



Faculté de Médecine

**Impact des polymorphismes génétiques du  
cytochrome P450 2B6 sur les concentrations  
plasmatiques de l'EFV et de la NVP chez les patients  
infectés par le virus VIH-1 au Rwanda**

Thèse présentée par

**Alain Gras**

En vue de l'obtention du titre de  
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : Prof. Vincent Bours  
Co-Promoteur : Dr. Carole Devaux

Réalisée au Laboratoire de Rétrovirologie  
Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg

Année académique 2012-2013

## Résumé de la thèse

**Objectifs:** Plus de 34 millions de personnes sont infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la majorité d'entre eux (22.5 millions) vit en Afrique Sub-Saharienne. Au Rwanda, où plus de 96000 individus ont eu accès aux antirétroviraux en 2013, la thérapie antirétrovirale de première ligne contient entre autres les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, éfavirenz (EFV) ou névirapine (NVP). Une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques en EFV et en NVP a cependant été observée qui est partiellement due à la forte variabilité génétique du cytochrome P450 2B6 (CYP2B6). Les objectifs de ce travail de thèse ont consisté (i) à identifier de nouveaux polymorphismes ponctuels (SNP) au niveau du gène *CYP2B6*, dans la population rwandaise (ii) de caractériser leurs effets sur l'activité enzymatique *in vitro* et *in silico*, (iii) à déterminer la fréquence des nouveaux SNP et de SNP connus dans une population rwandaise de patients infectés au VIH et (iv) à associer les polymorphismes et les haplotypes qui en étaient déduits aux concentrations plasmatiques d'EFV, de NVP et de leurs principaux métabolites hydroxylés.

**Méthodes :** Les neuf exons de *CYP2B6* de 39 individus rwandais ont été séquencés. Huit nouveaux SNP ont été exprimés dans des cellules COS-1 et la fonction enzymatique des nouvelles variantes *CYP2B6* a été déterminée *in vitro* par l'intermédiaire des substrats bupropion et EFV. Ces résultats ont été comparés au potentiel prédictif de huit algorithmes. Des analyses de docking et des simulations de dynamique moléculaire à long terme ont décrit des changements de la structure tertiaire du *CYP2B6* et du mode de liaison entre le site actif et les substrats de l'enzyme. 19 SNP ont été par la suite génotypés par une méthode de MALDI-TOF et 11 SNP ont été discriminés par PCR en temps réel chez 806 individus rwandais. Les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'EFV, de NVP et des métabolites 7-OH-, 8-OH-, 8,14-OH EFV et 2-OH, 3-OH NVP ont été quantifiées par LC/MS-MS chez 431 patients rwandais traités par EFV ou NVP. L'effet du génotype sur la distribution des inhibiteurs non nucléosidiques EFV et NVP a été étudié par des tests statistiques univariés et multivariés

**Résultats :** Trois nouveaux SNP [c.548T>G (p.V183G), c.637T>C (p.F213L), c.758G>A (p.R253H)] et cinq SNP dont la fonction n'était pas connue [c.329G>T (p.G110V), c.341T>C (p.I114T), c.444G>T (p.E148D), c.835G>C (p.A279P), c.1459C>A (p.R487S)] ont été identifiés et assignés aux cinq nouveaux allèles *CYP2B6*\*33 – *CYP2B6*\*37. Les analyses *in vitro* ont montré que les variantes 148D, 253H, 279P et 487S sont fonctionnelles tandis que la variante 213L a une activité enzymatique réduite et les variantes 110V, 114T et 183G sont non-fonctionnelles. 60% à 80% des prédictions de la fonction de chaque variante faites *in silico* étaient correctes. Les simulations de dynamique moléculaire à long terme ont montré que les variantes 110V, 114T, 183G et 213L entraînent des modifications structurales au niveau d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  qui entourent le site catalytique de l'enzyme *CYP2B6*. La fréquence des huit polymorphismes dans la population rwandaise était <0.9% ce qui les a classés comme variantes rares. 71% des 219 patients sous traitement EFV et 42% des 212 patients traités par NVP présentaient respectivement des concentrations supra- et sub-thérapeutiques. Un nouvel allèle *CYP2B6*Rwa7 (SNP c.341T>C, c.444G>T et c.835G>C) a été significativement associé à de faibles concentrations en EFV et NVP. L'haplotype TGT (c.516G>T, c.785A>G et g.21563C>T) a été fortement associé à des concentrations plasmatiques élevées d'EFV et de NVP et à de faibles taux plasmatiques en 8-OH EFV et 3-OH NVP. Le génotype \*6/\*18, le polymorphisme homozygote g.21563TT ainsi que l'haplotype TGT sous sa forme homozygote ont été identifiés comme les principaux facteurs indépendants responsables des concentrations plasmatiques élevées en EFV.

**Conclusions :** Nous avons décrit trois nouveaux SNP dont deux ont un impact sur la fonction enzymatique du *CYP2B6* *in vitro* et assigné cinq nouveaux allèles *CYP2B6* dans la population rwandaise. Nos travaux ont identifié un nouvel allèle *CYP2B6* qui a été associé à des concentrations faibles d'EFV et de NVP et confirmé l'existence de marqueurs génétiques permettant de prédire des concentrations supra-thérapeutiques en EFV. Ces résultats suggèrent une stratégie individualisée de génotypage afin de soutenir l'efficacité et la persistance de la thérapie antirétrovirale en Afrique Sub-Saharienne.

## Abstract

**Objectives:** Over 34 million individuals are living worldwide with the human immunodeficiency virus (HIV) and the majority living in Sub-Saharan Africa (22.5 million). In Rwanda, more than 96000 patients were receiving antiretroviral drugs by 2013. The Rwandese first-line treatment is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor based regimen containing either efavirenz (EFV) or nevirapine (NVP). High interindividual variations in EFV and NVP plasma concentrations have been reported which are partially caused by the high genetic variability of the cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*). The aims of this thesis project were (i) to identify new single nucleotide polymorphisms (SNP) within the *CYP2B6* gene, (ii) to characterize *in vitro* and *in silico* their effects on the enzyme activity, (iii) to determine the frequency of new and known SNP in HIV-infected patients from Rwanda and (iv) to correlate the SNP/haplotypes with plasma concentrations of EFV, NVP and their main hydroxy metabolites.

**Methods:** The nine *CYP2B6* exons of 39 individuals from Rwanda were sequenced. Eight new non-synonymous SNP were recombinantly expressed in COS-1 cells and the new *CYP2B6* variants were functionally characterized *in vitro* using the substrates bupropion and EFV. The results were compared with the functional prediction potency of eight algorithms. Docking and long-term molecular dynamic (MD) simulations were performed to describe structural changes and interaction modifications between the substrates and the *CYP2B6* binding pocket. 19 SNP were genotyped with a MALDI-TOF genotyping method and 11 SNP were discriminated with real time PCR in 806 individuals from Rwanda. Steady-state EFV, NVP and their main hydroxy metabolites 7-OH-, 8-OH-, 8,14-OH EFV and 2-OH, 3-OH NVP were quantified using LC/MS-MS in 431 Rwandese patients under EFV or NVP therapy. Uni- and multivariate statistical analyses were performed to assess the genotype significance in EFV and NVP drug distribution.

**Results:** Three new [c.548T>G (p.V183G), c.637T>C (p.F213L), c.758G>A (p.R253H)] and five uncharacterized non-synonymous SNP [c.329G>T (p.G110V), c.341T>C (p.I114T), c.444G>T (p.E148D), c.835G>C (p.A279P), c.1459C>A (p.R487S)] were identified and five novel alleles termed *CYP2B6*\*33 – *CYP2B6*\*37 were assigned. *In vitro* analysis revealed that the variants 148D, 253H, 279P and 487S were functional whereas the variant 213L showed a reduced enzyme activity and the variants 110V, 114T and 183G were complete loss-of-function variants. 60% to 80% of the *in silico* functional predictions of each variant were correct. The MD simulations showed that only the variants 110V, 114T, 183G and 213L had structural modifications in  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands surrounding the catalytic site of the *CYP2B6* enzyme. The frequency of the eight polymorphisms in the Rwandese population was <0.9% classifying them as rare variants. 71% of 219 EFV-treated patients and 42% of 212 NVP-treated patients had supra- and sub-therapeutic plasma concentrations, respectively. A new allele termed *CYP2B6Rwa7* (SNP c.341T>C, c.444G>T, c.835G>C) was significantly associated to low EFV and NVP concentrations. The “*CYP2B6*-TGT” haplotype (c.516T, c.785G, g.21563T) was strongly related to high EFV and NVP and low 8-OH EFV and 3-OH NVP plasma concentrations. The \*6/\*18 genotype, the homozygous g.21563TT SNP and the homozygous TGT haplotype were found as the most relevant independent factors to account for high EFV concentrations.

**Conclusions:** We have described three novel SNP with two altering the *CYP2B6* enzyme function *in vitro* and assigned five new *CYP2B6* alleles in a Rwandese population. Our research work allowed us to identify a new *CYP2B6* allele which was correlated to low EFV and NVP concentrations and to confirm the existence of genetic markers predicting supra-therapeutic EFV plasma concentrations. Our results suggest an individualized genotyping strategy to sustain the efficiency and the durability of the antiretroviral therapy in Sub-Saharan Africa.

# Table des Matières

Résumé de thèse – Abstract of the thesis .....	i
Table des Matières .....	iii
Remerciements .....	vi
Composition du Jury de thèse .....	vii
Liste des Abréviations .....	viii
<b>I. Introduction</b>	
<b>1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine.....</b>	<b>1</b>
1.1. Origine du SIDA .....	1
1.2. Les Rétrovirus/Lentivirus.....	2
1.3. Transmission du VIH.....	10
1.4. La Primo-Infektion .....	12
1.5. La Phase de Latence .....	15
1.6. La Prévention de l'Infection au VIH.....	16
1.6.1. Les préservatifs .....	16
1.6.2. La circoncision.....	17
1.6.3. La prévention de la transmission mère-enfant.....	17
1.6.4. Le vaccin anti-VIH.....	18
1.6.5. PrEP et PrEP oral .....	19
<b>2. Les Traitements Antirétroviraux .....</b>	<b>21</b>
2.1. Différentes Classes d'Antirétroviraux .....	22
2.1.1. Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	23
2.1.1.1. Inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse .....	23
2.1.1.2. Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse .....	24
2.1.2. Inhibiteurs de la protéase virale .....	25
2.1.3. Inhibiteurs de l'intégrase .....	25
2.1.4. Inhibiteurs de la fusion .....	26
2.1.5. Inhibiteurs des corécepteurs .....	26
2.2. La Trithérapie Antirétrovirale (ART).....	27
2.3. Initialisation du Traitement Antirétroviral .....	28
2.4. Effets Secondaires de la Thérapie Antirétrovirale .....	29
2.4.1. Effets secondaires des INNTI .....	30
2.5. Résistance du Virus aux Traitements Antirétroviraux.....	32

