
Maladie de Crohn : facteurs de résistance à l'Imurel®

XAVIER ROBLIN

CHU de Grenoble - Grenoble

L'azathioprine est un des « gold standard » dans la prise en charge de la MC. Le délai d'action de la molécule est long (délai moyen de 3.1 mois) et est variable en fonction du patient (entre 1 à 11 mois). Dans 20% des cas, chez les patients répondeurs, ce délai dépasse 4 mois. Classiquement, on estimait qu'il ne fallait pas conclure à un échec de l'AZA avant 9 mois. La connaissance pharmacologique de l'AZA a permis d'améliorer l'efficacité de la molécule et de mieux surveiller sa prescription. Des facteurs de résistance à l'AZA ont ainsi pu être identifiés.

A- RAPPEL SUR LE METABOLISME DE L'AZATHIOPRINE : figure 1

L'AZA est utilisée en transplantation depuis 1963, cependant son métabolisme n'est pas complètement connu. Dans l'organisme, l'AZA est très rapidement transformée en 6-MP, par une réaction non enzymatique faisant intervenir le glutathion, puis la 6-MP est elle-même métabolisée selon 3 voies enzymatiques compétitives (1,2)

- la 1ère voie est sous la dépendance de l'Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPGRT) intra-cellulaire qui conduit aux 6-thioguanine nucléotides (6-TGN) qui représentent les métabolites actifs de l'AZA. Les 6-TGN s'accumulent dans les érythrocytes où ils séjournent car ces cellules ne synthétisent pas d'acides nucléiques, et servent ainsi de tissu de substitution dans lequel on peut doser les 6-TGN. Il n'existe pas de polymorphisme génétique documenté de cette enzyme. La 6-MP, sous l'action de l'HPGRT, est d'abord convertie en 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) puis en 6-thioxanthosine monophosphate (6-TXMP) puis en 6-thioguanosine monophosphate, puis di- et triphosphates (6-TGMP, 6-TGDP, 6-TGTP respectivement). Ce sont ces derniers métabolites qui sont dosés dans les 6-TGN. Les dérivés TIMP peuvent également être méthylés sous l'action de la TPMT. Ces dérivés Me-TIMP ont également une action immunsuppressive par inhibition de la synthèse *de novo* des purines (3) car ce sont des inhibiteurs potentiels de la phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransférase (PRPP-AT), enzyme catalysant la première étape de la synthèse *de novo* des purines.

- la 2ème voie de la Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) qui transforme la 6-MP en dérivé méthylé, la 6-methylmercaptopurine (6-MMP). La TPMT est une enzyme cytoplasmique qui catalyse de façon préférentielle la S-méthylation des composés sulphydryls aromatiques et hétérocycliques tels que la 6-MP. La cytotoxicité de l'AZA est influencée par la TPMT; il existe en effet une relation inverse entre le taux de 6-TGN et l'activité TPMT. Un polymorphisme génétique de la TPMT a été démontré. Dans les tissus humains (érythrocytes, leucocytes, plaquettes, hépatocytes, et cellules rénales) cette enzyme suit une distribution trimodale (4) : 88,6% des sujets ont une activité élevée, 11,1% une activité intermédiaire et, chez 0,3% des sujets, l'activité n'est pas détectée. Un déficit de cette voie enzymatique entraîne une déviation du métabolisme de l'AZA vers la voie HGPRT augmentant ainsi la production des métabolites actifs, les 6-TGN, responsables de la myélotoxicité. Chez les patients présentant un déficit complet de cette activité, l'évitement de l'AZA est théoriquement définitive. Inversement, plus l'activité TPMT est élevée, moins il y a de formation de 6-TGN, dérivés cytotoxiques, source d'AZA résistance. Il existe une induction possible de l'activité de la TPMT par l'AZA et par les diurétiques, diminuant de ce fait l'efficacité de l'AZA. L'activité TPMT mesurée sous AZA comprend 2 composants, un niveau basal génétiquement déterminé et un niveau induit par l'AZA. La sulphasalazine, essentiellement, et les salicylés, plus modérément, ont un effet direct inhibiteur sur l'activité TPMT prédisposant ainsi les patients à l'activité cytotoxique des 6-TGN.

