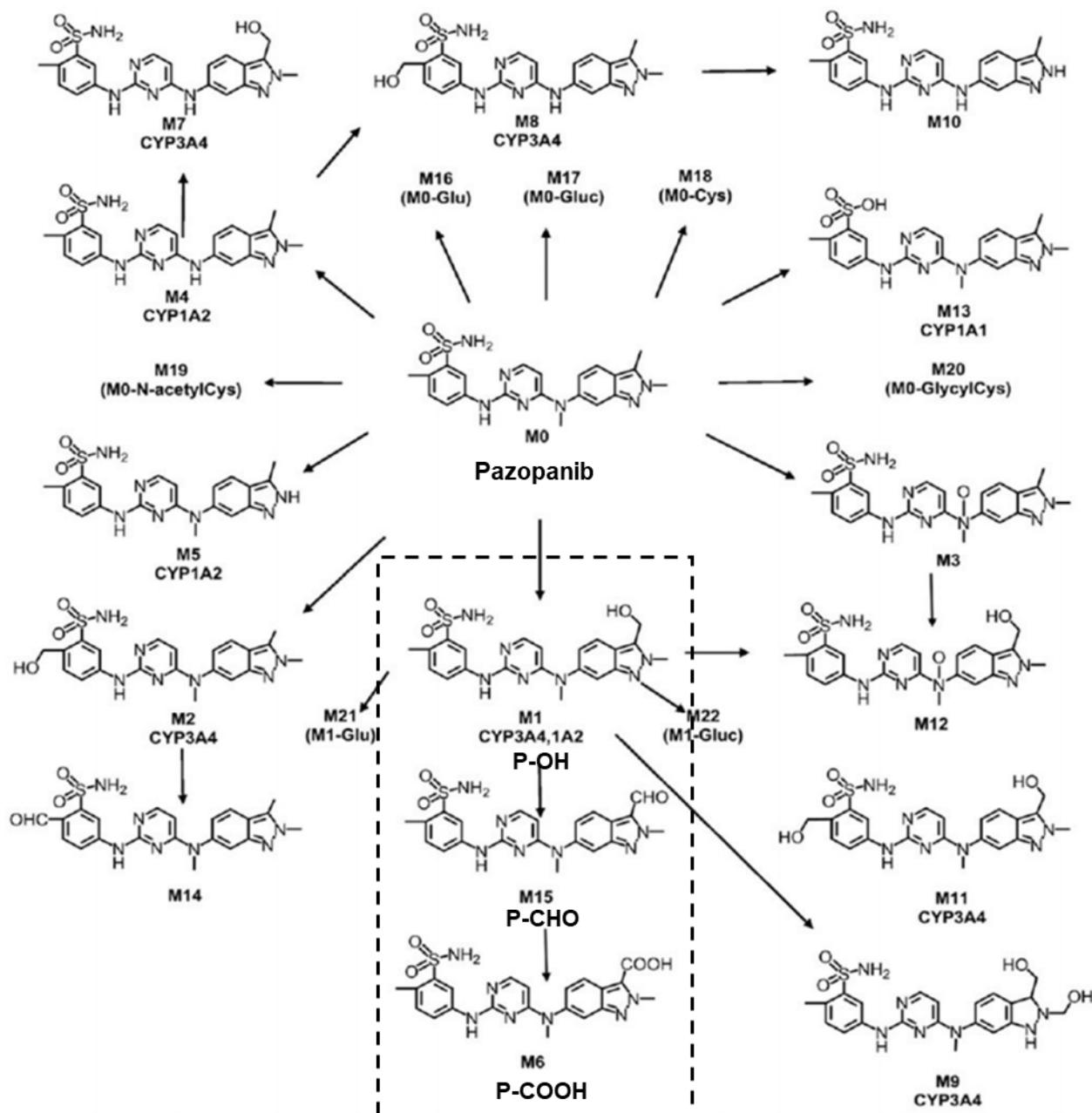
Le volume de distribution du pazopanib est faible (entre 9-13L) : il se lie très fortement aux protéines plasmatiques ($> 99,9\%$) et majoritairement à l'albumine³⁵⁹. La fraction libre est proche de $0,011\% \pm$

0,0013%³⁷⁵. Il est également substrat de la P-gp et de la protéine BCRP, impliquées dans l'absorption des médicaments au niveau intestinal. La biodisponibilité du pazopanib atteint en moyenne 21,4% [13,5-38,9%] et augmente fortement en cas de prise alimentaire : en effet, un repas riche en graisses augmenterait de près de 2,3 fois (IC90% : 1,6-3,4) l'exposition au pazopanib par rapport à une prise à jeun³⁷⁶. Afin de limiter la variabilité intra- et inter-jour de l'exposition plasmatique, il est préconisé d'administrer le pazopanib en un comprimé entier au minimum une heure avant un repas ou au moins deux heures après.

Une étude de bilan de masse (utilisant du pazopanib radiomarqué au carbone 14) a été menée chez des patients atteints de cancers par Deng et al.³⁷⁷. En moyenne, 20% de la dose administrée étaient absorbés par le tractus digestif. La collection des données urinaires et fécales pendant 7 jours a montré que le pazopanib était éliminé majoritairement dans les trois jours suivant la prise, sous forme inchangée dans les fèces (82,2% ±18,3% de la radioactivité en moyenne) et très peu dans les urines (2,63% ±1,15%). L'élimination rénale est donc limitée (<4%). La demi-vie du pazopanib est de 31,1 heures et résulte principalement de son accumulation lors des doses répétées.

Le pazopanib est majoritairement métabolisé dans le foie, avec une contribution importante du CYP3A4 (et dans une moindre mesure du CYP2E1 et du CYP2C8)³⁷⁸. Il a un faible coefficient d'extraction hépatique (< 0.3%) et une faible clairance plasmatique d'élimination³⁷⁷. Sept métabolites ont été identifiés dans l'étude de Deng et al.³⁷⁹, mais ils ne comptaient que pour moins de 10% de la radioactivité plasmatique. Parmi eux, deux produits hydroxylés M1 (GSK1268992), M2 (GSK1268997), deux produits N-déméthylés M4 et M5 (GSK10711306 et GW700201) sont obtenus par des réactions de phase I (Figure 14). Hormis M2, ces métabolites sont 10 à 20 fois moins actifs que la molécule mère et leurs très faibles concentrations plasmatiques ne contribuent que peu à l'effet pharmacologique de la molécule³⁷⁹. Dans une étude récente, Wang et al.³⁸⁰ ont utilisé une approche de métabolomique pour identifier les principales enzymes impliquées dans le métabolisme du pazopanib chez la souris. En parallèle, l'utili-

sation de microsomes murins et humains et de CYP450 recombinants (rCYP450) leur a permis d'identifier les voies de production de ces métabolites. Parmi les 22 métabolites identifiés, 15 ont été retrouvés dans les fractions métaboliques de microsomes. Les métabolites hydroxylés M1 et M2 comptaient pour 43% des métabolites identifiés, confirmant l'importance de l'hydroxylation dans la métabolisation du pazopanib. Des dérivés glucuroconjugués ont également été identifiés dans les fèces des souris soulignant l'implication du métabolisme de phase II notamment par transfert de groupement cystéine, N-acétylcystéine- et glycylocystéine, de glucose et d'acide glucuronique. Les auteurs ont également montré que le pazopanib était encore détectable dans le foie 24 heures après l'administration, signifiant qu'il s'accumule fortement au niveau du tissu hépatique.



Microsomes murins, humains, CYP3A4 recombinant, plasma

Figure 14 : Voies de métabolisation du pazopanib d'après Wang et al.³⁸⁰ et Paludetto et al.³⁸¹

1.2.7. Interactions médicamenteuses

En étant majoritairement métabolisé par le CYP3A4 et transporté par la P-gp et la BCRP, la prise de pazopanib est accompagnée d'un risque d'interactions médicamenteuses important. La co-administration d'activateurs et d'inhibiteurs de ces enzymes et transporteurs expose les patients à une diminution de son efficacité ou une potentialisation de ses effets toxiques, respectivement. Dans un essai clinique dédié à l'étude de l'interaction entre le pazopanib et le kétoconazole, un puissant inhibiteur du CYP3A4, Tan et al.³⁷⁸ ont montré que l'exposition du pazopanib augmentait lors de sa prise avec l'antifongique ($AUC_{0\rightarrow 24}$ multipliée par 1,7 et C_{max} augmentée de 1,5 fois après 5 jours de traitement). Les auteurs ont noté que la formation des principaux métabolites M2 et M3 était altérée (AUC plus faible de 0,39 et 0,56 fois, respectivement) alors que celle du métabolite M1 n'était pas affectée (ratio d'AUC de 1,06), écartant la possible implication du CYP3A4 dans sa formation. Par ailleurs, l'exposition mesurée lors de la prise journalière de pazopanib 400 mg co-administré avec du kétoconazole était équivalente à celle mesurée après la prise de 800 mg/jour sans kétoconazole. Par conséquent, il est recommandé de diminuer la dose de pazopanib à 400 mg lorsque la prise d'inhibiteur puissant du CYP3A4 est inévitable. Concernant l'induction enzymatique, la co-administration d'inducteurs puissants des CYP3A comme la phénytoïne, la carbamazépine ou encore l'ifosfamide réduit de près de 30 à 35% l'AUC et de 50% la C_{min} . Un essai clinique incluant 24 patients traités par un cocktail de substrats des CYP450 (midazolam, dextrométorphane, warfarine, oméprazole et caféine), a permis de montrer que le pazopanib était lui-même un inhibiteur et un inducteur modéré des CYP450³⁸². Le pazopanib est également un inhibiteur des transporteurs membranaires OATP1B1, OCT1, P-gp et BCRP mais aussi de l'enzyme de phase II, UGT1A1³⁸³. Enfin, Tan et al.³⁷⁸ ont montré qu'il existait une interaction entre le pazopanib et les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP). La capacité des IPP à augmenter le pH de l'estomac permet de diminuer la solubilité du pazopanib et limite son absorption diminuant ainsi l'exposition à l'ITK (ratio des $AUC_{pazopanib\ sans\ IPP/pazopanib\ avec\ IPP} = 0,60$ et de la $C_{max} = 0,58$). Ces observations ont également été

validées dans la population âgée chez qui la consommation de protecteurs gastriques est la plus importante³⁸⁴.

1.2.8. Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques

La plupart des études s'intéressant aux relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques du pazopanib ont montré que la concentration résiduelle (C_{\min}) était le paramètre pharmacocinétique le plus utilisé pour mesurer l'exposition des patients³⁵⁹. Dans une étude rétrospective menée sur 177 patients atteints de cancer rénal, le seuil de C_{\min} fixé à $\geq 20,5$ mg/L était associé à une réduction de la taille tumorale plus importante ($p < 0,001$) et une PFS améliorée ($p = 0,0038$)³⁸⁵. Ce seuil était également corrélé à l'apparition d'HTA chez 53% des patients ayant atteint ou dépassé le seuil, contre 18% des patients présentant des concentrations inférieures. L'utilisation de l'HTA comme un marqueur d'efficacité du pazopanib a par ailleurs été investiguée³⁸⁶. Dans les études d'enregistrement, l'élévation des ALT était également associée à une C_{\min} augmentée. Cependant, ce paramètre pharmacocinétique seul ne peut expliquer le risque de toxicité, puisque des études ont mis en évidence l'implication de mutations génétiques des gènes HLA (et particulièrement le génotype HLA-B*57:01) dans la tolérance hépatique au pazopanib³⁵⁹.

1.3. Généralités sur le sunitinib

1.3.1. Structure et relations structure-activité

Le sunitinib, SU11248 ou N-[2-(diéthylamino)éthyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidène)méthyl]-2,4-diméthyl-1H-pyrrole-3-carboxamide (C₂₂H₂₇FN₄O₂) est une petite molécule inhibitrice de tyrosine kinase mise à disposition par le laboratoire Pfizer et approuvée par les autorités sanitaires depuis 2007³⁸⁷. Cette molécule dérive de différents *hits* identifiés par screening à haut débit dont l'optimisation chimique a permis d'obtenir une molécule inhibitrice des récepteurs VEGFR2 et PDGFR entre autres, tout en ayant des profils d'efficacité et de tolérance satisfaisants ainsi que des propriétés pharmacocinétiques acceptables. Sa structure chimique (Figure 15) est en configuration *Z*, essentielle pour l'activité inhibitrice, tout comme le noyau pyrrole disubstitué par des résidus méthyles, qui permet d'augmenter la sélectivité au niveau des récepteurs.

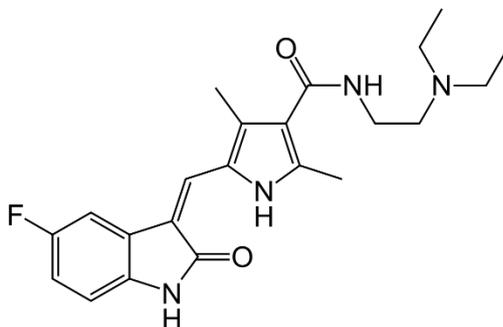


Figure 15 : Structure chimique du sunitinib SU11248 ou N-[2-(diéthylamino)-éthyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidène)méthyl]-2,4-diméthyl-1H-pyrrole-3-carboxamide (C₂₂H₂₇FN₄O₂)

L'ajout de la chaîne diéthylaminoéthyle par l'intermédiaire d'un amide secondaire a permis d'améliorer l'activité mais également la solubilité dans les milieux acide et neutre. Enfin, l'introduction de

l'atome de fluor en position 5 sur le noyau indolin-2-one a permis d'améliorer l'activité au niveau cellulaire³⁸⁸.

1.3.2. Propriétés physico-chimiques et stabilité

Le sunitinib est une molécule de faible masse moléculaire (398,5 g/mol) qui pénètre facilement les membranes cellulaires grâce à sa forte lipophilie ($\log P = 3,1$). Sa solubilité en milieu aqueux est faible mais s'améliore en milieu acide et il est bien plus soluble dans les solvants organiques (25 mg/ml dans le DMSO)³⁸⁷. Du fait de sa faible perméabilité déterminée sur les cellules Caco-2, le sunitinib est un composé de classe IV du BCS : peu soluble en milieu aqueux et peu perméable. Le sunitinib est commercialisé sous la forme de poudre orangée de sel de L-malate contenue dans une gélule. Différents dosages sont mis à disposition (12,5 mg, 25 mg, 37,5mg et 50 mg).

La configuration *Z* est favorisée en solution car elle est thermodynamique stable et limite l'encombrement stérique causé par la configuration *E*. L'isomérisation *Z/E* de cette double liaison est par ailleurs observable lors de l'exposition d'une solution de sunitinib à la lumière ou à la chaleur. En terme d'activité pharmacodynamique, l'isomère *Z* est la molécule active et l'isomère *E* est 100 fois moins actif sur le VEGFR³⁸⁷.

1.3.3. Propriétés pharmacodynamiques

Le sunitinib est un inhibiteur réversible et compétitif de l'ATP qui cible les récepteurs angiogéniques VEGFR-1, VEGFR-2 ($IC_{50} = 10$ nM) et VEGFR-3, mais aussi les récepteurs PDGFR- α et β ($IC_{50} = 10$ nM), le récepteur du facteur de croissance de cellules souches c-kit ($IC_{50} = 10-100$ nM), FLT3 (IC_{50}

= 250 nM), CSF-1R et le récepteur RET ($IC_{50} = 100 \text{ nM}$)³⁸⁹. Dans les études *in vitro*, l'inhibition de l'autophosphorylation des récepteurs VEGF et PDGF ainsi que la prolifération cellulaire étaient dose-dépendantes. Dans les modèles précliniques (modèles animaux de xénogreffes de cancer du rein, du sein, colon, poumon, mélanome, ...), le sunitinib inhibait l'activation de VEGFR2 et de PDGFR- β , la croissance tumorale, l'angiogenèse et la perméabilité capillaire de manière temps et dose-dépendante.

1.3.4. Indications cliniques

Le sunitinib est principalement indiqué dans le traitement des tumeurs gastro-intestinales (ou GIST) malignes non résecables et/ou métastatiques, après échec d'un traitement par imatinib (causé par une résistance ou une intolérance)³⁹⁰. Son efficacité a été évaluée en 2006 par Demetri et al.³⁹¹ au cours d'une étude de phase III, randomisée, menée en double aveugle, contrôlée *versus* placebo. Parmi les 312 patients inclus, 207 étaient traités par sunitinib à la dose de 50 mg par jour pendant 4 semaines, suivis d'une pause de 2 semaines. Le sunitinib a élargi le délai avant progression de la tumeur (27,3 semaines vs 6,4 semaines, HR = 0,33 ; IC95% = 0,23-0,47, $p < 0,0001$) et a eu un effet similaire sur la survie sans progression (PFS : 22,9 semaines vs 6 semaines, HR = 0,33 ; IC95% = 0,24-0,47 ; $p < 0,0001$). Au cours de cet essai, le traitement était bien toléré et les effets indésirables observés étaient de la fatigue, des diarrhées, de la dépigmentation cutanée et ou encore des nausées.

Le sunitinib est également utilisé dans le cadre du traitement du cancer du rein métastatique (mRCC) après que son efficacité ait été évaluée vs la prise d'interféron- α (IFN- α), référence avant l'arrivée des thérapies ciblées³⁹². Dans cette étude ayant enrôlé 750 patients, le sunitinib avait permis de doubler la PFS par rapport à l'IFN- α (médiane de 11 mois contre 5, HR = 0,42, IC95% = 0,32-0,54 ; $p < 0,001$). Par ailleurs, les profils de toxicité étaient similaires dans les deux groupes (interruption de dose pour cause d'effets indésirables chez 38% des patients du groupe sunitinib contre 32% pour l'IFN, réduction

de dose chez 32% vs 21%, respectivement). Par ailleurs, la qualité de vie des patients était améliorée dans le bras sunitinib ($p < 0,001$). Le sunitinib est aussi prescrit chez les patients en échec après traitement par cytokines (interleukine-2 notamment)³⁹³.

Enfin, le sunitinib est indiqué pour le traitement des tumeurs neuroendocrines du pancréas (pNET) non résécables ou métastatiques bien différenciées et en progression³⁹⁰.

1.3.5. Effets indésirables

Même si la survenue des effets indésirables avec le sunitinib est quasi systématique, cet ITK a un profil de toxicité relativement bien toléré. Dans les essais d'enregistrement, les taux de réduction de dose, d'interruption ou d'arrêt définitif du traitement étaient de 11-52%, 0-27%, 29-54%, respectivement contre 12-39%, 7-22%, 6-24% dans le bras contrôle³⁹¹⁻³⁹³.

Les effets indésirables cliniques les plus fréquemment rapportés étaient : les rash cutanés (81%), la fatigue (52%), des diarrhées (45%), des mucites (33%), des syndromes main-pied (30%), de l'hypertension (29%), des vomissements (21%) ou des épistaxis (9%). En termes de perturbation du bilan biologique, ont été notées : des élévations de la créatinine (44%), des perturbations du bilan hépatique (40%), des anémies et neutropénies (38%), des thrombopénies (35%) ou des hypothyroïdies (9%)³⁹⁰. Par ailleurs, ces effets indésirables peuvent atteindre un grade sévère entre 2 et 12% des cas selon l'évènement et peuvent être d'évolution fatale³⁹⁰. Les profils de toxicité du sunitinib sont identiques dans ses autres indications (pNET et GIST)³⁹⁰. Ainsi, en cas d'évènements indésirables, la dose de sunitinib peut être adaptée par paliers de 12,5 mg. Celle-ci doit être comprise entre 25 et 75 mg/jour pour le traitement des mRCC et des GIST, mais ne doit pas dépasser 50 mg/j pour le traitement des pNET³⁹⁰. La seule contre-indication formelle existant pour le sunitinib est l'hypersensibilité³⁹⁰.

Dans deux études de phase II, ouvertes, non contrôlées et comparant les profils de toxicité du pazopanib et du sunitinib chez des patients atteints de mRCC, Powles et al.³⁹⁴ ont montré que l'incidence des effets indésirables graves était plus élevée chez les patients traités par sunitinib (notamment la survenue de mucite, de fatigue, de syndrome main-pied et de toxicité hématologique). Le pazopanib était quant à lui responsable de plus de diarrhées et de perturbations (asymptomatiques) du bilan hépatique. De plus, les réductions de dose étaient significativement plus fréquentes chez les patients traités par sunitinib que par pazopanib (26% vs 6%, $p < 0,05$).

Les effets hépatotoxiques du sunitinib sont moins bien caractérisés que ceux du pazopanib. Les anomalies du bilan hépatique ont été relevées, avec des élévations de transaminases comprises entre 39-61% (tous grades confondus) et 2-4% (grade sévère) pour ALT ; 39-72% (2-5%) pour AST ; 16-37% (1%) pour la bilirubine totale. Des cas d'insuffisance hépatique sévère ont été observés chez moins d'1% des patients (certains d'issue fatale), ce qui a justifié la publication d'une mise en garde de type « *black-box warning* » pour le risque d'hépatotoxicité par la FDA³⁸⁷. Par ailleurs, l'étude de Shantakumar et al.³⁹⁵ menée en condition de vie réelle a validé le fait que le sunitinib était moins hépatotoxique que le pazopanib^{367,394}. Ainsi, un traitement par sunitinib doit impérativement être accompagné d'un suivi de la fonction hépatique. Celui-ci devra être interrompu en cas de manifestations hépatotoxiques et définitivement arrêté en l'absence de résolution de ces effets³⁹⁰.

1.3.6. Propriétés pharmacocinétiques

D'après les études précliniques, la biodisponibilité du sunitinib pourrait atteindre 50% chez l'Homme. Les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) de sunitinib sont observées au bout de 6 à 12 heures (T_{max}) suivant l'administration par voie orale³⁹⁰. L'absorption n'est pas modifiée par l'alimentation, il n'y a donc pas de recommandations sur le moment de la prise (au cours ou en dehors du

repas). La solubilité du sunitinib est pH-dépendante mais reste acceptable jusqu'à 6,8. Ainsi, il est absorbé au niveau du tractus digestif (estomac et intestin grêle) et son absorption n'est pas altérée en cas de gastrectomie³⁹⁶. Le sunitinib a un volume de distribution apparent très large ($V_d/F = 2230 \text{ L}$)³⁹⁰. C'est un substrat des transporteurs ABC (notamment la P-g-p et BCRP) et il se fixe de manière très importante aux protéines plasmatiques (95% et majoritairement à l'albumine et à l' α -glycoprotéine acide). Entre 25 et 350 mg, la pharmacocinétique du sunitinib est linéaire puisque l'AUC et la C_{max} augmentent de manière proportionnelle à la dose³⁹⁰. Le sunitinib est un substrat d'enzymes métaboliques hépatiques telles que les cytochromes P450 et les flavines mono-oxygénases (FMO)³⁸⁷. Majoritairement formé par le CYP3A4, son métabolite N-deséthylé au niveau de la chaîne latérale diéthylamine (ou N-deséthyl sunitinib, SU12662) est identifiable dans le plasma, les selles et les urines (Figure 16)³⁹⁷.

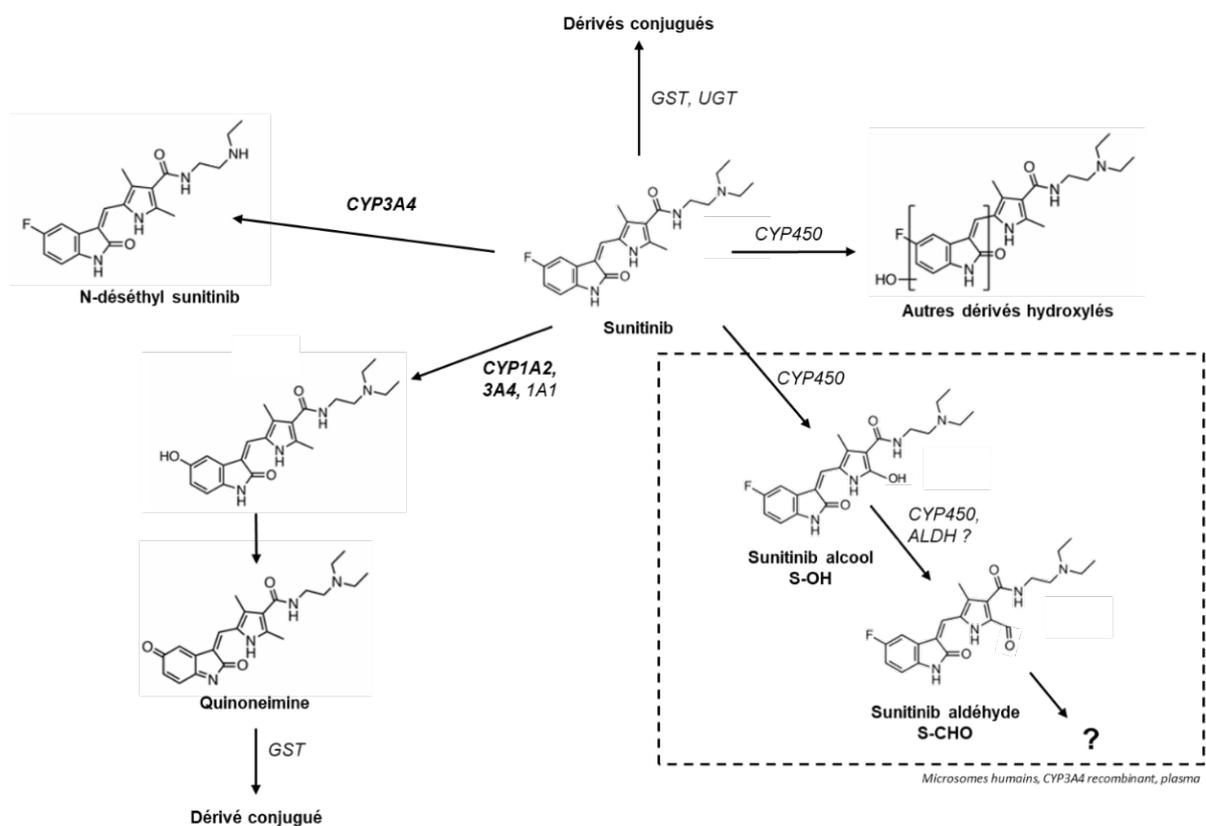


Figure 16 : Voies de métabolisation du sunitinib tirées des travaux de Speed et al.³⁹⁸, Amaya et al.³⁹⁷ et Paludetto et al.³⁸¹

ALDH : alcool déshydrogénase ; CYP : cytochrome ; GST : glutathion-S-transférase ; S-OH : dérivé alcool du sunitinib ; S-CHO : dérivé aldéhyde du sunitinib ; UGT : UDP-glycosyltransférase

D'autres voies métaboliques génèrent des produits minoritaires. Le N-deséthylsunitinib a une activité comparable à la molécule mère *in vitro* et est donc tout autant estimé et évalué lors des études PK-PD. Il compte également pour 23 à 37% de l'exposition plasmatique totale, est fortement lié aux protéines plasmatiques (90%) et distribué encore plus largement au niveau tissulaire que le sunitinib. Ce métabolite est lui-même transformé par les CYP450 en métabolite inactif.

L'élimination du sunitinib se fait majoritairement par voie fécale. Dans l'étude de bilan de masse menée par Speed et al.³⁹⁸, 61% de la dose administrée étaient éliminés dans les fèces (14% sous forme inchangée, 25% sous forme de N-deséthylsunitinib) et 16% dans les urines (7% sous forme inchangée, 6,4% sous forme de N-deséthylsunitinib). La clairance apparente (CL/F) évaluée pour le sunitinib variait de 34 à 62 L/h et sa demi-vie de 40 à 60h. Pour son métabolite actif, la CL/F atteignait 20 L/h et la demi-vie 80 à 110 heures. L'état d'équilibre du sunitinib et de son métabolite est atteint en 10-14 jours : au 14^e jour, les concentrations plasmatiques combinées de sunitinib et de N-deséthylsunitinib varient de 62,9 à 101 ng/mL. Enfin, la pharmacocinétique n'est pas modifiée lors de l'administration de doses répétées journalières ou tout au long des cycles³⁸⁷.