2.5.1. Résistance aux INNTI.....	32
<b>3. La Pharmacogénétique .....</b>	<b>36</b>
3.1. Les Cytochromes P450 .....	38
3.1.1. Activité enzymatique des cytochromes P450.....	40
3.1.2. Induction des cytochromes P450.....	41
3.1.3. Variabilité des cytochromes P450 .....	43
3.2. Variations Génétiques intervenant dans le Catabolisme des Antirétroviraux.....	44
3.2.1. <i>PXR</i> .....	46
3.2.1.1. <i>PXR</i> 63396C>T .....	46
3.2.2. <i>CAR</i> .....	47
3.2.2.1. <i>CAR</i> rs3003596T>C .....	47
3.2.3. <i>UGT2B7</i> .....	47
3.2.3.1. <i>UGT2B7*1a</i> .....	47
3.2.3.2. <i>UGT2B7*1c</i> (735A>G) .....	47
3.2.3.3. <i>UGT2B7*2a</i> (802C>T).....	47
3.2.4. <i>CYP3A4</i> .....	48
3.2.4.1. <i>CYP3A4*1B</i> (-392A>G) .....	48
3.2.5. <i>CYP3A5</i> .....	48
3.2.5.1. <i>CYP3A5*3</i> (6986A>G).....	48
3.2.5.2. <i>CYP3A5*6</i> (14690G>A).....	50
3.2.5.3. <i>CYP3A5*7</i> (G27131-32insT) .....	50
3.2.6. <i>CYP2C19</i> .....	50
3.2.6.1. <i>CYP2C19*2</i> (681G>A) .....	50
3.2.7. <i>CYP2D6</i> .....	51
3.2.7.1. <i>CYP2D6*3</i> (2549A>del) .....	51
3.2.7.2. <i>CYP2D6*4</i> (1846G>A).....	51
3.2.7.3. <i>CYP2D6*6</i> (1707T>del) .....	52
3.2.8. <i>CYP2A6</i> .....	52
3.2.9. <i>CYP2B6</i> .....	53
3.2.9.1. Catabolisme des INNTI EFV et NVP.....	55
3.2.9.2. Impact des polymorphismes du CYP2B6 sur le catabolisme des INNTI.....	57
<b>4. La République Démocratique du Rwanda .....</b>	<b>63</b>
<b>II. Objectifs de Recherche .....</b>	<b>67</b>
<b>III. Résultats</b>	

<b>1. Nouvelles variantes de l'enzyme CYP2B6 dans une population rwandaise: caractérisation fonctionnelle et valorisation d'outils de prédiction <i>in silico</i>.....</b>	<b>69</b>
1.1. Introduction .....	69
1.2. Résultats .....	69
1.3. Conclusions.....	70
1.4. Publication.....	70
<b>2. Impact de variantes nouvelles et connues du CYP2B6 sur les concentrations plasmatiques d'éfavirenz, de névirapine et de leurs métabolites chez des patients du Rwanda sous thérapie antirétrovirale .....</b>	<b>89</b>
2.1. Introduction .....	89
2.2. Résultats .....	89
2.3. Conclusions .....	90
2.4. Publication .....	90
<b>IV. Discussion Générale.....</b>	<b>128</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>140</b>
<b>Annexe</b>	
<b>1. Publications Supplémentaires.....</b>	<b>154</b>
<b>2. Présentations à des Congrès Internationaux.....</b>	<b>154</b>

## **Remerciements**

Tout d'abord, je voudrais remercier le Prof Vincent Bours de m'avoir permis d'entreprendre une thèse de doctorat et d'en avoir accepté la supervision. Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Jean-Claude Schmit de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Rétrovirologie du CRP-Santé du Luxembourg. Grâce à vous, ce travail a pu voir le jour.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr Carole Devaux pour son encadrement tout au long de ce travail de thèse, pour sa patience, pour son engagement auprès de collaborateurs, pour les discussions intéressantes et les multiples conseils.

Je remercie le Prof Uli Zanger de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Institut de Pharmacologie Clinique de Stuttgart ainsi que le Dr Kathrin Klein et Robert Radloff pour leur encadrement et le temps qu'ils ont accordés à la réalisation de ce travail.

J'aimerais en outre remercier le Dr Serge Schneider de m'avoir accueilli et formé aux techniques de mesure des antirétroviraux au Laboratoire de Toxicologie du Laboratoire National de Santé.

Je tiens à remercier en particulier les collègues qui ont contribué à la réussite de ce projet de thèse : Christine, Gilles, Cécile, Karthik, Olivier, Jean-Claude, Anne-Marie, Laurence, Laurent et Siu-Thinh.

Ma gratitude va également à tous les membres du Laboratoire de Rétrovirologie qui m'ont chaleureusement accueilli. Merci pour votre encouragement, pour vos conseils, pour les discussions, pour les moments inoubliables lors des participations aux congrès internationaux et les missions au Rwanda, ainsi que pour les moments de détente. Merci aux autres doctorants Eveline, Martin, Martyna et aux anciens doctorants Franky et Jean-Claude pour leur convivialité. Merci à tous les doctorants et collègues du CRP-Santé qui m'ont aidé tout au long de mon parcours : Katja, Katrin, Stéphanie, Tania, José...

Merci pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu au Laboratoire National de Référence (LNR) de Kigali au Rwanda. Merci à Karim et Françoise avec qui j'ai pu travailler au LNR et à Lux-Development. Merci également aux infirmières des Centres de Santé qui ont récolté les échantillons analysés et aux patients qui ont accepté de participer à ce projet de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers le Fonds National de la Recherche du Luxembourg (FNR) pour la contribution financière à la réalisation de ce travail.

Merci à mes amis pour leur soutien sans lesquels ce travail n'aurait pas pu se faire, surtout à Franky.

Un grand merci également à mes parents et surtout à ma mère pour le soutien et la confiance qu'elle m'a toujours témoignée au cours de mes études.

Toute ma gratitude à ma sœur Sandra qui m'a encouragé dans mon choix de faire ce doctorat, qui a toujours été auprès de moi, surtout pendant les moments difficiles et qui a pris plaisir à relire ce manuscrit.

A tous ceux, amis et collègues de travail, qui m'ont activement ou passivement aidé à compléter cette expérience inoubliable un GRAND MERCI !

## Composition du Jury de Thèse

<b>Président :</b>	Michel Moutschen
<b>Secrétaire :</b>	Vincent Seutin
<b>Membres facultaires :</b>	Vincent Bours Wouter Coppieters
<b>Membre extérieur à la Faculté :</b>	Carole Devaux
<b>Experts extérieurs à la Faculté :</b>	Vincent Haufroid Gilles Peytavin



## Liste des Abréviations:

3TC	Lamivudine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ARN	Acide Ribonucléique
ART	Thérapie antirétrovirale
ARV	Antirétroviraux
ASK-1	Apoptosis Signal Regulating Kinase-1
AUC	Aire sous la courbe de la concentration plasmatique d'un médicament au cours du temps
AZT	Zidovudine
CAPRISA	Center for the AIDS Program of Research in South Africa
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CCR5	CC Chemokine Receptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cdk9	Cyclin-dependent kinase 9
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I
CMV	Cytomégalovirus
CRF	Circulating Recombinant Form
CXCR4	CXC Chemokine Receptor 4
CYP	Cytochrome P450
d4T	Stavudine
ddI	Didanosine
DC-SIGN	Dendritic-Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin
EFV	Efavirenz
<i>env</i>	Enveloppe (gène)
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FasL	Fas Ligand
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavine mononucléotide
FNUAP	Fonds des Nations Unies pour la Population
FTC	Emtricitabine
<i>gag</i>	Group-specific antigen (gène)
<i>gp</i>	Glycoprotéine
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HR1	Heptad Repeat 1
HR2	Heptad Repeat 2
HRSH	Hommes qui ont des Rapports Sexuels avec des Hommes
HTLV	Human T-Cell Leukemia Virus
INTI	Inhibiteur Nucléosidique/Nucléotidique de la

INNTI	Transcriptase Inverse Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
iPrEX	Pre-exposure Prophylaxis Initiative
IRIS	Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome
LOF	Loss of Function
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
LTR	Long Terminal Repeats
MIP-1 $\alpha/\beta$	Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha/\beta$
MPER	Membrane proximal external region
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
Nef	Negative Factor
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NIH	National Institut of Health
NVP	Névirapine
PBREM	Phenobarbital-Responsive Enhancer Module
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
<i>pol</i>	Polymérase (gène)
POR	Cytochrome P450 oxidoréductase
PrEP	Pre-exposure prophylaxis
PXR	Pregane X Receptor
PXRE	Pregane X Receptor Response Element
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted
Rev	Regulation of virion expression
RXR	Retinoid X Receptor
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
SIDA	Syndrôme de l'Immunodéficience Aquisse
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SIVsmm	SIV sooty mangabey
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRS	Substrate Recognition Site
Tat	Transcriptional activator
TDF	Ténofovir disoproxil fumarate
TAR	Transactivation Response Region
UGT	Uridine 5'-diphosphate (UDP)- glucuronosyltransférase
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U
XREM	Xenobiotic Response Enhancer Module
ZDV	zidovudine

