



Société Française de  
Pharmacologie  
et de Thérapeutique

Groupe  
Suivi Thérapeutique Pharmacologique

---

**RECOMMANDATIONS POUR L'ANALYSE PHARMACOGENETIQUE  
DE LA TPMT (PHENOTYPAGE/GENOTYPAGE) ET LE SUIVI  
THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DE L'**AZATHIOPRINE**  
DANS LES CYTOPENIES AUTO-IMMUNES DE L'ENFANT.  
(jan. 2012)**

Laurent Chouchana<sup>(1,2)</sup>, Marie-Anne Lorient<sup>(1,2)</sup> et Delphine Allorge<sup>(3)</sup>, pour le Réseau National de Pharmacogénétique et le groupe Suivi Thérapeutique Pharmacologique de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

- (1) Service de Biochimie, UF de Pharmacogénétique et d'Oncologie Moléculaire, HEGP, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris.
- (2) UMR-S 775 Inserm/Université Paris Descartes.
- (3) Service de Toxicologie-Génopathies, Centre de Biologie-Pathologie, CHRU Lille.

---

Cet article a pour objectif de proposer des modalités de suivi thérapeutique pharmacologique (STP) et de pharmacogénétique de l'azathioprine (AZA ; Imurel®) dans le contexte des cytopénies auto-immunes de l'enfant.

**CONTACT :**

Dr Delphine Allorge dallorge@univ-lille2.fr

Responsable de l'UF de Toxicologie  
Centre de Biologie-Pathologie/CHRU de Lille Bd du Pr. J. Leclercq  
59037 Lille cedex, FRANCE  
Tel : +33(0)320444967 ou +33(0)320626818

## **Cytopénies auto-immunes :**

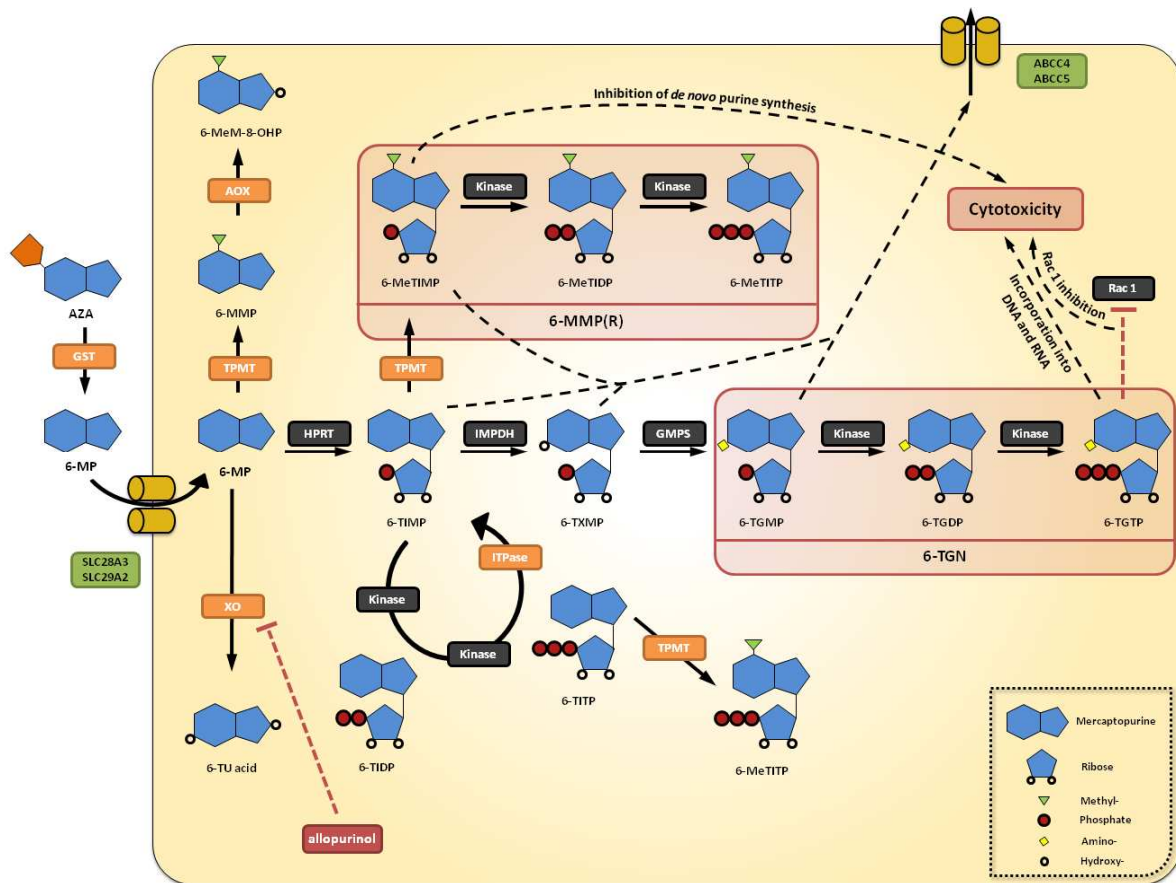
Les cytopénies auto-immunes (purpuras thrombopéniques immunologiques, PTI ; et anémies hémolytiques auto-immunes, AHAI) sont des maladies hématologiques rares et graves du jeune enfant. Ces pathologies évoluent très fréquemment vers la chronicité et s'accompagnent alors de maladies auto-immunes ou de déficits immunitaires nécessitant des traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs prolongés.