1.3.7. Interactions médicamenteuses

En étant substrat du CYP3A4, de la P-gp et de la BCRP, la prise de sunitinib expose les patients à un fort risque d'interactions médicamenteuses. Il est donc justifié que la prise d'inhibiteurs et d'inducteurs de ces enzymes et transporteurs soit associée à une surveillance clinique accrue et un suivi des concentrations plasmatiques renforcé pour éviter la perte d'efficacité ou un sur-risque de toxicité. Une étude *in vivo* a montré en effet que le kétoconazole, qui inhibe fortement le CYP3A4, augmentait la C_{max} et l'AUC combinée du sunitinib et de N-deséthylsunitinib de 49% et 51%, respectivement. Par ailleurs,

une augmentation de risque de survenue d'effets toxiques de grades 3-4 a été observée (neutropénie et +5% et anémie +7%), justifiant la réduction de dose de 33%.

Enfin, les recommandations d'adaptation de dose suggèrent que si l'utilisation de co-médications alternatives n'est pas possible, la dose de sunitinib doit être réduite au minimum (c'est-à-dire 37,5 mg/jour), en diminuant la dose par paliers de 12,5 mg pour les GIST ou les RCC, et 25 mg pour les pNET en cas de prise concomitante avec un inhibiteur puissant du CYP3A4. Si le sunitinib doit être pris en co-médication avec un inducteur enzymatique, sa dose doit être augmentée au maximum à 87,5 mg journaliers pour les GIST ou les RCC et 62,5 mg pour les pNET et accompagnée d'un suivi renforcé de l'état du patient³⁸⁷.

Concernant l'effet du sunitinib sur l'activité des cytochromes (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5 et CYP4A9/11) aucune interaction (inhibition ou induction) n'a été mise en évidence à des concentrations élevées³⁹⁰. Seul le N-deséthyl semble avoir un faible effet inducteur sur le CYP1A2. Des résultats contradictoires ne permettent pas de s'assurer de l'effet inhibiteur du sunitinib sur la P-gp. Enfin, le sunitinib est un inhibiteur de la BCRP mais aucune étude clinique d'interaction n'a été menée chez l'Homme.

1.3.8. Relations pharmacocinétiques-pharmacodynamiques

La concentration plasmatique cible de sunitinib a été déterminée *in vivo* chez des souris xénotreffées par Mendel et al.³⁸⁹. Les auteurs ont noté que les concentrations plasmatiques devaient être supérieures à 50 ng/mL pour obtenir une inhibition de VEGFR-2 et PDGFR- β équivalente à l'activité antiangiogénique observée *in vitro*. Les résultats ont également montré que l'inhibition de l'autophosphorylation des récepteurs VEGFR-2 et PDGFR- β était dose et temps-dépendante.

Chez l'Homme, de nombreuses études ont évalué les relations PK-efficacité du sunitinib³⁹⁹. Les taux de réponse et de régression tumorale et la survie globale ont été corrélés à une augmentation de l'AUC du sunitinib et de son métabolite actif, justifiant ainsi la mise en place d'un suivi thérapeutique des concentrations de sunitinib + N-deséthylsunitinib en plus de la forte variabilité interindividuelle qui existe pour cette molécule^{400,401}. Les adaptations de posologie basées sur l'estimation des concentrations plasmatiques permettent ainsi d'améliorer l'exposition sans toxicité surajoutée lors d'une escalade de dose maîtrisée. Ainsi, pour le traitement des mRCC, dont le schéma posologique correspond à 4 semaines de traitement puis 2 semaines d'arrêt, l'intervalle de concentrations cibles a été déterminé entre 50 et 100 ng/mL et entre 37,5 et 100 ng/mL pour les GIST (37,5 mg/jour en continu).

Des relations PK-toxicité ont également été relevées, associant des toxicités de haut grade et dose-limitantes comme la thrombopénie, la neutropénie, l'hypertension ou encore la toxicité dermatologique à l'exposition au sunitinib et à son métabolite⁴⁰²⁻⁴⁰⁶. D'autres études ont montré que celle-ci était également significativement supérieure chez des patients ayant nécessité des réductions de dose ou subi des arrêts de traitement⁴⁰⁷. Concernant l'hépatotoxicité, une étude menée dans la population pédiatrique (18 mois-22 ans) a pu montrer que plus la concentration plasmatique moyenne de sunitinib était élevée, plus la probabilité d'avoir une élévation des transaminases était importante⁴⁰⁸.

1.4. Rôle des métabolites réactifs dans l'hépatotoxicité et les interactions médicamenteuses liés au pazopanib et au sunitinib

1.4.1. Métabolisation du pazopanib et du sunitinib en métabolites réactifs

Les inhibiteurs des tyrosines kinases sont à l'origine d'une incidence variable d'effets secondaires hépatiques (5 à 25 %) et peuvent se compliquer d'une atteinte hépatique sévère chez une minorité de

patients en cas de poursuite du traitement. Parmi les 52 ITK autorisés par la FDA, 5 d'entre eux ont un encart *Black Box Label* apposé dans leur notice pour un risque d'hépatotoxicité : lapatinib, pazopanib, ponatinib, regorafenib et sunitinib. La compréhension des mécanismes soutenant cette hépatotoxicité est limitée et des études se sont intéressées particulièrement à la production de métabolites réactifs entre autres causes comme l'activation de la réponse immunitaire.

Kenny et al.⁴⁰⁹ ont été parmi les premiers à caractériser la formation de métabolites réactifs à partir du sunitinib et du pazopanib en identifiant des dérivés conjugués au glutathion ou à la méthoxylamine potentiellement associés à des inhibition temps-dépendante des cytochromes, à l'instar de Filppula et al.⁴¹⁰ qui ont indiqué que les molécules mères inactivaient les CYP3A.

De nombreux travaux se sont intéressés au lien entre les dérivés réactifs issus de la biotransformation des ITK et leurs effets hépatotoxiques ou leurs interactions médicamenteuses. La présence de motifs d'alerte au sein de leur structure les expose à un métabolisme oxydatif favorable à la formation de métabolites réactifs. Leur capacité à lier de manière covalente les protéines, les lipides ou l'ADN peut endommager directement ou indirectement l'intégrité cellulaire et leur fixation aux cytochromes est responsables de leur inhibition ou inactivation (regroupés sous le nom de *mechanism-based inhibition* MBI) responsables des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques. Ces inactivations peuvent être temps-, concentration- ou NAD(P)- dépendante, progressive ou prolongée. Elle peut également être quasi-irréversible par la formation de complexes de coordination entre la molécule et le fer de l'hème ou irréversible par alkylation de l'hème ou de l'apoprotéine. Cette inactivation peut avoir pour conséquence l'auto-inhibition du métabolisme de la molécule mère ou celui d'autres substrats de l'enzyme⁴¹¹.

Zhao et al.⁴¹², en incubant de l'erlotinib dans des microsomes, ont identifié deux intermédiaires réactifs de type quinoneimine et kétène possiblement impliqués dans l'hépatotoxicité et les interactions médicamenteuses liées à la molécule mère. En effet, le deuxième dérivé avait la capacité de fixer de manière covalente les résidus de lysines des cytochromes et de détruire la structure de l'hème menant à son inactivation. De la même manière, l'O-déalkylation du lapatinib qui mène à une quinoneimine réactive,

ou le métabolisme oxydatif associé à la défluorination du géfinitib font partie de mécanismes impliqués dans la toxicité. Par ailleurs, il a été montré que les dérivés quinoneimines avaient la capacité d'induire la libération de DAMPs par l'hépatocyte qui activent l'inflammasome, un complexe macromoléculaire impliqué dans l'activation des caspases et la cascade inflammatoire⁴¹³. Enfin, trois dérivés aldéhydes ont été identifiés à partir de la biotransformation de l'avitinib, un ITK de troisième génération non commercialisé mais qui a montré son efficacité pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules EGFR positif⁴¹⁴. Cependant, la grande réactivité de ces espèces est un obstacle à la compréhension de ces mécanismes : générés *in vivo*, ils se fixent rapidement sur les macromolécules constituant les cellules et les tissus, ce qui limite leur détection dans les milieux biologiques accessibles (comme le plasma, l'urine ou les fèces).

Le métabolisme du pazopanib et du sunitinib est médié principalement par le CYP3A4 qui permet la formation de métabolites hydroxylés et N-déalkylés. Ces structures majoritaires n'ont jamais été corrélées au risque d'hépatotoxicité, mais la génération d'espèces toxiques minoritaires à partir du métabolisme des ITK a déjà été prouvée comme l'un des mécanismes impliqués. Le sunitinib est majoritairement N-deséthylé par le CYP3A4, mais peut également perdre son atome de fluor (défluorination oxydative) lors de sa prise en charge par le CYP3A4 et le CYP1A2 pour ensuite former des adduits au glutathion (Figure 16)⁴¹⁵. Le pazopanib est quant à lui transformé par le CYP3A4 en de nombreux métabolites, les majoritaires étant N-déméthylés et hydroxylés au niveau des groupements méthyl de l'aniline et du noyau indazole (Figure 14).

Dans une étude s'intéressant au métabolisme du pazopanib et du sunitinib menée au sein de notre équipe de recherche, Paludetto et al.³⁸¹ ont identifié des dérivés aldéhydes issus d'un mécanisme d'oxydation comparable à celui des CYP450, à l'aide de métalloporphyrines. Ces systèmes catalytiques oxydoréducteurs sont utilisés *in vitro* pour mimer l'oxydation biologique des médicaments spécifique des cytochromes P450 ou des peroxydases, à l'aide de composés donneurs d'oxygène. Les métalloporphyrines fonctionnent en solution aqueuse ou organique (solvant favorisé pour les molécules hydrophobes) et

permettent l'hydroxylation de composés saturés ou aromatiques ou la N-déméthylation d'amines tertiaires.

En incubant du sunitinib avec des métalloporphyrines et de l'hydrogénéopersulfate de potassium comme donneur d'oxygène ($\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TDCPP})\text{Cl}/\text{KHSO}_5$), les auteurs ont identifié un dérivé aldéhyde représenté très abondamment dans le milieu d'incubation (**S-CHO**, 15% mol, Figure 16) et correspondant à une oxydation au niveau du méthyl du carbone 11 du noyau pyrrole. Cette molécule a été détectée par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à de la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) et sa structure a été validée par résonance magnétique nucléaire (RMN). Un composé de type alcool (**S-OH**, 12% mol, Figure 16) a également été identifié comme possible intermédiaire de la réaction. La présence de cet aldéhyde a été confirmée par l'utilisation de méthoxylamine, qui en se complexant avec la fonction aldéhyde dans le milieu permet de détecter l'oxime correspondante : Sunitinib- $\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$.

De manière similaire, l'incubation du pazopanib avec les métalloporphyrines ($\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TDCPP})\text{Cl}/\text{MMPP}$) a permis d'identifier par RMN un dérivé carbonylé de type aldéhyde (9% mol) au niveau du méthyl en position 7 du noyau indazole (**P-CHO**, M15 sur la Figure 14)³⁸¹. Un dérivé alcool, précédemment décrit^{379,416}, a également été observé et supposé comme étant l'intermédiaire de formation de l'aldéhyde (**P-OH**, Figure 14). Afin de déterminer les voies de production métaboliques de ces métabolites réactifs, les auteurs ont incubé les molécules mères avec des microsomes afin de comparer les espèces obtenues avec les métalloporphyrines. Les surnagants analysés par UPLC-MS/MS ont confirmé la présence des aldéhydes dans les modèles biologiques par la détection de forme libre et d'oximes correspondantes après co-incubation avec de la méthoxylamine. Par ailleurs, la même année, Wang et al.³⁸⁰ ont identifié le P-CHO dans des microsomes murins et humains mais aussi dans l'urine et les fèces de souris traitées par pazopanib. Dans cette étude utilisant une approche métabolomique, 22 métabolites du pazopanib ont été identifiés, dont 17 nouveaux dérivés jamais décrits auparavant. La caractérisation des voies de production a été menée avec l'utilisation d'enzymes recombinantes (rCYP) mais aucune de la famille

des CYP450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9B, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5B et CYP4A11) n'a été déterminante dans la production de ce métabolite (0% de production pour chaque enzyme). Cependant, en s'intéressant particulièrement aux dérivés réactifs, dont cet aldéhyde, ils ont montré que l'inhibition non-spécifique des cytochromes murins par pré-injection intrapéritonéale d'aminobenzotriazole (ABT, un pan-inhibiteur des CYP450) réduisait de moitié la quantité d'aldéhyde excrétée dans les urines. Enfin, la concentration de P-CHO dans les urines des modèles de souris était corrélée à l'activité des transaminases ($r_{ALT} = 0,76, p < 0,05$; $r_{AST} = 0,75, p < 0,05$).

Dans la seconde étude de Paludetto et al.⁴¹⁷, la formation de ces métabolites réactifs a été évaluée dans le plasma de patients traités par pazopanib ou sunitinib pour un cancer du rein métastatique. Les pics correspondants aux aldéhydes libres dans le plasma ont été détectés et la cinétique de ces métabolites était similaire à celle de la molécule mère qui évoluait au cours du traitement.

Les potentielles interactions avec les cytochromes ont été évaluées lors d'étude de *docking* moléculaire et ont révélé que la fonction carboxyaldéhyde avait la capacité d'interagir avec plusieurs résidus arginine situés dans le site actif du CYP3A4, mais également des lysines. Ces données ont été confirmées par la suite par l'incubation de protéines humaines (albumine, cytochromes recombinants et microsomes) avec les aldéhydes. La réaction a été rendue irréversible par réduction de la fonction imine en amine, grâce au cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN). Des adduits à la lysine ont été observés pour le P-CHO et le S-CHO dans les trois incubations protéiques.

Ces résultats apportaient alors de nouvelles pistes quant aux possibles déterminants de la toxicité hépatique du pazopanib et du sunitinib. La potentielle interaction avec les lysines des protéines hépatiques pourrait être un des événements déclencheurs d'une réaction locale, directe ou indirecte, menant à la destruction hépatocytaire et par conséquent à une toxicité hépatique majeure. Ces adduits aux protéines pourraient également expliquer certaines interactions médicamenteuses liées aux molécules mères, par une fixation covalente au site actif ou même allostérique sur l'apoprotéine.

1.4.2. Rôle des aldéhydes dans la toxicité des médicaments

Les aldéhydes sont des composés organiques réactifs ubiquitaires carbonylés (notés R-CHO, R étant souvent un radical carboné). L'organisme est continuellement exposé à des aldéhydes issus de l'environnement (plantes, animaux, micro-organismes, etc...). D'autres voies de production existent : oxydation photochimique, combustion de carburant, fumée de cigarette, etc... et les processus biologiques tels que le métabolisme lipidique ou la détoxification des xénobiotiques sont d'importantes sources d'aldéhydes. Très électrophiles, ces espèces sont toxiques de par leur capacité à former des adduits avec des molécules nucléophiles comme les protéines, les lipides ou encore l'ADN, menant à de très nombreuses réactions toxiques (cytotoxicité, mutagénicité, génotoxicité, carcinogénèse, etc...). Les aldéhydes ont également la capacité d'augmenter le stress oxydant, d'affecter la production d'ATP mitochondriale et serait impliqués dans les interactions médicamenteuses de par leur capacité à fixer et inactiver les protéines, notamment riches en cystéines, comme les enzymes de phases I ou II (cytochromes ou GST, par exemple)⁴¹⁸.

Plusieurs enzymes au sein de l'organisme ont la capacité de prendre en charge ces molécules réactives afin de limiter leur toxicité : les aldéhydes oxydases (AOX, cytosoliques), les cytochromes P450 (CYP450, exprimés dans le réticulum endoplasmique), des aldo-céto réductases (AKR, cytosoliques), des réductases (cytosoliques), les alcools déshydrogénases (ADH, cytosoliques et mitochondriales) ou encore les aldéhydes déshydrogénases (ALDH, cytosoliques, mitochondriales, du réticulum endoplasmique et nucléaires) sont notamment exprimées au niveau hépatocytaire.

De multiples exemples de médicaments métabolisés en dérivés aldéhydes ont été publiés ces dernières années. L'abacavir, un analogue nucléosidique utilisé comme antirétroviral dans le cadre du traitement du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH), est souvent associé à de sévères réactions d'hypersensibilité, parfois létales, et une cardiotoxicité importante⁴¹⁹. Cette pro-drogue est transformée au niveau hépatique par les UGT en un dérivé glucuroconjugué et par l'ADH en un acide carboxylé

éliminé dans les urines. Très rapidement, Walsh et al.⁴²⁰ ont montré que la formation de cet acide passait par un intermédiaire aldéhyde *in vitro* mais n'ont pu le démontrer *in vivo* du fait de la faible stabilité de ces dérivés. Cependant, Charneira et al.⁴¹⁹ ont montré que l'isomère conjugué de cet aldéhyde avait la capacité de fixer des radicaux protéiques nucléophiles, comme les lysines et les valines, en formant une base de Schiff *in vitro* dans du cytosol de rat et sur de l'hémoglobine humaine et *in vivo* chez le rat⁴¹⁹. Par la suite, Grilo et al.⁴²¹ ont mis au point une méthode d'identification de ces adduits à l'hémoglobine dans des échantillons sanguins de patients traités par abacavir, apportant une preuve supplémentaire quant au possible rôle de ces adduits dans la toxicité de cette molécule.

Dans une étude s'intéressant au métabolisme oxydatif de l'imrecoxib, un anti-inflammatoire inhibiteur sélectif des cyclooxygénases de type 2, la formation d'un métabolite carboxylé était limitée par celle de l'intermédiaire aldéhyde M-CHO issue de l'oxydation d'un alcool lui-même formé à partir de la molécule mère par les cytochromes P450⁴²². Les auteurs ont noté qu'en incubant de l'aldéhyde avec des cytochromes recombinants et du NADPH, ils arrivaient à détecter à la fois l'acide et l'alcool correspondant, signifiant que l'aldéhyde était également réduit dans le milieu. Les auteurs expliquent cette observation par la présence de cytochromes-P450 oxydoréductase et de cytochrome *b5* dans les formes commerciales des enzymes recombinantes utilisés pour leur fonctionnement métabolique. Les auteurs ont par ailleurs confirmé que le CYP3A4 était l'enzyme la plus impliquée dans la biotransformation de la molécule, mais également l'AOX-1 cytosolique impliquée dans la réduction de l'aldéhyde. L'alcool et l'aldéhyde peuvent être convertis l'un en l'autre par processus d'oxydoréduction, sans pour autant être un processus réversible puisqu'impliquant deux acteurs différents : dans les microsomes, l'alcool est oxydé en aldéhyde par les CYP450 et l'aldéhyde est réduit en alcool par la CYP450 oxydoréductase.

Récemment, Gampe et Verma⁴²³ ont démontré dans une revue de la littérature d'autres aspects que l'effet toxique des aldéhydes. Habituellement, de telles structures sont considérées pour leur réactivité et leurs effets délétères alors qu'ils peuvent devenir des outils importants pour évaluer les interactions covalentes entre résidus protéiques. Intrigués par le fait que les aldéhydes ne soient pas plus au

cœur du développement des médicaments, les auteurs ont recensé les molécules commercialisées qui possèdent un groupement fonctionnel aldéhyde au sein de leur structure. Parmi elles, des vitamines (phosphate de pyridoxal, vitamine B6 et rétinol, vitamine A), des antibiotiques (streptomycine, des macrolides) ou encore des anticancéreux (comme le roblitinib, un ITK anti-FGFR4 en cours de développement, possédant un motif aldéhyde afin de favoriser le ciblage covalent et spécifique du récepteur). Ce dernier exemple prouve que les aldéhydes peuvent être utilisés de manière sûre, à condition de maîtriser les effets *off-target* et les interactions médicamenteuses résultats de leur forte réactivité. Par ailleurs, cette réactivité est réversible dans les conditions physiologiques et la fonction aldéhyde seule est essentielle à la sélectivité mais non suffisante à l'activité de ces nouvelles molécules en développement qui dépend également des interactions non covalentes avec la cible.

1.4.3. Mécanismes d'hépatotoxicité des ITK : dommages intracellulaires liés à la production de métabolites toxiques

De nombreuses études ont montré que les dommages à la mitochondrie et l'augmentation du stress oxydant intracellulaire étaient à l'origine des hépatotoxicités liés aux ITK et de l'accumulation de métabolites réactifs (phénomènes décrits pour le regorafenib, l'erlotinib et le lapatinib⁴²⁴⁻⁴²⁶).

Mingard et al.⁴²⁷ ont investigué l'hépatotoxicité de six molécules dont le pazopanib sur deux types d'hépatocytes humains : HepG2 et HepaRG. Leur objectif était d'évaluer l'impact de ces molécules sur le fonctionnement mitochondrial : pour cela, ils ont mesuré la production d'ATP, qui repose généralement sur l'utilisation du glucose par la glycolyse et de façon moindre par phosphorylation oxydative. Dans le cas où le glucose est remplacé par du galactose, le métabolisme cellulaire est orienté uniquement vers l'utilisation préférentielle de la chaîne respiratoire mitochondriale. Kamalian et al.²⁶⁴ ont montré que la privation en glucose pendant au moins 4 heures avant l'addition d'une molécule était suffisante pour évaluer son impact sur le dysfonctionnement mitochondrial, même pendant une exposition à court terme

n'induisant pas une cytotoxicité (2-8h). Les molécules mito-toxiques peuvent alors affecter de manière plus importante la production d'ATP à des concentrations plus faibles qu'en présence de glucose.

La respiration mitochondriale repose sur le mécanisme de phosphorylation oxydative durant lequel sont réduits des cofacteurs comme le NAD^+ et le coenzyme Q (CoQ) en NADH et QH_2 , respectivement (Figure 17A)⁴²⁸.

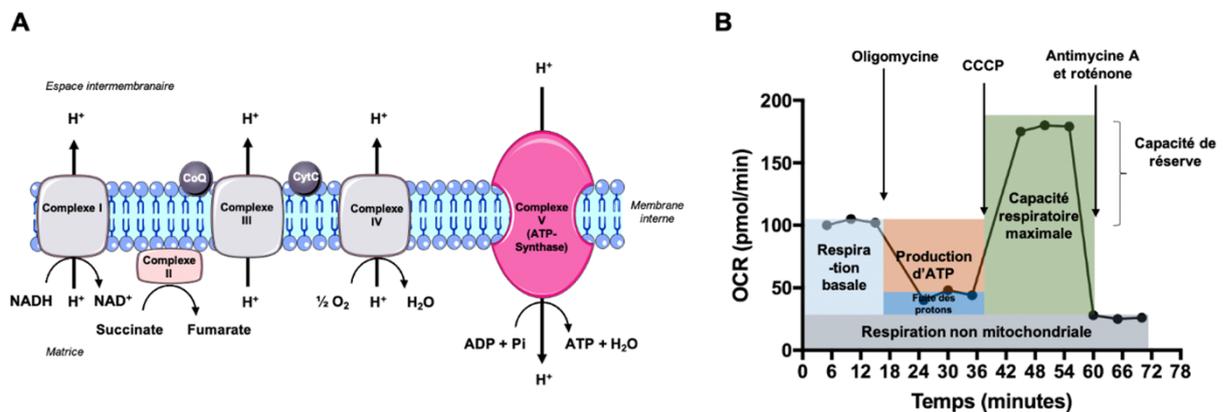


Figure 17 : Fonctionnement et évaluation de la respiration mitochondriale.

(A) Constituants et fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. (B) Représentation graphique de la consommation cellulaire d'oxygène (respiration mitochondriale) mesurée par Seahorse (Agilent®). ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CCCP : carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone ; CoQ : coenzyme Q ; CytC : cytochrome C ; NAD : nicotinamide adénine dinucléoside ; OCR : oxygen consumption rate, taux de consommation d' O_2 cellulaire

Les électrons circulent entre les différents complexes de la chaîne électronique située dans la membrane interne mitochondriale et créent un gradient d'énergie potentielle qui permet d'activer le pompage des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes I, III et IV. Ce gradient électrochimique (ou force proton-motrice, Δp) permet le retour des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice en passant par le complexe V, ou ATP-synthase, permettant ainsi la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Les électrons sont ainsi collectés par le complexe IV et la cytochrome *c* oxydase puis intégrés à une molécule d'oxygène pour former de l'eau ($4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$). Ces électrons peuvent également réagir avec de l'oxygène moléculaire et produire du superoxyde O_2^\bullet . Cette

espèce thermodynamiquement instable (à l'origine de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$) peut endommager directement les protéines contenant un atome de fer ou de soufre central (comme certains composants de la chaîne respiratoire ou certaines protéines du cycle de Krebs) ou former des dérivés réactifs comme le radical hydroxyle HO^{\bullet} . De ce fait, la production des espèces réactives se fait principalement au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire et est très dépendante de Δp . Le premier complexe peut former du superoxyde lors du transport des électrons de l'espace inter-membranaire vers la matrice (oxydation du NADH) et lors du transport inverse (réduction du NAD^+). Le complexe III produit seulement de fortes concentrations de superoxyde en présence d'inhibiteurs (comme l'antimycine)⁴²⁸. L'inhibition des complexes I et III a par ailleurs été associée à une augmentation de la production des ROS⁴²⁹. Par ailleurs, les protons peuvent migrer vers la matrice indépendamment de l'ATP synthase, phénomène appelé « fuite des protons » (ou *proton leak*) qui est donc responsable d'un découplage de la production d'ATP et la concentration en oxygène⁴³⁰.

Le fonctionnement mitochondrial est souvent évalué par la consommation d'oxygène qui peut être mesurée en temps réel. Cet essai, souvent réalisé grâce au système Seahorse d'Agilent™ permet d'obtenir des informations sur les différentes capacités mitochondriales : respiration basale, production d'ATP, capacité respiratoire maximale, capacité de réserve, etc... La mesure des taux d'oxygène se fait de manière cyclique et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des composants de la chaîne respiratoire permet d'obtenir un profil de consommation d'oxygène qui sera impactée par l'exposition à des molécules toxiques pour la mitochondrie (Figure 17B). Parmi ces inhibiteurs, l'oligomycine induit l'inhibition de l'ATP synthase entraînant une diminution drastique du flux d'électrons au travers de la chaîne de transport d'électrons, affectant ainsi la respiration mitochondriale et par conséquent la production intracellulaire d'ATP. L'ajout de CCCP (carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone) induit un découplage des électrons permettant d'évaluer la capacité respiratoire maximale de la cellule. Le gradient de proton se dissipe entre l'espace transmembranaire et la matrice mitochondriale et diminue ainsi la capacité du complexe V à phosphoryler l'ADP en ATP. Cette hyperactivité permet également de calculer la capacité de réserve respiratoire (capacité des cellules à répondre à une demande énergétique croissante), juste

avant l'ajout d'antimycine A et de roténone. Ces deux inhibiteurs des complexes I et III, respectivement, abolissent complètement le fonctionnement de la chaîne respiratoire en inhibant le flux de protons, ce qui permet de mesurer la part de la respiration non mitochondriale dans le processus de respiration cellulaire globale.

Dans l'étude de Mingard et al.⁴²⁷, le pazopanib n'a montré aucun effet sur la toxicité membranaire des cellules HepG2, ni HepaRG. Par ailleurs, il n'a impacté le contenu intracellulaire en ATP que très faiblement et uniquement dans les cellules HepG2 cultivées dans un milieu galactose (même à de très fortes concentrations comme 50 μM). Afin de tout de même caractériser cette légère diminution dans la production d'ATP, les auteurs ont investigué le fonctionnement mitochondrial et ont montré que le pazopanib n'altérait pas le potentiel de membrane mitochondrial (biomarqueur de l'intégrité et du fonctionnement de l'organite), ni le taux de consommation d'oxygène des hépatocytes. Après 24 heures d'incubation avec du pazopanib, les auteurs ont détecté une augmentation des radicaux oxygénés dès 10 μM . Le mécanisme de mortalité cellulaire a également été investigué : le pazopanib activait tout de même l'apoptose à partir de 20 μM , évaluée par la mesure du clivage des caspases 3 et de la Poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP) et par cytométrie de flux (annexine V/iodure de propidium).

