

DOSAGE DES NUCLÉOTIDES DE LA 6-THIOGUANINE (N6TG), DE LA 6-MERCAPTOPYRINE (N6MP) ET DE LA 6 MÉTHYLMERCAPTOPYRINE (N6MMP) LORS DE L'ADMINISTRATION DE L'AZATHIOPRINE (IMURAN®) ET DE LA MERCAPTOPYRINE (PURINETHOL®).

Bernard Vinet, Ph. D.
Pharmacologie Toxicologie
Département de biochimie
CHUM – Hôpital Notre-Dame
1560 Sherbrooke est, Montréal, Qc.
CANADA, H2L 4M1

RÉSUMÉ.

Cet article constitue une brève revue des données récentes de la littérature scientifique sur le sujet. Les mécanismes de biotransformation, d'action et la pharmacogénomique de l'azathioprine et de la mercaptopurine sont passés en revue. Les conditions où les dosages sanguins des métabolites de ces deux médicaments sont utiles sont présentées et les méthodes de dosage disponibles sont brièvement décrites.

ABSTRACT

This paper is a brief review of the literature on the biotransformation, action mechanism and pharmacogenomic of azathioprine and mercaptopurine. Conditions for the significance of blood level determinations of the metabolites of these two drugs are presented and the analytical methods available are briefly described.

USAGE THÉRAPEUTIQUE

L'azathioprine et la mercaptopurine sont administrées comme immunosuppresseurs pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin (1,2,3), certaines atteintes dermatologiques (4), l'arthrite (5), en transplantation d'organes (6,7,8) et pour traiter la leucémie, particulièrement chez les enfants. Ils sont souvent en association avec des stéroïdes, dont la prednisone.

BIOTRANSFORMATION

L'azathioprine est une prodrogue rapidement transformée dans le tube digestif de façon non enzymatique en 6-mercaptopurine. Sa biodisponibilité n'est que de l'ordre de 50%. L'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPR1) la transforme en acide thioinosique et celui-ci est transformé en nucléotides de la 6 thioguanine (N6TG)

considérés comme les éléments actifs. La xanthine oxydase transforme les N6TG en acide thiourique (inactif) et la thiopurine méthyle transférase (TPMT) en nucléotides de la 6 méthyle mercaptopurine (N6MMP) aussi inactifs mais suspectés d'une partie du moins des effets toxiques (1).

ACTION

Ces produits agissent au niveau de la synthèse de l'ADN des cellules prolifératives et en particulier des leucocytes. Les N6TG seraient incorporés à l'ADN au lieu des nucléotides à guanine ce qui impliquerait des erreurs de lecture et des mutations fatales (9, 10). Il fut démontré que les CD3+ et CD56+ et le TNFalpha étaient abaissés tandis que les CD4+ et CD45 RA+ étaient augmentés (11).

EFFETS SECONDAIRES

L'azathioprine serait bien tolérée chez 80 à 90% des patients traités pour les maladies inflammatoires de l'intestin. Les effets secondaires sont cependant importants et peuvent être divisés en deux catégories (1). Les réactions d'ordre allergique apparaîtraient 3 à 4 semaines après le début du traitement et seraient caractérisées par de la fièvre, un rash, des nausées et autres perturbations gastro-intestinales. Les effets non allergiques apparaîtraient plus tard, des mois voire une année après le début du traitement. Ils se traduisent par des désordres hématologiques, néoplasiques et des hépatites.

PHARMACOGÉNOMIQUE

Le métabolisme de la mercaptopurine est sensible à plusieurs médicaments et conditions physiologiques. L'allopurinol inhibe la xanthine oxydase et pourrait bloquer une partie de l'élimination du médicament et accroître les risques de toxicité (6). La TPMT est affectée par divers médicaments. Elle est inhibée par S-méthylation, par les salicylates, le 5-aminosalicylate et le furosémide (12). De plus, elle présente plusieurs variantes génétiques. Il existerait une déficience en cette enzyme chez 0,3% de la population. Cette déficience produirait une accumulation des N6TG et une intoxication rapide ; 89% des individus métabolisent rapidement la 6MP tandis que 11% sont de niveau intermédiaire. Les Noirs américains présentent moins d'activité tandis que chez les Coréens il n'existerait pas de variantes génétiques connues. Pour identifier les déficients en TPMT, plusieurs approches furent proposées. Il est possible de mesurer l'activité de l'enzyme plasmatique par une méthode radioisotopique (13). Il est aussi possible de faire le génotypage et d'identifier l'allèle lent par PCR. Récemment il fut proposé de mesurer les paramètres pharmacocinétiques de l'azathioprine en tout début de traitement par mesures sériées des concentrations sanguines (14).