Les données de la littérature pédiatrique ne permettent pas, à ce jour, de déterminer une stratégie thérapeutique optimale en cas d'échappement au traitement de première ligne (immunoglobulines polyvalentes et/ou corticothérapie). La splénectomie est le traitement curatif le plus efficace (guérison dans 50 à 85% des cas), mais son indication chez l'enfant est envisagée le plus tard possible. De fait, les traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs sont largement prescrits en deuxième ligne. Il s'agit notamment du rituximab, de l'azathioprine, du mycophénolate mofetil, de la ciclosporine et de l'hydroxychloroquine. Cependant l'utilisation de ces différentes molécules demeure très empirique. Seule l'azathioprine possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication.<sup>1</sup>

## **Justification de l'optimisation thérapeutique de l'azathioprine par l'analyse pharmacogénétique de la TPMT (phénotypage/génotypage) et par le suivi thérapeutique pharmacologique, basé sur le dosage des métabolites de l'azathioprine (6-TGN et 6-MMP[R]) :**

L'azathioprine (AZA) – classe pharmacologique : thiopurines – est une pro-drogue nécessitant une bioactivation, *via* un métabolisme complexe, afin d'exercer son effet thérapeutique (Fig. 1). *In fine*, les métabolites produits à partir de l'AZA sont les 6-thioguanine nucléotides (6-TGN), très largement responsables de l'effet immunosuppresseur, et les dérivés méthylés ou 6-méthyl-mercaptopurine ribonucléotides (6-MMP[R]). Une concentration sanguine élevée en 6-TGN entraîne leur accumulation dans les tissus hématopoïétiques qui est à l'origine d'une toxicité hématologique importante, de type leucopénie-neutropénie (10-20%), voire aplasie médullaire (1-5%) pouvant être létale. Par ailleurs, une concentration élevée de manière durable en 6-MMP[R] est très probablement à l'origine d'hépatites (10%).<sup>2</sup>

La variabilité inter-individuelle du métabolisme de l'AZA explique une part importante de la variabilité dans la réponse clinique à ce médicament. En particulier, une enzyme clé de ce processus métabolique la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) présente des variations d'activité importantes, en lien avec un polymorphisme génétique. Ainsi, la mesure de l'activité TPMT (ou la prédiction de l'activité par le génotype TPMT) *a priori* permet de dépister les patients méthyleurs déficitaires (homozygotes mutés ou hétérozygotes composites) et les patients méthyleurs intermédiaires (hétérozygotes) qui sont, respectivement, à très haut risque et à risque élevé de développer une toxicité hématologique sévère et précoce, en l'absence d'une réduction posologique ou de l'arrêt du traitement.<sup>2</sup>