La toxicité hépatocellulaire du sunitinib a été évaluée par la même équipe⁴³¹ dans des conditions similaires (mêmes modèles cellulaires HepG2 et HepaRG, évaluation de la cytotoxicité suivie de l'étude des dommages à la mitochondrie par mesure de l'ATP intracellulaire...). Par rapport aux autres ITK étudiés (imatinib, erlotinib et lapatinib), le sunitinib était responsable d'une cytotoxicité importante très rapidement (dès 6 heures), aux concentrations les plus faibles (5-10 μM , concentration maximale égale à 100 μM). Il induisait également une diminution très rapide des concentrations d'ATP intracellulaire, quel que soit le milieu (galactose vs glucose), phénomène correspondant à la diminution de la viabilité cellulaire. Les résultats observés dans les cellules HepaRG – plus représentatives des événements physiologiques des hépatocytes humains – étaient similaires (cytotoxicité à partir de 10 μM , diminution des taux d'ATP à partir de 50 μM). Le sunitinib était également associé à une augmentation de l'activité des

caspases (à partir de 20 μM). L'évaluation de l'intégrité des composants de la chaîne respiratoire a permis de montrer que le sunitinib impactait la capacité respiratoire maximale de manière concentration-dépendante. L'utilisation d'un système haute résolution de respirométrie leur a permis de démontrer que le sunitinib altérait le complexe I de la mitochondrie impliqué dans la réduction des coenzymes pour la phosphorylation de l'ADP en ATP (Figure 17A). L'utilisation de mitochondries hépatiques isolées à partir de foie a permis de valider cette observation. L'inhibition de ce complexe est par ailleurs associée à l'augmentation de la production des ROS elle-même suivie d'une augmentation de l'expression de gènes de réponse au stress oxydant, comme les superoxyde dismutases cytosoliques ou mitochondriales (SOD1 ou SOD2, respectivement). Enfin, il est intéressant de noter que ces effets mitotoxiques du sunitinib ont également été rapportés dans d'autres types cellulaires et particulièrement dans les cardiomyocytes dont le métabolisme énergétique dépend de manière très importante du bon fonctionnement mitochondrial⁴³².

Une étude de bilan de masse utilisant du lapatinib radioactif et menée chez des patients volontaires a montré que l'hépatotoxicité de cet inhibiteur de ErbB2 et de l'EGFR utilisé dans le cancer du sein, était corrélée aux concentrations plasmatiques de métabolites réactifs⁴³³. L'O-déalkylation de cet ITK (lapatinib O-déalkylé, OD-LAP) mène à la formation d'une quinoneimine toxique et en fait un bon candidat pour étudier son impact au niveau mitochondrial.

Eno et al.⁴²⁶ ont ainsi comparé l'effet cytotoxique et mitotoxique du lapatinib sur deux lignées cellulaires HepG2, l'une sauvage, l'autre transduite avec un vecteur lentiviral permettant l'expression du CYP3A4 (HepG2-3A4). En ayant à disposition le métabolite étudié, OD-LAP, les auteurs ont montré que l'exposition pendant 24 heures diminuait significativement de manière concentration-dépendante les capacités respiratoires basales et maximales des cellules HepG2, sans pour autant affecter la viabilité cellulaire. Par ailleurs, la co-incubation de OD-LAP avec de la BSO, responsable de la déplétion intracellulaire en glutathion, a drastiquement diminué les capacités respiratoires globales et le fonctionnement de la chaîne mitochondriale des hépatocytes. Afin de déterminer si le CYP3A4 était bien l'enzyme

responsable de la production de OD-LAP, les auteurs ont incubé la molécule mère dans les mêmes conditions, avec les cellules HepG2-3A4. Les résultats étaient similaires à l'exposition au métabolite puisqu'une diminution importante de l'OCR a été observée à partir de 30 μM pendant 24 heures, toujours sans affecter la viabilité cellulaire. Les auteurs ont évalué l'impact du métabolite en l'incubant avec des HepG2 cultivés en milieu galactose. Les résultats étaient consistants avec les précédents effets mitochondriaux de l'OD-LAP observés puisque la déplétion en ATP y était bien plus marquée.

L'une des hypothèses des auteurs était que l'accumulation d'espèces réactives, produites à la suite d'un dysfonctionnement mitochondrial, entraînait l'activation de la voie de détoxification menée par le facteur de transcription Nrf2 (ou NFE2L2 pour *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2*). En effet, les gènes de détoxification et de réponse au stress oxydant sont exprimés de manière coordonnée lors de l'exposition à des espèces électrophiles ou des espèces réactives de l'oxygène²³⁴. Cette réponse est régulée notamment par l'activation *cis* d'un élément régulateur appelé ARE pour *antioxidant-responsive element* situé au niveau des régions régulatrices des gènes de réponse aux xénobiotiques tels que les glutathion-S-transférases (GST), la NAD(P)H-quinone oxydoréductase (NQO-1) ou de réponse au stress oxydant comme l'hème oxygénase 1 (HO-1). L'activation dose-dépendante de la transcription de Nrf2 par le métabolite du lapatinib a été observée au bout de 4 heures d'exposition où il induisait une augmentation de l'expression de la NQO-1 (qui réduit les composés comme les quinones en métabolite non électrophiles de type hydroquinone) et de l'HO-1 (inductible et responsable de la dégradation de l'hème en biliverdine et de la réduction des ions ferreux Fe^{2+}). Enfin, les superoxyde dismutases 1 et 2 (SOD1 et SOD2) sont respectivement des protéines de réponse au stress oxydant cytoplasmique et mitochondrial. Ces métalloprotéines sont responsables de l'élimination des radicaux oxygénés et notamment du superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$. L'application du métabolite OD-LAP avec les cellules HepG2 a particulièrement activé SOD2, soulignant l'impact sur la mitochondrie.

Puisque le mécanisme de production de métabolite réactif est soumis à l'activation par les cytochromes P450, il est envisageable que les métabolites réactifs du sunitinib et du pazopanib puissent réagir de la

même manière que ceux des ITK précédemment décrits. Le second article présenté dans ce manuscrit rassemble les résultats obtenus lors de l'étude du rôle des métabolites aldéhydes dans l'hépatotoxicité du sunitinib et du pazopanib tout en portant un intérêt particulier à leurs effets mitochondriaux. Le second objectif était de déterminer leur implication dans les interactions médicamenteuses décrites pour ces deux ITK.

2. Article n°2

Evaluation biologique des effets hépatotoxiques des aldéhydes du sunitinib et du pazopanib et implication dans les interactions médicamenteuses.

Les observations et les résultats de Paludetto et al.^{381,417} ont permis de mettre en perspective l'intérêt d'étudier le rôle des dérivés aldéhydes du pazopanib et du sunitinib dans l'hépatotoxicité de ces deux ITK. L'évaluation biologique des conséquences de l'exposition à ces molécules apporterait des informations complémentaires quant aux mécanismes cytotoxicité hépatocytaire et d'interactions médicamenteuses liés à la prise de sunitinib ou pazopanib. C'est l'objectif de ce projet qui rassemble une étude *in vitro* d'évaluation de l'effet toxique directe de ces aldéhydes, une étude d'interaction avec les protéines hépatiques évaluée par une analyse protéomique et l'évaluation des concentrations plasmatiques de ces dérivés dans le plasma de patients traités par les molécules mères inclus au sein d'un essai clinique. L'article est en cours de rédaction et sera soumis à la revue *Chemical Research in Toxicology*.

Biological evaluation of the role of pazopanib and sunitinib reactive aldehyde metabolites in drug-induced liver injury and drug-drug interactions

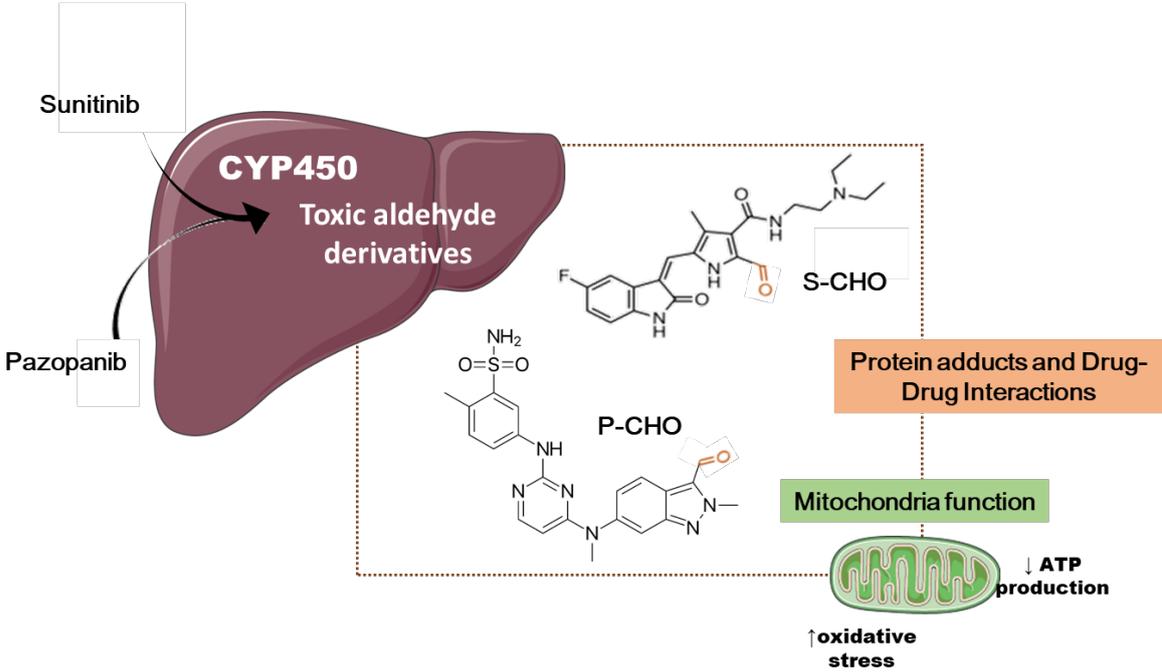
Maud Maillard^{†‡§}, Cécile Arellano^{†‡}, Christelle Vachoux^{†‡}, Christine Chevreau[§], Frédéric Pont[†], Nathalie Saint-Laurent[†], Thierry Lafont^{†§}, Etienne Chatelut^{†‡§} and Fabienne Thomas^{†‡§}.*

[†]Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037/CNRS ERL, 2 Avenue Hubert Curien, CS53717, 31037 Toulouse, Cedex 1, France

[‡]Université de Toulouse III Paul Sabatier, 31330 Toulouse, France

[§]Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, 31059 Toulouse, Cedex 9, France

TABLE OF CONTENT GRAPHIC



ABSTRACT

Drug-induced liver injuries are the primary cause of drug withdrawal and represent a major concern for healthcare. Pazopanib and sunitinib are two oral tyrosine kinase inhibitors (TKI) used for the treatment of advanced renal cell carcinoma and treatment exposes patients to an increased risk of hepatotoxicity. To date, mechanisms underlying this adverse event are not well understood but strong interest is given to the production of reactive metabolites that could interact with liver cell components (as proteins, lipids or nucleic acids). This interaction could consequently modulate the cell functions or lead to cell death. Based on our previous findings, we aimed to assess the role of two aldehyde derivatives issued from the biotransformation of pazopanib and sunitinib (P-CHO and S-CHO, respectively) in the hepatotoxicity and drug-drug interactions (DDIs) related to pazopanib and sunitinib. P-CHO was involved in the decrease of viability and ATP production in HepG2 cells. For S-CHO, we showed that it decreased the viability of HepG2 but to a lesser extent than its parent molecule and affected the maximal respiratory capacity of the mitochondrial chain. Moreover, we reported that P-CHO could be involved in pazopanib-mediated DDIs as this derivative can bind the coenzyme NADPH cytochrome P450-reductase, which is critical for the function of CYP450. Finally, we assessed the plasma concentrations of P-CHO in patients treated with pazopanib and detected small amounts that could reflect a possible higher accumulation in the liver. This study was in the continuity of a previous work on reactive metabolites and brings new evidence of their implication in the multifactorial process sustaining the pazopanib and sunitinib related hepatotoxicity.

1. Introduction

Drug-induced liver injuries (DILIs) are the primary cause of acute liver failure and drug withdrawal in the United-States¹. They represent a major clinical and economic concern for healthcare as they can lead to liver transplantation in 10% of the cases². Pazopanib (Votrient®) and sunitinib (Sutent®) are two oral tyrosine kinase inhibitors (TKI) used, among other indications, for the treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC). They also share the characteristic of being “black-boxed” by the US Federal Drug Administration (FDA) for an increased risk of hepatotoxicity inherent to their use^{3,4}. Consequently, prescribing information emphasizes the importance of a systematic monitoring of the liver function of patients in order to identify any hepatic damage since the first administration of pazopanib and sunitinib.

The mechanisms sustaining this liver toxicity are not fully understood for TKIs. Recent works have highlighted a multifactorial etiology and a particular interest was given to the formation of reactive metabolites from the biotransformation of various TKIs including lapatinib⁵, famitinib⁶, pazopanib, sunitinib⁷ and more recently olmutinib⁸. Indeed, these metabolites could be able to covalently bind intracellular components, affect the cell structure and therefore induce cell death. Their toxic potential is supposed to rely on their propensity to generate electrophilic radicals or moieties (like aldehydes or intermediate semi-quinone radical leading to reactive quinone imines). These patterns, also known as being structural alerts, may result from the biotransformation of the parent molecule by phase 1 enzymes like cytochromes P450 (CYP450), making the liver the privileged place for the production of reactive metabolites⁹.

By using metalloporphyrins, a chemical catalytic system that mimics the specific CYP450-type oxidation, our team identified two aldehyde derivatives of pazopanib and sunitinib¹⁰. After validating these observations in microsomal and recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) models, we hypothesized that these reactive metabolites could result from the CYP3A4-mediated oxidation of pazopanib and sunitinib. In addition, we detected covalent adducts involving lysine amino groups in the plasma of patients treated

with pazopanib or sunitinib for mRCC, suggesting the putative role of aldehyde-protein complexes in TKI-related clinical hepatotoxicity and drug-drug interactions⁷.

Drug-induced impairment of the structure or function of mitochondria is one of the mechanisms described as being involved in DILIs occurrence¹¹. For TKIs, this has been reported for ponatinib, regorafenib, sorafenib¹², sunitinib^{13,14} and lapatinib⁵ in the adenocarcinoma derived hepatic cell line HepG2 cells and crizotinib, dasatinib, ponatinib, regorafenib and sorafenib in human HepaRG cells¹⁵. However, except for lapatinib, no involvement of reactive metabolites was specifically investigated.

Therefore, based on the identification of sunitinib and pazopanib aldehydes derivatives by Paludetto et al.^{7,10}, we aimed to understand the role of these electrophilic derivatives in the mechanisms supporting the hepatotoxicity associated with the parent molecules. By using HepG2 cells, we evaluated the ability of these aldehydes to impair their viability by activating the apoptosis and focused on their ability to affect the mitochondrial function and the accumulation of intracellular oxidative stress. Furthermore, we aimed to go further in the understanding of pazopanib and sunitinib aldehydes interaction with proteins such as CYP450 to evaluate their implication in mechanism-based inhibition (MBI) related to pazopanib and sunitinib. Finally, we assessed the relationships between plasma circulating pazopanib aldehyde and the clinical hepatic side effects reported for patients treated with pazopanib for mRCC.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals and solvents

Sunitinib L-malate and pazopanib hydrochloride were purchased from Alsachim (Illkirch Graffenstaden, France, purity > 98%). Aldehyde metabolites of pazopanib (P-CHO) and sunitinib (S-CHO) were synthesized by the chemical synthesis department of the Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS, Université Claude Bernard, Villeurbanne, France). Their structures were confirmed by NMR and LC-MS analysis. Stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and stored at -20°C. L-buthionine sulfoximine (BSO) and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich, formic acid was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN) was provided by Sigma-Aldrich. The solvents used for UPLC/MS-MS analyses (acetonitrile and methanol) were provided by Biosolve (Valkenswaard, Netherlands) and isopropanol was purchased from Merck. Blank plasma from healthy donors was provided by “Etablissement Français du Sang” (EFS, Toulouse, France).

2.2. Cell culture

The human hepatocarcinoma cell line HepG2 was used for the cell-based assays (ATCC reference: HB-8065). All cell culture media and additives were purchased from Sigma-Aldrich. In basal condition, cells were maintained in high-glucose Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) containing 4.5g/L of glucose, L-glutamine, sodium pyruvate and sodium bicarbonate. This medium was supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS), with 0.1% of antimycotic solution (Plasmocin™ prophylactic, InvivoGen, Toulouse, France) and 1% of an antibiotic cocktail (penicillin and streptomycin, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). A part of HepG2 cells was cultured in DMEM 10 % FBS without glucose but supplemented with 10 mM galactose, 2 mM L-glutamine, antibiotic-antimycotic solution, 5 mM HEPES and 1 mM sodium pyruvate.

2.3. Cell cytotoxicity and caspases 3/7 activation

Cytotoxicity was assessed by measuring the liberation of lactate dehydrogenase following membrane damages with the CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Madison, WI). Briefly, HepG2 were seeded at 20 000 cells per well and then exposed during 24 hours to increasing concentrations of parent molecules and corresponding aldehydes (1 to 100 μ M and 1 to 50 μ M for pazopanib due to its limited solubility in aqueous media). Incubations with DMSO maximal amount (according to the assay) was used as negative control and Triton® X-100 was used as positive control. This assay was performed with and without 250 μ M of BSO, an agent that induces intracellular glutathione depletion. Fluorescence (560/590 nm) was measured using a Clariostar plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) and data were integrated with the Mars Data Analysis software (v.1.51, BMG Labtech). In parallel, to investigate the mechanisms of metabolite-induced cell-death and particularly apoptosis, caspases 3/7 activity was measured with the Caspase-Glo® 3/7 assay (Promega) which provides a proluminescent caspase-3/7 DEVD-aminoluciferin substrate cleaved by caspases into a luminescent product. Proportional luminescence was recorded using a plate reader.

2.4. ATP-content measurement in viable cells

In order to evaluate the impact of compounds on cells energetic production, the intracellular ATP was measured in HepG2 cultured in high-glucose or galactose media. When cultured in glucose, cells have the ability to produce ATP from glycolysis and in lesser extent from oxidative phosphorylation. However, reducing the amount of glucose and replacing it by galactose forces the cells to switch the ATP production by relying only on the second process (known as the Warburg effect, specific to immortalized

cell lines¹⁶), allowing the identification of potential toxicants for mitochondria¹⁷. ATP content was measured by using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) that generates a luminescent signal proportional to the amount of intracellular ATP after inducing cell lysis.

2.5. Evaluation of mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was assessed by measuring the oxygen consumption rate (OCR) in HepG2 with the Seahorse XF Cell Mito Stress Test by using a Seahorse XF24e analyzer (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA). Cells were seeded at the concentration of 20 000 cells/well and were allowed to adhere overnight in high-glucose medium. Cells were exposed to aldehydes at increasing concentrations (1-40 μM) during 24 hours. One hour before the experiment, medium was replaced by low glucose specific medium supplemented with pyruvate 1 mM, glutamine 2 mM and glucose 10 mM (Agilent, Santa-Clara, CA, USA). NaOH 0.1 M was used to adjust the pH to 7.4. The plate was incubated at 37°C, 0% CO₂ during one hour. Inhibitors of the mitochondrial respiratory chain were prepared in the fresh-made low-glucose medium. Basal respiration was assessed in every condition, followed by the sequential addition of oligomycin (2 μM), that inhibits the F₀-F₁-ATPase. Then, the uncoupler carbonyl cyanure m-chlorophenylhydrazone (CCCP, 2 μM) was added to stimulate the electron transport chain. Finally, rotenone and antimycin A (0.5 μM each) were added to assess the extra-mitochondrial respiration by inhibiting the complexes I and III, respectively. OCR was measured during 96 minutes and data were normalized to the protein content measured with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher).

2.6. Mitochondrial superoxide accumulation

The accumulation of mitochondrial superoxide was assessed in live cells by using the MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Invitrogen) which is selective of mitochondria superoxide

production. Cells were exposed to an increased range of reactive metabolites (1-50 μM) in presence or absence of BSO. Rotenone (50 μM) was used as positive control. After treatment, cells were gently washed with PBS and covered with 2.5 μM of MitoSOX reagent in PBS. Fluorescence was recorded after incubation at 510/580 nm and data were normalized to the protein concentration.

2.7. *SOD1* and *SOD2* gene expression

Quantitative PCR was used to measure the expression of superoxide dismutases 1 and 2 genes (*SOD1* and *SOD2*, respectively) in response to the exposure of HepG2 cells to 20 μM of sunitinib, pazopanib, S-CHO or P-CHO during 2 and 6 hours. DMSO 0.1% was used as control. β 2-microglobulin (*B2M*) was used as the reference gene and primers were designed with BLAST (*B2M*, forward 5'-TGAGTGCTGTCTCCATGTTTG-3' and reverse 5'-TCTGCTCCCCACCTCTAAGTT-3'; *SOD1*, forward 5'-GCAGGTCCTCACTTTAATCC-3' and reverse 5'-GCCACACCATCTTTGTCA-3'; *SOD2*, forward: 5'-GGGTTGGCTTGGTTTCAA-3' and reverse 5'-GTGCTCCCACACATCAATC-3'). RNA was extracted from HepG2 cultured in glucose or galactose with Qiagen RNEasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcription was performed with the Biorad iScript™ reverse transcription supermix (Biorad, Hercules, CA) according to manufacturer's indications. Quantitative PCR mix was prepared with SYBR® Green Master Mix (Biorad), 20 μM of corresponding forward and reverse primers and free-DNase water. Analyses were performed in triplicates and repeated on two distinct RNA extractions. Expression levels were calculated with the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method, by using the DMSO 0.1% sample as the calibrator, considering a PCR efficiency of 100%¹⁸.

2.8. Assessment of *in vitro* formation of reactive metabolites

For microsomal incubations, a mixture containing 2 mg/mL of pooled human liver microsomes (ref. #452161, Corning, Bedford, US), NADPH regenerating solutions A (20X, 12.5 $\mu\text{L}/250 \mu\text{L}$, ref. #451220, Corning) and B (100X, 2.5 $\mu\text{L}/250 \mu\text{L}$, ref. #451200, Corning) was prepared in a warm phosphate buffer (0.1M, pH = 7.4, 37°C). Final volume was 250 μL after the addition of sunitinib and pazopanib at the concentration of 20 μM (total amount of DMSO <0.2%). Negative control was microsomes without NADPH. The reaction was stopped by the addition of 250 μL of acetonitrile to precipitate proteins. The mixture was centrifuged at 10 000 g during 15 minutes. Supernatant was filtered with a tuberculin 2.0 mL syringe and a Nylon Acrodisc® Syringe filter (0.2 μM , 13 mm, Waters, Milford, MA) before analysis by UPLC/MS-MS. The same protocol was conducted with human liver cytosol (Corning® UltraPool™ cytosol human liver 150 donors pool, ref. #452115) in phosphate buffer (pH = 8.0).

2.9. Proteomic analysis of microsomal fraction

To identify the interaction sites of aldehydes metabolites with proteins, a proteomic analysis was conducted. Briefly, 20 μM of P-CHO and S-CHO were incubated with microsomes (0.25 mg/ml, final volume of 50 μL). Protein covalent irreversible binding by reductive amination was allowed by the sequential addition of 0.5 μL of NaBH₃CN (1.25 M solution in methanol) every 30 minutes during 2 hours. Protein purification was made by one-dimension polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) with use of sodium dodecyl sulfate. The bands were reduced and alkylated by D, L-dithiothreitol DTT (10 mM) and 2-chloroacetamide (55mM) and were digested with trypsin. Peptides were diluted in buffer containing 10% ACN and 0.05% trifluoroacetic acid. Samples were analyzed by capillary-LC-MS/MS with a Triple TOF 5600 system (data dependent acquisition mode). Peptide identification was performed with MSFragger database search tool applied to the SwissProt human database coupled to a research in the Protein DataBank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>)¹⁹.

2.10. Measurement of CYP3A4 activity

In order to evaluate the effect of aldehydes on the activity of CYP3A4, we co-incubated recombinant CYP3A4 (0.25 mg/mL) with pazopanib or P-CHO at increasing concentrations (up to 50 μ M for pazopanib and up to 100 μ M for P-CHO). Ketoconazole 50 μ M was used as a positive control. CYP3A4 activity was measured with the P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Promega) during a short incubation of 30 minutes at 37°C, according manufacturer's indications.

2.11. Mitochondria isolation and proteolytic digestion

Mitochondria isolation was performed with the Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells of ThermoFisher. Briefly, 6.10⁶ HepG2 cells were harvested and treated with pazopanib or sunitinib aldehyde metabolite during 24 hours. After mitochondria isolation, protein digestion was conducted as previously described in this study⁷. Briefly, after reductive amination and denaturation, proteins were digested with a cocktail of proteolytic enzymes (trypsin, chymotrypsin and pronase E). The mixture was kept overnight at 37°C and centrifuged at 10 000g during 15 minutes. After filtration, the supernatant was analyzed by UPLC/MS-MS to identify amino acids adducts on mitochondrial proteins.

2.12. Patients and hepatotoxicity data

Plasma samples of 15 patients treated with pazopanib for mRCC were collected during the SUP-R clinical trial (EUDRACT 2015-001051-68, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France). This pilot study is a national prospective, non-interventional, open-labelled and non-comparative trial that aimed to evaluate sunitinib and pazopanib pharmacokinetics parameters and toxicity. According to the protocol, patients were sampled the first day (D) of the first cycle (C) of treatment (C1D1) before the intake

(T0), then, 2, 4, 6 and 8 hours after the intake (T2, T4, T6, T8). This, was repeated at T0, T2 and T6 for the 15th day of cycle 1 (C1D15) and cycle 2 (C2D1 and C2D15).

Patients' characteristics were collected before the inclusion and along the treatment. Hepatotoxicity was evaluated by assessing hepatic biochemical parameters. Correlation between plasma concentrations of P-CHO and levels of biological liver parameters like transaminases (aspartate aminotransferases, AST and alanine aminotransferases, ALT), plasma bilirubin, alkaline phosphatases, serum albumin and gamma-glutamyltransferases (γ -GT) was evaluated and graded according the Common Terminology Criteria for Adverse Event (CTCAE) v.4.03.

2.13. Preparation of UPLC/MS-MS plasma samples for aldehyde quantification

Plasma extraction was conducted with 250 μ L of plasma collected from the whole-blood samples. Proteins were precipitated with 750 μ L of acetonitrile and samples were centrifuged at 1500 g during 20 minutes at 4°C. For samples from patients who received pazopanib, supernatant was dried at 37°C until complete solvent evaporation. Extract was dissolved in a mixture composed of 75% methanol and 25% aqueous mobile phase, filtered and analyzed. For P-CHO quantification, plasma P-CHO solutions (0.49 to 250 ng/mL) were prepared with pure synthetic standard and extracted extemporaneously as mentioned above. Three working solutions at three different concentrations for the low, medium and high quality controls (QC) were prepared at 2.5 ng/mL (low QC), 40 ng/mL (medium QC) and 200 ng/mL (high QC) and extracted likewise. Experimentation was validated when at least 2 out of 3 QC samples were $\pm 15\%$ of the targeted value for medium and high QC and $\pm 20\%$ for low QC. Of note, plasma concentrations of pazopanib were previously assessed according a published procedure planned for the SUP-R study^{20,21}.

Following the observation of traces of aldehydes in microsomal control incubations without NADPH (*i.e.*, non-functional system), five tablets of Votrient® 200 mg were crushed in fine powder. An equivalent of 2.5 mg of pazopanib was then completely dissolved in DMSO to obtain a solution of 1 mg/mL.

The resulting solution was filtered through 0.22 μm membrane filter and diluted at 30 000 ng/mL in ACN and analyzed by UPLC/MS-MS. Plasma samples were prepared likewise and then extracted by ACN precipitation.

For sunitinib, the entire content of a 25 mg capsule of Sutent® was dissolved in DMSO to obtain a sunitinib solution of 5 mg/mL. After complete dissolution, the stock solution was filtered and diluted at the concentration of 1 mg/mL in DMSO. A solution at 10 000 ng/mL was prepared in acetonitrile in order to assess the amount of sunitinib aldehyde residue in powder. A similar sample was prepared in plasma and extracted like patients' samples.