# **I. Introduction**

# 1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

## 1.1. Origine du SIDA

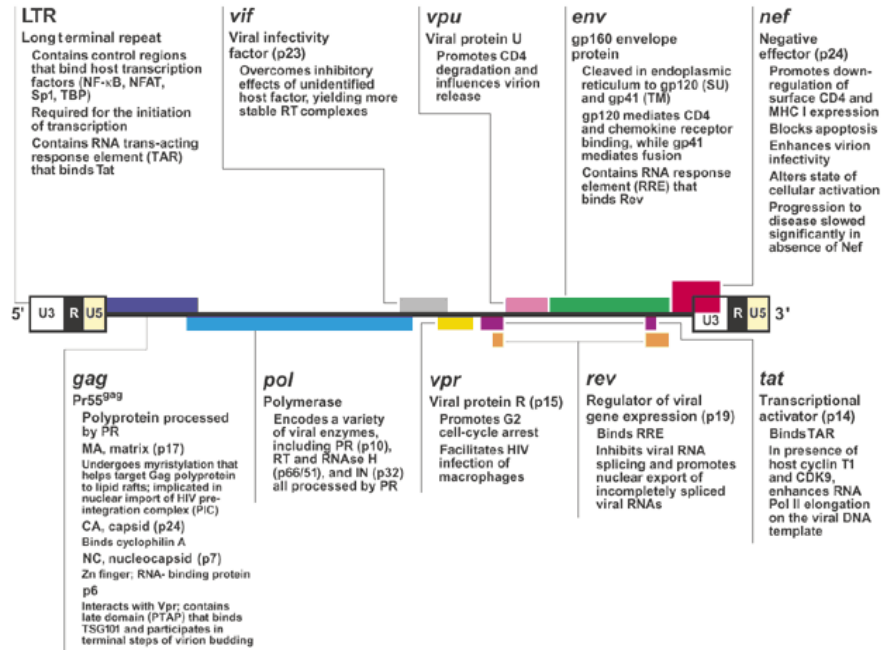
Le début officiel de l'épidémie du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) date de 1981 lorsque les « Centers for Disease Control and Prevention » (CDC) ont rapporté des leucopénies importantes avec diminution des taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez cinq jeunes hommes homosexuels de Los Angeles en Californie, âgés de 29 à 36 ans, qui étaient auparavant en bonne santé. Ce symptôme était accompagné d'infections opportunistes telles que des pneumonies à *Pneumocystis carinii*, des candidoses buccales, des maladies provoquées par des cytomégalovirus (CMV) ainsi que des cancers tels que le sarcome de Kaposi (Centers for Disease 1981; Gottlieb, Schroff et al. 1981; Klimas, Koneru et al. 2008). Deux ans plus tard, en mai 1983, Françoise Barré-Sinoussi et ses collègues de l'équipe du Professeur Montagnier de l'Institut Pasteur à Paris ont isolé un nouveau rétrovirus humain à partir de ganglions lymphatiques d'un patient souffrant d'une lymphadénopathie (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). En parallèle, le Professeur Gallo du « National Institut of Health » (NIH) a démontré qu'une infection par ce nouveau rétrovirus était la cause du SIDA (Vahlne 2009). En mai 1986, le Comité International de la Taxonomie des Virus a nommé le nouveau rétrovirus Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Coffin, Haase et al. 1986). L'origine de l'infection par le VIH chez l'être humain est bien antérieure aux années 1970 puisque des particules virales avaient été détectées dans un échantillon de sérum prélevé en 1959 chez un patient de Kinshasa (République Démocratique du Congo). L'analyse du matériel génétique du VIH et sa diversité au cours du temps à l'intérieur de son hôte humain a montré que le VIH-1 est probablement apparu vers 1931 et le VIH-2 vers 1940 (Stebbing, Gazzard et al. 2004).

Lors de la découverte du VIH, on croyait que les hommes homosexuels des grandes villes comme New York, San Francisco et Los Angeles étaient la population à risque d'être infectée par ce virus et de développer le SIDA (71% des cas de SIDA enregistrés entre juin 1981 et septembre 1983 au CDC étaient révélés chez des homosexuels). Cependant une infection au VIH dite horizontale a touché rapidement d'autres personnes comme par exemple des toxicomanes à injection intraveineuse, des patients souffrant d'hémophilie ou des personnes qui avaient reçu une transfusion sanguine. Les femmes et les enfants étaient aussi atteints de cette infection. En 1993, le SIDA était devenu la cause principale de décès chez les jeunes adultes (Pomerantz and Horn 2003).

Au cours du temps, l'infection au VIH s'est développée dans la population mondiale et a provoqué ainsi une situation de pandémie du SIDA. De nos jours, plus de 34 millions de personnes sont infectées et la majorité d'entre eux (22.5 millions) vit en Afrique Sub-Saharienne. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 2.7 millions de nouvelles infections ont été enregistrées en 2010 et 1.8 millions de patients VIH sont décédés au cours de cette même année.

## **1.2. Les Rétrovirus/Lentivirus**

Le SIDA résulte d'une infection chronique provoquée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce virus appartient à la famille des *Retroviridae* qui peut être subdivisée en trois sous-familles : (i) les oncovirus « Human T-Cell Leukemia Virus » (HTLV) et « Simian T-Cell Leukemia Virus » qui sont associés à des tumeurs et des leucémies, (ii) les spumavirus qui sont identifiés chez beaucoup de mammifères mais qui ne causent aucune pathologie connue chez l'homme ou l'animal et (iii) les lentivirus, qui provoquent des maladies à évolution lente (Roquebert, Damond et al. 2009). Le VIH est un exemple de lentivirus qui est une particule virale sphérique de 80 à 120 nm de diamètre. Il est entouré d'une enveloppe d'origine cellulaire et contient à son centre un core conique ou cylindrique hébergeant le génome viral (Roquebert, Damond et al. 2009; Vahlne 2009). Ce dernier est constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin codant pour les gènes de structure *gag* et *env*, les enzymes virales *pol* et les gènes *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* et *Vpu* qui sont tous indispensables pour la réplication virale (**Figure 1**).



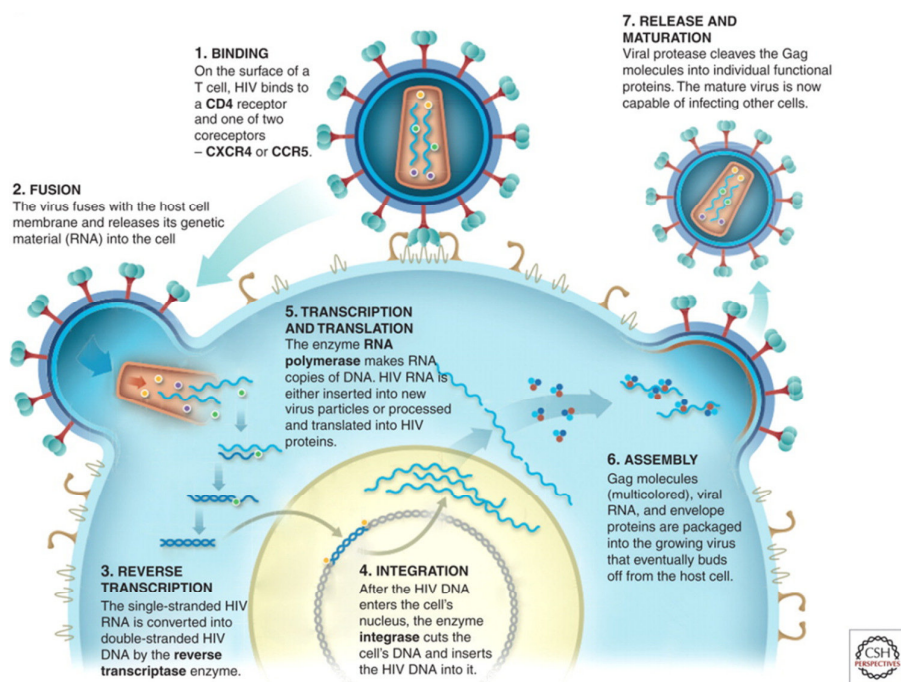
**Figure 1.** Représentation schématique du génome (~10kb) d'un provirus VIH et résumé des fonctions des neuf gènes viraux (Greene and Peterlin 2002).

En position 5' de l'ADN proviral se situe le promoteur LTR (« long-terminal repeat ») qui est activé par la liaison de facteurs de transcription cellulaire (comme le facteur de transcription  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ou le facteur de transcription de lymphocytes T activés (NFAT)). La présence des facteurs de transcription favorise ensuite la liaison de l'ARN polymérase de type II qui induit la transcription de l'ADN proviral. Cependant, en absence de la protéine de régulation Tat, l'élongation de l'ARN messenger est incomplète et conduit à la formation de petits transcrits non-polyadénylés. Ces derniers prennent une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux appelé TAR (« transactivation response region ») ce qui les rend stable et leur permet de persister à l'intérieur de la cellule. Le motif riche en arginine de la protéine Tat permet de lier celle-ci à TAR. Tat recrute ensuite la protéine cellulaire cycline-T1 qui se lie à la grande boucle de TAR. Le complexe TAR-Tat-cycline-T1 se fixe ensuite à la kinase 9 cycline-dépendante (Cdk9) qui phosphoryle le domaine C-terminal de la polymérase et augmente ainsi l'efficacité de la transcription virale. Les protéines Rev inhibent l'épissage des ARN messenger et permettent la translocation du noyau vers le cytoplasme des ARN à épissage incomplets qui codent pour les protéines enzymatiques et structurales ainsi que des ARN non-épissés qui vont être intégrés dans de nouveaux virions. Les protéines Nef vont accélérer la progression de l'infection vers le stade clinique du SIDA. Elles interviennent à

plusieurs niveaux : après l'arrivée du core viral dans le cytoplasme de la cellule cible, Nef semble favoriser la dissociation des protéines du core en modifiant le pH par l'intermédiaire d'une pompe à proton V-ATPase à laquelle Nef est associée. La down-régulation des récepteurs CD4 par Nef optimise la réplication virale qui est corrélée à la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Nef protège aussi la cellule infectée contre une élimination par le système immunitaire en provoquant l'internalisation et la destruction des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). En outre, Nef active l'expression de FasL qui est le ligand du récepteur Fas (CD95) exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires comme par exemple les lymphocytes T cytotoxiques. Une telle liaison induit l'apoptose du lymphocyte T CD8<sup>+</sup> et protège ainsi la cellule infectée contre le système immunitaire adapté. Nef empêche aussi l'apoptose de la cellule infectée par liaison aux facteurs d'apoptose p53 et ASK-1 (« apoptosis signal regulating kinase-1 »). Les protéines Vpu se lient à la queue cytoplasmique d'un nouveau récepteur CD4 qui est ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique et induit sa dégradation par le protéasome avant qu'il puisse atteindre la surface cellulaire. Vif permet de stabiliser le complexe de la transcription inverse en s'opposant à l'action du facteur de résistance cellulaire CEM-15. Les protéines Vpr agissent sur le cycle cellulaire de la cellule infectée et la bloquent en phase G2 ce qui augmente la réplication de l'ADN proviral vu que le promoteur LTR est plus actif pendant cette phase cellulaire (Greene and Peterlin 2002). Vpr semble aussi intervenir dans la déplétion des lymphocytes T en induisant la mort cellulaire de la cellule infectée par activation de caspases (Stevenson 2003).

L'entrée du VIH dans une cellule cible (lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, macrophage, cellule de Langerhans, cellule dendritique) requiert trois étapes qui résultent dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et la libération du core viral dans le cytoplasme de la cellule infectée (**Figure 2**). L'adsorption et l'entrée du virus sont menées par le complexe trimérique Env. Chaque monomère est constitué de la glycoprotéine transmembranaire gp41 qui est liée de façon non-covalente à la glycoprotéine de surface gp120. Le mécanisme d'entrée est déclenché avec la liaison entre le domaine C4 de la gp120 et le domaine D1 du récepteur membranaire CD4 d'une cellule cible. Cette liaison induit un changement de conformation au sein de gp120 et expose la boucle hypervariable V3 qui favorise un second lien avec un corécepteur (la deuxième étape de l'entrée virale). Les principaux corécepteurs sont les récepteurs aux  $\alpha$ -chimiokines CCR5 et aux  $\beta$ -chimiokines CXCR4. Les récepteurs CCR5 sont reconnus par les virus dit R5 qui transmettent l'infection par voie muqueuse ou intraveineuse. Les virus X4 vont se lier aux récepteurs CXCR4 qui

apparaissent plus tard dans l'évolution de la maladie lorsque les patients progressent vers le stade final du SIDA (Scarlati, Tresoldi et al. 1997). Certains virus peuvent utiliser les deux récepteurs (virus R5X4) (Rizzuto, Wyatt et al. 1998). Finalement, la liaison entre la gp120, le récepteur CD4 et le corécepteur induit un deuxième changement conformationnel au niveau de gp41 qui expose le peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale de gp41 (Westby and van der Ryst 2005). Ce dernier est suivi par les domaines hélicoïdaux « heptad repeat 1 » (HR1) et « heptad repeat 2 » (HR2) et par la partie C-terminale contenant les domaines transmembranaires qui permettent d'ancrer la gp41 dans la bicouche phospholipidique virale. Après l'insertion des protéines de fusion dans la membrane cellulaire, les trois domaines HR2 vont se replier et entrer en contact avec trois sillons hydrophobes et hautement conservés des domaines HR1. Cette structure en faisceau de six hélices rapproche l'enveloppe virale de la membrane cellulaire et favorise la fusion des deux membranes phospholipidiques (De Clercq 2005).