**Figure 1.** Métabolisme des thiopurines. D'après Chouchana *et al.* 2012.<sup>2</sup>

### Intérêt clinique du phénotypage/génotypage de la TPMT

- De manière générale, il existe une bonne corrélation entre le génotype et le phénotype TPMT sur la base de la recherche de 3 principales mutations (caractérisant les allèles sauvage (TPMT\*1) et mutés : TPMT\*2 et TPMT\*3A-B-C). La présence de l'un de ces allèles mutés est associée à un déficit d'activité de la TPMT. Cependant, il faut noter qu'il existe des discordances phénotype-génotype, principalement dans le cas de mutations rares qui ne sont pas recherchées *a priori*.<sup>3</sup>

- L'apparition d'une myélosuppression est fortement liée à une activité TPMT déficitaire entraînant un métabolisme préférentiel vers la formation des 6-TGN et une accumulation excessive de ces derniers.<sup>4,5</sup>

- De nombreuses études ou cas cliniques dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et des leucémies aiguës lymphoblastiques ont décrit des patients ayant une activité basse/nulle ou un génotype homozygote muté développant une leucopénie sévère durant les deux premières semaines de traitement à dose standard.<sup>6-12</sup> Néanmoins, ces patients peuvent être traités de façon satisfaisante par AZA en diminuant la posologie initiale selon les recommandations.<sup>13-</sup>

- Dans une population de 106 patients atteints de MICI, dont 10 porteurs d'une activité TPMT intermédiaire et d'un génotype TPMT hétérozygote, Ansari *et al.*<sup>18</sup> ont mis en évidence une association entre l'apparition d'effets indésirables et une activité TPMT intermédiaire (OR, 5.4; IC 95% , 1.5–19.8; p=0.0082).

- Dans une étude rétrospective sur 262 patients atteints de MICI de Zelinkova *et al.*<sup>6</sup>, la présence d'une mutation sur le gène de la TPMT était prédictive de l'apparition d'une leucopénie (OR, 6.316; IC 95%, 2.141–18.634; p=0.004) ; les doses d'AZA étaient équivalentes dans les deux groupes.

#### Dosage érythrocytaire des 6-TGN et des 6-MMP[R]

- Dans une population de 92 patients pédiatriques atteints de MICI, Dubinsky *et al.*<sup>5</sup> ont montré que l'efficacité clinique était significativement corrélée aux concentrations en 6-TGN et une concentration supérieure au seuil de 235 pmol/8.10<sup>8</sup> globules rouges (GR) était un facteur prédictif de la réponse (65% vs 27% ; p<0.001). Les patients avec une concentration en 6-MMP[R] supérieure à 5700 pmol/8.10<sup>8</sup> GR ont trois fois plus de risque de développer une hépatite (18% vs 6%). Dans cette étude, les 6-TGN sont plus élevés chez les patients avec un génotype hétérozygote par rapport à ceux avec un génotype homozygote sauvage (589 vs 256 pmol/8.10<sup>8</sup> GR ; p<0.0001).

- Dans une population de 51 patients pédiatriques atteints de MICI et résistants à l'AZA, Dubinsky *et al.*<sup>19</sup> ont montré qu'une augmentation de la dose d'AZA en fonction des concentrations sanguines en 6-TGN et en 6-MMP[R] permet d'obtenir une réponse clinique chez 27% des patients, associée à une augmentation significative des concentrations en 6-TGN (de 183 à 306 pmol/8.10<sup>8</sup> GR ; p=0.03). Par ailleurs, des concentrations plus élevées en 6-MMP[R] ont été mesurées chez les patients développant une hépatite (12751 vs 6627 pmol/8.10<sup>8</sup> GR; p<0.001). De plus, un ratio 6-MMP[R]/6-TGN inférieur à 11 semble être un facteur prédictif d'une réponse thérapeutique.

- Dans une étude comportant 207 patients adultes atteints de MICI, Ansari *et al.*<sup>20</sup> ont mis en évidence un taux de rémission plus élevé chez les patients ayant des concentrations sanguines en 6-TGN supérieures à 100 pmol/8.10<sup>8</sup> GR (74% vs 46% ; p=0.0017) ; chez ces patients, il y avait une tendance à plus de succès cliniques en présence de concentrations en 6-TGN plus élevées (p=0.018).