2.14. UPLC/MS-MS analysis

Extracted plasma samples and metabolism incubations analyses were performed by UPLC/MS-MS, as previously described⁴¹⁷. Briefly, an UPLC Waters Acquity system equipped with a Waters TQ-S micro mass spectrometer (triple quadrupole detector) added to an electrospray ionization source (ESI) was used for the analyses. About the chromatographic separation, a linear gradient was used for the elution of components with sequential changes in the proportion of aqueous eluent (ammonium formate in ultrapure water, pH = 3.2) and organic eluent (acetonitrile with formic acid 0.1% (v/v)). Data were managed by the MassLynx software (version 4.2, Waters, Milford, MA). Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for mass spectrometry detection. MRM characteristic transition used for detection of pazopanib was 438.0>357.0 (loss of SO_2NH_2). P-CHO was characterized by 452.0>328.0 (loss of SO_2NH_2 , CHO and CH_3) and 452.0>343.0 (loss of SO_2NH_2 and CHO moieties). S-CHO was detected with the following transitions: 413.1>340.1 (loss of $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 413.1>297.1 (loss of $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ - $(\text{CH}_2)_2$ -NH-CO) and 413.1>268.1 (cleavage of the amide bond and loss of aldehyde moiety). Transition 399.2>326.0 was used to detect sunitinib and 371.1>283.0 for its main metabolite N-desethyl sunitinib. Two previously described alcohol derivatives of pazopanib were also detected (P-OH1 454.0>373.0, P-OH2 454.0>436.0)⁴¹⁶. For the protein digestion, adducts to lysine were sought with 582.0>436.0 for P-

CHO and for 543.0>326.0 S-CHO. Arginine adducts were detected with 610.0>436.0 for P-CHO and 571.0>175.0 for S-CHO.

2.15. Statistical analyses

All experiments were conducted three times so that the data are given as the mean \pm standard error of the mean (SEM), except where indicated. Statistical analyses were performed with R software (v.4.1.0) and plots were created with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). One-way ANOVA followed by Dunnett's posttest procedure was used for the comparison to vehicle control. Two-ways ANOVA followed by Bonferroni's posttest procedure was used to compare multiple conditions. A *P* value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Pazopanib and sunitinib aldehydes alter membrane integrity and activate apoptosis in HepG2 cells

To evaluate the direct cytotoxicity of the two aldehydes of pazopanib and sunitinib (P-CHO and S-CHO, respectively), LDH release was measured in HepG2 cells exposed to increasing concentrations of molecules during 24 hours. As presented on Figure 1A, pazopanib did not affect the cell viability at any concentration (note that maximal concentration tested for pazopanib was 50 μM , due to pazopanib solubility limit). In contrast, P-CHO started to be slightly cytotoxic at the concentration of 50 μM with a significant difference at this concentration compared to pazopanib. To clarify the cell-death mechanism following aldehydes exposure, caspases 3/7 activity was measured and put in perspective of the LDH release. As shown in Figure 1C, pazopanib did not activate caspases 3/7 whereas P-CHO increased nearly 2-fold caspases-dependent cleavage of the pro-luminescent substrate at the starting concentration of 75 μM . For sunitinib and S-CHO, both started to induce cell lysis at 50 μM but sunitinib was more cytotoxic than its aldehyde derivative ($p < 0.01$) (Figure 1B). Finally, in Figure 1D, the two molecules activated apoptosis in a concentration-dependent way, however, sunitinib induced caspases activity more importantly than S-CHO at 50 and 75 μM . S-CHO increased caspases-dependent cleavage since 20 μM and a switch to a higher effect of S-CHO was observed at the highest concentration tested (100 μM). These results indicate a slight effect of S-CHO and P-CHO on cell viability and activation of apoptosis cell-death mechanism.

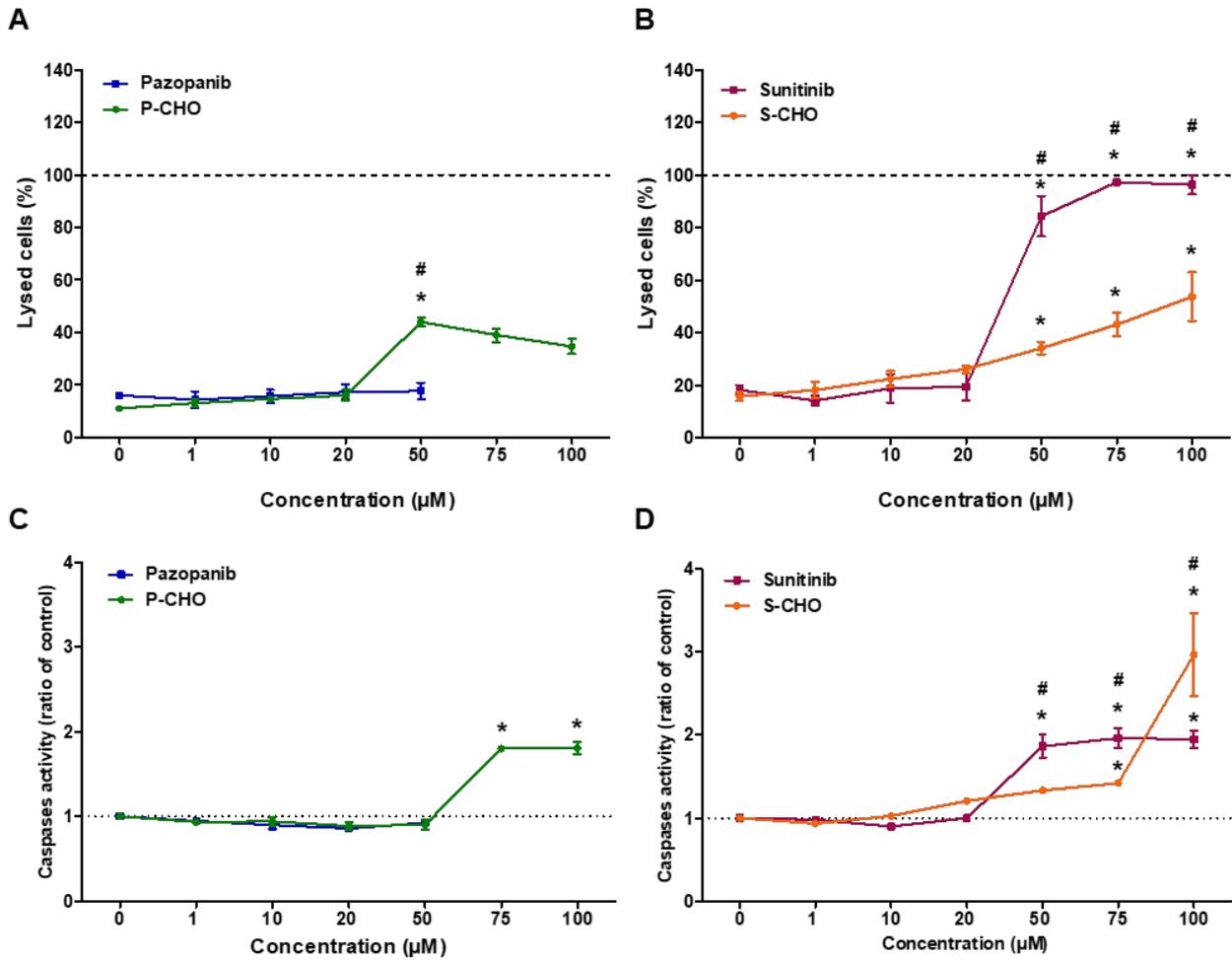


Figure 1: Pazopanib, sunitinib and related reactive aldehyde cytotoxicity on HepG2 cells and activation of caspases 3/7 cleavage. LDH accumulation was measured after incubation with increasing concentrations of (A) pazopanib or P-CHO and (B) sunitinib or S-CHO during 24 hours. Caspases 3/7 activity was measured in the same conditions (C and D). All data are expressed as a percentage of vehicle control (DMSO 0.2%). * $P < 0.05$ compared to control, # corresponds to the comparison between parent molecules *versus* aldehyde metabolites.

3.2. Alteration of the mitochondrial function and structure in the presence of aldehydes

Mitochondrial respiration was assessed by using a Seahorse XF24e analyzer to measure the oxygen consumption rate (OCR) of HepG2 cells exposed to aldehydes. P-CHO and S-CHO effects on respiratory capacity were tested at concentrations that did not affect cell viability ($< 50 \mu\text{M}$). As presented in Figure 2A, P-CHO initially increased the respiratory function of the mitochondria and a slight but significant decrease was observed from $10 \mu\text{M}$ to $40 \mu\text{M}$ especially for the basal respiration and the ATP production. S-CHO did not affect the function of the respiratory chain until 30 and $40 \mu\text{M}$ for which a significant decrease in maximal respiratory capacity was observed (Figure 2B).

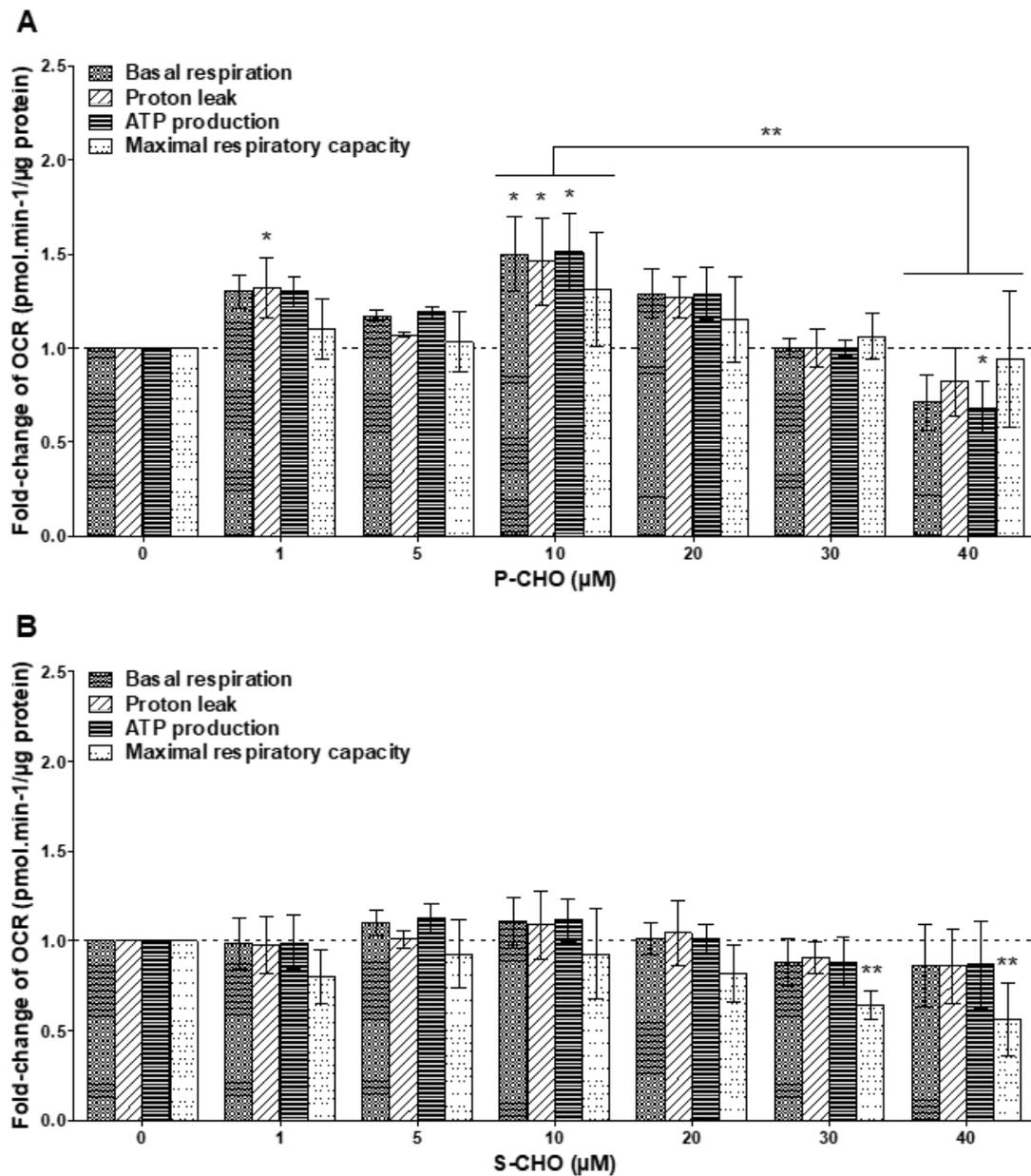


Figure 2: Alteration of the functions of the mitochondrial respiratory chain in HepG2 cells. Oxygen consumption rate (OCR) was measured in cells after exposure to (A) P-CHO or (B) S-CHO at increasing concentrations during 24 hours. Data represent the mean \pm SEM of fold-change of OCR to vehicle control (DMSO 0.1%) measured for basal respiration, proton leak, ATP production and maximal respiratory capacity for three independent experiments. * Represents a $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to the control condition.

Protein digestion of mitochondria isolated from HepG2 cells exposed to 20 μ M of P-CHO or S-CHO during 24 hours were analyzed by UPLC/MS-MS. Traces of arginine and lysine adducts were detected in the mitochondrial mixture of S-CHO but no adducts were observed in the P-CHO incubation (data not shown).

3.3. Alteration of the ATP content

Figure 3 shows the ATP content of HepG2 cells cultured in galactose and high-glucose DMEM and exposed to pazopanib, sunitinib and aldehyde derivatives.

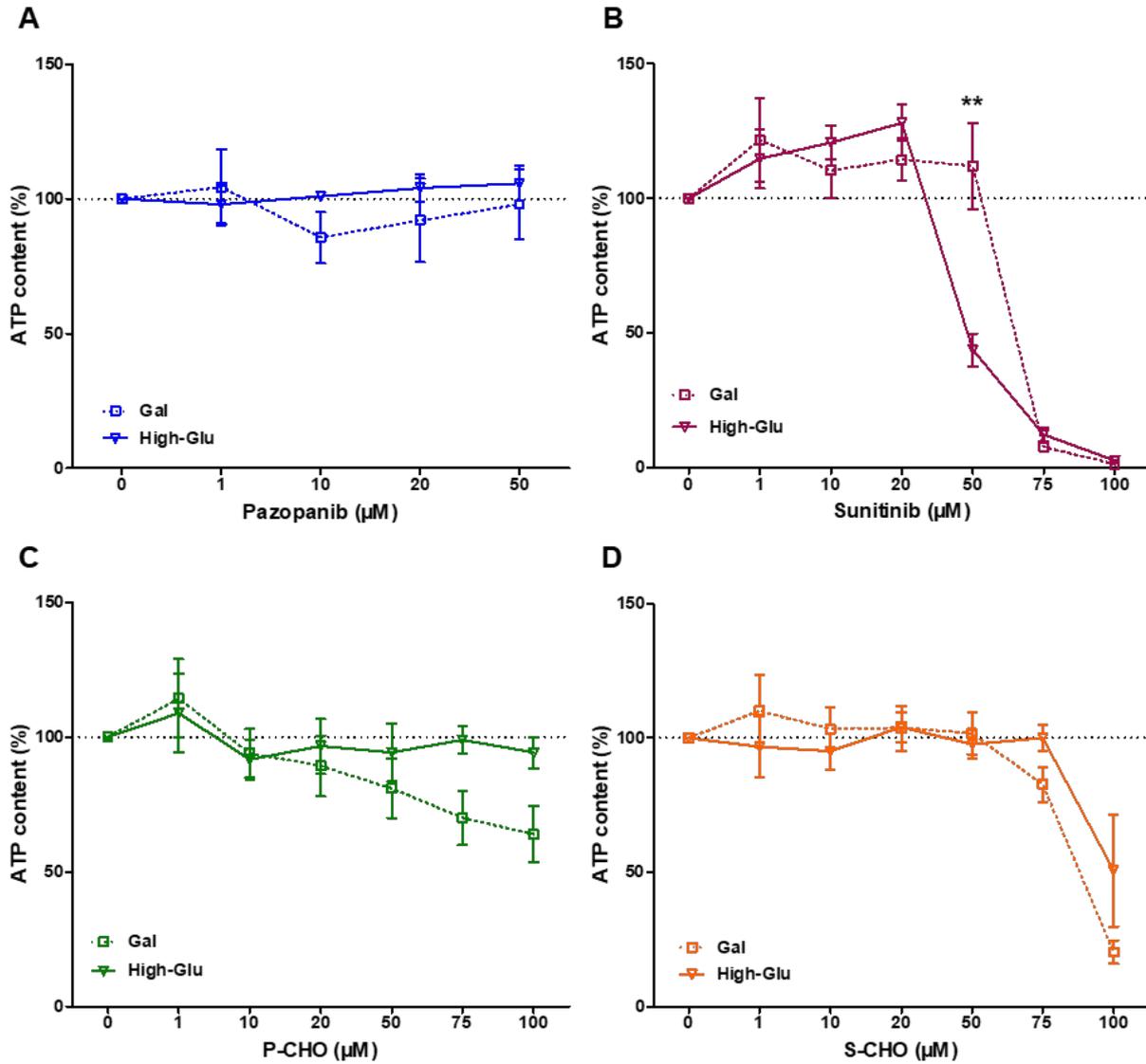


Figure 3: ATP content in HepG2 cells exposed to pazopanib (A) and P-CHO (C) and to sunitinib (B) and S-CHO (D) in high glucose medium (4.5 mM, High-Glu, solid line) or galactose medium (10 mM, Gal, dot line). ATP content was measured in HepG2 cultured in the two different media and exposed to increasing concentrations of tested compounds during 24 hours. All data are expressed as a percentage of vehicle control (DMSO 0.2%). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for comparison between galactose and high-glucose conditions.

First observation is that pazopanib did not affect the ATP content of HepG2 (Figure 3A) whereas P-CHO induced a concentration-dependent decrease in ATP starting at 20 μ M especially in HepG2 cultured in galactose (Figure 3C, non-significant difference). Figure 3B and 3D show that both sunitinib and its aldehyde induced an important decrease in ATP content, consistent with the observed cytotoxicity starting at 50 μ M. However, HepG2 cells cultured in high-glucose medium were more sensitive to sunitinib compared to the glucose-depleted condition ($p < 0.01$), which was unexpected, but consistent with the loss of viability observed in the previous cytotoxicity assay. Finally, S-CHO depleted 80% of the ATP of HepG2 cultured in galactose, whereas it only affected less than 50% of the viability of the hepatocytes (Figure 3D).

3.4. Effects of aldehydes on the production of mitochondrial superoxide

Ability of toxicants to interfere with mitochondria can result in the increase of reactive oxygen species (ROS), including mitochondrial superoxide, and this, particularly when complexes III and I are inhibited. Glutathione, which is produced in cells, acts as a protectant through its conjugation to reactive molecules (like quinoneimines or aldehydes) and the reduction of reactive oxygen species. In order to evaluate the production of oxidative species, HepG2 cells were exposed to increasing concentrations of P-CHO and S-CHO with or without L-buthionine sulfoximine (BSO), which inhibits the γ -glutamyl-cysteine synthetase, the rate-limiting enzyme for the synthesis of glutathione (GSH) and reduces cellular GSH levels. Figure 4 shows that compared to vehicle control, in most cases, cell cytotoxicity was higher with BSO even in the control condition containing 0.2% of DMSO.

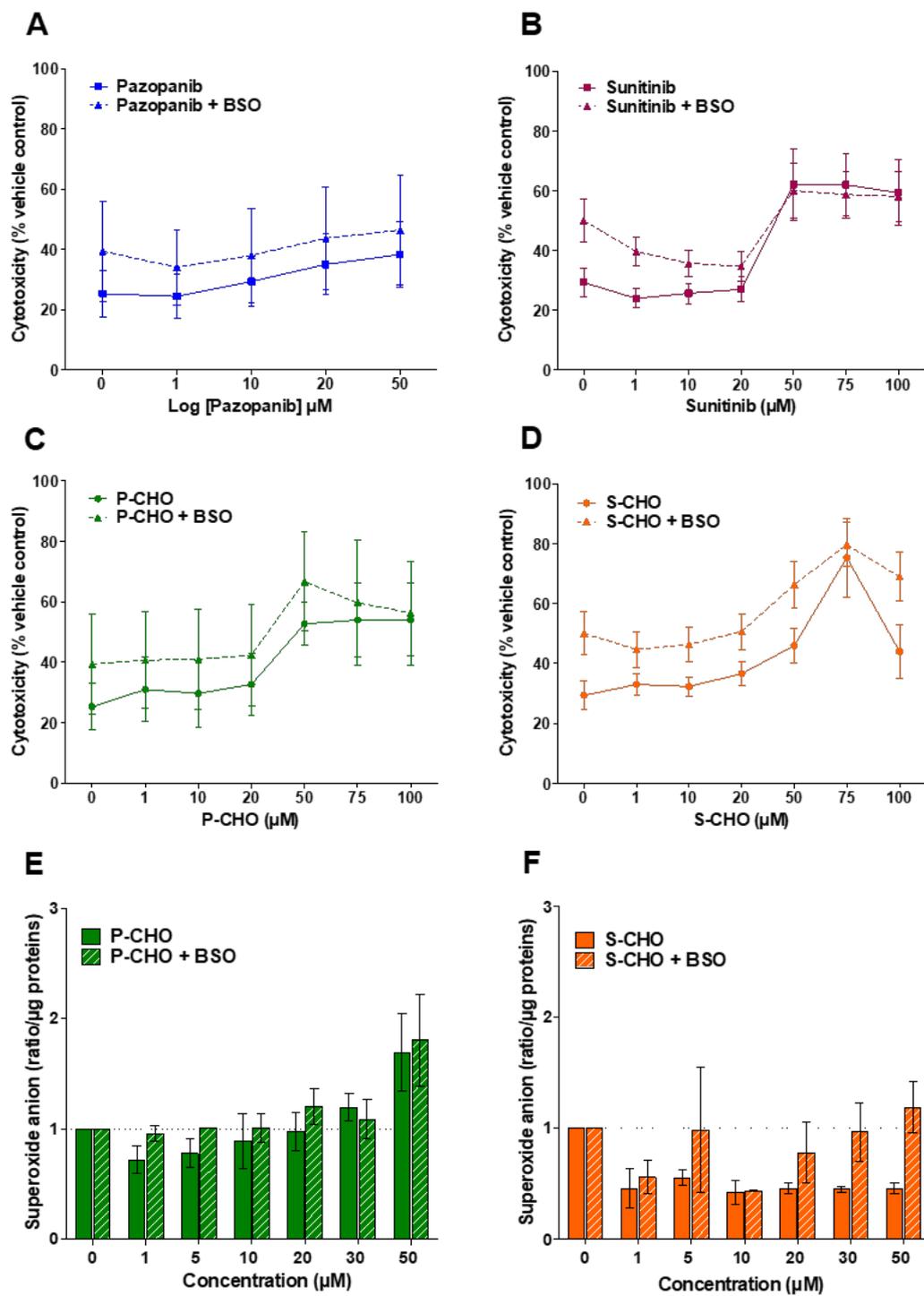


Figure 4: Effect of the glutathione depletion in HepG2 cells. Cytotoxicity was measured in HepG2 pre-incubated with 250 μM of BSO after exposure to pazopanib (A), sunitinib (B), P-CHO (C) and S-CHO

(D) during 24 hours. Accumulation of mitochondrial superoxide was measured after exposure to increasing concentrations of P-CHO (E) or S-CHO (F) with or without BSO during 24 hours of treatment. Data are compared to the control condition (0.2% DMSO).

Sunitinib alone induced even more cytotoxicity in normal condition than in the GSH depleted condition (Figure 4B). For the other molecules, similar cytotoxicity ratios (with BSO/without BSO) were observed at every concentration tested (Figure 4A, 4C and 4D) which eliminates a protective effect of GSH against the drug or metabolite cytotoxicity. Accumulation of superoxide was measured in HepG2 cells in presence and absence of BSO. As shown in Figure 4E, the production of superoxide slightly increased in a concentration-dependent manner in cells exposed to P-CHO, with an equivalent accumulation in presence or absence of BSO. S-CHO treatment was not followed by an accumulation of reactive mitochondrial species in normal conditions, however, the depletion in glutathione seemed to favor the accumulation of specific superoxide, as it could not be taken in charge by antioxidant agents.

3.5. *SOD1* and *SOD2* expression in response to reactive metabolites exposure

Accumulation of reactive species may result in a higher expression of enzymes like superoxide dismutases 1 and 2 that have been respectively described as cytoplasmic and mitochondrial stress biomarkers. In order to evaluate these two types of stress, expression of *SOD1* and *SOD2* was measured by quantitative reverse-transcription PCR in HepG2 cells exposed to 20 μ M of pazopanib, sunitinib or respective aldehydes in galactose and high-glucose conditions during 2 and 6 hours. As shown in Figure 5, the mRNA expression of *SOD1* was not affected by the treatment with any molecule. However, *SOD2* gene expression was nearly two-times increased in cells exposed to pazopanib and sunitinib and respective aldehydes (Figure 5B and 5D). A higher expression of *SOD2* was observed in cells cultured in galactose and exposed to P-CHO (Figure 5B). Equivalent expression was found for cells treated with S-

CHO, regardless of the type of medium. However, the high variability obtained for the galactose condition prevents from a strong interpretation of the expression of *SOD2* in response to the toxicants.

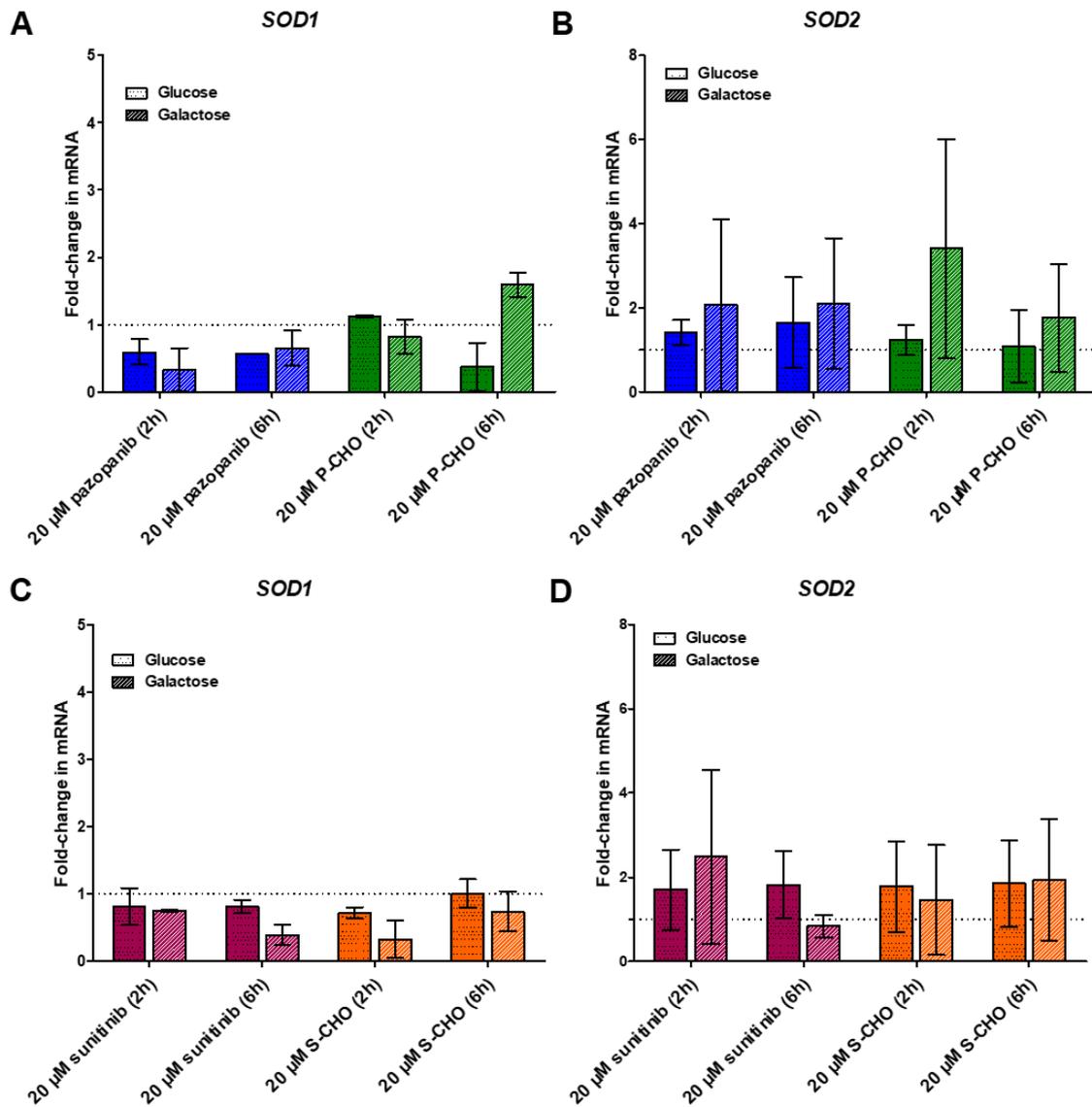


Figure 5: *SOD1* and *SOD2* response to accumulation of reactive species in HepG2 cells. Relative gene expression of *SOD1* (A and C) and *SOD2* (B and D) was measured after incubation with 20 μ M of pazopanib, sunitinib, P-CHO and S-CHO. Expression levels are expressed as a fold-change compared

to control (calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method). Data represent the mean \pm SEM in HepG2 cells cultured in high-glucose or galactose media.