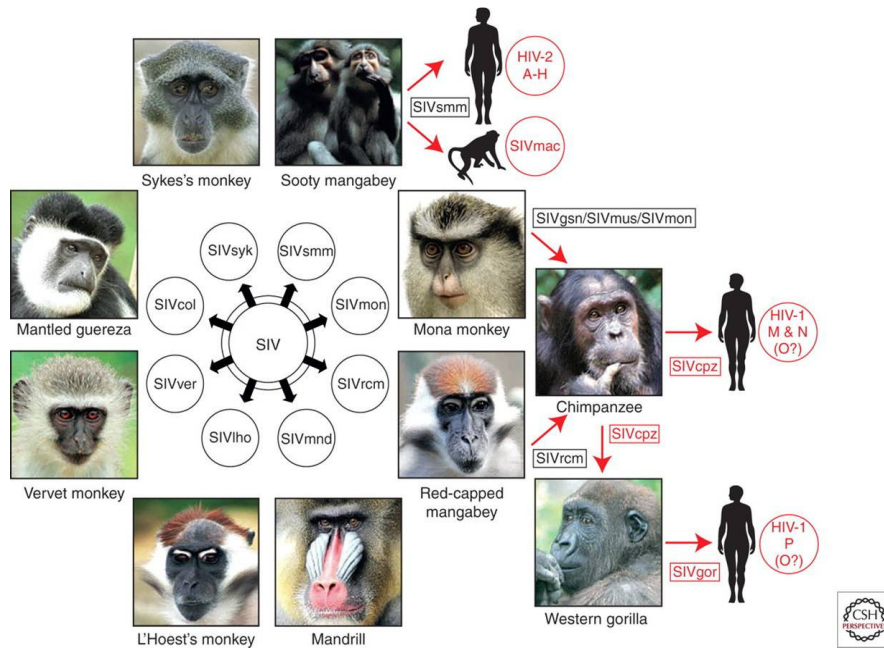
**Figure 2.** Cycle de réplication du VIH (Shattock and Rosenberg 2012).

Les rétrovirus se caractérisent par la présence de la transcriptase inverse, une enzyme virale qui est primordiale pour la réplication du génome viral. Après la dissociation du core, les deux brins d'ARN viral sont transcrits en ADN double-brins par l'intermédiaire de la transcriptase inverse qui est ensuite transporté dans le noyau de la cellule hôte où il est intégré



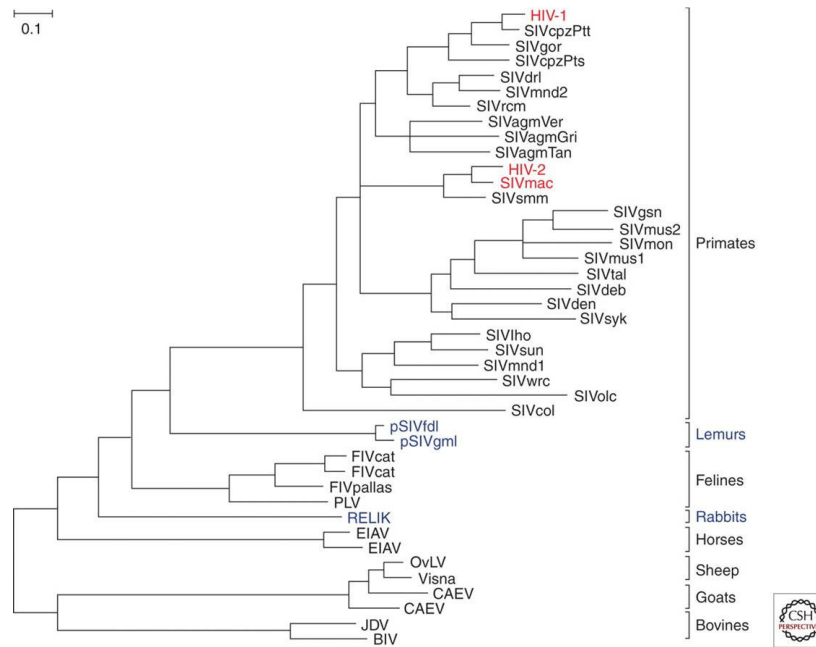
dans l'ADN cellulaire. Cet ADN viral, appelé provirus, est ensuite transcrit en ARN messenger qui, grâce à la machinerie cellulaire, est traduit en protéines virales. L'assemblage des protéines virales et de deux brins d'ARN viral donne naissance à de nouveaux virions qui bourgeonnent à travers la membrane cellulaire et deviennent mature après l'action des protéases. Ainsi de nouveaux virus sont disséminés ou directement transférés à un nouveau lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (Sudharshan and Biswas 2008).

Deux principaux types de virus de l'immunodéficience humaine ont été décrits: le VIH de type 1 qui est responsable de la pandémie mondiale et le VIH de type 2 qui est localisé principalement en Afrique de l'Ouest (Kanki, Hopper et al. 1987). Bien que phylogénétiquement éloigné du VIH-1 et le fait de pouvoir utiliser plusieurs corécepteurs (CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR4) (McKnight, Dittmar et al. 1998), le VIH-2 présente le même tropisme pour les cellules du système immunitaire que ce dernier en utilisant majoritairement le corécepteur CCR5 (Klimas, Koneru et al. 2008; Kannangai, David et al. 2012) et provoque aussi des maladies qui sont liées à une déficience immunitaire. Le VIH-2 possède cependant un taux de transmission moindre que le VIH-1 et est généralement moins pathogène (Roquebert, Damond et al. 2009). La phylogénie du VIH-2 le rapproche plus des virus simiens SIVsmm qui ont été découverts chez des macaques en captivité qui subissaient une immunodéficience. Peu après cette découverte, d'autres lentivirus apparentés appelés « Simian Immunodeficiency Virus » (SIV) ont été détectés chez plus de quarante espèces de singes d'Asie et d'Afrique comme par exemple les singes verts d'Afrique, les mangabeys enfumés, les mandrills, les chimpanzés et les gorilles (**Figure 3**). A l'intérieur de leur hôte naturel, ces virus sont non pathogéniques. Une transmission inter-espèce du singe africain au macaque asiatique ou à l'homme induit l'activation du virus et provoque une destruction des lymphocytes T du système immunitaire (Sharp and Hahn 2011).



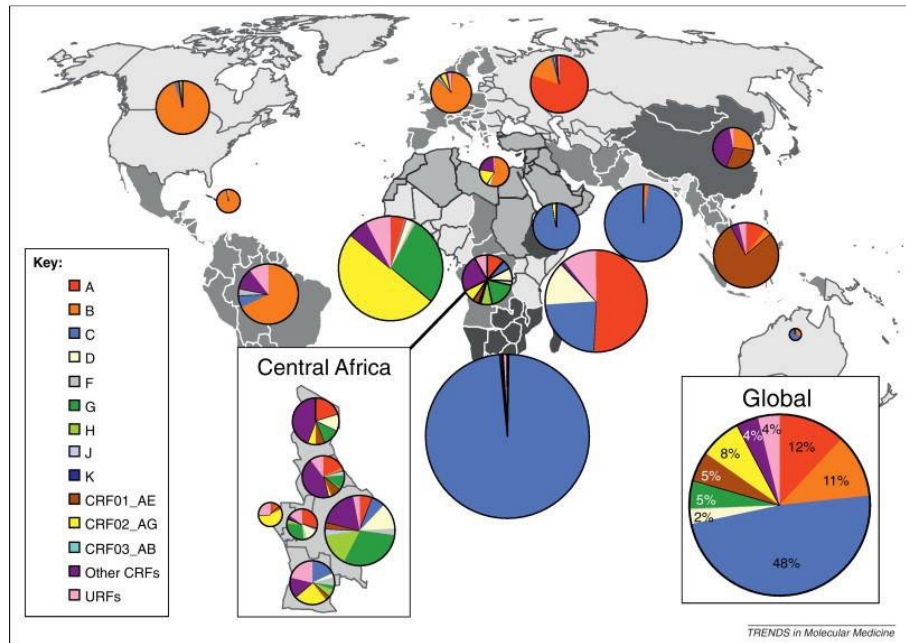
**Figure 3.** Origine des virus VIH de l'Homme (Sharp and Hahn 2011).

Des études phylogénétiques ont en effet pu démontrer que le VIH de type 1 a été transmis à l'homme par les chimpanzés (*Pan troglodytes*) de l'Afrique Centrale. Le VIH de type 2, quant à lui, a été transmis par les mangabeys enfumés (*Cercocebus atys*) vivant à la côte ouest de l'Afrique (**Figure 4**). La transmission des virus du singe à l'homme a été facilitée dans ces régions par le fait que ces singes ont été gardés comme animaux domestiques ou ont été mangés par l'homme (Stebbing, Gazzard et al. 2004).



**Figure 4.** Arbre phylogénétique des lentivirus (Sharp and Hahn 2011).

Les virus VIH-1 sont classés en quatre groupes sur base de leurs séquences nucléotidiques : le groupe M (Majoritaire), le groupe O (« Outlier »), le groupe N (non-M, non-O) et le groupe P (Roquebert, Damond et al. 2009; Hemelaar 2012). Le groupe M est le plus répandu dans le monde. Le groupe O, qui est à l’origine de moins de 10% de toutes les infections provoquées par le VIH-1 dans le monde entier, peut être retrouvé en Afrique Centrale de l’Ouest comme le Cameroun, le Gabon, le Nigeria et la Guinée Equatoriale. Il s’est réparti ensuite en Europe et aux Etats-Unis où sa présence est liée aux individus qui ont eu une relation avec l’Afrique Centrale de l’Ouest. Le groupe N a été identifié en Afrique Centrale de l’Ouest chez quelques personnes du Cameroun (Requejo 2006). Le groupe P a été récemment identifié chez deux personnes originaires du Cameroun. Onze sous-types (A-K) et 51 formes recombinantes (« circulating recombinant form », CRF) du groupe M ont été décrits (**Figure 5**) (Requejo 2006; Hemelaar 2012).