- la 3ème voie de la xanthine oxydase (XO) conduit à l'acide 6-thiourique, métabolite inactif éliminé par voie rénale. Cette enzyme est absente des leucocytes circulants et présente dans les érythrocytes. Elle est retrouvée en quantité importante dans le foie et la muqueuse de l'intestin grêle. Il n'existe pas de polymorphisme génétique documenté de cette enzyme. Le déficit en xanthine oxydase reste une anomalie autosomique rare, elle toucherait 2% de la population générale et se traduit par une hypouricémie. La variabilité de transformation de l'AZA par ces 2 dernières voies implique une adaptation individuelle de

posologie car elle peut provoquer des troubles toxiques. La combinaison possible d'un déficit concomitant de la xanthine oxidase et de la TPMT pourrait être à l'origine d'une intolérance rapide et sévère à l'AZA ; dans ce cas, une hypouricémie pourrait en être le témoin indirect (5). Une inhibition de son activité par l'allopurinol a été décrite rendant nécessaire la diminution des doses d'AZA des 2/3 ou des 3/4 de façon à ne pas dévier le métabolisme de l'AZA vers les composés cytotoxiques (6-TGN).

B-RESISTANCE A L'AZATHIOPRINE : UN PROBLEME DE METABOLISME.

La résistance à l'AZA est fréquemment rencontrée aux doses habituellement prescrites (2 à 2,5 mg/kg/jour). Cette notion nous impose souvent de changer de thérapeutique ou d'augmenter, "à l'aveugle", la posologie d'AZA. Inversement, devant toute toxicité, notamment hématologique, de l'AZA, un arrêt de la molécule ou une baisse de posologie est effectué sans possibilité de l'analyse du mécanisme.

Ces complications sont la conséquence :

- d'une activité TPMT élevée ou un déficit,
- d'un sous-dosage en AZA : d'où l'intérêt d'un "monitorage" des 6-TGN.

1. Activité TPMT élevée :

Si environ 1/300 patient (0,3%) a un déficit génétique en TPMT, une activité significativement plus élevée de cette enzyme est en fait plus fréquemment retrouvée, dans environ 10% des cas. Dans ce cas, le métabolisme de l'AZA est "dévié" vers la 6-MMP. Ces dérivés méthylés, souvent considérés comme inactifs, ont toutefois également un effet immunsupresseur car ce sont des inhibiteurs potentiels de la synthèse des purines *de novo*. De façon concomitante, ces patients ont un taux de 6-TGN bas du fait de la relation inverse entre l'activité TPMT et le taux des 6TGN. Par contre des données récentes impliqueraient la 6-MMP dans l'hépatotoxicité de l'AZA, notamment pour des taux de 6-MMP > 6000 pmoles/8.10⁸ érythrocytes (5). Des données récentes montrent également

qu'une déplétion en glutathion, sous l'action de l'AZA, entraînerait des lésions mitochondrielles qui aboutiraient à la mort hépatocytaire par déplétion en ATP (6).