3.6. CYP450 involvement in the biological metabolic pathway of aldehydes formation

As pazopanib and sunitinib aldehydes were obtained with a porphyrin catalytic system mimicking P450 metabolism, the first hypothesis emerging from the work of Paludetto et al.⁷ was that reactive metabolites production depends on the CYP450 metabolism. The use of recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) in their previous work led them to identify this enzyme as a possible major determinant of the aldehyde production. To complete and confirm these observations, we incubated pazopanib and sunitinib with hepatic microsomes and cytosolic fraction. After a 90 minutes incubation with or without CYP450 inhibitors (ketoconazole 50 μ M and aminobenzotriazole, ABT, 500 μ M) or cytosolic alcohol dehydrogenase inhibitor 4-methylpyrazole (4-MP, 500 μ M), the amounts of parent molecules and their related metabolites were evaluated by measuring the area for each compound (obtained by UPLC-MS analysis) and compared with the area obtained for the control condition (*i.e.*, microsomes without the NADPH regeneration system) (Figure 6).

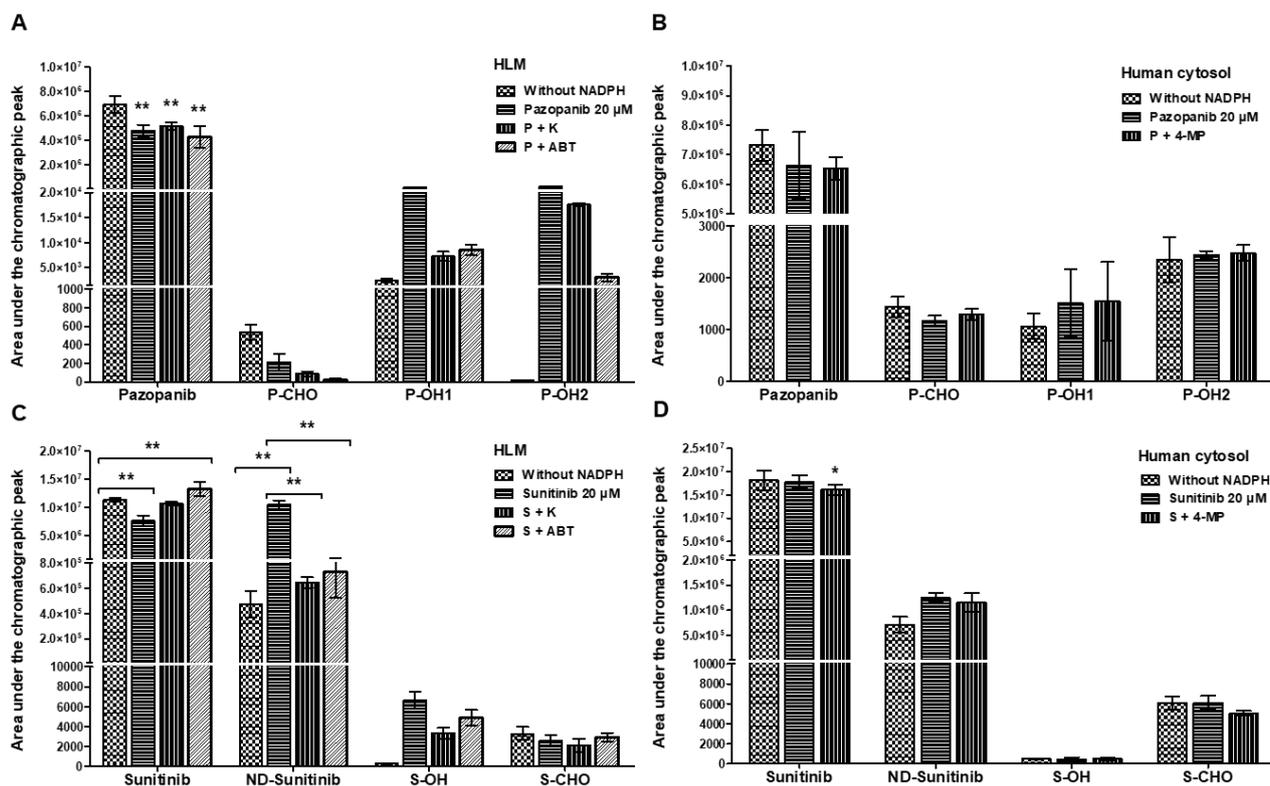


Figure 6: Microsomal and cytosolic incubations of pazopanib (A, B) and sunitinib (C, D). Data represent the mean \pm standard deviation of the area under the chromatographic peak of the detected metabolites of pazopanib (P-CHO and pazopanib alcohol derivatives, P-OH1 and P-OH2) and sunitinib (N-desethyl (ND) sunitinib, S-CHO and sunitinib alcohol, S-OH) for at least three independent experiments. Human liver microsomes (HLM) were co-incubated with 50 μ M ketoconazole (K) or 500 μ M aminobenzotriazole (ABT). Cytosolic fractions were co-incubated with 4-methylpyrazole (4-MP) 500 μ M. Negative control corresponds to microsomes or cytosol without any regeneration system of NADPH (without NADPH condition). Two-ways ANOVA was performed between condition and negative control. * Represents a significant P value < 0.05 , ** < 0.01 .

As depicted in Figure 6A, pazopanib aldehyde was surprisingly at its highest level in the negative control condition and when adding NADPH, aldehyde signal was reduced. In addition, treatment with ketoconazole (an inhibitor of CYP3A4) or ABT (a pan-inhibitor of cytochromes) decreased even more the aldehyde detected signal. Furthermore, the two pazopanib-derived alcohol P-OH1 and P-OH2 were highly produced in the functional microsomes and their production was inhibited by ketoconazole (which targets CYP3A4), especially for P-OH1, whereas P-OH2 was less affected by this inhibitor. However, the decrease of P-OH2 signal in presence of ABT supports the implication of cytochromes in its production. As aldehyde could result from the oxidation of an alcohol, we incubated pazopanib with a cytosolic fraction containing oxidative enzymes as the alcohol dehydrogenase (ADH) (Figure 6B). Inhibition of the enzyme with 4-MP did not increase the production of the metabolite neither it decreased the quantity of the two pazopanib alcohol metabolites.

Regarding sunitinib, its main metabolite N-desethyl sunitinib was importantly produced in the functional microsomes and production was inhibited in presence of CYP450 inhibitors (Figure 6C). Same results were observed at lower levels for sunitinib alcohol derivative; however, as observed for P-CHO, S-CHO signal was at its highest level in the control condition (nonfunctional microsomes) and it was stable between the different conditions, including in the cytosolic fraction (Figure 6D), without being affected by the presence of inhibitors.

3.7. Pazopanib aldehyde interaction with proteins and significance for drug-drug interactions

As Paludetto et al.⁴¹⁷ described that reactive aldehydes could covalently interact with lysine residues, we incubated the two aldehydes with microsomes in reductive condition to conduct a mass spectrometry-based proteomic analysis. A fragmented peptide (EELAQFHRDGALTQLNVAFSR) belonging to the

CYP450 coenzyme NADPH-cytochrome P450 reductase (NCPR_HUMAN) has been shown to be modified by P-CHO in the histidine at position 583. However, no relevant result was observed for sunitinib aldehyde.

We performed short incubations (30 minutes) with rCYP3A4 and increasing concentrations of pazopanib or P-CHO by measuring the catalytic activity of the enzyme with a specific pro-luminescent substrate (proluciferin converted into D-luciferin). Results depicted in Figure 7 showed that pazopanib did not affect the activity of CYP3A4. However, the activity of the enzyme was affected since the lowest concentration of P-CHO (1 μ M) and was clearly reduced at the highest concentration.

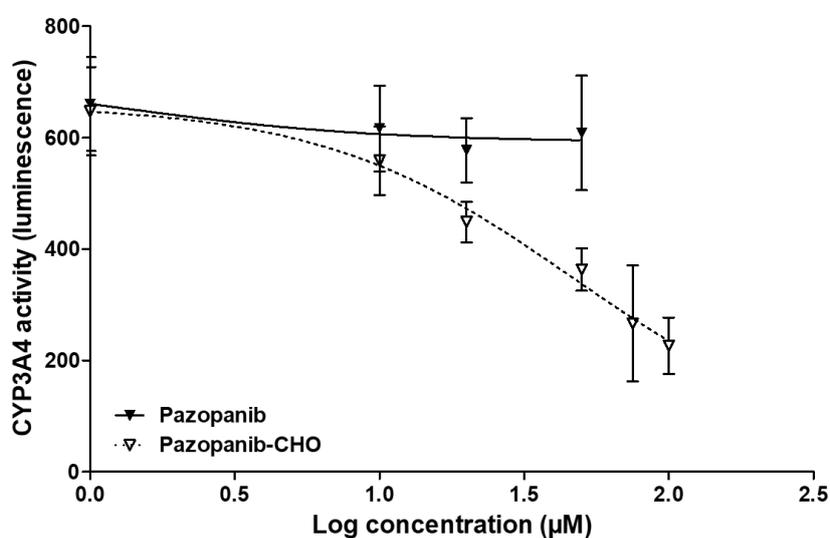


Figure 7: Evaluation of the effect of pazopanib and P-CHO on the activity of recombinant CYP3A4 (rCYP3A4). Data are expressed as the raw luminescence signal produced after incubation of rCYP3A4 with the pazopanib (solid line) or P-CHO (dot line) at increasing concentrations compared to basal luminescence, representing basal CYP3A4 activity (mean \pm SEM of triplicates).

3.8. Clinical relevance of aldehydes related hepatic toxicity

In order to determine if clinical hepatotoxicity reported for pazopanib could rely on the production of its aldehyde derivative, we assessed the concentration of P-CHO in the plasma as a possible reflect of patients' exposure. Concentrations profiles of both molecules extracted from the plasma of 15 patients included in the SUP-R (EUDRACT 2015-001051-68) clinical trial are showed in Figure 8. The concentrations of P-CHO were very low compared to those of pazopanib but the patients' kinetic profiles were similar. Median ratio between P-CHO and pazopanib was 0.026% [min = 0.009%; max = 1.924%]. A Spearman correlation test was performed between the concentrations of pazopanib and those of P-CHO, revealing a strong association ($\rho = 0.75$, p value $< 2.2e^{-16}$).

In the pazopanib cohort, five patients among 15 had at least one abnormality of its liver biochemistry (all grades and all cycles included) but among them, only one patient experienced a severe hepatotoxicity, characterized by a severe elevation ($>$ grades 3-4) of its transaminases (AST and ALT) and γ -GT (9.3, 8.6 and 3.4 times the upper normal limit ULN, respectively) observed at the beginning of cycle 2. Furthermore, P-CHO mean plasma concentration in these five patients at C1D15, before administration (T0) was of 9.16 ng/mL (standard deviation SD = 3.65 ng/mL), and 7.21 ng/mL (SD = 3.35 ng/mL) for patients who did not. The difference between the respective concentrations of the two groups was not significant (Wilcoxon's test p value = 0.639).

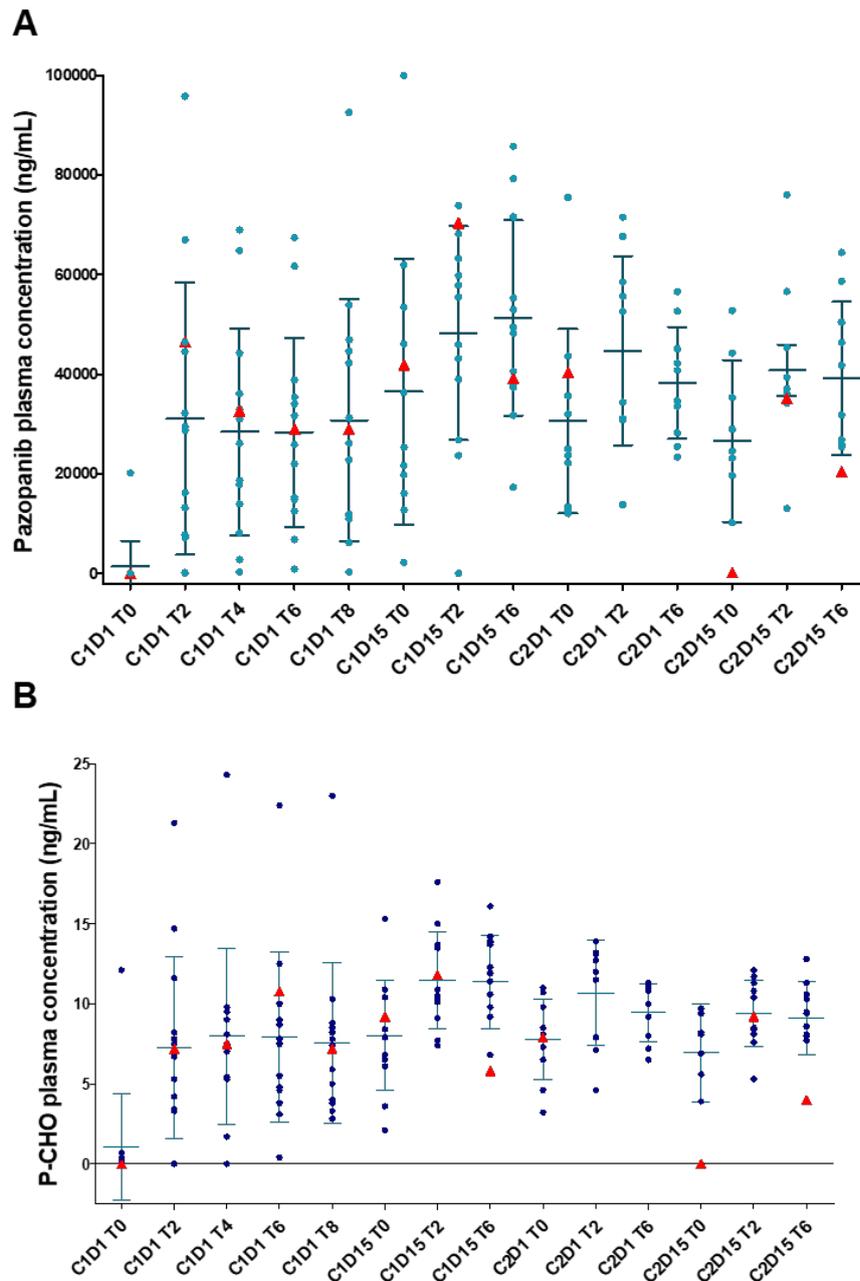


Figure 8: Pharmacokinetics profile of pazopanib and P-CHO measured by UPLC/MS-MS. Data represents the concentrations of pazopanib (A) and P-CHO (B) measured in the plasma of 15 patients who received pazopanib 800 mg/day. In red triangles, the concentrations of the patients who experienced severe hepatotoxicity at cycle 2 of pazopanib. Samples at C2D1T2 and T6 were not available for this patient. C1, C2: therapy cycle 1 or 2; D1, D15; first day of cycle, 15th day of cycle; T0, T2, T6, T8: time of sampling, in hours.

Based on our previous observation in microsomes (*i.e.*, there was no increase of pazopanib aldehyde signal in functional microsomes compared to control incubations) and the fact that P-CHO has been reported as a photodegradation product of pazopanib²², the question of its origin arose and led us to verify its absence in the drug tablet or solution.

Aldehyde amount, expressed as a ratio of the parent compound, was very low in a plasma sample spiked with pazopanib extracted from Votrient® tablets (0.0037%, SD = 0.001%) and much lower than in patients' plasma samples. Similar experiment was done for sunitinib extracted from Sutent® commercialized capsule and S-CHO amount represented 0.021% (SD = 0.003%) of the amount of sunitinib, similar to the proportions found in the microsomal (0.026%, SD = 0.007%) and cytosolic incubations (0.033%, SD = 0.002%).

4. Discussion

As a major side effect of pazopanib and sunitinib, identifying the causes and risk factors of their hepatotoxicity is part of a challenge to improve its management for metastatic renal cancer patients. However, understanding the mechanistic features supporting liver damages is limited by their multifactorial origin²³.

Based on the identification of pazopanib and sunitinib reactive aldehyde metabolites¹⁰, our first objective was to assess the direct cytotoxicity of P-CHO and S-CHO on hepatocytes with a focus on mitochondria function and oxidative stress. Results showed that P-CHO induced its cytotoxic effect at high concentrations (>50 μ M) by activating the apoptosis and possibly by impairing ATP synthesis whereas pazopanib was confirmed to be nontoxic on this cell line, as previously described¹⁵.

However, this cytotoxic P-CHO concentration was much higher than the circulating concentrations observed in patients who had an impaired liver function (all grades confounded) at cycle 1 (approximately 10 ng/mL, *i.e.*, 22 nM), which rises questioning about the involvement of this cytotoxicity mech-

anism in the hepatotoxicity observed in the clinical context. Nevertheless, as the intra-cellular concentration of P-CHO is not accessible and not necessarily reflected by the circulating levels, we cannot exclude that the dysfunctions that we observed *in vitro* occur *in vivo*.

For sunitinib and its aldehyde, we observed an important concentration-dependent toxicity and activation of apoptosis, as previously showed for sunitinib by Paech et al.¹³ at clinically relevant concentration found in mice *in vivo* but far above the concentrations found in patients (C_{\max} of sunitinib $\approx 0.12 \mu\text{M}$)⁴. They also demonstrated that sunitinib can inhibit the hepatic mitochondrial proliferation and impair both glycolysis and mitochondrial respiration in HepG2 cells^{14,24}. In our study, we completed these observations by showing that its aldehyde metabolite S-CHO seemed to decrease the maximal respiration rate in a concentration-dependent way.

As a protective agent, mitochondrial glutathione GSH (which represents $10\% \pm 15\%$ of the intracellular GSH) is of paramount importance in protecting the mitochondria from reactive oxygen species (ROS) like superoxide O_2^\cdot produced during coupled mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation or after exposure to mitotoxic drugs²⁵. Here, we did not observe any effect of the GSH depletion by L-buthionine sulfoximine (which inhibits the synthesis of GSH) on the cytotoxicity. Furthermore, accumulation of superoxide was not significantly increased in HepG2 cells when glutathione was depleted, except at highest concentration of S-CHO (above $20\mu\text{M}$). That was consistent with the increased expression of the mitochondrial superoxide dismutase 2 expression which binds the superoxide bioproducts and transforms them into molecular oxygen and hydrogen peroxide. Taken together, these results demonstrated that pazopanib aldehyde may non-negligibly affect the mitochondria function, especially on the production of ATP. Concerning S-CHO, it seemed to be more implicated in the direct cytotoxicity but in a smaller degree than sunitinib itself.

It has been demonstrated that pazopanib and sunitinib aldehyde derivatives can react with lysine amine groups to give covalent adducts during *in vitro* incubation with human albumin or plasma⁷. A proteomic mass spectrometry analysis of microsomal samples incubated with these aldehydes showed

that P-CHO had the ability to covalently bind the rate limiting enzyme NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR). This rate-limiting enzyme is essential for the reaction cycle of CYP450, as it is involved in the transfer of two electrons from NADPH^{26,27}. Structural changes, whether of genetic origin or by post-translational modifications like covalent binding to structural domains, can cause important functional consequences on the function of CPR. Large adducts formed by the interaction of P-CHO with histidine 583, located in the NADPH-binding domain may interfere with this critical step of electron-transfer. This kind of noncompetitive inhibition could explain, at least in part, pazopanib-induced drug-drug interactions that involve CYP450 and termed as mechanism-based inhibition (MBI)²⁸. MBIs are characterized by a time-, concentration- or NADPH-dependent inhibition that relies on the enzymatic biotransformation of unreactive molecules into active species that inhibits the enzyme through covalent modification of the active site for example by a reactive metabolite²⁹. Our finding is congruent with the previously published observation of a time-dependent inhibition of CYP3A caused by pazopanib ($K_i = 2.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$)³⁰. The observation of a higher inhibitory effect of pazopanib aldehyde on CYP3A4 activity compared to its parent molecule can lead to consider two distinct inhibition mechanisms based on the ability of the aldehyde function to react with residues in an allosteric site (noncompetitive inhibition) or directly in the active site of cytochromes.

Assessment of the production of reactive metabolites is limited by their ability to quickly react with proteins and the small amounts detectable in the biological matrix. Pazopanib aldehyde was detected in the microsomal incubations, and even if the highest signal observed was in the control incubation, a decrease of its production was observed when cytochromes were inhibited. This suggests that a part of the aldehyde detected is probably issued from the biotransformation of pazopanib as previously hypothesized and partially demonstrated⁷. Wang et al.³¹ also detected the aldehyde derivative of pazopanib in the urine (0.2%) and the feces (<0.1%) but not the plasma of mice treated with pazopanib (300 mg/kg). Pretreatment with ABT (100 mg/kg) decreased the amount of P-CHO and its abundance in the urine of mice was significantly correlated with serum transaminases activities ($r_{\text{ALT}} = 0.76$, $r_{\text{AST}} = 0.75$, $p < 0.05$)³¹. In a study characterizing the forced degradation products of pazopanib, Patel et al.²² detected

P-CHO after exposing a neutral drug solution under intensive UV light during three days followed by an oxidation in aldehyde. Knowing this, coupled to our findings in patients and microsomes and the fact that we detected only traces of P-CHO in a solution of Votrient®, P-CHO probably also results from the oxidation of pazopanib in the organism and not only as an impurity product of the pazopanib solution. Yet, no cytochrome was identified as being responsible for the production of P-CHO but other enzymes may be involved like the alcohol dehydrogenase (known for oxidizing alcohol functions in the cytosol of hepatocytes), as previously described for the antiretroviral drug abacavir³². No correlation was observed between P-CHO circulating plasma concentrations and hepatic side effects in patients, but the circulating concentrations may just reflect, without being correlated, a localized production and accumulation in the hepatocytes which are not assessable through a plasma sampling.

Sunitinib biotransformation to oxidized products through CYP450 metabolism has been widely described both *in vitro*, *in vivo* and in humans^{33,34}. However, we did not observe any increase of the formation of S-CHO in microsomal or cytosolic incubation that could evidence its production in the liver. These results led us to hypothesize that this molecule, in addition of being a metabolite issued from the oxidation of an alcohol, could also be a potential contaminant of sunitinib powders. Yet, the formation of S-CHO may result from an oxidative biochemical process involving reactive oxygen species. Indeed, the accumulation of a reactive quinone imine issued from the defluorination of sunitinib by the CYP3A4 or CYP1A2³³ could increase the formation of superoxide $O_2^{\cdot-}$ from molecular oxygen O_2 , a mechanism already described for doxorubicin³⁵. This reported accumulation of superoxide in the hepatocytes¹³ may be followed by its spontaneous dismutation to form hydrogen peroxide H_2O_2 . This molecule can react with the remaining superoxide (or directly with the quinoneimine) to form the hydroxyl radical HO^{\cdot} in presence of iron or directly with Fe^{2+} ions to form HO^{\cdot} . In the end, this radical could participate to the oxidation of sunitinib alcohol into an aldehyde explaining its formation without involving enzymes like cytochromes.

To conclude, our work aimed to elucidate the mechanisms of toxicity resulting from the production of reactive metabolites issued from the biotransformation of sunitinib and pazopanib, which is of growing interest. Our findings demonstrate that pazopanib aldehyde exerts some cytotoxic effects at high concentration characterized by apoptosis and mitochondria dysfunction. The protein interactions observed are of importance for their involvement in clinical drug-drug interaction described for pazopanib and sunitinib. Finally, these results need further investigations to determine the origin of the aldehydes which appeared to be at the crossroads of biological and chemical mechanisms of production.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fabienne THOMAS

Laboratoire de Biologie Médicale Oncologique, secteur Pharmacologie, Institut Claudius Regaud,
IUCT-O, 31059 Toulouse, Cedex 9, France

thomas.fabienne@iuct-oncopole.fr

Author Contributions

Conceptualization: F.T., C.A., E.C.; Methodology: M.M., F.T., C.A., E.C., C.C.; Validation: F.T., C.A., E.C.; Formal analysis: M.M., C.V., F.T., C.A., F.P., N.S.L.; Investigation: M.M., C.V., T.L.; Writing - Original Draft: M.M., F.T., C.A., E.C.; Writing - Review & Editing: M.M., F.T., C.A., E.C.

Funding Sources

This work was not funded.

ACKNOWLEDGMENT

None

REFERENCES

- (1) Björnsson, E. S. Global Epidemiology of Drug-Induced Liver Injury (DILI). *Curr Hepatology Rep* 2019, 18 (3), 274–279. <https://doi.org/10.1007/s11901-019-00475-z>.
- (2) Lee, W. M. Drug-Induced Hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003, 349 (5), 474–485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021844>.
- (3) FDA. Drug Approval Package: Votrient (Pazopanib). Application number: 22-465 https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022465s000TOC.cfm (accessed 2020 -05 -10).
- (4) FDA. Drug Approval Package: Sutent (Sunitinib Malate) NDA #021938 & 021968 https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021938s000_021968s000_Stutent.cfm (accessed 2020 -05 -10).
- (5) Eno, M. R.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Cameron, M. D. P450 3A-Catalyzed O-Dealkylation of Lapatinib Induces Mitochondrial Stress and Activates Nrf2. *Chem. Res. Toxicol.* 2016, 29 (5), 784–796. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00524>.
- (6) Xie, C.; Zhou, J.; Guo, Z.; Diao, X.; Gao, Z.; Zhong, D.; Jiang, H.; Zhang, L.; Chen, X. Metabolism and Bioactivation of Famitinib, a Novel Inhibitor of Receptor Tyrosine Kinase, in Cancer Patients. *Br. J. Pharmacol.* 2013, 168 (7), 1687–1706. <https://doi.org/10.1111/bph.12047>.
- (7) Paludetto, M.-N.; Stigliani, J.-L.; Robert, A.; Bernardes-Génisson, V.; Chatelut, E.; Puisset, F.; Arellano, C. Involvement of Pazopanib and Sunitinib Aldehyde Reactive Metabolites in Toxicity and Drug-Drug Interactions in Vitro and in Patient Samples. *Chem. Res. Toxicol.* 2020, 33 (1), 181–190. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00205>.
- (8) Attwa, M. W.; Kadi, A. A.; Abdelhameed, A. S. Detection and Characterization of Olmutinib Reactive Metabolites by LC–MS/MS: Elucidation of Bioactivation Pathways. *Journal of Separation Science* 2020, 43 (4), 708–718. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900818>.
- (9) Stepan, A. F.; Walker, D. P.; Bauman, J.; Price, D. A.; Baillie, T. A.; Kalgutkar, A. S.; Aleo, M. D. Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. *Chem. Res. Toxicol.* 2011, 24 (9), 1345–1410. <https://doi.org/10.1021/tx200168d>.
- (10) Paludetto, M.-N.; Bijani, C.; Puisset, F.; Bernardes-Génisson, V.; Arellano, C.; Robert, A. Metalloporphyrin-Catalyzed Oxidation of Sunitinib and Pazopanib, Two Anticancer Tyrosine Kinase Inhibitors: Evidence for New Potentially Toxic Metabolites. *J. Med. Chem.* 2018, 61 (17), 7849–7860. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00812>.
- (11) Pessayre, D.; Mansouri, A.; Berson, A.; Fromenty, B. Mitochondrial Involvement in Drug-Induced Liver Injury. *Handb Exp Pharmacol* 2010, No. 196, 311–365. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_11.