**Figure 5.** Présence mondiale entre 2004 et 2007 des sous-types A-K et de quelques formes recombinantes (Hemelaar 2012).

La variabilité au niveau de la séquence en acides aminés d'un sous-type varie entre 8 et 30%. La variabilité entre les différentes régions génomiques se situe entre 17% et 35% et peut atteindre jusqu'à 42% selon les sous-types et les régions examinées (Hemelaar 2012). Le sous-type A est subdivisé en sous-sous-types A1, A2, A3 et A4. Il est responsable de 80% des infections au VIH en Afrique de l'Ouest (Roquebert, Damond et al. 2009). Depuis 1995, ce sous-type est prédominant en Europe de l'Est, notamment en Russie et en Ukraine. Le sous-type B est très répandu en Europe de l'Ouest (60%) et il est aussi prédominant en Australie, aux Etats-Unis et en Asie comme par exemple en Corée, en Inde, en Singapour et au Japon. Le sous-type C, qui représente 48% des infections mondiales au VIH, est majoritairement localisé en Afrique du Sud (par exemple au Botswana, Zimbabwe, Malawi, Zambie, Namibie) où il est responsable de 92% des infections au VIH en région urbaine. Le sous-type C est aussi prédominant en Inde (Butler, Pandrea et al. 2007; Lihana, Ssemwanga et al. 2012). Sa présence a aussi été montrée en Afrique de l'Est (plus de 90% des infections au VIH en Ethiopie), au sud de l'Asie (Malaisie, sud-ouest de la Chine) et en Europe (Ecosse). Le sous-type D est répandu en Afrique Central et en Afrique de l'Est. Le sous-type F est majoritaire en Europe de l'Est comme la Roumanie mais est aussi retrouvé en Amérique du Sud. Le sous-type I a été découvert en Chypres et en Grèce avant de se répandre dans toute la région méditerranéenne. Les sous-types G, H, J et K ont été décrits au Burkina Faso, au Mali, au

Niger, en Côte d'Ivoire, au Gabon et en République Démocratique du Congo par où ils se sont répandus en Europe du Sud ainsi qu'en Asie.

22% des infections mondiales au VIH sont dues aux formes recombinantes (CRF) du virus (Hemelaar, Gouws et al. 2011). Les CRF résultent de la recombinaison entre différents groupes M lorsqu'un patient est infecté en même temps par plusieurs sous-types. Un virus recombinant est classé comme CRF s'il a été entièrement séquencé et s'il a été isolé chez au moins trois personnes n'ayant aucun lien épidémiologique direct. Si ces conditions ne sont pas atteintes, le virus recombinant est classé comme URF (« unique recombinant form ») (Robertson, Anderson et al. 2000). Les CRF les plus répandus sont le CRF01\_AE (l'ancien sous-type E) et le CRF02\_AG étant respectivement présent chez 5% et 8% de la population mondiale infectée au VIH-1 (**Figure 5**). Le CRF\_01AE est prédominant en Thaïlande et au Vietnam tandis que le CRF02\_AG est très fréquent en Afrique de l'ouest (Butler, Pandrea et al. 2007),

L'épidémie provoquée par le VIH de type 2 est cependant restreinte à l'Afrique de l'Ouest. Les premières particules VIH-2 ont été isolées en 1986 chez un patient originaire des îles du Cap-Vert. Les premiers cas de sida associés à VIH-2 ont été diagnostiqués rétrospectivement en 1978 chez plusieurs patients portugais qui étaient probablement exposés au virus dans les années 1960. Depuis lors, huit sous-types (A-H) du virus VIH-2 ont été décrits parmi lesquels les groupes A et B sont les plus prévalents (Roquebert, Damond et al. 2009).

### **1.3. Transmission du VIH**

Le VIH peut être transmis entre individus par l'intermédiaire des liquides corporels tels que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et rectales, le liquide céphalorachidien et le lait maternel. La transmission se fait essentiellement selon les trois voies suivantes: la voie sexuelle qui favorise la majorité des infections au VIH dans le monde, la voie sanguine et la voie pré- ou postnatale. Au cours d'un contact sexuel, les virus peuvent traverser la barrière formée par la muqueuse au niveau du vagin, de la vulve, du pénis ou du rectum. Pour un couple hétérosexuel, la probabilité de transmission par relation sexuelle varie entre 0.0005 et 0.005 pour la femme et entre  $3.33e^{-4}$  et 0.0014 pour l'homme. Cette probabilité augmente dans le cas d'un rapport sexuel anal et atteint une valeur de 0.003 à 0.05 (Hladik and McElrath 2008). La probabilité d'une transmission à travers la muqueuse buccale au cours d'une relation sexuelle buccogénitale varie entre 0.001 et 0.02 (Tebit, Ndembi et al. 2012).

Les femmes sont plus susceptibles à l'infection que les hommes à cause de la physiologie de leur appareil génital présentant une grande surface de muqueuse qui est exposée au liquide séminal (Klimas, Koneru et al. 2008). Par conséquent, 76% de tous les jeunes gens du monde entier qui sont âgés de 15 à 24 ans et sont porteurs du VIH sont des femmes. En plus, Pilcher et ses collègues ont montré que la charge virale du sperme d'hommes infectés par le VIH-1 de sous-type B est élevée dans les deux premiers mois de l'infection ce qui peut conduire à une transmission de la maladie à 2% – 6% de femmes. En Afrique Sub-Saharienne, le nombre de particules virales du sperme est même 3 à 4 fois plus élevé chez des hommes infectés au VIH-1 de sous-type C qui peuvent ainsi infecter entre 7% – 24% de femmes (Pilcher, Tien et al. 2004). Il existe ainsi une relation directe entre la transmission des particules virales et la quantité de virus présents dans les sécrétions génitales et ces derniers sont directement proportionnels à la charge virale sanguine (Gupta, Mellors et al. 1997). Le risque d'une infection aux VIH transmis par voie sexuelle est augmenté lorsque la personne subit déjà une maladie sexuellement transmissible ou lors d'une pratique sexuelle violente car ceci peut engendrer des blessures au niveau des muqueuses et favoriser la transmission du virus.

Une seconde voie de transmission du VIH est la voie sanguine. La majorité des personnes concernées sont des toxicomanes à injection intraveineuse qui utilisent des aiguilles et des seringues contaminées. Depuis 1985, le risque d'une infection au cours d'une transfusion sanguine a été éliminé aux États-Unis, au Canada et en Europe par des contrôles judiciaires des poches sanguines. Les personnes qui travaillent dans le domaine clinique sont dans une moindre mesure également exposées au risque de transmission par voie sanguine surtout lorsqu'elles se piquent accidentellement avec une aiguille ou lorsqu'elles sont soumises à des éclaboussures de sang contaminé.

La troisième voie de transmission touche les fœtus et les nouveau-nés de femmes séropositives et peut se dérouler à trois étapes différentes de la naissance. La première phase critique est celle de la grossesse car les particules virales de la mère peuvent traverser la barrière du placenta et infecter l'embryon. La probabilité d'une transmission via le placenta est de 1/10 à 1/20 (Hladik and McElrath 2008). La deuxième situation dangereuse peut arriver au moment de l'accouchement lorsque le sang d'une mère infectée au VIH entre en contact avec celui de son nouveau-né. L'allaitement représente le troisième risque auquel le nouveau-né est exposé car il peut entrer en contact avec les particules virales qui sont présentes dans le

lait maternel et s'infecter (Klimas, Koneru et al. 2008). La probabilité d'une telle infection est de 1/5 à 1/10.

#### **1.4. La Primo-Infection**

Dans le cas d'une exposition sexuelle, les virus contenus dans le sperme sont d'abord piégés dans la muqueuse de l'utérus ce qui permet d'activer le système immunitaire inné qui va bloquer l'entrée d'une partie des virus CXCR4 et CCR5 par l'intermédiaire de chémokines et de cytokines comme par exemple le SDF-1 (qui bloque les souches X4 via CXCR4), le MIP-1 $\alpha/\beta$  et le RANTES (qui bloquent les souches R5 via le corécepteur CCR5) (Tebit, Ndembi et al. 2012). La muqueuse facilite cependant la transmission du VIH vers les cellules épithéliales en augmentant la durée de contact entre les cellules et les particules virales. Environ 30 à 60 minutes après l'exposition, les virus vont pénétrer dans la couche épithéliale par transcytose ou en traversant les espaces interstitiels qui entourent les cellules épithéliales. Des micro-abrasions de la muqueuse apparues lors d'un rapport sexuel mais surtout des ulcères au niveau de la couche épithéliale provoqués par des maladies sexuellement transmissibles (syphilis, chancreuse, infection par le virus de l'Herpes) favorisent la pénétration des particules virales et l'infection des cellules cibles des tissus sous-jacents (Hladik and McElrath 2008). Parmi celles-ci comptent les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires. Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques immatures présentes dans les couches épithéliales de la peau. Elles sont les premières cellules du système immunitaire qui entrent en contact avec le VIH. Par l'intermédiaire de leurs longues dendrites, les cellules de Langerhans vont phagocyter les virus qui se lient par les protéines gp120 de l'enveloppe aux langerines (CD207) de leur surface membranaire. La plupart des virus internalisés sont dégradés par les enzymes lysosomiales après la fusion entre les phagosomes et les lysosomes. Cependant, si la concentration en particules virales est élevée, l'effet protecteur des langerines peut être inhibé permettant à quelques virus d'échapper à la dégradation et de rester dans des compartiments à pH non-acide (Stevenson 2003; Tebit, Ndembi et al. 2012). En effet, 60 heures après une exposition, des virions intacts peuvent être retrouvés dans de tels compartiments endosomiaux (Hladik and McElrath 2008).

Les cellules dendritiques qui circulent aussi au niveau de la couche épithéliale, vont interagir avec les particules virales par l'intermédiaire de leurs protéines membranaires DC-SIGN (« dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin », CD209), une lectine de type

C qui reconnaît le mannose des carbohydrates de l'enveloppe virale. Ainsi, le VIH est phagocyté et est soit dégradé dans les phago-lysosomes comme dans le cas des cellules de Langerhans, soit reste enfermé dans des endosomes et échappe à l'élimination. Les cellules dendritiques expriment aussi les récepteurs CD4 et les corécepteurs CCR5 ce qui les rend susceptibles à une infection par le VIH (Hladik and McElrath 2008). Cependant, il a été montré que les cellules dendritiques infectées ne libèrent de nouveaux virions qu'à un faible taux (Stevenson 2003).