2. Sous-dosage en AZA :

Une illustration simple de ce fait est que les patients qui ne répondent pas à l'AZA, à la posologie usuelle de 2 à 2,5 mg/kg/j, peuvent répondre à des posologies plus élevées en cas de MICI. Ceci est probablement lié aux particularités du métabolisme de l'AZA (cf ci-dessus). Dans ce cas, il paraît intéressant de disposer d'un marqueur d'efficacité du métabolisme de l'AZA ; les 6-TGN apparaissent comme le candidat potentiel Dans ce contexte, un suivi du taux des 6-TGN pourrait être d'une grande aide dans la surveillance thérapeutique des patients sous AZA. Le but recherché étant d'optimiser le rapport efficacité/toxicité de l'AZA. Ce dosage a également un intérêt dans l'étude de la compliance des patients. En effet, la mise en évidence d'un taux de 6-TGN bas ou nul avec une activité TPMT normale confirme la non-observance thérapeutique. Cuffari et al (7), ont, les premiers, montré une corrélation inverse entre le niveau de 6TGN et l'évolutivité de la MC. Un taux de 6-TGN > 250 pmol/8x10⁸ érythrocytes était hautement corrélé avec la rémission clinique chez plus de 130 adolescents avec MC. De même, Dubinsky et al. (8), dans une étude prospective chez 92 patients de moins de 19 ans, porteurs d'une maladie de Crohn (n=79), d'une rectocolite hémorragique (n=8) ou d'une colite indéterminée (n=5), sous 6-MP ou AZA depuis au moins 4 mois, sont arrivés aux mêmes conclusions. Le taux médian des 6-TGN était plus élevé chez les répondeurs que chez les non répondeurs (312 vs 199, P<0,0001). Le taux seuil de 6-TGN, au-delà duquel les patients avaient une probabilité élevée de répondre au traitement était de 235 pmoles/8x10⁸ érythrocytes. Les taux de 6-TGN étaient significativement associés avec la réponse (P=0,002). Cela confirme que l'efficacité de l'AZA n'est pas fonction des doses mais de son métabolisme (la dose efficace n'étant que le témoin du métabolisme de l'AZA par le patient).

La détermination du génotypage et/ou de l'activité TPMT, avant institution d'un traitement par AZA, a également un intérêt pour savoir quels sont les patients susceptibles de faire un accident hématologique sous AZA (homozygotes déficitaires, activité TPMT faible) ou au contraire d'être répondeurs faibles (activité TPMT élevée). Une récente étude du GETAID sur les MICI (9) montre que seulement 27% des patients qui ont présenté un accident hématologique sous AZA sont déficitaires en TPMT. Dans ce cas, les accidents hématologiques surviennent dans le premier mois suivant l'introduction de l'AZA, voire même dans les 2 premières semaines. Ceci suppose que l'on ne parle pas d'échec thérapeutique tant que le taux des 6-TGN n'est pas > 250 pmoles, 8.10^8 érythrocytes ou que l'on n'attribue pas trop vite à l'AZA son imputabilité dans les complications hématologiques, privant ainsi le patient d'une molécule efficace. On peut en effet penser que la détermination du génotypage et/ou de l'activité TPMT avant introduction de l'AZA et la surveillance des 6-TGN devrait permettre 1) de raccourcir le délai d'action de l'AZA, 2) d'optimiser le pourcentage de rémission clinique tout en diminuant la toxicité (notamment hématologique), 3) de proposer aux patients résistants (activité TPMT élevée) une autre voie thérapeutique comme, par exemple, la 6-thioguanine (6-TG) qui est essentiellement métabolisée par l'HGPRT, court-circuitant ainsi les étapes enzymatiques limitantes, et qui débouche directement sur les 6-TGN, ou l'association éventuelle avec des inhibiteurs de la TPMT (dérivés 5-amino-salicylés ou inhibiteurs sélectifs).

C- INTERET DU DOSAGES PHARMACOLOGIQUE DES METABOLITES DE L'AZA

1- Le dosage des 6TGN :

L'existence d'un seuil de 6-TGN reste encore débattu. Trois études ont isolés un seuil d'efficacité des 6TGN : Dubinsky et al. avec 235 pmol (8) , C Cuffari et al. avec 250 pmol (7) puis 292 pmol (10). A l'inverse , Lowry et al. (11) n'isolaient pas de seuil d'efficacité des 6TGN. Dans notre expérience, le monitorage des 6-TGN nous a permis de montrer,