UTILITÉ DES DOSAGES SANGUINS

Existe-t'il un lien entre les effets secondaires,

l'activité biologique de la mercaptopurine et la concentration sanguine de ses métabolites ? La réponse à cette question est au cœur même de l'utilité des suivis des traitements thérapeutiques à l'azathioprine par des concentrations sanguines et, selon la littérature scientifique à ce jour, il semblerait que ce soit un sujet à controverse. Il existe en effet des études qui ne montrent pas de lien entre le pouvoir immunosuppresseur, les effets toxiques (leucopénie) et les concentrations sanguines des N6MP et N6TG (15). Cependant, les résultats de ces études sont difficiles à interpréter et à valider pour plusieurs raisons. D'abord, il semble que l'action du médicament tarde à se manifester. Ce n'est qu'après plusieurs semaines de traitement que l'organisme peut être considéré en équilibre. De plus, le médicament est souvent donné en association avec d'autres immunosuppresseurs pouvant présenter des effets toxiques tels que la cyclosporine, la prednisone. Mais, à mon avis, la raison majeure pour tarder à confirmer l'utilité des mesures des métabolites de la mercaptopurine est d'ordre analytique. Les métabolites sont instables dans le sang, les nucléotides doivent être hydrolysés pour libérer les bases associées et ce à des températures élevées qui risquent de compromettre l'intégrité des molécules mesurées et leur rendement d'extraction. Il est généralement admis que les dosages doivent être faits dans les globules rouges au lieu du plasma bien qu'un dosage dans l'ADN lymphocytaire ait été décrit (16) et devrait théoriquement mieux représenter l'action biologique. Ce n'est que sous des conditions analytiques standardisées que les diverses études pourront être comparées.

SEUILS THÉRAPEUTIQUE ET TOXIQUE

Malgré toutes ces limitations, des études récentes confirment que le dosage dans les globules rouges est en relation avec la toxicité et l'effet biologique en transplantation rénale (6,7, 8) et cardiaque (17). Un seuil thérapeutique de 100 à 200 pmoles / 8×10^8 hématies en triple thérapie est admis en transplantation tandis que le seuil toxique serait de 450 pmoles / 8×10^8 hématies.

MESURE HPLC

Les méthodes d'analyse sont par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Elles permettent de déterminer simultanément les trois bases 6TG, 6MP et 6MMP. Brièvement, les globules rouges sont recueillis par centrifugation, lavés avec de la saline et les protéines précipitées à l'acide perchlorique. Les nucléotides sont hydrolysés par chauffage à 100 °C et les bases libérées analysées par HPLC avec gradient d'acétonitrile en milieu acide. La détection est en UV avec programmation de longueur d'onde en cours d'analyse. À cause d'une susceptibilité à l'oxydation, le prélèvement doit être gardé au froid et du dithiothréitol est ajouté immédiatement après le prélèvement pour préserver le groupe SH. Les cellules doivent être lavées rapidement et comptées puisque les résultats sont normalisés pour un compte globulaire de 8×10^8 hématies (18,19,20). Toutes ces contraintes analytiques rendent l'analyse laborieuse et difficile.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sandborn W. J. Azathioprine : state of the art in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33 Suppl 225 :

- 92-9.
2. Kirschner B. S. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 813-821.
3. Robinson M. Optimizing therapy for inflammatory bowel disease. *Amer J Gastroenterology* 1997; 92 :12S-17S.
4. Tan B. B. , Lear J. T., Gawkrödger D. J., English J. S. Azathioprine in dermatology : a survey of current practice in U. K. *Br J Dermatology* 1997; 136 :351-5.
5. Ramsey-Goldman R. Schilling E. Immunosuppressive drugs used during pregnancy. *Rheumatic Dis Clinics North Amer* 1997; 23 :149-67.
6. Bergan S. Rugstad H. E. Bentdal O. et al. Monitored high-dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66; 334-339.
7. Bergan S. Rugstad H. E. et al. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine : 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Ther Drug Monit* 1997; 19 : 318-326.
8. El-Gamel A. Evans C. et al. Effect of allopurinol on the metabolism of azathioprine in heart transplant patients. *Transplant. Proceedings* 1998; 30 : 1127-1129.
9. Uribe-Luna S., Quintana-Hau J. D. et al. Mutagenic consequences of the incorporation of 6-thioguanine into DNA. *Biochem Pharmacol* 1997; 54 : 419-24.
10. Waters T. R., Swann P. F. Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine : hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylguanine. *Biochemistry* 1997; 36 :2501-6.
11. Salmaggi A. Corsini E. et al. Immunological monitoring of azathioprine treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurology* 1997; 244 :167-74.
12. Lennard L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monit* 1998; 20 : 527-31
13. Yates C. R. Krynetske E. Y. et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency : genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals Intern Med* 1997; 126 : 608-14.
14. Escousse A. Guedon F. et al. 6-Mercaptopurine pharmacokinetics after use of azathioprine in renal transplant recipients with intermediate or high thiopurine methyl transferase activity phenotype. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50 : 1261-6.
15. Bouliou R. Lenoir A. et al. Intracellular thiopurine nucleotides and azathioprine myelotoxicity in organ transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 43 :116-8.
16. Cuffari C. Seidman E. G. et al. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74 : 580-5.
17. Schütz E. Gummert J. et al. Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipient given azathioprine? *Ther Drug Monit* 1996 ; 18 : 228-33.
18. Dervieux T. Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem* 1998; 44 : 551-5.
19. Rowland K., Lennard L. Lilleyman J. S. High-performance liquid chromatography assay of methylthioguanine nucleotide. *J Chromatogr B.* 1998; 705 : 29-37.
20. Mawatari H. Kato Y. et al. Reversed- phase high-performance liquid chromatographic assay method for quantitating 6-mercaptopurine and its methylated and non methylated metabolites in a single sample. *J Chromatogr B.* 1998; 716 : 392-396.