**La corrélation entre les concentrations en 6-TGN et la réponse clinique est encore discutée, et les zones thérapeutiques encore débattues.<sup>21-23</sup> Les 6-MMP[R] ont un rôle encore mal connu dans l'efficacité clinique. Le ratio 6-MMP[R]/6-TGN semble être un facteur prédictif de la réponse clinique.**

**Par ailleurs, les valeurs des concentrations peuvent varier selon les laboratoires et les techniques de dosages. Il est donc préférable d'effectuer le STP d'un patient dans le même laboratoire.**

## L'azathioprine dans les cytopénies auto-immunes de l'enfant

La littérature ne rapporte aucune information objective concernant l'utilisation des différents tests pharmacologiques dans le cadre des cytopénies auto-immunes de l'enfant.

Cependant, l'intérêt du dépistage des patients ayant une activité TPMT déficitaire a été démontré pour la prévention des accidents hématologiques aussi bien chez des patients atteints de MICI (adulte et pédiatrie) que dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant.<sup>13,24</sup>

De même, pour la relation concentration-toxicité, il est clairement établi que des concentrations trop élevées en 6-TGN sont fortement liées à l'apparition d'une toxicité hématologique (neutropénie jusqu'à aplasie médullaire) ; les concentrations élevées de manière durable en 6-MMP[R] sont très probablement liées à l'apparition d'une toxicité hépatique. Elles peuvent également refléter une activité TPMT élevée, révélatrice d'une orientation préférentielle du métabolisme vers la production de 6-MMP[R] et d'un risque de résistance pharmacologique à un traitement par thiopurine.

Concernant la relation concentration-efficacité, les données sont parfois contradictoires concernant le seuil de concentration minimale efficace en 6-TGN, mais il semble qu'*a minima*, une concentration supérieure à 100-200 pmol/8.10<sup>8</sup> GR soit nécessaire pour obtenir une efficacité clinique.

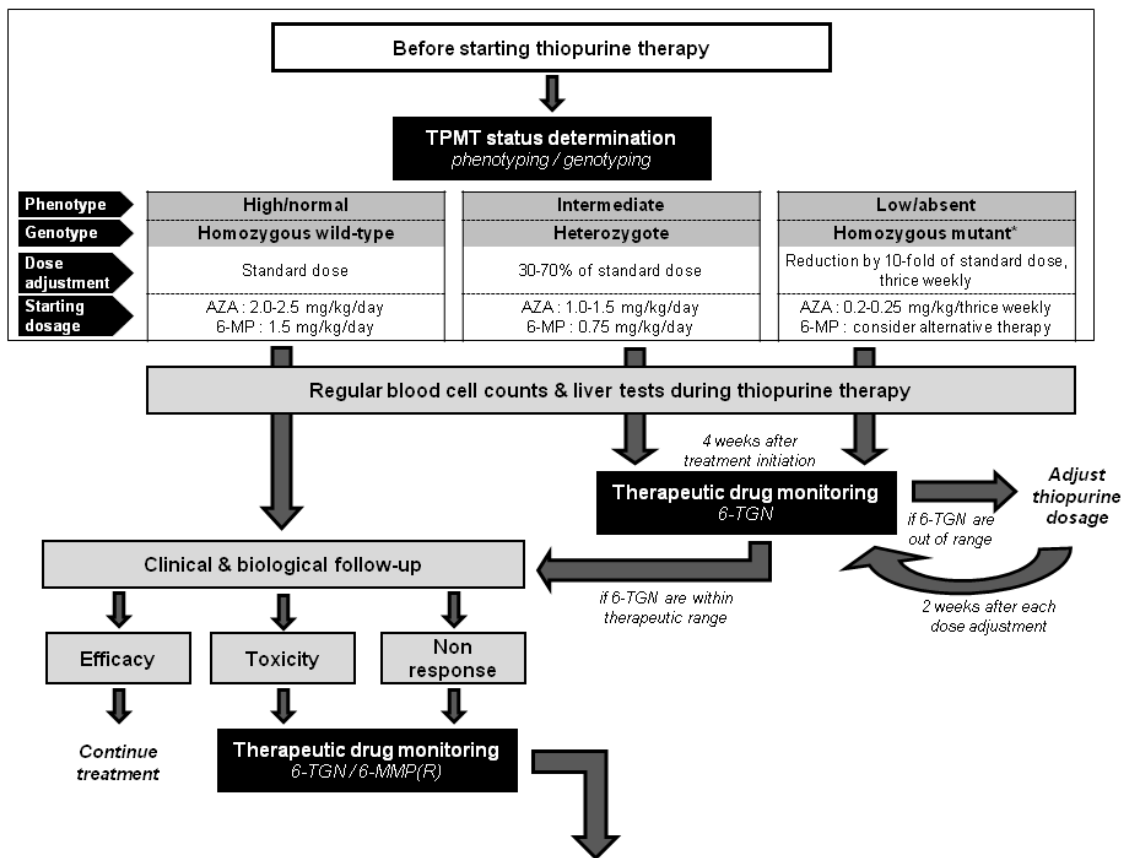
Au total, la détermination du statut TPMT par phénotypage ou génotypage avant le traitement est fortement conseillée.