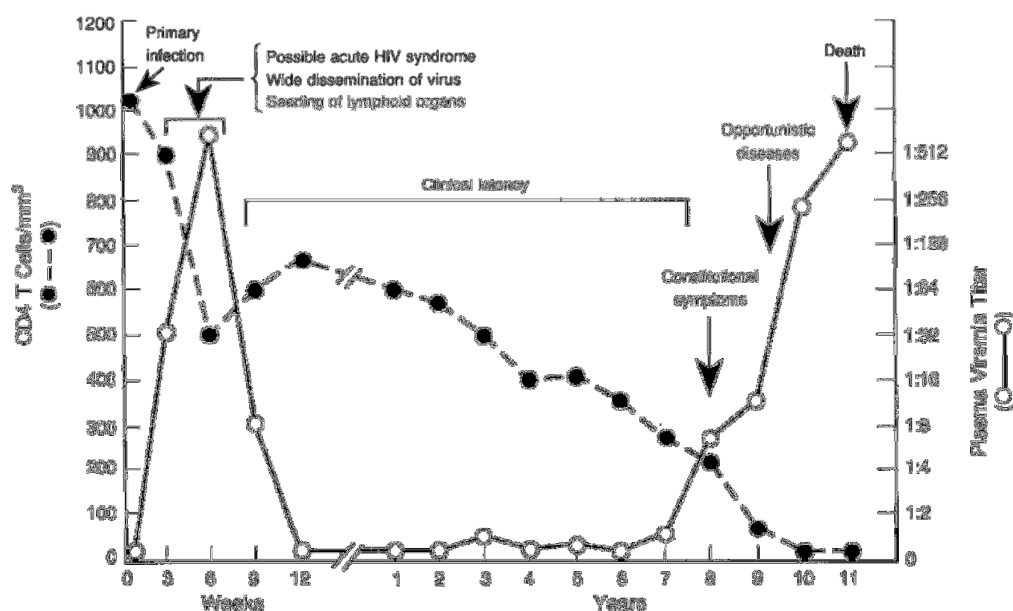
Les macrophages sont aussi ciblés par les virus lors de la première exposition. Les virus peuvent envahir les macrophages par trois voies différentes : (i) par infection car les macrophages expriment le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5, (ii) par phagocytose après une interaction entre l'enveloppe des virus et les récepteurs membranaires appelés syndécans et (iii) par simple macropinocytose. Les virus ainsi internalisés peuvent rester dans des endosomes pendant plusieurs jours avant d'être libérés par exocytose et transmis par trans-infection au lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (Hladik and McElrath 2008).

Lors du passage du VIH à travers la couche épithéliale, les virus vont aussi interagir avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires qui présentent une expression élevée en corécepteur CCR5 à leur surface membranaire. Ces lymphocytes T mémoires sont, après leur activation, les premières cellules qui permettent une multiplication rapide des VIH. Pendant la première semaine de l'infection, une forte production locale de virions est déclenchée au niveau des cellules cibles de l'épithélium (Tebit, Ndembu et al. 2012). En raison de cette production virale élevée, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés ont une demi-vie ( $t_{1/2}$ ) d'un jour et sont donc rapidement éliminés au niveau de l'épithélium (Hladik and McElrath 2008).

Pour protéger le corps humain contre l'intrusion des particules virales, les cellules présentatrices d'antigène (cellules de Langerhans, cellules dendritiques et macrophages) qui sont devenues actives après l'internalisation des parasites, vont émigrer quelques jours après leur première rencontre avec les virus vers les ganglions lymphatiques locaux pour y activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et déclencher la réponse immune cellulaire. Protégés à l'intérieur des endosomes, les virus profitent des cellules présentatrices d'antigène pour atteindre les ganglions lymphatiques. Après la fusion des endosomes avec la membrane cellulaire des cellules présentatrices d'antigène ou la libération de nouveaux virions produits à un faible taux par les cellules dendritiques (Stevenson 2003), les virus vont infecter les lymphocytes T qui ont été attirés par les cellules présentatrices d'antigène et déclencher un nouveau cycle d'infection. A partir de la deuxième semaine post-infection, la réplication du VIH au sein des



tissus lymphatiques augmente de façon exponentielle et atteint un taux de virémie de plusieurs millions de copies (**Figure 6**), ce qui correspond à un maximum qui n'est plus dépassé à n'importe quel stade de l'infection (Kassutto and Rosenberg 2004). Après 3 à 12 semaines, la séroconversion ainsi qu'une réponse immune cellulaire induite par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques réduisent la virémie qui atteint 3 à 4 mois après l'infection un taux faible mais stable de nouveaux virions (Pantaleo, Graziosi et al. 1993; Kassutto and Rosenberg 2004; Tebit, Ndembu et al. 2012).



**Figure 6.** Evolution de la charge virale (cercles blancs) et du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (cercles noirs) au cours de l'infection par le VIH (Pantaleo, Graziosi et al. 1993).

De façon générale, entre la deuxième et la dixième semaine d'infection, le patient présente des symptômes grippaux (le plus fréquemment fièvre et perte d'appétit mais aussi fatigue, maux de tête, nausée, myalgie, diarrhée, pharyngite, etc.), des éruptions cutanées et une lymphadénopathie. 81% des personnes infectées présentes au moins 1 symptôme tandis que 52% ont au moins 3 symptômes (Richey and Halperin 2012). Dans de plus rares cas, le patient infecté peut développer une myo-péricardite, une insuffisance rénale aiguë, des infections opportunistes comme des candidoses, des infections aux cytomégalovirus ou une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* ou *carinii* (Kassutto and Rosenberg 2004).

Au cours de l'infection, le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> diminue par destruction des cellules infectées ce qui affaiblit le système immunitaire. Une personne en bonne santé

présente entre 800 et 1200 lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par millimètre cube (mm<sup>3</sup>) de sang. Lorsqu'une personne infectée au VIH présente moins de 500 lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par mm<sup>3</sup> de sang, la moitié de son système immunitaire a été détruit ce qui favorise l'apparition d'infections mineures comme le condylome, des infections fongiques, le muguet ou d'autres candidoses. Si le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> continue à diminuer et descend en-dessous de 200 cellules par mm<sup>3</sup> de sang, le patient se trouve dans le stade du SIDA et devient fortement vulnérable aux infections opportunistes telles que la toxoplasmose et les infections au niveau de l'œil ou de l'intestin provoquées par des cytomégalovirus mais aussi aux cancers comme par exemple des lymphomes et des sarcomes de Kaposi (Klimas, Koneru et al. 2008).

### **1.5. La Phase de Latence**

Les tissus lymphatiques sont de véritables réservoirs qui permettent la production continue de nouveaux virus. De plus, ils hébergent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires qui sont retournés d'une phase immunologiquement active vers une phase latente. Tous ces lymphocytes T qui ont été infectés par le VIH au moment de cette transition du stade actif vers les cellules mémoires vont intégrer l'ADN virale au sein de leur génome cellulaire et bloquer la transcription des gènes viraux à trois niveaux : (i) par des modifications épigénétiques comme la désacétylation des histones ou la méthylation de l'ADN, (ii) par l'exclusion des facteurs de transcription NF-κB et NFAT du nucléus des cellules latentes et (iii) par la séquestration de P-TEFb, un complexe formé de la Cdk9 et de la cycline T1, qui associé à la protéine Tat permet l'élongation des transcrits viraux (Nabel and Baltimore 1987; Peterlin and Price 2006; Durand, Blankson et al. 2012). Ainsi, les cellules infectées n'expriment pas d'antigènes viraux ce qui permet aux virus d'être protégés contre le système immunitaire de l'hôte et de persister dans les cellules latentes. D'autres cellules comme les macrophages et les cellules gliales du système nerveux central, dans lesquels les effets cytopathogènes du virus sont moindres, peuvent aussi héberger des provirus et faciliter leur présence dans l'organisme. Le nombre des cellules latentes est cependant faible et ne semble diminuer que faiblement au cours du temps ce qui garantit la persistance du VIH dans l'organisme des patients même si ceux-ci sont sous traitements antirétroviraux (Sudharshan and Biswas 2008; Durand, Blankson et al. 2012). En effet, la fréquence des lymphocytes T mémoires n'est que de 1/10<sup>6</sup> cellules et une activation des cellules latentes présentes dans les différents réservoirs provoque une production virale qui correspond à <0.01% des virus produits chez des personnes non-traitées. L'ensemble des cellules latentes ne joue donc qu'un

rôle mineur dans la progression de l'infection mais empêche l'éradication des virus par une thérapie antirétrovirale (Eisele and Siliciano 2012). Dès l'arrêt d'un traitement efficace, les provirus inactifs répliquent rapidement (en une à deux semaines) et la charge virale augmente (Harrigan, Whaley et al. 1999). Le VIH n'échappe pas au système immunitaire grâce aux cellules latentes mais plutôt par son évolution rapide (Coffin 1995; Borrow, Lewicki et al. 1997; Richman, Wrin et al. 2003). En effet, même si on estime qu'un seul virus a effectivement été transmis, la diversité des VIH augmente au cours de l'infection à cause d'une production continue qui fait appel à une transcriptase inverse ayant un taux d'erreur élevé (Preston, Poiesz et al. 1988). Les mutations qui apparaissent constamment dans le génome viral favorisent la sélection naturelle des virions les plus aptes à s'échapper au système immunitaire (Coffin, Haase et al. 1986).

## **1.6. La Prévention de l'Infection au VIH**

La prévention de l'infection au VIH est primordiale pour contrôler, réduire et peut-être éliminer l'épidémie du VIH. Il existe différentes stratégies de prévention qui sont couramment appliquées et souvent combinées pour augmenter leurs efficacités: (i) la mise en place d'un programme d'échange des seringues et aiguilles contaminées, (ii) l'éducation des gens infectés ou à risque et la motivation des personnes à changer leur comportement sexuel, (iii) l'utilisation convenable des préservatifs, (iv) la circoncision des hommes et (v) la prévention de la transmission du VIH de la mère infectée à son enfant (Dieffenbach and Fauci 2011). Au niveau mondial, ces méthodes de prévention ne sont cependant accessibles qu'à une minorité de personnes.

### **1.6.1. Les préservatifs**

L'utilisation de préservatifs est importante non seulement comme contraceptif car environ la moitié des 100 millions de grossesses qui ont lieu en une année à l'échelle mondiale sont imprévues mais aussi comme moyen de diminuer le risque de transmission du VIH et d'autres maladies sexuellement transmissibles (Thurman, Clark et al. 2011). Une utilisation régulière peut ainsi réduire la transmission du VIH de 95% (Pinkerton and Abramson 1997). Des préservatifs féminins ont été mis sur le marché pour offrir un moyen de protection aux femmes qui ont des partenaires qui refusent d'utiliser un préservatif pour des raisons sociales, économiques ou psychologiques. Le Fonds des Nations Unies pour la

population (FNUAP) a estimé en 2007 le nombre de préservatifs nécessaires pour réduire la transmission du VIH à 13.1 milliards par année. Moins de 15% ont cependant pu être distribués en 2008 (Bekker, Beyrer et al. 2012).