qu'à deux mois, l'absence de rémission clinique malgré un taux de 6-TGN > 250 pmol
présentait une valeur prédictive de résistance à l'AZA de 91% (12). De plus, l'augmentation des doses d'AZA, afin d'obtenir un taux de 6TGN> 250 pmoles, chez 73 patients en échec d'AZA, a permis d'obtenir une rémission clinique sans corticothérapie dans 80% des cas à 6 mois (13). La discordance des résultats sur l'existence ou non d'un seuil pour les 6-TGN est sans doute liée à la technique de dosage des 6-TGN. Ainsi même si la discussion d'un seuil d'efficacité reste ouverte, tout le monde s'accorde à penser que ce dosage est utile, soit en cas d'inefficacité de l'AZA (recherche d'une non observance ou d'une activité TPMT élevée), soit en cas d'effets secondaires hématologiques ou hépatotoxiques (recherche de taux élevé de 6-TGN ou d'un rapport 6-MMP/6-TGN élevé). SI le seuil d'efficacité de l'AZA est débattu, il n'existe quasiment aucune donnée sur un seuil éventuel de résistance à l'AZA. Dans une étude prospective (14) sur 81 patients porteurs de MICI, nous avons montré que l'absence de rémission clinique malgré un taux de 6-TGN supérieur à 400 pmoles était synonyme de résistance à l'AZA . Ainsi dans aucun cas, une augmentation des doses d'AZA ne permettait d'obtenir une rémission clinique mais augmentait le risque iatrogène.

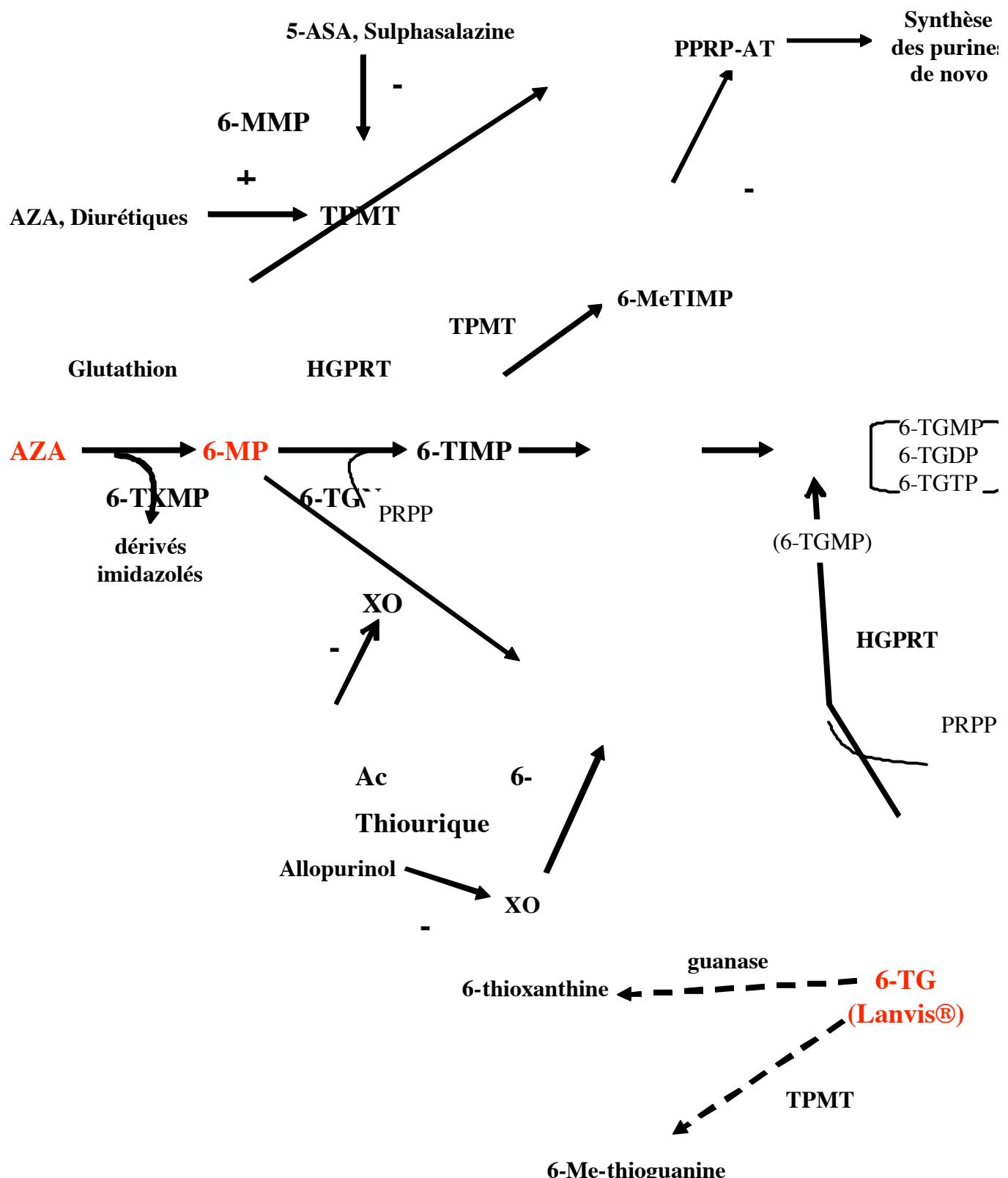
2- Intérêt du dosage de l'activité TPMT :