Le STP est indiqué, *a minima*, en cas de :

- validation d'une adaptation posologique chez un patient méthyleur déficitaire ou intermédiaire ;
- toxicité hématologique ou hépatique ;
- résistance au traitement ;
- suspicion de non-observance du patient.

## Proposition de prise en charge thérapeutique des patients sous azathioprine

(adapté de Chouchana *et al.* 2012)<sup>2</sup>



	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
<b>TDM</b>	low/absent 6-TGN and low/absent 6-MMP	low 6-TGN and low 6-MMP	low 6-TGN and high 6-MMP	high 6-TGN and low 6-MMP	high 6-TGN and high 6-MMP
<b>Risk</b>	inefficacy (false resistance)	inefficacy or poor response	poor response and/or hepatotoxicity	myelotoxicity	myelotoxicity and/or hepatotoxicity
<b>Hypothesis</b>	poor compliance to treatment	underdosing	very high TPMT activity i.e. pharmacological resistance to thiopurines	deficient TPMT activity	overdose or refractoriness to thiopurines
<b>Action</b>	therapeutic patient education	increase thiopurine dosage	increase thiopurine dosage cautiously (monitor liver function) or switch to another drug	decrease thiopurine dosage according to TPMT phenotype*	switch to another drug if active disease

## Phénotypage de la TPMT

### **Modalités :**

Mesure *ex-vivo* de l'activité enzymatique sur des cytosols érythrocytaires par dosage chromatographique de la 6-MMP formée après ajout de 6-MP.

### **Condition de réalisation :**

- De préférence avant l'initiation du traitement de manière à déterminer la posologie initiale ; l'activité enzymatique est potentiellement modifiée par le traitement.
- Au cours du traitement pour expliquer l'apparition d'une toxicité.
- A distance d'au moins 3 mois d'un épisode transfusionnel car risque de phénocopie (interférence avec l'activité TPMT des GR transfusés).

## Génotypage de la TPMT

### **Modalités :**

Recherche des variants alléliques TPMT\*2, \*3A, \*3B et \*3C par discrimination allélique avec des sondes fluorescentes (PCR quantitative en point final) ou autre méthode de biologie moléculaire (séquençage).

### **Condition de réalisation :**

- De préférence avant l'initiation du traitement de manière à déterminer la posologie initiale.
- Au cours du traitement pour expliquer l'apparition d'une toxicité.
- Utile lorsque le phénotypage n'est pas réalisable ou difficile à interpréter (valeur d'activité égale ou proche des valeurs-seuil décisionnelles).

## Suivi thérapeutique pharmacologique

### **Modalités :**

Dosage des métabolites pharmacologiquement actifs 6-TGN et 6-MMP[R] après hydrolyse acide sur des cytosols érythrocytaires.

### **Condition de réalisation :**

Les 6-TGN ont une demi-vie longue (3-13 jours) et varient faiblement en cas d'absence de prise du médicament la veille du prélèvement.

Etat d'équilibre atteint environ en 4-5 semaines.

- Validation d'une adaptation posologique chez un patient avec TPMT déficitaire ou intermédiaire.
- Toxicité hématologique ou hépatique.
- Résistance au traitement
- Suspicion de non-observance du patient.