- (12) Paech, F.; Mingard, C.; Grünig, D.; Abegg, V. F.; Bouitbir, J.; Krähenbühl, S. Mechanisms of Mitochondrial Toxicity of the Kinase Inhibitors Ponatinib, Regorafenib and Sorafenib in Human Hepatic HepG2 Cells. *Toxicology* 2018, 395, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.01.005>.
- (13) Paech, F.; Abegg, V. F.; Duthaler, U.; Terracciano, L.; Bouitbir, J.; Krähenbühl, S. Sunitinib Induces Hepatocyte Mitochondrial Damage and Apoptosis in Mice. *Toxicology* 2018, 409, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.009>.
- (14) Bouitbir, J.; Alshaikhali, A.; Panajatovic, M. V.; Abegg, V. F.; Paech, F.; Krähenbühl, S. Mitochondrial Oxidative Stress Plays a Critical Role in the Cardiotoxicity of Sunitinib: Running Title: Sunitinib and Oxidative Stress in Hearts. *Toxicology* 2019, 426, 152281. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152281>.
- (15) Mingard, C.; Paech, F.; Bouitbir, J.; Krähenbühl, S. Mechanisms of Toxicity Associated with Six Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Hepatocyte Cell Lines. *J. Appl. Toxicol.* 2018, 38 (3), 418–431. <https://doi.org/10.1002/jat.3551>.
- (16) Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956, 123 (3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- (17) Marroquin, L. D.; Hynes, J.; Dykens, J. A.; Jamieson, J. D.; Will, Y. Circumventing the Crabtree Effect: Replacing Media Glucose with Galactose Increases Susceptibility of HepG2 Cells to Mitochondrial Toxicants. *Toxicological Sciences* 2007, 97 (2), 539–547. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm052>.
- (18) Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nat Protoc* 2008, 3 (6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- (19) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000, 28 (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (20) Paludetto, M.-N.; Puisset, F.; Le Louedec, F.; Allal, B.; Lafont, T.; Chatelut, E.; Arellano, C. Simultaneous Monitoring of Pazopanib and Its Metabolites by UPLC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018, 154, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.013>.
- (21) Gallais, F.; Ysebaert, L.; Despas, F.; De Barros, S.; Dupré, L.; Quillet-Mary, A.; Protin, C.; Thomas, F.; Obéric, L.; Allal, B.; Chatelut, E.; White-Koning, M. Population Pharmacokinetics of Ibuprofen and Its Dihydrodiol Metabolite in Patients with Lymphoid Malignancies. *Clin Pharmacokinet* 2020, 59 (9), 1171–1183. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00884-0>.
- (22) Patel, P. N.; Kalariya, P. D.; Sharma, M.; Garg, P.; Talluri, M. V. N. K.; Gananadhamu, S.; Srinivas, R. Characterization of Forced Degradation Products of Pazopanib Hydrochloride by UHPLC–Q-TOF/MS and in Silico Toxicity Prediction. *Journal of Mass Spectrometry* 2015, 50 (7), 918–928. <https://doi.org/10.1002/jms.3602>.
- (23) Andrade, R. J.; Chalasani, N.; Björnsson, E. S.; Suzuki, A.; Kullak-Ublick, G. A.; Watkins, P. B.; Devarbhavi, H.; Merz, M.; Lucena, M. I.; Kaplowitz, N.; Aithal, G. P. Drug-Induced Liver Injury. *Nature Reviews Disease Primers* 2019, 5 (1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0>.

- (24) Paech, F.; Bouitbir, J.; Krähenbühl, S. Hepatocellular Toxicity Associated with Tyrosine Kinase Inhibitors: Mitochondrial Damage and Inhibition of Glycolysis. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 367. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00367>.
- (25) Armstrong, J. S.; Steinauer, K. K.; Hornung, B.; Irish, J. M.; Lecane, P.; Birrell, G. W.; Peehl, D. M.; Knox, S. J. Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation in Apoptotic Signaling in a Human B Lymphoma Cell Line. *Cell Death Differ* 2002, 9 (3), 252–263. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400959>.
- (26) Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Masters, B. S. S.; Kim, J.-J. P. Three-Dimensional Structure of NADPH– Cytochrome P450 Reductase: Prototype for FMN- and FAD-Containing Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 6.
- (27) Kandel, S. E.; Lampe, J. N. Role of Protein–Protein Interactions in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism and Toxicity. *Chem Res Toxicol* 2014, 27 (9), 1474–1486. <https://doi.org/10.1021/tx500203s>.
- (28) Watanabe, A.; Nakamura, K.; Okudaira, N.; Okazaki, O.; Sudo, K. Risk Assessment for Drug-Drug Interaction Caused by Metabolism-Based Inhibition of CYP3A Using Automated in Vitro Assay Systems and Its Application in the Early Drug Discovery Process. *Drug Metab Dispos* 2007, 35 (7), 1232–1238. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015016>.
- (29) Silverman, R. B. Mechanism-Based Enzyme Inactivators. In *Methods in Enzymology; Enzyme Kinetics and Mechanism Part D: Developments in Enzyme Dynamics*; Academic Press, 1995; Vol. 249, pp 240–283. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)49038-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)49038-8).
- (30) Kenny, J. R.; Mukadam, S.; Zhang, C.; Tay, S.; Collins, C.; Galetin, A.; Khojasteh, S. C. Drug-Drug Interaction Potential of Marketed Oncology Drugs: In Vitro Assessment of Time-Dependent Cytochrome P450 Inhibition, Reactive Metabolite Formation and Drug-Drug Interaction Prediction. *Pharm. Res.* 2012, 29 (7), 1960–1976. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0724-6>.
- (31) Wang, Y.-K.; Yang, X.-N.; Liang, W.-Q.; Xiao, Y.; Zhao, Q.; Xiao, X.-R.; Gonzalez, F. J.; Li, F. A Metabolomic Perspective of Pazopanib-Induced Acute Hepatotoxicity in Mice. *Xenobiotica* 2019, 49 (6), 655–670. <https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1489167>.
- (32) Walsh, J. S.; Reese, M. J.; Thurmond, L. M. The Metabolic Activation of Abacavir by Human Liver Cytosol and Expressed Human Alcohol Dehydrogenase Isozymes. *Chem Biol Interact* 2002, 142 (1–2), 135–154. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00059-5](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00059-5).
- (33) Amaya, G. M.; Durandis, R.; Bourgeois, D. S.; Perkins, J. A.; Abouda, A. A.; Wines, K. J.; Mohamud, M.; Starks, S. A.; Daniels, R. N.; Jackson, K. D. Cytochromes P450 1A2 and 3A4 Catalyze the Metabolic Activation of Sunitinib. *Chem. Res. Toxicol.* 2018, 31 (7), 570–584. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00005>.
- (34) Speed, B.; Bu, H.-Z.; Pool, W. F.; Peng, G. W.; Wu, E. Y.; Patyna, S.; Bello, C.; Kang, P. Pharmacokinetics, Distribution, and Metabolism of [¹⁴C]Sunitinib in Rats, Monkeys, and Humans. *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40 (3), 539–555. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042853>.

(35) Mimnaugh, E. G.; Trush, M. A.; Gram, T. E. Stimulation by Adriamycin of Rat Heart and Liver Microsomal NADPH-Dependent Lipid Peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 1981, 30 (20), 2797–2804. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90417-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90417-2).

3. Discussion et perspectives

La responsabilité des métabolites réactifs dans l'apparition de toxicités (notamment hépatiques) liées à la prise de médicaments est aujourd'hui connue et la découverte de deux dérivés aldéhydes du pazopanib et du sunitinib (P-CHO et S-CHO, respectivement) a permis d'envisager leur imputabilité dans l'apparition des effets hépatotoxiques chez les patients traités par ces deux ITK.

L'objectif de cette étude biologique était de caractériser leur mode de cytotoxicité, d'identifier les mécanismes de mort cellulaire activés en leur présence, leur impact sur la fonction mitochondriale et l'accumulation de stress oxydant intracellulaire. Les expérimentations préliminaires présentées dans cette thèse ont été menées sur la lignée hépatocytaire HepG2, très utilisée dans les études de métabolisme et d'hépatotoxicité. Les premiers résultats ont montré que l'aldéhyde du pazopanib, contrairement à sa molécule mère, pouvait être impliqué dans les dommages hépatocytaires en altérant le fonctionnement mitochondrial à fortes concentrations, néanmoins très supérieures à celles retrouvées dans le plasma de patients traités par pazopanib : puisque de très larges concentrations sont nécessaires pour obtenir un effet toxique *in vitro*, se pose alors la question de son implication dans l'effet clinique hépatotoxique observé. Ces concentrations circulantes peuvent cependant refléter une accumulation plus importante au niveau hépatique et cette information – non maîtrisable lors d'essais *in vitro* – pourrait se vérifier à l'aide de modèles *in vivo*. L'aldéhyde du sunitinib, également cytotoxique, entraînait une diminution de la capacité respiratoire cellulaire et l'accumulation d'anion superoxyde lorsque les systèmes de protection cellulaire (comme la production de glutathion) étaient abolis.

La complexité des voies de métabolisation existant au sein des hépatocytes et la forte réactivité de ces molécules dans les milieux biologiques ont limité notre capacité à identifier leurs voies de production. En effet, il n'a pas été possible de démontrer quelles enzymes (cytosoliques ou microsomales) étaient impliquées dans leur production. Par ailleurs, la forte réactivité du sunitinib aldéhyde dans les

milieux biologiques tel que le plasma et le manque de sensibilité ou d'efficacité de notre méthode d'extraction ont limité sa détection dans des échantillons de patients traités par sunitinib et il n'a pas été possible de les quantifier.

Ces résultats nécessitent d'être validés sur des modèles cellulaires plus complexes. L'utilisation d'hépatocytes humain cryopréservés s'est révélée infructueuse (à cause de problématiques liées à l'expérimentation). Par ailleurs, le traitement de cellules HepaRG, plus proches de la physiologie hépatocytaire que les HepG2 est envisagé afin de comparer les effets d'un modèle cellulaire avec un métabolisme fonctionnel. Par ailleurs, un modèle plus complet et physiologiquement proche du fonctionnement organique (de manière optimale, animal) permettrait de tenir compte des interactions cellulaires et protéiques intra- et extra-hépatiques (comme par exemple l'activation de la réponse immunitaire et l'hypothèse hapténique).

L'autre perspective envisagée à court terme est d'identifier les conséquences de la fixation du pazopanib aldéhyde sur la cytochrome P450-oxydoréductase, enzyme indispensable au fonctionnement des cytochromes P450. Une interaction entre le P-CHO et l'enzyme pourrait s'évaluer par une diminution de son activité spécifique et permettrait ainsi d'expliquer une partie des interactions médicamenteuses impliquant les cytochromes et le pazopanib.

Enfin, plus d'une cinquantaine d'inhibiteurs de tyrosine kinases sont autorisés sur le marché et la majorité est prise en charge par les CYP450. Les résultats obtenus pour les métabolites du pazopanib et du sunitinib pourraient ouvrir la voie à d'autres ITK. Ces études seraient menées dans l'objectif de prévenir le risque toxique émanant de la production de métabolites réactifs, mais également d'identifier les potentielles interactions médicamenteuses, nombreuses pour cette classe thérapeutique.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont porté sur deux projets indépendants articulés autour d'un objectif commun : fournir des nouvelles données ou compléter certaines observations pour la compréhension des mécanismes d'hépatotoxicité causée par les médicaments anticancéreux. La trabectedine, le sunitinib et le pazopanib sont trois molécules issues de deux classes thérapeutiques différentes (les cytotoxiques et les thérapies ciblées) et dont les lésions hépatiques sont fréquentes mais encore peu caractérisées. Pourtant, le métabolisme hépatique est l'une des clés de la compréhension de ces dommages hépatiques, puisque des métabolites réactifs issus de leur biotransformation hépatique *via* les enzymes du métabolisme comme les cytochromes P450 semblent être une cause probable de leur origine. Deux approches ont été menées au cours de ces travaux : une première approche clinique de prédiction du risque toxique, et une seconde plus fondamentale, axée sur l'identification des mécanismes biologiques impliqués dans cette toxicité.

La première étude de pharmacogénétique présentée dans cette thèse a permis de décrire des polymorphismes géniques prédictifs du risque d'hépatotoxicité lié à la trabectedine et de mettre en évidence la faisabilité d'un dépistage *a priori* basé sur le statut génétique du patient. Les résultats obtenus s'inscrivent dans une démarche de médecine personnalisée dont l'objectif est d'expliquer et réduire les variabilités inter- et intraindividuelles en termes de toxicité mais également d'efficacité. L'utilisation de marqueurs prédictifs de la fonction des acteurs du métabolisme et de l'élimination de la trabectedine tels que les CYP450 (particulièrement CYP3A5 et CYP3A4) ou les transporteurs membranaires (comme MRP2) optimiserait son usage thérapeutique. Obtenus à partir d'un faible nombre de patients, ces résultats nécessitent d'être validés sur des cohortes plus larges et indépendantes. Une étude prospective au cours de laquelle l'individualisation thérapeutique serait basée sur l'évaluation de ces marqueurs génétiques (diminution de la posologie initiale, surveillance de la fonction hépatique accrue en fonction du génotype) pourrait être conduite afin d'évaluer leurs bénéfices. Cependant, la catégorisation des patients

est à mettre en regard de la nécessité de trouver un équilibre entre le bénéfice clinique et le risque toxique, qui plus est chez des patients pour lesquels la trabectedine est souvent utilisée en dernier recours.

Le pazopanib et le sunitinib sont également à l'origine de dysfonctionnements hépatiques encore inexpliqués. La découverte de nouveaux métabolites réactifs de type aldéhyde lors d'un projet précédemment mené dans notre équipe a permis d'envisager d'étudier leur impact biologique au niveau hépatocytaire (identification des mécanismes de cytotoxicité, impact sur le fonctionnement cellulaire). Ces expérimentations cellulaires préliminaires ont été limitées par la complexité des voies de métabolisation ainsi que la forte réactivité de ces dérivés aldéhydes dans les milieux biologiques et nécessitent d'être reproduites sur des modèles plus complexes et proche de la physiologie. En effet, l'implication d'un mécanisme unique comme la métabolisation en molécules réactives ne peut être considérée comme unique source de la toxicité hépatique des médicaments anticancéreux et la compréhension de l'apparition des DILI reste à la croisée des caractéristiques de la molécule, de l'hôte et de son environnement.

Travaux supplémentaires

Publications

- **Maillard, Maud**, Audrey Eche-Gass, Mony Ung, Aurélie Brice, Sabrina Marsili, Marion Monstastruc, Florent Puisset, and Fabienne Thomas. “Severe Toxicity of Capecitabine in a Patient with DPD Deficiency after a Safe FEC-100 Experience: Why We Should Test DPD Deficiency in All Patients before High-Dose Fluoropyrimidines.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 87, no. 4 (April 2021): 579–83.
- **Maillard, Maud**, Félicien Le Louedec, Fabienne Thomas, and Etienne Chatelut. 2020. “Diversity of Dose-Individualization and Therapeutic Drug Monitoring Practices of Platinum Compounds: A Review.” *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, October 2020, 1–19.
- Thomas, F., **M. Maillard**, M. Launay, C. Tron, M.-C. Etienne-Grimaldi, E. Gautier-Veyret, V. Haufroid, et al. “Artificial Increase of Uracilemia during Fluoropyrimidine Treatment Can Lead to DPD Deficiency Misinterpretation.” *Annals of Oncology* 32, no. 6 (June 1, 2021): 810–11.

Communications orales et posters

- **IATDMCT 2021 (septembre, Rome) – communication orale** : Evaluation of pre-analytical practices and intraindividual variability of uracilemia for DPD phenotyping: results of a study from the French Group of Clinical Oncological Pharmacology.
- **SFPT 2021 (juin, e-congrès) – session poster** : Genetic variations of ABC transporters and CYP450 associated with trabectedin hepatotoxicity in patients with advanced soft-tissue sarcomas: a pharmacogenetic study.

- **IATDMCT 2020 (septembre, e-congrès) – session poster** : Impact of the preanalytical practices on the uracil and dihydrouracil stability for the diagnosis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A collaborative work of the French Oncopharmacology Group (GPCO-Unioncancer) and Pharmacogenetics Network (RNPGx).
- **Toulouse OncoWeek 2020 (janvier) – session poster** : Genetic variations of ABC transporters and CYP450 associated with trabectedin hepatotoxicity in patients with advanced soft-tissue sarcomas: a pharmacogenetic study.

Références

1. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. & Duncan, S. A. Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189 (2010).
2. Vernon, H., Wehrle, C. J. & Kasi, A. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Liver. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
3. Shin, D. S. *et al.* Surgical Resection of a Malignant Liver Lesion: What the Surgeon Wants the Radiologist to Know. *Am. J. Roentgenol.* **203**, W21–W33 (2014).
4. Juza, R. M. & Pauli, E. M. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians: Clinical and Surgical Anatomy of the Liver. *Clin. Anat.* **27**, 764–769 (2014).
5. Pawlina, W. & Ross, M. H. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 8th edition. (2020).
6. LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E. & Powers, M. J. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit. Rev. Toxicol.* **42**, 501–548 (2012).
7. Braeuning, A. *et al.* Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J.* **273**, 5051–5061 (2006).
8. Rautio, J., Meanwell, N. A., Di, L. & Hageman, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 559–587 (2018).
9. Wang, L. & Boyer, J. L. The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* **39**, 892–899 (2004).
10. Nebert, D. W. & Dalton, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 947–960 (2006).
11. Dubey, K. D. & Shaik, S. Cytochrome P450—The Wonderful Nanomachine Revealed through Dynamic Simulations of the Catalytic Cycle. *Acc. Chem. Res.* **52**, 389–399 (2019).
12. Montellano, P. R. O. de. The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1181–1187 (1995).
13. Manikandan, P. & Nagini, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* **19**, 38–54 (2018).
14. Mohutsky, M. & Hall, S. D. Irreversible enzyme inhibition kinetics and drug-drug interactions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1113**, 57–91 (2014).
15. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103–141 (2013).
16. Sadler, N. C. *et al.* Hepatic Cytochrome P450 Activity, Abundance, and Expression Throughout Human Development. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 984–991 (2016).
17. Lee, J. K., Leslie, E. M., Zamek-Gliszczyński, M. J. & Brouwer, K. L. R. Modulation of trabectedin (ET-743) hepatobiliary disposition by multidrug resistance-associated proteins (Mrps) may prevent hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228**, 17–23 (2008).
18. Yang, L. *et al.* Sex Differences in the Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. *J. Drug Metab. Toxicol.* **3**, 1000119 (2012).
19. Scandlyn, M. J., Stuart, E. C. & Rosengren, R. J. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 413–424 (2008).
20. Taburet, A. M. & Furlan, V. Le système des cytochromes P450 : définition, rôle et implication dans la pharmacocinétique des anti-infectieux. *MISE AU POINT* **6** (2000).
21. Mohutsky, M. A. *et al.* Hepatic drug-metabolizing enzyme induction and implications for preclinical and clinical risk assessment. *Toxicol. Pathol.* **38**, 799–809 (2010).
22. Iyanagi, T. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. in *International Review of Cytology* vol. 260 35–112 (Elsevier, 2007).

23. The International Transporter Consortium. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 215–236 (2010).
24. Hediger, M. A., Clémenton, B., Burrier, R. E. & Bruford, E. A. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol. Aspects Med.* **34**, 95–107 (2013).
25. SLCTables –Bioparadigms.org. Accessed: November 21, 2020. Available at: <http://slc.bioparadigms.org/>.
26. Otsuka, M. *et al.* A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17923–17928 (2005).
27. Hagenbuch, B. & Stieger, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 396–412 (2013).
28. König, J., Cui, Y., Nies, A. T. & Keppler, D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**, G156–164 (2000).
29. Kullak-Ublick, G. A. *et al.* Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**, 525–533 (2001).
30. Zair, Z. M., Eloranta, J. J., Stieger, B. & Kullak-Ublick, G. A. Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics* **9**, 597–624 (2008).
31. Jetter, A. & Kullak-Ublick, G. A. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol. Res.* **154**, 104234 (2020).
32. Kalliokoski, A. & Niemi, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 693–705 (2009).
33. Fahrmayr, C., Fromm, M. F. & König, J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab. Rev.* **42**, 380–401 (2010).
34. Lozano, E. *et al.* Role of the Plasma Membrane Transporter of Organic Cations OCT1 and Its Genetic Variants in Modern Liver Pharmacology. *BioMed Res. Int.* **2013**, 1–13 (2013).
35. Nigam, S. K. *et al.* The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiol. Rev.* **95**, 83–123 (2015).
36. Koepsell, H. & Endou, H. The SLC22 drug transporter family. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 666–676 (2004).
37. Boxberger, K. H., Hagenbuch, B. & Lampe, J. N. Common Drugs Inhibit Human Organic Cation Transporter 1 (OCT1)-Mediated Neurotransmitter Uptake. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 990–995 (2014).
38. Geyer, J., Wilke, T. & Petzinger, E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **372**, 413–431 (2006).
39. Claro da Silva, T., Polli, J. E. & Swaan, P. W. The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol. Aspects Med.* **34**, 252–269 (2013).
40. Dong, Z., Ekins, S. & Polli, J. E. Structure Activity Relationship for FDA Approved Drugs as Inhibitors of the Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP). *Mol. Pharm.* **10**, 1008–1019 (2013).
41. Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–162 (1976).
42. Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S. & Pavek, P. Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. in *Multi-Drug Resistance in Cancer* (ed. Zhou, J.) vol. 596 199–222 (Humana Press, 2010).
43. Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **33 Suppl 2**, 6–9 (2003).
44. Canaparo, R. *et al.* Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 1138–1144 (2007).
45. Thörn, M., Finnström, N., Lundgren, S., Rane, A. & Lööf, L. Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60**, 54–60 (2005).

46. Cascorbi, I. P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations. in *Drug Transporters* (eds. Fromm, M. F. & Kim, R. B.) vol. 201 261–283 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
47. Fromm, M. F. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 69–74 (2000).
48. Young, A. M., Allen, C. E. & Audus, K. L. Efflux transporters of the human placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 125–132 (2003).
49. del Moral, R. G., Olmo, A., Aguilar, M. & O'Valle, F. P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp. Nephrol.* **6**, 89–97 (1998).
50. Cascorbi, I. & Haenisch, S. Pharmacogenetics of ATP-Binding Cassette Transporters and Clinical Implications. in *Multi-Drug Resistance in Cancer* (ed. Zhou, J.) vol. 596 95–121 (Humana Press, 2010).
51. Němcová-Fürstová, V. *et al.* Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **310**, 215–228 (2016).
52. Beumer, J.-H. *et al.* Trabectedin (ET-743, Yondelis) is a substrate for P-glycoprotein, but only high expression of P-glycoprotein confers the multidrug resistance phenotype. *Invest. New Drugs* **25**, 1–7 (2007).
53. Sedláková, I. *et al.* Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **25**, 236–243 (2015).
54. Lehne, G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr. Drug Targets* **1**, 85–99 (2000).
55. Bradley, G. & Ling, V. P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 223–233 (1994).
56. Zhang, H. *et al.* Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Med. Res. Rev.* (2020) doi:10.1002/med.21739.
57. Li, Y. *et al.* The Structure and Functions of P-Glycoprotein. *Curr. Med. Chem.* **17**, 786–800 (2010).
58. Bossennec, M., Di Roio, A., Caux, C. & Ménétrier-Caux, C. MDR1 in immunity: friend or foe? *Oncolimmunology* **7**, e1499388 (2018).
59. Aller, S. G. *et al.* Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* **323**, 1718–1722 (2009).
60. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
61. Kim, Y. & Chen, J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science* **359**, 915–919 (2018).
62. Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 3–29 (2003).
63. Boulton, D. W., DeVane, C. L., Liston, H. L. & Markowitz, J. S. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci.* **71**, 163–169 (2002).
64. Elsinga, P. H., Hendrikse, N. H., Bart, J., Vaalburg, W. & van Waarde, A. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1493–1503 (2004).
65. Kock, K. & Brouwer, K. L. R. A Perspective on Efflux Transport Proteins in the Liver. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**, 599–612 (2012).
66. Jedlitschky, G., Hoffmann, U. & Kroemer, H. K. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 351–366 (2006).
67. El-Sheikh, A. A. K., Heuvel, J. J. M. W. van den, Koenderink, J. B. & Russel, F. G. M. Interaction of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Multidrug Resistance Protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-Mediated Methotrexate Transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 229–235 (2007).

68. Breedveld, P. *et al.* Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer Res.* **64**, 5804–5811 (2004).
69. Corpechot, C. *et al.* Genetic contribution of ABCC2 to Dubin-Johnson syndrome and inherited cholestatic disorders. *Liver Int.* **40**, 163–174 (2020).
70. Kamisako, T. *et al.* Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J. Gastroenterol.* **35**, 659–664 (2000).
71. Chai, J. *et al.* Elevated Hepatic MRP3/ABCC3 Expression in Human Obstructive Cholestasis Is Mediated through TNF α and JNK/SAPK Signaling Pathway. *Hepatology. Baltim. Md* **55**, 1485–1494 (2012).
72. Vlaming, M. L. H. *et al.* Carcinogen and Anticancer Drug Transport by Mrp2 in Vivo: Studies Using Mrp2 (Abcc2) Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 319–327 (2006).
73. Chu, X.-Y. *et al.* Characterization of Mice Lacking the Multidrug Resistance Protein Mrp2 (Abcc2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 579–589 (2006).
74. Doyle, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15665–15670 (1998).
75. Bruhn, O. & Cascorbi, I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 1337–1354 (2014).
76. Mao, Q. & Unadkat, J. D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J.* **17**, 65–82 (2015).
77. König, J., Rost, D., Cui, Y. & Keppler, D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology. Baltim. Md* **29**, 1156–1163 (1999).
78. Keppler, D. Progress in the Molecular Characterization of Hepatobiliary Transporters. *Dig. Dis.* **35**, 197–202 (2017).
79. Mennone, A. *et al.* Mrp4 $^{-/-}$ mice have an impaired cytoprotective response in obstructive cholestasis. *Hepatology* **43**, 1013–1021 (2006).
80. Gradhand, U. *et al.* Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *Pharmacogenomics J.* **8**, 42–52 (2008).
81. Berthier, J. *et al.* MRP4 is responsible for the efflux transport of mycophenolic acid β -D glucuronide (MPAG) from hepatocytes to blood. *Xenobiotica* 1–10 (2020) doi:10.1080/00498254.2020.1813352.
82. Willson, T. M. & Kliewer, S. A. Pxr, car and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 259–266 (2002).
83. Wada, T., Gao, J. & Xie, W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 273–279 (2009).
84. Kalow, W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J.* **6**, 162–165 (2006).
85. EMEA. ICH Topic E15: Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. Accessed: January 6, 2021. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e15-definitions-genomic-biomarkers-pharmacogenomics-pharmacogenetics-genomic-data-sample-coding> (2007).
86. Aguilera, A. & Gómez-González, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 204–217 (2008).
87. Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C. & Ferlini, C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med. Genomics* **8**, (2015).
88. Schildgen, V. & Schildgen, O. How is a molecular polymorphism defined? *Cancer* **119**, 1608 (2013).
89. Crawford, D. C. & Nickerson, D. A. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annu. Rev. Med.* **56**, 303–320 (2005).

90. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945 (2004).
91. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**, 1299–1320 (2005).
92. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
93. Pritchard, J. K. & Przeworski, M. Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 1–14 (2001).
94. Hardy, G. H. Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science* **28**, 49–50 (1908).
95. Montpetit, A. & Chagnon, F. La Carte d'Haplotype du génome humain - Une révolution en génétique des maladies à hérédité complexe. *médecine/sciences* **22**, 1061–1068 (2006).
96. Singer, J. B. Candidate gene association analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **573**, 223–230 (2009).
97. Tam, V. *et al.* Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 467–484 (2019).
98. Minelli, C., Thompson, J. R., Abrams, K. R., Thakkinstian, A. & Attia, J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int. J. Epidemiol.* **34**, 1319–1328 (2005).
99. Zanger, U. M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. 39 (2013).
100. Steward, D. J. *et al.* Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* **7**, 361–367 (1997).
101. King, B. P., Khan, T. I., Aithal, G. P., Kamali, F. & Daly, A. K. Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. *Pharmacogenetics* **14**, 813–822 (2004).
102. Sim, S. *et al.* A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**, 103–113 (2006).
103. Chaudhry, A. S. *et al.* The CYP2C19 Intron 2 Branch Point SNP is the Ancestral Polymorphism Contributing to the Poor Metabolizer Phenotype in Livers with CYP2C19*35 and CYP2C19*2 Alleles. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **43**, 1226–1235 (2015).
104. Zhang, L. *et al.* CYP2C9 and CYP2C19: Deep Mutational Scanning and Functional Characterization of Genomic Missense Variants. *Clin. Transl. Sci.* **13**, 727–742 (2020).
105. Morais, S. M. de *et al.* The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J. Biol. Chem.* **269**, 15419–15422 (1994).
106. Johansson, I. *et al.* Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 11825–11829 (1993).
107. Yang, X. *et al.* Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res.* **20**, 1020–1036 (2010).
108. Hu, X. *et al.* Antituberculosis Drug-Induced Adverse Events in the Liver, Kidneys, and Blood: Clinical Profiles and Pharmacogenetic Predictors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **104**, 326–334 (2018).
109. Kubo, M., Koue, T., Maune, H., Fukuda, T. & Azuma, J. Pharmacokinetics of Aripiprazole, a New Antipsychotic, following Oral Dosing in Healthy Adult Japanese Volunteers: Influence of CYP2D6 Polymorphism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **22**, 358–366 (2007).
110. Roco, Á. *et al.* Frequencies of 23 Functionally Significant Variant Alleles Related with Metabolism of Antineoplastic Drugs in the Chilean Population: Comparison with Caucasian and Asian Populations. *Front. Genet.* **3**, (2012).
111. Saito, T. *et al.* Functional characterization of 50 CYP2D6 allelic variants by assessing primaquine 5-hydroxylation. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **33**, 250–257 (2018).
112. Leathart, J. B. *et al.* CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics* **8**, 529–541 (1998).

113. Iacobucci, I. *et al.* Profiling of drug-metabolizing enzymes/transporters in CD33+ acute myeloid leukemia patients treated with Gemtuzumab-Ozogamicin and Fludarabine, Cytarabine and Idarubicin. *Pharmacogenomics J.* **13**, 335–341 (2013).
114. Chamorro, J. G. *et al.* Effect of gene–gene and gene–environment interactions associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 363–371 (2017).
115. Fairbrother, K. S. *et al.* Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics* **8**, 543–552 (1998).
116. Werk, A. N. & Cascorbi, I. Functional Gene Variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 340–348 (2014).
117. Żochowska, D., Wyzgał, J. & Pączek, L. Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann. Transplant.* **17**, 36–44 (2012).
118. Wang, D. & Sadee, W. CYP3A4 intronic SNP rs35599367 (CYP3A4*22) alters RNA splicing. *Pharmacogenet. Genomics* **26**, 40–43 (2016).
119. Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E. & Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* **11**, 274–286 (2011).
120. Kuehl, P. *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **27**, 383–391 (2001).
121. Birdwell, K. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* **98**, 19–24 (2015).
122. Court, M. H. *et al.* Candidate Gene Polymorphisms in Patients with Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 28–32 (2014).
123. Garcia-Donas, J. *et al.* Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet Oncol.* **12**, 1143–1150 (2011).
124. Quaranta, S. & Thomas, F. Pharmacogenetics of anti-cancer drugs: State of the art and implementation – recommendations of the French National Network of Pharmacogenetics. *Therapies* **72**, 205–215 (2017).
125. Motzer, R. J. *et al.* Hyperbilirubinemia in pazopanib- or sunitinib-treated patients in COMPARZ is associated with UGT1A1 polymorphisms†. *Ann. Oncol.* **24**, 2927–2928 (2013).
126. Yoshihama, T. *et al.* GSTP1 rs1695 is associated with both hematological toxicity and prognosis of ovarian cancer treated with paclitaxel plus carboplatin combination chemotherapy: a comprehensive analysis using targeted resequencing of 100 pharmacogenes. *Oncotarget* **9**, 29789–29800 (2018).
127. McLeod, H. L. *et al.* Pharmacogenetic Predictors of Adverse Events and Response to Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer: Results From North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3227–3233 (2010).
128. Gong, J.-Y. *et al.* Evaluating the role of GSTP1 genetic polymorphism (rs1695, 313A>G) as a predictor in cyclophosphamide-induced toxicities. *Medicine (Baltimore)* **100**, e24423 (2021).
129. Andrews, E. *et al.* A role for the pregnane X receptor in flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 1656–1664 (2010).
130. Zhang, J. *et al.* Genetic polymorphisms in PXR and NF-κB1 influence susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury. *PLOS ONE* **14**, e0222033 (2019).
131. Tornio, A. & Backman, J. T. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. in *Advances in Pharmacology* vol. 83 3–32 (Elsevier, 2018).
132. Kuang, Z. *et al.* Overexpression of CYP3A5 attenuates inducibility and activity of CYP3A4 in HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 2868–2874 (2015).
133. Elens, L. *et al.* Functional defect caused by the 4544G>A SNP in ABCC2: potential impact for drug cellular disposition. *Pharmacogenet. Genomics* **21**, 884–893 (2011).

134. Kitzmiller, J. P., Luzum, J. A., Baldassarre, D., Krauss, R. M. & Medina, M. W. CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort. *Pharmacogenet. Genomics* **24**, 486–491 (2014).
135. Zeigler-Johnson, C. *et al.* CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 8461–8467 (2004).
136. Bertholee, D., Maring, J. G. & van Kuilenburg, A. B. P. Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anti-cancer Drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **56**, 317–337 (2017).
137. Pilotto, A. *et al.* Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Gastroenterology* **133**, 465–471 (2007).
138. Johnson, J. A. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, 397–404 (2017).
139. Dean, L. Voriconazole Therapy and CYP2C19 Genotype. in *Medical Genetics Summaries* (eds. Pratt, V. M. *et al.*) (National Center for Biotechnology Information (US), 2012).
140. Pan, X., Ning, M. & Jeong, H. Transcriptional Regulation of CYP2D6 Expression. *Drug Metab. Dispos.* **45**, 42–48 (2017).
141. Goetz, M. P. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 770–777 (2018).
142. Goh, L. L., Lim, C. W., Sim, W. C., Toh, L. X. & Leong, K. P. Analysis of Genetic Variation in CYP450 Genes for Clinical Implementation. *PLOS ONE* **12**, e0169233 (2017).
143. Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T. & Leeder, J. S. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet. Med.* **19**, 69–76 (2017).
144. Puszkiel, A. *et al.* Factors Affecting Tamoxifen Metabolism in Patients With Breast Cancer: Preliminary Results of the French PHACS Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **106**, 585–595 (2019).
145. Hertz, D. L. *et al.* In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 1122–1130 (2015).
146. Gonzalez, F. J. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **35**, 1–8 (2007).
147. Wolf, K. K. *et al.* Role of CYP3A and CYP2E1 in alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: comparison of wild-type and Cyp2e1(-/-) mice. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **35**, 1223–1231 (2007).
148. Lee, S. S., Buters, J. T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. & Gonzalez, F. J. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.* **271**, 12063–12067 (1996).
149. Gonzalez, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res.* **569**, 101–110 (2005).
150. de Man, F. M., Goey, A. K. L., van Schaik, R. H. N., Mathijssen, R. H. J. & Bins, S. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 1229–1254 (2018).
151. Toffoli, G. *et al.* The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 3061–3068 (2006).
152. Biason, P., Masier, S. & Toffoli, G. UGT1A1*28 and Other UGT1A Polymorphisms as Determinants of Irinotecan Toxicity. *J. Chemother.* **20**, 158–165 (2008).
153. Xu, C.-F. *et al.* Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br. J. Cancer* **102**, 1371–1377 (2010).
154. Nebert, D. W. & Vasiliou, V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum. Genomics* **1**, 460–464 (2004).

155. Watson, M. A., Stewart, R. K., Smith, G. B., Massey, T. E. & Bell, D. A. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* **19**, 275–280 (1998).
156. Wu, S. *et al.* Genetic Polymorphisms of Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) and the Incidence of Anti-Tuberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity. *PLOS ONE* **11**, e0157478 (2016).
157. Aarnoudse, A.-J. L. H. J. *et al.* Common ATP-binding cassette B1 variants are associated with increased digoxin serum concentration. *Pharmacogenet. Genomics* **18**, 299–305 (2008).
158. Chowbay, B., Li, H., David, M., Cheung, Y. B. & Lee, E. J. D. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60**, 159–171 (2005).
159. Kimchi-Sarfaty, C. *et al.* A ‘Silent’ Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* **315**, 525–528 (2007).
160. Jiang, Z.-P. *et al.* Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 433–444 (2008).
161. Schaefer, M., Roots, I. & Gerloff, T. In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenet. Genomics* **16**, 855–861 (2006).
162. Ishikawa, T. *et al.* High-speed screening of human ATP-binding cassette transporter function and genetic polymorphisms: new strategies in pharmacogenomics. *Methods Enzymol.* **400**, 485–510 (2005).
163. Dulucq, S. *et al.* Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **112**, 2024–2027 (2008).
164. Diekstra, M. H. M. *et al.* CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms as Predictors for Sunitinib Outcome in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol.* **68**, 621–629 (2015).
165. Kimchi-Sarfaty, C. *et al.* Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics* **8**, 29–39 (2007).
166. Salama, N. N., Yang, Z., Bui, T. o. t. & Ho, R. J. Y. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J. Pharm. Sci.* **95**, 2293–2308 (2006).
167. Wolking, S., Schaeffeler, E., Lerche, H., Schwab, M. & Nies, A. T. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin. Pharmacokinet.* **54**, 709–735 (2015).
168. Beuselink, B. *et al.* Efflux pump ABCB1 single nucleotide polymorphisms and dose reductions in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Acta Oncol.* **53**, 1413–1422 (2014).
169. Giacomelli, A. *et al.* Clinical and genetic factors associated with increased risk of severe liver toxicity in a monocentric cohort of HIV positive patients receiving nevirapine-based antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.* **18**, 1–8 (2018).
170. Kim, R. B. *et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **70**, 189–199 (2001).
171. Llaudó, I. *et al.* Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl. Int.* **26**, 177–186 (2013).
172. de Klerk, O. L. *et al.* ABCB1 gene variants influence tolerance to selective serotonin reuptake inhibitors in a large sample of Dutch cases with major depressive disorder. *Pharmacogenomics J.* **13**, 349–353 (2013).
173. Wojnowski, L. *et al.* NAD(P)H Oxidase and Multidrug Resistance Protein Genetic Polymorphisms Are Associated With Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Circulation* **112**, 3754–3762 (2005).
174. Deo, A. K., Prasad, B., Balogh, L., Lai, Y. & Unadkat, J. D. Interindividual Variability in Hepatic Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2/ABCC2): Quantification by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 852–855 (2012).

175. Yap, D. Y. H. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacogenomics of mycophenolic acid and its clinical correlations in maintenance immunosuppression for lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **35**, 810–818 (2020).
176. Kim, W.-J. *et al.* A nonsynonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 249–256 (2010).
177. Lopez-Lopez, E. *et al.* Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* **17**, 731–741 (2016).
178. Laurenty, A.-P. *et al.* Irreversible hepatotoxicity after administration of trabectedin to a pleiomorphic sarcoma patient with a rare ABCC2 polymorphism: a case report. *Pharmacogenomics* **14**, 1389–1396 (2013).
179. Barraclough, K. A., Lee, K. J. & Staats, C. E. Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy. *Pharmacogenomics* **11**, 369–390 (2010).
180. Franke, R. *et al.* Dependence of erythromycin metabolism on ABCC2 (MRP2) transport function. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 693–701 (2011).
181. Nguyen, T. D. *et al.* Functional characterization of ABCC2 promoter polymorphisms and allele specific expression. *Pharmacogenomics J.* **13**, 396–402 (2013).
182. Choi, J. H. *et al.* Mrp2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 403–415 (2007).
183. Dahlin, A. *et al.* A Pharmacogenetic Candidate Gene Study of Tenofovir-Associated Fanconi Syndrome. *Pharmacogenet. Genomics* **25**, 82–92 (2015).
184. Poonkuzhali, B. *et al.* Association of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2 Phenotypes and Novel Promoter and Intron 1 Single Nucleotide Polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 780–795 (2008).
185. Mizuarai, S., Aozasa, N. & Kotani, H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int. J. Cancer* **109**, 238–246 (2004).
186. Verboom, M. C. *et al.* Genetic polymorphisms in ABCG2 and CYP1A2 are associated with imatinib dose reduction in patients treated for gastrointestinal stromal tumors. *Pharmacogenomics J.* **19**, 473–479 (2019).
187. Han, J.-Y., Lim, H.-S., Park, Y. H., Lee, S. Y. & Lee, J. S. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **63**, 115–120 (2009).
188. Hira, D. & Terada, T. BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. *Biochem. Pharmacol.* **147**, 201–210 (2018).
189. Kashihara, Y. *et al.* Small-Dosing Clinical Study: Pharmacokinetic, Pharmacogenomic (SLCO2B1 and ABCG2), and Interaction (Atorvastatin and Grapefruit Juice) Profiles of 5 Probes for OATP2B1 and BCRP. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2688–2694 (2017).
190. De Mattia, E. *et al.* Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 549–557 (2013).
191. Stocker, S. L. *et al.* The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **93**, 186–194 (2013).
192. Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B. & Klein, T. E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* **22**, 820–827 (2012).
193. Pussegoda, K. *et al.* Replication of TPMT and ABCC3 Genetic Variants Highly Associated With Cisplatin-Induced Hearing Loss in Children. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 243–251 (2013).
194. Caronia, D. *et al.* Effect of ABCB1 and ABCC3 Polymorphisms on Osteosarcoma Survival after Chemotherapy: A Pharmacogenetic Study. *PLoS ONE* **6**, e26091 (2011).
195. Lang, T. *et al.* Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics* **14**, 155–164 (2004).
196. Hegyi, M. *et al.* Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget* **8**, 9388–9398 (2016).

197. Moeung, S. Evaluation du suivi thérapeutique pharmacologique du carboplatine et étude pharmacocinétique/pharmacogénétique de l'étoposide dans le cadre d'un essai clinique de phase II d'intensification thérapeutique en cancérologie. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2018).
198. Likanonsakul, S. *et al.* A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection. *PLOS ONE* **11**, e0147724 (2016).
199. Billat, P.-A. *et al.* Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) controls ganciclovir intracellular accumulation and contributes to ganciclovir-induced neutropenia in renal transplant patients. *Pharmacol. Res.* **111**, 501–508 (2016).
200. Nicoletti P. *et al.* Genomewide Pharmacogenetics of Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw: The Role of RBMS3. *The Oncologist* **17**, 279–287 (2012).
201. de Denus, S. *et al.* A pharmacogenetic investigation of intravenous furosemide in decompensated heart failure: a meta-analysis of three clinical trials. *Pharmacogenomics J.* **17**, 192–200 (2017).
202. Kiser, J. J. *et al.* Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999** **47**, 298–303 (2008).
203. Mesrian Tanha, H., Rahgozar, S. & Mojtabavi Naeini, M. ABCC4 functional SNP in the 3' splice acceptor site of exon 8 (G912T) is associated with unfavorable clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **80**, 109–117 (2017).
204. Anderson, P. L., Lamba, J., Aquilante, C. L., Schuetz, E. & Fletcher, C. V. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999** **42**, 441–449 (2006).
205. Rungtivasuwan, K. *et al.* Influence of ABCC2 and ABCC4 Polymorphisms on Tenofovir Plasma Concentrations in Thai HIV-Infected Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3240–3245 (2015).
206. Ban, H. *et al.* The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **45**, 1014–1021 (2010).
207. den Hoed, M. A. H. *et al.* Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* **15**, 248–254 (2015).
208. Lopez-Lopez, E. *et al.* Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 53–61 (2013).
209. Angelini, S. *et al.* Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol. Res.* **68**, 1–6 (2013).
210. Low, S.-K. *et al.* Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J. Hum. Genet.* **54**, 564–571 (2009).
211. Haenisch, S. *et al.* Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J.* **7**, 56–65 (2007).
212. Rau, T. *et al.* High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 468–476 (2006).
213. Lévesque, E., Benoit-Biancamano, M.-O., Delage, R., Couture, F. & Guillemette, C. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and its glucuronide metabolites in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* **9**, 869–879 (2008).
214. Rosner, G. L., Panetta, J. C., Innocenti, F. & Ratain, M. J. Pharmacogenetic pathway analysis of irinotecan. *Clin. Pharmacol. Ther.* **84**, 393–402 (2008).
215. Kashihara, Y. *et al.* Small-Dosing Clinical Study: Pharmacokinetic, Pharmacogenomic (SLCO2B1 and ABCG2), and Interaction (Atorvastatin and Grapefruit Juice) Profiles of 5 Probes for OATP2B1 and BCRP. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2688–2694 (2017).

216. Huang, S. *et al.* Clinical and genetic risk factors for the prediction of hepatotoxicity induced by a docetaxel, epirubicin and cyclophosphamide regimen in breast cancer patients. *Pharmacogenomics* (2020) doi:10.2217/pgs-2020-0080.
217. Scheffer, G. L. *et al.* Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **82**, 193–201 (2002).
218. Abia, N. *et al.* The Human Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4, ABCC4): Functional Analysis of a Highly Polymorphic Gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 859–868 (2008).
219. Navarro, V. J. Drug-Related Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* **354**, 731–739 (2006).
220. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).
221. Lee, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* **349**, 474–485 (2003).
222. Sgro, C. *et al.* Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatol. Baltim. Md* **36**, 451–455 (2002).
223. Roth, R. A. & Ganey, P. E. Intrinsic versus Idiosyncratic Drug-Induced Hepatotoxicity—Two Villains or One? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 692–697 (2010).
224. Andrade, R. J. *et al.* Drug-induced liver injury. *Nat. Rev. Dis. Primer* **5**, 1–22 (2019).
225. Hodgman, M. J. & Garrard, A. R. A Review of Acetaminophen Poisoning. *Crit. Care Clin.* **28**, 499–516 (2012).
226. Lee, W. M. Drug-Induced Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* **12** (2003).
227. Babai, S., Auclert, L. & Le-Louët, H. Safety data and withdrawal of hepatotoxic drugs. *Therapie* (2018) doi:10.1016/j.therap.2018.02.004.
228. Villanueva-Paz, M. *et al.* Oxidative Stress in Drug-Induced Liver Injury (DILI): From Mechanisms to Biomarkers for Use in Clinical Practice. *Antioxidants* **10**, 390 (2021).
229. Chen, M., Borlak, J. & Tong, W. High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. *Hepatology* **58**, 388–396 (2013).
230. Park, B. K. *et al.* Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 292–306 (2011).
231. Stepan, A. F. *et al.* Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1345–1410 (2011).
232. Daly, A. K. *et al.* Genetic Susceptibility to Diclofenac-Induced Hepatotoxicity: Contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 Genotypes. *Gastroenterology* **132**, 272–281 (2007).
233. Kaplowitz, N. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. *Semin. Liver Dis.* **22**, 137–144 (2002).
234. Ma, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 401–426 (2013).
235. Gunawan, B. K. & Kaplowitz, N. Mechanisms of Drug-Induced Liver Disease. *Clin. Liver Dis.* **11**, 459–475 (2007).
236. Njoku, D. B. Drug-Induced Hepatotoxicity: Metabolic, Genetic and Immunological Basis. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 6990–7003 (2014).
237. Whitcomb, D. C. & Block, G. D. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA* **272**, 1845–1850 (1994).
238. Kaplowitz, N. Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38 Suppl 2**, S44–48 (2004).
239. Kleiner, D. E. *et al.* Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatol. Baltim. Md* **59**, 661–670 (2014).
240. Boige, V. & Buffet, C. Diagnostic strategy in case of isolated increase in serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **21**, 8 (1997).

241. Andrade, R.-J. *et al.* Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. *World J. Gastroenterol.* **13**, 329–340 (2007).
242. Giordano, C., Rivas, J. & Zervos, X. An Update on Treatment of Drug-Induced Liver Injury. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2**, 74–79 (2014).
243. Padda, M. S., Sanchez, M., Akhtar, A. J. & Boyer, J. L. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* **53**, 1377–1387 (2011).
244. Pauli-Magnus, C. & Meier, P. J. Hepatocellular Transporters and Cholestasis: *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, S103–S110 (2005).
245. Temple, R. Guidance for Industry. *Drug Saf.* **28** (2009).
246. Lewis, J. H. *et al.* Utility of the Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM) to analyze the hepatic findings in a clinical trial program: evaluation of the direct thrombin inhibitor ximelagatran. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 327–339 (2008).
247. Temple, R. Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* **15**, 241–243 (2006).
248. FDA. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. *Interact. Stud.* **47**.
249. Richmond J. The 3Rs - Past, Present and Future. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **27**, (2000).
250. Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D. & Knöspel, F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp. Biol. Med.* **241**, 1684–1698 (2016).
251. Westerink, W. M. A. & Schoonen, W. G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **21**, 1581–1591 (2007).
252. Westerink, W. M. A. & Schoonen, W. G. E. J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* **21**, 1592–1602 (2007).
253. Wilkening, S., Stahl, F. & Bader, A. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line Hepg2 with Regard to Their Biotransformation Properties. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1035–1042 (2003).
254. Araki, N. *et al.* Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: *in vitro* screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity. *Xenobiotica* **38**, 1355–1364 (2008).
255. Tolosa, L. *et al.* Customised in vitro model to detect human metabolism-dependent idiosyncratic drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* **92**, 383–399 (2018).
256. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15655–15660 (2002).
257. Guillouzo, A. *et al.* The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **168**, 66–73 (2007).
258. Aninat, C. *et al.* Expression of cytochromes P450 conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 75–83 (2006).
259. Gerets, H. H. J. *et al.* Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 69–87 (2012).
260. Korzeniewski, C. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **64**, 313–320 (1983).
261. Riss, T. L. & Moravec, R. A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 51–62 (2004).
262. Marroquin, L. D., Hynes, J., Dykens, J. A., Jamieson, J. D. & Will, Y. Circumventing the Crabtree Effect: Replacing Media Glucose with Galactose Increases Susceptibility of HepG2 Cells to Mitochondrial Toxicants. *Toxicol. Sci.* **97**, 539–547 (2007).
263. Swiss, R. & Will, Y. Assessment of Mitochondrial Toxicity in HepG2 Cells Cultured in High-Glucose- or Galactose-Containing Media. *Curr. Protoc. Toxicol.* **49**, 2.20.1-2.20.14 (2011).

264. Kamalian, L. *et al.* The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol. In Vitro* **29**, 732–740 (2015).
265. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
266. Xu, J., Oda, S. & Yokoi, T. Cell-based assay using glutathione-depleted HepaRG and HepG2 human liver cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicol. In Vitro* **48**, 286–301 (2018).
267. McGill, M. R. & Jaeschke, H. Animal models of drug-induced liver injury. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1865**, 1031–1039 (2019).
268. Mak, A., Cho, T. E. & Uetrecht, J. The Effects of Immune Modulators on Amodiaquine-Induced Liver Injury. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 739–744 (2018).
269. Hewitt, M. & Przybylak, K. In Silico Models for Hepatotoxicity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1425**, 201–236 (2016).
270. He, S. *et al.* An In Silico Model for Predicting Drug-Induced Hepatotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
271. Izbicka, E. *et al.* In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **9**, 981–987 (1998).
272. Ghielmini, M. *et al.* In vitro schedule-dependency of myelotoxicity and cytotoxicity of Ecteinascidin 743 (ET-743). *Ann. Oncol.* **9**, 989–993 (1998).
273. EMEA. Yondelis® INN-trabectedin - Summary of Product Characteristics. Accessed online: January 21, 2021. Available at: *European Medicines Agency* https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yondelis-epar-product-information_en.pdf (2009).
274. Monk, B. J. *et al.* Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin (PLD) versus PLD in recurrent ovarian cancer: Overall survival analysis. *Eur. J. Cancer* **48**, 2361–2368 (2012).
275. Casado, A. *et al.* Trabectedin for reversing platinum resistance and resensitization to platinum in patients with recurrent ovarian cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* **15**, 271–280 (2019).
276. D’Incalci, M. & Galmarini, C. M. A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2157–2163 (2010).
277. David-Cordonnier, M.-H. *et al.* DNA and Non-DNA Targets in the Mechanism of Action of the Antitumor Drug Trabectedin. *Chem. Biol.* **12**, 1201–1210 (2005).
278. Pommier, Y. *et al.* DNA Sequence- and Structure-Selective Alkylation of Guanine N2 in the DNA Minor Groove by Ecteinascidin 743, a Potent Antitumor Compound from the Caribbean Tunicate Ecteinascidia turbinata. *Biochemistry* **35**, 13303–13309 (1996).
279. D’Incalci, M., Badri, N., Galmarini, C. M. & Allavena, P. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br. J. Cancer* **111**, 646–650 (2014).
280. D’Incalci, M. *et al.* Unique Features of the Mode of Action of ET-743. *The Oncologist* **7**, 210–216 (2002).
281. Larsen, A. K., Galmarini, C. M. & D’Incalci, M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 663–671 (2016).
282. Herrero, A. B., Martín-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F. & Moreno, S. Cross-Talk between Nucleotide Excision and Homologous Recombination DNA Repair Pathways in the Mechanism of Action of Antitumor Trabectedin. *Cancer Res.* **66**, 8155–8162 (2006).
283. Erba, E. *et al.* Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur. J. Cancer* **37**, 97–105 (2001).
284. Li, X. & Heyer, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**, 99–113 (2008).
285. Povo-Retana, A. *et al.* Specific Effects of Trabectedin and Lurbinectedin on Human Macrophage Function and Fate—Novel Insights. *Cancers* **12**, 3060 (2020).
286. Caruso, C. & Garofalo, C. Pharmacogenomics Biomarkers of Soft Tissue Sarcoma Therapies. *Front. Oncol.* **10**, (2020).