Cuffari et al. ont montré récemment qu'un taux d'activité TPMT > 12UI/ml était un facteur de résistance à l'AZA (15). Ces résultats doivent être confirmés par des études randomisées, et prospectives. Cara et al. proposent ainsi de corrélérer la dose d'AZA en fonction du taux d'activité TPMT.

3- Intérêt du génotypage de la TPMT :

Les patients porteurs d'une mutation homozygote au niveau du gène de la TPMT présentent un risque majeur et précoce de myelotoxicité . Si l'AZA n'est pas contre-indiquée formellement, la dose à utiliser ne doit pas dépasser 0,2 à 0,3 mg/kg/j sous surveillance du taux de 6-TGN et de l'hémogramme. Les résultats de F Colombel et al

(16) ne montrant pas de lien entre génotypage et myélotoxicité étaient confirmés par Dubinsky et al. montrant que seul 1 patient sur 12 présentant une leucopénie sous AZA était porteur d'une mutation du gène de la TPMT.



Métabolisme de l'AZA/6-MP et 6-TG

HGPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl
transférase

Fig 1 : Métabolisme de l'AZA

Références :

- 1-Lennard L, Brown CB, Fox M, Maddocks JL.. Azathioprine metabolism in kidney transplant recipients. Br J Clin Pharmacol 1984 ; 18 : 693-700.
- 2-Serre-Debeauvais F, Touraine JL. Pharmacological monitoring of azathioprine therapy in transplantation and clinical immunology vol XXIV Touraine JL et al. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1992 : 211-216.
- 3-Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptopurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. Biochim Biophys Acta 1993;1181 : 189-194.
- 4-Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM.. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Clin Pharmacol Ther 1989; 46: 149-154.
- 5-Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliaskas EA.. An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. Inflammatory Bowel Disease 2001; 7: 181-189.
- 6- Lee AU, Farrel GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes : roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. J Hepatol 2001; 35 : 756-764.
- 7-Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G.. 6Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease : correlation with efficacy and toxicity. Gut 1996; 39: 401-406.

8-Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118 :705-713.

9-Colombel JF, Ferrari N, Debuyse H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B.. Genotypic analysis of the thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000 ;118 : 1025-103..

10- Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:410-7.

11- Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001;49:665-70.

12- Roblin X, Serres Debeauvais F, Phelip JM, Bessard G, Bonaz B. Intérêt d'un monitorage précoce des 6TGN au cours des MICI sous Azathioprine : étude prospective chez 120 patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2004 ;28,A9.

13-Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM, Faucheron JL, Hardy G, Chartier A, Helluwaert F, Bessard G, Bonaz B. 6-tioguanine monitoring in steroid-dependent patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Apr 1;21(7):829-39.

14-Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM, Faucheron JL, Hardy G, Chartier A, Helluwaert F, Bessard G, Bonaz B . A 6-TGN threshold of 400pmoles is a predictive factor of AZA resistance in IBD patients without clinical remission. *Gastroenterology* 2005;128;4:A61

15-Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 May;2(5):410-7.

16-Colombel JF, Ferrari N, Debuyse H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F Genotypic analysis of thiopurine S

methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1025-30.