### **1.6.2. La circoncision**

La circoncision des hommes a été proposée dès 1986 comme une intervention chirurgicale protectrice permettant de réduire le risque d'une infection au VIH (Fink 1986). En effet, le prépuce est susceptible à des abrasions lors du rapport sexuel ce qui crée des microlésions et facilite l'entrée des virus. La muqueuse de la surface interne du prépuce, qui est exposée lors de l'érection, contient une densité élevée de cellules ciblées par le VIH (cellules de Langerhans, lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et macrophages) ce qui favorise aussi l'infection (Patterson, Landay et al. 2002). Cette densité peut encore augmenter si l'individu a récemment été exposé aux pathogènes d'une maladie sexuellement transmissible (Weiss, Thomas et al. 2006). Plusieurs études ont montré que la prévalence du VIH et celle de la circoncision chez les hommes hétérosexuels sont inversement proportionnelles et que l'effet protecteur varie entre 48% et 88% (Gray, Kiwanuka et al. 2000). De plus, la circoncision réduit de 50% le risque d'ulcères génitaux provoqués par le virus de l'Herpès, de la syphilis ou de la chancrelle et de 30% à 35% l'infection aux Papillomavirus humain (Bekker, Beyrer et al. 2012).

### **1.6.3. La prévention de la transmission mère-enfant**

Une autre mesure de prévention consiste à éviter la transmission du VIH d'une mère séropositive à son nouveau-né. Les particules virales peuvent être transmises au cours de la grossesse, de la naissance ou pendant l'allaitement. La meilleure protection est obtenue par les médicaments antirétroviraux. Selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2010, la mère séropositive doit être traitée avec de la zidovudine (ZDV) après la 14<sup>ième</sup> semaine de la grossesse. Au moment de l'accouchement, une simple dose de névirapine (NVP) et de lamivudine (3TC) est administrée à la mère. Une césarienne est réalisée pour éviter le contact entre le sang du nouveau-né et le sang ou d'autres fluides corporels de la mère. Après la naissance, ZDV et 3TC sont donnés à la mère pendant sept jours tandis que l'enfant reçoit chaque jour une dose de NVP jusqu'à une semaine après l'arrêt de l'allaitement ou une dose journalière de NVP ou de ZDV jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines si l'enfant n'est

pas allaité. Il a été observé chez les mères qui n'ont pas allaité leurs enfants que la transmission du VIH diminue fortement et est inférieure à 2%. L'utilisation de lait artificiel pour inhiber la transmission du VIH est pourtant difficile dans les pays en voie de développement à cause des coûts élevés, d'un accès limité à de l'eau propre et d'une certaine intolérance des mères et de leur membres de famille vis-à-vis du lait artificiel (Ogundele and Coulter 2003). C'est pourquoi, des études récentes ont montré qu'il était aussi sûr dans un tel cadre de traiter la mère pendant l'allaitement indépendamment du taux de CD4 pour éviter la transmission et faire bénéficier l'enfant de la réponse immunitaire de la mère (Schneider, Peltier et al. 2008; Kilewo, Karlsson et al. 2009; Peltier, Ndayisaba et al. 2009; Shetty and Maldonado 2013). Les conclusions de ces études ont servi pour définir des recommandations par lesquelles l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) encourage le traitement des mères par une trithérapie pour qu'elles puissent allaiter leurs nourrissons.

#### **1.6.4. Le vaccin anti-VIH**

Le développement d'un vaccin anti-VIH est une des approches qui, combinée avec les autres stratégies de prévention, permettra de protéger les individus non-infectés et d'inhiber la répartition globale du VIH. Les premiers vaccins testés (injection de virus inactivés ou tués, de protéines recombinantes d'enveloppe (gp120, gp160, gp140, trimère), de peptides (V3, MPER) ou de différentes régions et structure de l'enveloppe virale) étaient inefficaces et ont dû être abandonnés au cours de leur développement. Uniquement quelques vaccins sont passés en phase clinique IIb et III mais ni les vaccins stimulant la production d'anticorps anti-VIH par injection d'une protéine recombinante des sous-unités de l'enveloppe du VIH (vaccin essayé chez les toxicomanes à injection intraveineuse (étude AIDSVAX B/E) et chez le groupe à risque des hommes qui ont des rapports sexuels avec des hommes (HRSH) (étude AIDSVAX B/B)), ni les vaccins basés sur l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques par injection de vecteurs viraux recombinants qui produisent des protéines virales au sein des cellules qu'ils infectent, n'ont donné des résultats satisfaisants (Gilbert, Peterson et al. 2005; Pitisuttithum, Gilbert et al. 2006; Gray, Buchbinder et al. 2010). En 2009, l'étude de vaccination RV144 réalisée en Thaïlande a visé une activation des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. 16000 hommes et femmes hétérosexuels de Thaïlande ont participé à cet essai clinique. Afin d'induire une protection humorale et cellulaire, les participants ont été vaccinés avec des glycoprotéines gp120 de l'essai AIDSVAX B/E et le vecteur viral recombinant ALVAC-HIV-1 (vCP1521) exprimant les protéines virales gag (LAI), protéase

(LAI), la glycoprotéine gp120 (CRF01\_AE) et la glycoprotéine gp41 (LAI) (Kwong, Mascola et al. 2012; Reynell and Trkola 2012). Une prévention à l'infection au VIH de 31% a été atteinte. L'efficacité modeste de cette vaccination a quand-même donné de l'espoir au fait qu'un vaccin prophylactique pourra peut-être être développé. Pendant les 15 à 20 ans dont le monde scientifique aura probablement besoin pour développer et tester l'efficacité d'un nouveau vaccin, environ 20 à 60 millions de nouvelles infections au VIH apparaîtront (Bekker, Beyrer et al. 2012). Ces pronostics alarmants soulignent l'importance de développer des approches de prévention alternatives.

### **1.6.5. PrEP et PrEP oral**

Au début des années '90, une stratégie d'inhibition de l'infection au VIH au niveau du vagin des femmes par l'utilisation de certains produits a été envisagée. Le concept des microbicides, connu sous l'acronyme PrEP (« pre-exposure prophylaxis ») s'est développé et constitue un élément principal de la prévention contre le VIH en inhibant les premières étapes de l'infection au niveau des muqueuses vaginale et rectale (Shattock and Rosenberg 2012). Les microbicides ont un grand potentiel dans la protection des femmes contre l'infection au VIH et l'acquisition d'autres parasites des maladies sexuellement transmissibles et dans l'évitement une grossesse (Romano, Robbiani et al. 2012). Les hommes peuvent également se protéger contre le VIH lors d'un rapport sexuel anal non-protégé. Les microbicides existent sous différentes formes : des gels, des capsules, des tablettes, des films et des anneaux intra-vaginaux. Ils peuvent être utilisés au moment du rapport sexuel, de façon journalière (gels et films) ou sur une période prolongée (anneau intra-vaginal) ce qui facilite l'adhérence et donc l'effet protecteur du PrEP.

Les premiers microbicides contenant des spermicides nonoxynol 9 (N9) et C31G (SAVVY) (Thurman, Clark et al. 2011) ou des substances qui maintiennent le pH acide du vagin (O'Connor, Kinchington et al. 1995) ou des polymères sulfonés ou des polymères poly anioniques sulfatés ciblant les régions chargées positivement de l'enveloppe du VIH-1 (Fletcher and Shattock 2008) se sont avérés inefficaces *in vivo*.

Les médicaments antirétroviraux (ARV) inhibant l'entrée des virus, la transcription inverse de l'ARN viral en ADN viral, l'intégration de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte ou la maturation des nouveaux virions ont montré une efficacité importante lors des essais cliniques (Shattock and Rosenberg 2012). En effet, une diminution de 39% de la prévalence du VIH-1 a été observée par l'utilisation d'un gel vaginal contenant 1% de

ténofovir, un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse, dans l'étude CAPRISA (« Center for the AIDS Program of Research in South Africa ») et une réduction de 51% de l'infection au VIH-2 (Abdool Karim, Abdool Karim et al. 2010). Bien que très efficace, cette forme du PrEP a néanmoins des inconvénients : il a été suggéré que les microbicides réduisent l'utilisation des préservatifs et qu'un usage occasionnel augmente le risque d'infection. L'administration du PrEP contenant un seul ARV peut également favoriser la transmission de virus porteurs d'une résistance contre cet ARV ou sélectionner une sous-population résistante après continuation de l'usage du microbicide chez la personne infectée. Pour éviter cela, une nouvelle génération de microbicides vont regrouper plusieurs ARV qui peuvent soit interrompre le cycle viral à différents niveaux, soit exercer des effets synergiques ou complémentaires sur les virus (Shattock and Rosenberg 2012).

Le PrEP oral est une autre stratégie de prévention qui consiste à donner des ARV aux individus VIH-négatifs afin de les protéger contre une infection au VIH. Identique aux microbicides, le PrEP oral vise à inhiber la prolifération des virus dans les muqueuses vaginale et rectale qui se réalise quelques jours après l'entrée du VIH. Pour que la prophylaxie aux ARV ait du succès, les médicaments doivent être bien tolérables, être prescrits en un nombre restreint de pilules pour faciliter l'adhérence, avoir une posologie simple et ne pas provoquer de résistances croisées. En plus, les ARV doivent rapidement atteindre les tissus génitaux et rectaux et s'y accumuler (Heneine and Kashuba 2012). Une prophylaxie à base de la combinaison à dose fixe de ténofovir et d'emtricitabine a permis d'inhiber l'infection au VIH chez 44% des HRSH qui ont participé à l'étude iPrEx (« Pre-exposure Prophylaxis Initiative ») et pouvait même augmenter à 73% pour des participants parfaitement adhérents (Dieffenbach and Fauci 2011). Une amélioration de la protection a été proposée par l'implantation d'un anneau vaginal ou d'un dépôt intramusculaire qui secrètent une concentration constante d'un ou de plusieurs antirétroviraux. Indépendant de l'adhérence du patient, ceci présente l'avantage d'avoir rapidement au niveau de l'entrée du virus la concentration d'antirétroviraux nécessaire pour inhiber l'infection. En plus, la concentration des antirétroviraux est maintenue pendant les jours qui suivent l'exposition et empêchent ainsi une seconde infection par une éventuelle réapparition de virus infectieux (Collins, Patterson et al. 2000; Heneine and Kashuba 2012).

## 2. Les Traitements Antirétroviraux

Excepté la guérison d'un patient infecté au VIH par une greffe osseuse qu'il a reçue d'un donneur n'exprimant pas le corécepteur CCR5, le traitement aux médicaments antirétroviraux est jusqu'à présent le seul moyen efficace pour inhiber la réplication du virus et contrôler l'infection au VIH. A l'heure actuelle, il existe 24 molécules antirétrovirales approuvées par la FDA (« Food and Drug Administration ») pour le traitement de l'infection au VIH (**Tableau 1**).