287. Italiano, A. *et al.* ERCC5/XPG, ERCC1, and BRCA1 gene status and clinical benefit of trabectedin in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* **117**, 3445–3456 (2011).
288. Moura, D. S. *et al.* CUL4A, ERCC5, and ERCC1 as Predictive Factors for Trabectedin Efficacy in Advanced Soft Tissue Sarcomas (STS): A Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS) Study. *Cancers* **12**, (2020).
289. Schöffski, P. *et al.* Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: a retrospective multicentric study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **47**, 1006–1012 (2011).
290. Le Cesne, A. Making the Best of Available Options for Optimal Sarcoma Treatment. *Oncology* **95**, 11–20 (2018).
291. Taamma, A. *et al.* Phase I and Pharmacokinetic Study of Ecteinascidin-743, a New Marine Compound, Administered as a 24-hour Continuous Infusion in Patients With Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1256–1265 (2001).
292. Kesteren, C. van *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Novel Marine-derived Anticancer Agent Ecteinascidin 743 in a Phase I Dose-finding Study. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4725–4732 (2000).
293. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and Safety of Trabectedin in Patients With Advanced or Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Prior Anthracyclines and Ifosfamide: Results of a Randomized Phase II Study of Two Different Schedules. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4188–4196 (2009).
294. Buonadonna, A. *et al.* A noninterventional, multicenter, prospective phase IV study of trabectedin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Anticancer. Drugs* **28**, 1157–1165 (2017).
295. Le Cesne, A. *et al.* Trabectedin in patients with advanced soft tissue sarcoma: A retrospective national analysis of the French Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* **51**, 742–750 (2015).
296. Le Cesne, A. *et al.* A randomized phase III trial comparing trabectedin to best supportive care in patients with pre-treated soft tissue sarcoma: T-SAR, a French Sarcoma Group trial. *Ann. Oncol.* (2021) doi:10.1016/j.annonc.2021.04.014.
297. Sessa, C. *et al.* Trabectedin for Women With Ovarian Carcinoma After Treatment With Platinum and Taxanes Fails. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1867–1874 (2005).
298. Beumer, J. H. *et al.* Trabectedin (Yondelis™, formerly ET-743), a mass balance study in patients with advanced cancer. *Invest. New Drugs* **23**, 429–436 (2005).
299. Perez-Ruixo, J. J. *et al.* Population Pharmacokinetic Meta-Analysis of Trabectedin (ET-743, Yondelis) in Cancer Patients. *Clin. Pharmacokinet.* **46**, 867–884 (2007).
300. Beumer, J. H., Lopez-Lazaro, L., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H. & van Tellingen, O. Evaluation of human plasma protein binding of trabectedin (Yondelis, ET-743). *Curr. Clin. Pharmacol.* **4**, 38–42 (2009).
301. Puchalski, T. *et al.* Pharmacokinetics of ecteinascidin 743 administered as a 24-h continuous intravenous infusion to adult patients with soft tissue sarcomas: associations with clinical characteristics, pathophysiological variables and toxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **50**, 309–319 (2002).
302. Beumer, J. H. *et al.* Metabolism of trabectedin (ET-743, Yondelis™) in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 825–837 (2007).
303. Le Cesne, A. *et al.* A retrospective pooled analysis of trabectedin safety in 1,132 patients with solid tumors treated in phase II clinical trials. *Invest. New Drugs* **30**, 1193–1202 (2012).
304. Meco, D. *et al.* Effective combination of ET-743 and doxorubicin in sarcoma: preclinical studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **52**, 131–138 (2003).
305. Takahashi, N., Li, W. W., Banerjee, D., Scotto, K. W. & Bertino, J. R. Sequence-dependent enhancement of cytotoxicity produced by ecteinascidin 743 (ET-743) with doxorubicin or paclitaxel in soft tissue sarcoma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 3251–3257 (2001).
306. Monk, B. J. *et al.* A phase 3 randomized, open-label, multicenter trial for safety and efficacy of combined trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin therapy for recurrent ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **156**, 535–544 (2020).

307. Monk, B. J. *et al.* Data on prior pegylated liposomal doxorubicin (PLD) treatment in recurrent ovarian cancer: Post-hoc data analysis from the phase 3 randomized, open-label study comparing trabectedin and PLD versus PLD alone in patients with recurrent ovarian cancer. *Data Brief* **30**, 105465 (2020).
308. Calvo, E. *et al.* Hepatic safety analysis of trabectedin: results of a pharmacokinetic study with trabectedin in patients with hepatic impairment and experience from a phase 3 clinical trial. *Invest. New Drugs* **36**, 476–486 (2018).
309. Thariat, J. *et al.* Pharmacokinetics of trabectedin on hemodialysis: an application for the management of cancer patients with end-stage renal disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**, 1363–1367 (2011).
310. Moe, M. M. M., Fernandez Teruel, C. & Soto-Matos, A. Experience with trabectedin in an advanced sarcoma patient on peritoneal dialysis for end-stage renal failure. *Chemotherapy* **59**, 458–460 (2013).
311. Vermeir, M. *et al.* In vitro studies on the metabolism of trabectedin (YONDELIS®) in monkey and man, including human CYP reaction phenotyping. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1642–1654 (2009).
312. Sparidans, R. W. *et al.* Search for metabolites of ecteinascidin 743, a novel, marine-derived, anti-cancer agent, in man: *Anticancer. Drugs* **12**, 653–666 (2001).
313. Beumer, J. H., Schellens, J. H. M. & Beijnen, J. H. Hepatotoxicity and metabolism of trabectedin: a literature review. *Pharmacol. Res.* **51**, 391–398 (2005).
314. Reid, J. M. *et al.* Rat and Human Liver Cytochrome P-450 Isoform Metabolism of Ecteinascidin 743 Does Not Predict Gender-dependent Toxicity in Humans. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2952–2962 (2002).
315. Marco, E., David-Cordonnier, M.-H., Bailly, C., Cuevas, C. & Gago, F. Further Insight into the DNA Recognition Mechanism of Trabectedin from the Differential Affinity of Its Demethylated Analogue Ecteinascidin ET729 for the Triplet DNA Binding Site CGA. *J. Med. Chem.* **49**, 6925–6929 (2006).
316. Soucek, P. & Gut, I. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **22**, 83–103 (1992).
317. Wilkinson, G. R. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **24**, 475–490 (1996).
318. Parkinson, A., Mudra, D. R., Johnson, C., Dwyer, A. & Carroll, K. M. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 193–209 (2004).
319. Brandon, E. F. A. *et al.* In vitro characterization of the human biotransformation and CYP reaction phenotype of ET-743 (Yondelis®, Trabectedin®), a novel marine anti-cancer drug. *Invest. New Drugs* **24**, 3–14 (2006).
320. Leporini, C. *et al.* A Comprehensive Safety Evaluation of Trabectedin and Drug–Drug Interactions of Trabectedin-Based Combinations. *BioDrugs* **28**, 499–511 (2014).
321. Brandon, E. F. A. *et al.* In-vitro cytotoxicity of ET-743 (Trabectedin, Yondelis), a marine anti-cancer drug, in the Hep G2 cell line: influence of cytochrome P450 and phase II inhibition, and cytochrome P450 induction. *Anticancer. Drugs* **16**, 935–943 (2005).
322. Machiels, J.-P. *et al.* Impact of cytochrome P450 3A4 inducer and inhibitor on the pharmacokinetics of trabectedin in patients with advanced malignancies: open-label, multicenter studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **74**, 729–737 (2014).
323. Fayette, J. *et al.* ET-743: A Novel Agent with Activity in Soft Tissue Sarcomas. *The Oncologist* **10**, 827–832 (2005).
324. Chuk, M. K., Balis, F. M. & Fox, E. Trabectedin. *The Oncologist* **14**, 794–799 (2009).
325. Synold, T. W., Dussault, I. & Forman, B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat. Med.* **7**, 584–590 (2001).
326. Ekins, S. & Erickson, J. A. A Pharmacophore for Human Pregnane X Receptor Ligands. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 96–99 (2002).
327. Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G. & Scotto, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6775–6779 (2000).

328. Sparfel, L. Pregnane X receptor-dependent and -independent effects of 2-acetylaminofluorene on cytochrome P450 3A23 expression and liver cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7** (2003).
329. Staudinger, J. L., Ding, X. & Lichti, K. Pregnane X receptor and natural products: beyond drug–drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 847–857 (2006).
330. Beumer, J. H. *et al.* Disposition and toxicity of trabectedin (ET-743) in wild-type and *mdr1* gene (P-gp) knock-out mice. *Invest. New Drugs* **28**, 145–155 (2010).
331. van Waterschoot, R. A. B. *et al.* ABCC2, ABCC3, and ABCB1, but not CYP3A, Protect against Trabectedin-Mediated Hepatotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7616–7623 (2009).
332. Grosso, F. *et al.* A comprehensive safety analysis confirms rhabdomyolysis as an uncommon adverse reaction in patients treated with trabectedin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **69**, 1557–1565 (2012).
333. Gronchi, A. *et al.* Phase II clinical trial of neoadjuvant trabectedin in patients with advanced localized myxoid liposarcoma. *Ann. Oncol.* **23**, 771–776 (2012).
334. Rathinamanickam, H. Trabectedin Induced Irreversible Hepatotoxicity: 1863. *Am. J. Gastroenterol.* **111**, S893 (2016).
335. Delaloge, S. *et al.* Ecteinascidin-743: A Marine-Derived Compound in Advanced, Pretreated Sarcoma Patients—Preliminary Evidence of Activity. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1248–1255 (2001).
336. Villalona-Calero, M. A. *et al.* A Phase I and Pharmacokinetic Study of Ecteinascidin-743 on a Daily × 5 Schedule in Patients with Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **8**, 75–85 (2002).
337. Ryan, D. P. *et al.* Phase I and Pharmacokinetic Study of Ecteinascidin 743 Administered as a 72-Hour Continuous Intravenous Infusion in Patients with Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **7**, 231–242 (2001).
338. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* **34**, 786–793 (2016).
339. D’Incalci, M. & Jimeno, J. Preclinical and clinical results with the natural marine product ET-743. *Expert Opin. Investig. Drugs* **12**, 1843–1853 (2003).
340. Donald, S. *et al.* Hepatobiliary Damage and Changes in Hepatic Gene Expression Caused by the Antitumor Drug Ecteinascidin-743 (ET-743) in the Female Rat. *Cancer Res.* **62**, 4256–4262 (2002).
341. Reid, J. M., Walker, D. L. & Ames, M. M. Preclinical pharmacology of ecteinascidin 729, a marine natural product with potent antitumor activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **38**, 329–334 (1996).
342. Donald, S. *et al.* Complete Protection by High-Dose Dexamethasone against the Hepatotoxicity of the Novel Antitumor Drug Yondelis (ET-743) in the Rat. *Cancer Res.* **63**, 5902–5908 (2003).
343. Donald, S. *et al.* Comparison of four modulators of drug metabolism as protectants against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the female rat and in hepatocytes in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**, 305–312 (2004).
344. Vermeir, M. *et al.* Cell-based models to study hepatic drug metabolism and enzyme induction in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**, 75–90 (2005).
345. Brandon, E. F. A., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189**, 233–246 (2003).
346. Grosso, F. *et al.* Steroid premedication markedly reduces liver and bone marrow toxicity of trabectedin in advanced sarcoma. *Eur. J. Cancer* **42**, 1484–1490 (2006).
347. Grisanti, S. *et al.* Hepatoprotective effect of N-acetylcysteine in trabectedin-induced liver toxicity in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Support. Care Cancer* **26**, 2929–2935 (2018).
348. Fabiano, S. *et al.* Epidemiology of Soft Tissue Sarcoma and Bone Sarcoma in Italy: Analysis of Data from 15 Population-Based Cancer Registries. *Sarcoma* **2020**, e6142613 (2020).
349. Robinson, D. R., Wu, Y.-M. & Lin, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548–5557 (2000).

350. Cohen, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5001–5010 (2001).
351. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
352. Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361–370 (2004).
353. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365 (2001).
354. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
355. Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol. Res.* **165**, 105463 (2021).
356. Thomson, R. J., Moshirfar, M. & Ronquillo, Y. Tyrosine Kinase Inhibitors. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
357. Harris, P. A. *et al.* Discovery of 5-[[4-[(2,3-Dimethyl-2 H -indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methyl-benzenesulfonamide (Pazopanib), a Novel and Potent Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor. *J. Med. Chem.* **51**, 4632–4640 (2008).
358. Jia, Y. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of pazopanib derivatives as antitumor agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **83**, 306–316 (2014).
359. Verheijen, R. B., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M., Huitema, A. D. R. & Steeghs, N. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pazopanib: Towards Optimized Dosing. *Clin. Pharmacokinet.* **56**, 987–997 (2017).
360. FDA. Drug Approval Package: Votrient (Pazopanib). Application number: 22-465. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022465s000TOC.cfm (2009).
361. Herbrink, M. *et al.* Solubility and bioavailability improvement of pazopanib hydrochloride. *Int. J. Pharm.* **544**, 181–190 (2018).
362. Patel, P. N. *et al.* Characterization of forced degradation products of pazopanib hydrochloride by UHPLC-Q-TOF/MS and in silico toxicity prediction. *J. Mass Spectrom.* **50**, 918–928 (2015).
363. Bukowski, R. M., Yasothan, U. & Kirkpatrick, P. Pazopanib. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 17–18 (2010).
364. Kumar, R. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2012–2021 (2007).
365. Hurwitz, H. I. *et al.* Phase I Trial of Pazopanib in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4220–4227 (2009).
366. Sternberg, C. N. *et al.* A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update. *Eur. J. Cancer* **49**, 1287–1296 (2013).
367. Motzer, R. J. *et al.* Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 722–731 (2013).
368. EMEA. Votrient® Pazopanib - Summary of Product Characteristics. Accessed online: March 21, 2021. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/votrient-epar-product-information_fr.pdf.
369. van der Graaf, W. T. A. *et al.* Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **379**, 1879–1886 (2012).
370. Mir, O. *et al.* Pazopanib plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced gastrointestinal stromal tumours resistant to imatinib and sunitinib (PAZOGIST): a randomised, multicentre, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 632–641 (2016).
371. du Bois, A. *et al.* Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 3374–3382 (2014).
372. Klempner, S. J. *et al.* Severe Pazopanib-Induced Hepatotoxicity: Clinical and Histologic Course in Two Patients. *J. Clin. Oncol.* **30**, e264–e268 (2012).

373. Kapadia, S., Hapani, S., Choueiri, T. K. & Wu, S. Risk of liver toxicity with the angiogenesis inhibitor pazopanib in cancer patients. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **52**, 1202–1212 (2013).
374. Powles, T. *et al.* Characterisation of liver chemistry abnormalities associated with pazopanib monotherapy: a systematic review and meta-analysis of clinical trials in advanced cancer patients. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **51**, 1293–1302 (2015).
375. Imbs, D.-C. *et al.* Determination of unbound fraction of pazopanib in vitro and in cancer patients reveals albumin as the main binding site. *Invest. New Drugs* **34**, 41–48 (2016).
376. Heath, E. I. *et al.* A phase I study of the pharmacokinetic and safety profiles of oral pazopanib with a high-fat or low-fat meal in patients with advanced solid tumors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**, 818–823 (2010).
377. Deng, Y. *et al.* Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **43**, 443–453 (2013).
378. Tan, A. R. *et al.* Effects of ketoconazole and esomeprazole on the pharmacokinetics of pazopanib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 1635–1643 (2013).
379. Deng, Y. *et al.* Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. **12**.
380. Wang, Y.-K. *et al.* A metabolomic perspective of pazopanib-induced acute hepatotoxicity in mice. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **49**, 655–670 (2019).
381. Paludetto, M.-N. *et al.* Metalloporphyrin-Catalyzed Oxidation of Sunitinib and Pazopanib, Two Anticancer Tyrosine Kinase Inhibitors: Evidence for New Potentially Toxic Metabolites. *J. Med. Chem.* **61**, 7849–7860 (2018).
382. Goh, B. C. *et al.* An Evaluation of the Drug Interaction Potential of Pazopanib, an Oral Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Using a Modified Cooperstown 5+1 Cocktail in Patients With Advanced Solid Tumors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**, 652–659 (2010).
383. Iwase, M. *et al.* Pazopanib interacts with irinotecan by inhibiting UGT1A1-mediated glucuronidation, but not OATP1B1-mediated hepatic uptake, of an active metabolite SN-38. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **83**, 993–998 (2019).
384. Mourey, L. *et al.* VOTRAGE study: Phase I dose-escalation study of pazopanib in unfit older patients. *J. Geriatr. Oncol.* **12**, 759–764 (2021).
385. Suttle, A. B. *et al.* Relationships between pazopanib exposure and clinical safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **111**, 1909–1916 (2014).
386. Duffaud, F. *et al.* Hypertension (HTN) as a potential biomarker of efficacy in pazopanib-treated patients with advanced non-adipocytic soft tissue sarcoma. A retrospective study based on European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 62043 and 62072 trials. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **51**, 2615–2623 (2015).
387. FDA. Drug Approval Package: Sutent (Sunitinib Malate) NDA #021938 & 021968. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021938s000_021968s000_Student.cfm.
388. Sun, L. *et al.* Discovery of 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1 H-pyrrole-3-carboxylic Acid (2-Diethylaminoethyl)amide, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *J. Med. Chem.* **46**, 1116–1119 (2003).
389. Mendel, D. B. *et al.* In Vivo Antitumor Activity of SU11248, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor Receptors: Determination of a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship. *Clin. Cancer Res.* **9**, 327–337 (2003).
390. EMEA. Sutent® Sunitinib - Summary of Product Characteristics. Accessed online: March 21, 2021. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sutent-epar-product-information_fr.pdf.

391. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *The Lancet* **368**, 1329–1338 (2006).
392. Motzer, R. J. *et al.* Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 115–124 (2007).
393. Motzer, R. J. *et al.* Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* **295**, 2516–2524 (2006).
394. Powles, T. *et al.* An indirect comparison of the toxicity of sunitinib and pazopanib in metastatic clear cell renal cancer. *Eur. J. Cancer* **48**, 3171–3176 (2012).
395. Shantakumar, S. *et al.* Occurrence of hepatotoxicity with pazopanib and other anti-VEGF treatments for renal cell carcinoma: an observational study utilizing a distributed database network. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 559–566 (2016).
396. de Wit, D. *et al.* Effect of gastrointestinal resection on sunitinib exposure in patients with GIST. *BMC Cancer* **14**, 575 (2014).
397. Amaya, G. M. *et al.* Cytochromes P450 1A2 and 3A4 Catalyze the Metabolic Activation of Sunitinib. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 570–584 (2018).
398. Speed, B. *et al.* Pharmacokinetics, distribution, and metabolism of [14C]sunitinib in rats, monkeys, and humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **40**, 539–555 (2012).
399. Westerdijk, K., Desar, I. M. E., Steeghs, N., Graaf, W. T. A. van der & Erp, N. P. van. Imatinib, sunitinib and pazopanib: From flat-fixed dosing towards a pharmacokinetically guided personalized dose. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **86**, 258–273 (2020).
400. Lankheet, N. A. G. *et al.* Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **110**, 2441–2449 (2014).
401. Yu, H. *et al.* Practical Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Anticancer Tyrosine Kinase Inhibitors: Focus on the Pharmacokinetic Targets. *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 305–325 (2014).
402. Teo, Y. L. *et al.* Role of sunitinib and SU12662 on dermatological toxicities in metastatic renal cell carcinoma patients: in vitro, in vivo, and outcomes investigation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**, 381–388 (2014).
403. Teo, Y. L. *et al.* Association of drug exposure with toxicity and clinical response in metastatic renal cell carcinoma patients receiving an attenuated dosing regimen of sunitinib. *Target. Oncol.* **10**, 429–437 (2015).
404. Faivre, S. *et al.* Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 25–35 (2006).
405. Houk, B. E. *et al.* Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 357–371 (2010).
406. Cabel, L. *et al.* Drug monitoring of sunitinib in patients with advanced solid tumors: a monocentric observational French study. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **32**, 98–107 (2018).
407. Takasaki, S. *et al.* Relationships between sunitinib plasma concentration and clinical outcomes in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* **23**, 936–943 (2018).
408. Wang, E., DuBois, S. G., Wetmore, C. & Khosravan, R. Population pharmacokinetics–pharmacodynamics of sunitinib in pediatric patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **86**, 181–192 (2020).
409. Kenny, J. R. *et al.* Drug-drug interaction potential of marketed oncology drugs: in vitro assessment of time-dependent cytochrome P450 inhibition, reactive metabolite formation and drug-drug interaction prediction. *Pharm. Res.* **29**, 1960–1976 (2012).
410. Filppula, A. M., Neuvonen, P. J. & Backman, J. T. In Vitro Assessment of Time-Dependent Inhibitory Effects on CYP2C8 and CYP3A Activity by Fourteen Protein Kinase Inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1202–1209 (2014).
411. Silverman, R. B. Mechanism-based enzyme inactivators. in *Methods in Enzymology* vol. 249 240–283 (Academic Press, 1995).

412. Zhao, H. *et al.* Identification of Ketene-Reactive Intermediate of Erlotinib Possibly Responsible for Inactivation of P450 Enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **46**, 442–450 (2018).
413. Kato, R., Ijiri, Y., Hayashi, T. & Uetrecht, J. Reactive metabolite of gefitinib activates inflammasomes: implications for gefitinib-induced idiosyncratic reaction. *J. Toxicol. Sci.* **45**, 673–680 (2020).
414. Attwa, M. W., Kadi, A. A. & Abdelhameed, A. S. Reactive intermediates and bioactivation pathways characterization of avitinib by LC–MS/MS: In vitro metabolic investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **164**, 659–667 (2019).
415. Paludetto, M., Puisset, F., Chatelut, E. & Arellano, C. Identifying the reactive metabolites of tyrosine kinase inhibitors in a comprehensive approach: Implications for drug-drug interactions and hepatotoxicity. *Med. Res. Rev. med.* 21577 (2019) doi:10.1002/med.21577.
416. Paludetto, M.-N. *et al.* Simultaneous monitoring of pazopanib and its metabolites by UPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **154**, 373–383 (2018).
417. Paludetto, M.-N. *et al.* Involvement of Pazopanib and Sunitinib Aldehyde Reactive Metabolites in Toxicity and Drug-Drug Interactions in Vitro and in Patient Samples. *Chem. Res. Toxicol.* **33**, 181–190 (2020).
418. Ahmed Laskar, A. & Younus, H. Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metab. Rev.* **51**, 42–64 (2019).
419. Charneira, C. *et al.* Reactive Aldehyde Metabolites from the Anti-HIV Drug Abacavir: Amino Acid Adducts as Possible Factors in Abacavir Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 2129–2141 (2011).
420. Walsh, J. S., Reese, M. J. & Thurmond, L. M. The metabolic activation of abacavir by human liver cytosol and expressed human alcohol dehydrogenase isozymes. *Chem. Biol. Interact.* **142**, 135–154 (2002).
421. Grilo, N. M. *et al.* Monitoring abacavir bioactivation in humans: Screening for an aldehyde metabolite. *Toxicol. Lett.* **219**, 59–64 (2013).
422. Hou, X. *et al.* Differences in the In Vivo and In Vitro Metabolism of Imrecoxib in Humans: Formation of the Rate-Limiting Aldehyde Intermediate. *Drug Metab. Dispos.* **46**, 1320–1328 (2018).
423. Gampe, C. & Verma, V. A. Curse or Cure? A Perspective on the Developability of Aldehydes as Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Med. Chem.* **63**, 14357–14381 (2020).
424. Weng, Z. *et al.* Regorafenib impairs mitochondrial functions, activates AMP-activated protein kinase, induces autophagy, and causes rat hepatocyte necrosis. *Toxicology* **327**, 10–21 (2015).
425. Chen, X., Yang, S., Pan, Y., Li, X. & Ma, S. Mitochondrial pathway-mediated apoptosis is associated with erlotinib-induced cytotoxicity in hepatic cells. *Oncol. Lett.* **15**, 783–788 (2018).
426. Eno, M. R., El-Gendy, B. E.-D. M. & Cameron, M. D. P450 3A-Catalyzed O-Dealkylation of Lapatinib Induces Mitochondrial Stress and Activates Nrf2. *Chem. Res. Toxicol.* **29**, 784–796 (2016).
427. Mingard, C., Paech, F., Bouitbir, J. & Krähenbühl, S. Mechanisms of toxicity associated with six tyrosine kinase inhibitors in human hepatocyte cell lines. *J. Appl. Toxicol.* **38**, 418–431 (2018).
428. Mookerjee, S. A., Divakaruni, A. S., Jastroch, M. & Brand, M. D. Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 463–472 (2010).
429. Dröse, S. & Brandt, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **748**, 145–169 (2012).
430. Cheng, J. *et al.* Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **982**, 359–370 (2017).
431. Paech, F., Bouitbir, J. & Krähenbühl, S. Hepatocellular Toxicity Associated with Tyrosine Kinase Inhibitors: Mitochondrial Damage and Inhibition of Glycolysis. *Front. Pharmacol.* **8**, 367 (2017).
432. Bouitbir, J. *et al.* Mitochondrial oxidative stress plays a critical role in the cardiotoxicity of sunitinib: Running title: Sunitinib and oxidative stress in hearts. *Toxicology* **426**, 152281 (2019).
433. Castellino, S. *et al.* Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: implications for hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **40**, 139–150 (2012).

TITLE: Pharmacological mechanisms involved in hepatotoxicity of anti-cancer drugs: focus on trabectedin and tyrosine kinase inhibitors

SUMMARY: The central role of the liver in drug metabolism may expose it to molecules with high hepatotoxic potential or reactive metabolic products directly issued from their biotransformation. Drug-induced liver injury (DILI) is an important public health concern as it is the primary cause of drug withdrawal by the FDA. Due to their multifactorial origine and in absence of a specific clinico-biological signature, the understanding of the mechanisms supporting DILIs constitutes a major challenge for their management. Two independent but complementary projects are presented in this thesis which primary objective was to bring new explanations and to complete the current knowledges about the hepatotoxic effects related to anticancer drugs. The objective of the first study presented in this manuscript was to elucidate the participation of genetic polymorphisms of CYP450 enzymes and ABC transporters in the interindividual variability of the hepatotoxicity of trabectedine. The results of this pharmacogenetic study in a cohort of patients with advanced soft tissue sarcoma are part of a comprehensive approach for the clinical prevention of liver toxicity related to this cytotoxic drug. Pazopanib and sunitinib are two oral tyrosine kinase inhibitors (TKIs) used for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. However, their intake exposes patients to a high risk of liver dysfunction. To date, few studies have attempted to explain the mechanisms underlying the development of these hepatotoxic effects. However, there is a growing interest in the production of toxic metabolites which would have the ability to bind essential components of the hepatocytes like proteins, lipids or nucleic acids. In the continuity of a recent work led by our team, the second project presented in this thesis aimed at characterizing the role of two aldehydes derivatives of sunitinib and pazopanib: firstly, in the TKIs-related hepatotoxicity and secondly, in the drug-drug interactions described in patients treated with these two molecules.

KEY-WORDS: hepatotoxicity; pharmacogenetics; reactive metabolites; trabectedin; tyrosine kinases inhibitors

AUTEUR : Maud MAILLARD

TITRE : Etude des mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité des médicaments anticancéreux : exemples de la trabectedine et des inhibiteurs de tyrosine kinases

DIRECTRICE DE THESE : Dr Fabienne THOMAS

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 19 octobre 2021, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

RESUME : Le rôle essentiel du foie dans le métabolisme des médicaments l'expose constamment à des molécules au potentiel hépatotoxique important ou capables d'être biotransformées en métabolites réactifs. Première cause du retrait des médicaments par la FDA, les hépatotoxicités médicamenteuses (ou DILI pour Drug-induced Liver Injuries) sont un problème de santé publique majeur. Multifactorielles et sans signature clinico-biologique spécifique, la compréhension des mécanismes à l'origine de ces lésions hépatiques constitue un enjeu majeur pour leur prise en charge. C'est autour de cette problématique que s'articulent les deux projets indépendants présentés dans cette thèse mais dont les approches sont complémentaires pour l'étude des effets hépatotoxiques causés par les médicaments anticancéreux. L'objectif de la première étude présentée dans ce manuscrit était d'élucider la part des polymorphismes génétiques des gènes codant pour des enzymes CYP450 et des transporteurs ABC dans la variabilité interindividuelle appliquée à l'hépatotoxicité de la trabectedine. Les résultats de cette étude pharmacogénétique menée sur une cohorte de patients atteints de sarcomes des tissus mous avancés s'inscrivent dans une démarche de prévention des effets indésirables en proposant des outils de dépistage du risque hépatotoxique. Le pazopanib et le sunitinib sont deux inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) oraux utilisés dans le cadre du traitement du cancer rénal métastatique et leur prise expose les patients à un fort risque d'atteinte hépatique. Aujourd'hui, peu de travaux sont parvenus à expliquer la totalité des mécanismes soutenant l'apparition de ces effets. Un intérêt croissant est tout de même porté à la production de métabolites toxiques qui auraient la capacité de fixer les composants indispensables au fonctionnement de la cellule hépatique (protéines, lipides, acides nucléiques). Dans la continuité de récents travaux menés par notre équipe, le second projet présenté dans cette thèse avait pour objectif d'étudier le rôle de deux dérivés aldéhydes issus de la biotransformation hépatique du sunitinib et du pazopanib, d'une part dans la toxicité hépatique mais également dans les interactions médicamenteuses décrites chez les patients traités par les molécules mères.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS : voir au recto de la dernière page de la thèse

MOTS CLES : hépatotoxicité ; inhibiteurs de tyrosine kinases ; métabolites réactifs ; trabectedine ; pharmacogénétique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Sciences de la vie et de la santé – Pharmacologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Equipe DIAD "*Dose Individualization of Anticancer Drugs*"
Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM UMR1037, CNRS ERL5294
2, avenue Hubert Curien 31100 Toulouse