## EN PRATIQUE

### **Modalités de prélèvement :**

Pour le phénotypage : prélèvement de 5mL à effectuer sur tube EDTA ou sur tube hépariné (selon le laboratoire).

Pour le génotypage : prélèvement de 5mL à effectuer sur tube EDTA, accompagné du consentement éclairé d'analyse génétique signé par le patient.

Pour le STP : prélèvement de 5mL à effectuer sur tube EDTA ou sur tube hépariné (selon le laboratoire).

### **Recueil du prélèvement :**

- Phénotypage : de préférence avant le début d'un traitement par azathioprine.
- Génotypage : de préférence avant le début d'un traitement par azathioprine.
- STP : au cours du traitement en résiduelle, c'est à dire juste avant la prise de l'azathioprine ;  
à partir de 2 semaines de traitement si patient avec une activité TPMT déficitaire/intermédiaire ou à partir de 4 semaines de traitement pour les patients avec une activité TPMT normale.

### **Acheminement du prélèvement :**

Délai et conditions de température : +2 à +8°C si acheminement dans les 48h.

Attention : **congélation à proscrire** en vue de la préparation des globules rouges

Protection de la lumière : non

Traitement pré-analytique: non



## **Références :**

1. *Protocole national de diagnostic et de soins: Anémies hémolytiques auto-immunes*. 32 (HAS / Service Maladies chroniques et dispositifs d'accompagnement des malades: 2009).à <[www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)>
2. Chouchana, L., Narjoz, C., Beaune, P., Lorient, M.-A. & Roblin, X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 15-36 (2012).
3. Schaeffeler, E. *et al.* Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* **14**, 407-417 (2004).
4. Lennard, L., Van Loon, J.A., Lillieyman, J.S. & Weinshilboum, R.M. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **41**, 18-25 (1987).
5. Dubinsky, M.C. *et al.* Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **118**, 705-713 (2000).
6. Zelinkova, Z. *et al.* Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* **4**, 44-49 (2006).
7. Gisbert, J.P. & Gomollón, F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am. J. Gastroenterol* **103**, 1783-1800 (2008).
8. Gardiner, S.J., Geary, R.B., Barclay, M.L. & Begg, E.J. Two cases of thiopurine methyltransferase (TPMT) deficiency--a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* **62**, 473-476 (2006).
9. Schwab, M. *et al.* Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology* **121**, 498-499 (2001).
10. Cuffari, C., Théorêt, Y., Latour, S. & Seidman, G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* **39**, 401-406 (1996).
11. Wright, S., Sanders, D.S., Lobo, A.J. & Lennard, L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1123-1128 (2004).
12. Gupta, P., Gokhale, R. & Kirschner, B.S. 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* **33**, 450-454 (2001).
13. Relling, M.V. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther* **89**, 387-391 (2011).
14. Meggitt, S.J., Gray, J.C. & Reynolds, N.J. Azathioprine dosed by thiopurine methyltransferase activity for moderate-to-severe atopic eczema: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **367**, 839-846 (2006).
15. Kaskas, B.A. *et al.* Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* **52**, 140-142 (2003).
16. Andersen, J.B., Szumlanski, C., Weinshilboum, R.M. & Schmiegelow, K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr* **87**, 108-111 (1998).
17. Evans, W.E., Horner, M., Chu, Y.Q., Kalwinsky, D. & Roberts, W.M. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr* **119**, 985-989 (1991).
18. Ansari, A. *et al.* Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther* **16**, 1743-1750 (2002).
19. Dubinsky, M.C. *et al.* 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 904-915 (2002).
20. Ansari, A. *et al.* Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther* **28**, 973-983 (2008).
21. Lowry, P.W. *et al.* Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **49**, 665-670 (2001).
22. Reuther, L.O. *et al.* Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scand. J. Gastroenterol* **38**, 972-977 (2003).
23. Wusk, B. *et al.* Therapeutic drug monitoring of thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease or autoimmune hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **16**, 1407-1413 (2004).
24. FDA Summary of Product Characteristics: Imuran®.  
<[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/016324s034s0351bl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/016324s034s0351bl.pdf)>.