Nom Générique	Abréviation	Nom Commercial	Firme Pharmaceutique	Introduction
<b>Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse</b>				
Zidovudine	ZDV, AZT	Retrovir <sup>®</sup>	GlaxoSmithKline	1987
Didanosine	ddI	Videx <sup>®</sup>	Bristol-Myers Squibb	1991
Stavudine	d4T	Zerit <sup>®</sup>	Bristol-Myers Squibb	1994
Lamivudine	3TC	Epivir <sup>®</sup>	GlaxoSmithKline	1995
Abacavir	ABC	Ziagen <sup>®</sup>	GlaxoSmithKline	1998
Ténofovir disoproxil fumarate	TDF	Viread <sup>®</sup>	Gilead Sciences	2001
Emtricitabine	FTC	Emtriva <sup>®</sup>	Gilead Sciences	2003
<b>Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse</b>				
Nevirapine	NVP	Viramune <sup>®</sup>	Boehringer Ingelheim	1996
Delavirdine	DLV	Rescriptor <sup>®</sup>	Pfizer	1997
Efavirenz	EFV	Sustiva <sup>®</sup>	Bristol-Myers Squibb	1998
Etravirine	ETR	Intelence <sup>®</sup>	Tibotec Therapeutics	2008
Rilpivirine	RPV	Edurant <sup>®</sup>	Janssen Pharmaceuticals, Inc.	2011
<b>Les inhibiteurs de la protéase</b>				
Saquinavir	SQV	Invirase <sup>®</sup>	Hoffmann-La Roche	1995
Ritonavir	RTV	Norvir <sup>®</sup>	Abbott Laboratories	1996
Indinavir	IDV	Crixivan <sup>®</sup>	Merck	1996
Nelfinavir	NLV	Viracept <sup>®</sup>	Agouron Pharmaceuticals	1997
Amprénavir	APV	Agenerase <sup>®</sup>	GlaxoSmithKline	1999
Atazanavir	ATV	Reyataz <sup>®</sup>	Bristol-Myers Squibb	2003
Fosamprenavir	FOS-APV	Lexiva <sup>®</sup>	GlaxoSmithKline	2003
Tipranavir	TPV	Aptivus <sup>®</sup>	Boehringer Ingelheim	2005



Darunavir	DRV	Prezista <sup>®</sup>	Tibotec Therapeutics	2006
<b>Les inhibiteurs de l'intégrase</b>				
Raltégravir	RAL	Isentress <sup>®</sup>	Merck	2007
<b>Les inhibiteurs de la fusion</b>				
Enfuvirtide	ENF	Fuzeon <sup>®</sup>	Hoffmann-La Roche/Trimeris	2003
<b>Les inhibiteurs des corécepteurs</b>				
Maraviroc	MVC	Celsenti <sup>®</sup> , Selzentry <sup>®</sup>	Pfizer	2007

**Tableau 1.** Liste des molécules antirétrovirales approuvées par la 'Food and Drug Administration' (FDA). Modifié de (Perno 2011).

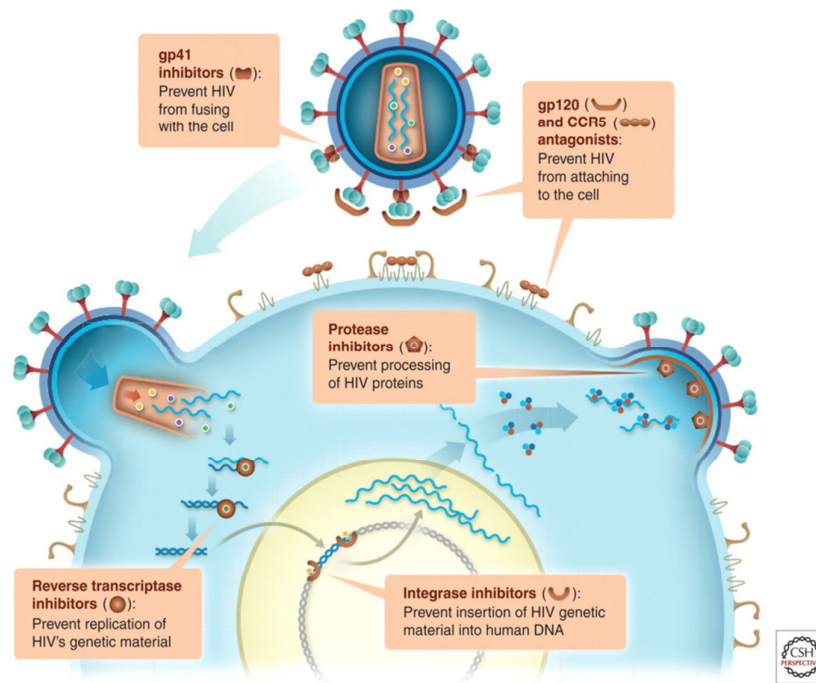
A ces médicaments s'ajoutent les huit traitements combinés Combivir<sup>®</sup> (zidovudine + lamivudine), Kaletra<sup>®</sup> (lopinavir + ritonavir), Trizivir<sup>®</sup> (abacavir + zidovudine + lamivudine), Truvada<sup>®</sup> (ténofovir + emtricitabine), Epzicom<sup>®</sup> (abacavir + lamivudine), Atripla<sup>®</sup> (ténofovir + emtricitabine + éfavirenz), Complera (emtricitabine + rilpivirine + ténofovir) et Stribild (elvitegravir + cobicistat + emtricitabine + ténofovir) qui ont respectivement été mis sur le marché en 1997 par GlaxoSmithKline, en 2000 par Abbott Laboratories, en 2000 par GlaxoSmithKline, en 2004 par Gilead Sciences, en 2004 par GlaxoSmithKline, en 2006 par Gilead Sciences et Bristol-Myers Squibb, en 2011 par Gilead Sciences et en 2012 par Gilead Sciences.

## 2.1. Différentes Classes d'Antirétroviraux

Suite à la compréhension des différentes étapes du cycle de réplication virale, les chercheurs ont su créer des substances chimiques et peptidiques qui interrompent ce cycle à différents endroits (**Figure 7**). Les antirétroviraux commercialisés peuvent ainsi être groupés dans les six classes suivantes:

- Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse
- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
- Les inhibiteurs de la protéase
- Les inhibiteurs de l'intégrase

- Les inhibiteurs de la fusion
- Les inhibiteurs des corécepteurs



**Figure 7.** Les antirétroviraux ciblent l'entrée du virus, sa réplication, son intégration et la maturation de nouveaux virions (Shattock and Rosenberg 2012).

### 2.1.1. Inhibiteurs de la transcriptase inverse

La transcription inverse du matériel génomique viral peut être inhibée de deux façons différentes : soit par l'incorporation d'analogues des nucléosides naturels qui provoquent la terminaison de la transcription (**Figure 8a**), soit par un changement de conformation de la transcriptase inverse virale qui réduit l'activité de celle-ci (**Figure 8b**).

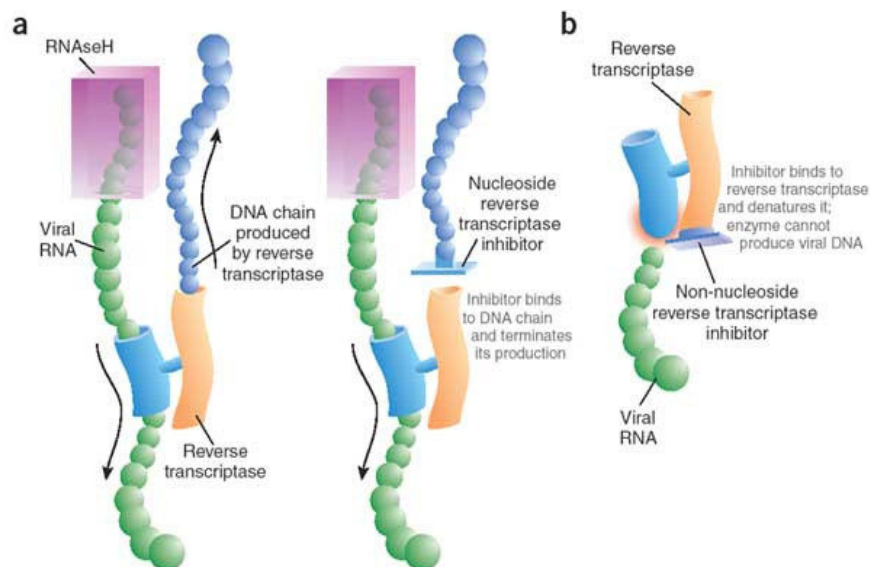
#### 2.1.1.1. Inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) étaient les premiers médicaments à être approuvés par la FDA pour intervenir dans la lutte contre la réplication rapide du VIH. Le tout premier INTI était la zidovudine dont l'effet inhibiteur a été décrit en 1985 et qui a été approuvé en 1987 (De Clercq 2010). Ce sont des prodrogues qui requièrent une phosphorylation intracellulaire par des kinases cellulaires afin d'atteindre leur

stade actif. Les INTI 5'-triphosphates entrent en compétition avec les nucléosides naturels (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) de la cellule. Après libération d'un pyrophosphate, l'INTI monophosphate est incorporé au niveau du bout 3' du brin d'ADN. Dépourvu du groupement 3'-hydroxyle au niveau du ribose, cet INTI va terminer la chaîne nucléotidique en empêchant la création d'un nouveau lien 3'-5'-phosphodiester. Les prodrogues des inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse contiennent déjà un groupement phosphonate qui est un analogue du groupement phosphate et par conséquent nécessitent l'ajout de deux phosphates par la machinerie cellulaire pour devenir actifs.

#### **2.1.1.2. Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse**

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ont été découverts dans les années 1990. Ils interagissent avec la transcriptase inverse en se liant par une forte affinité à un site allostérique hydrophobe qui est différent mais proche du site catalytique de l'enzyme virale (Hang, Li et al. 2007). Cette liaison provoque un changement de la conformation spatiale du site catalytique de l'enzyme et réduit son activité (Spence, Kati et al. 1995; Sluis-Cremer, Temiz et al. 2004). Névirapine et éfavirenz sont les INNTI les plus utilisés pour démarrer une thérapie chez des patients non-traités. Selon les recommandations de l'utilisation des antirétroviraux chez des adolescents et adultes infectés au VIH-1 publiées par le « Department of Health and Human Services » des Etats-Unis, le traitement à l'éfavirenz permet jusqu'à présent d'avoir la meilleure réponse virologique. Le nouvel INNTI rilpivirine a été approuvé récemment par la FDA et constitue une alternative de traitement efficace pour démarrer une thérapie (McCollum 2011).



**Figure 8.** Représentation schématique du mécanisme d'action des inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques (a) et non nucléosidiques (b) de la transcriptase inverse (Pomerantz and Horn 2003).

### 2.1.2. Inhibiteurs de la protéase virale

La protéase du VIH joue aussi un rôle important dans la réplication du virus. Elle est indispensable pour la maturation des nouvelles particules virales en virions infectieux en clivant les polypeptides précurseurs gag-pol en protéines matures du core viral et de la capside et en enzymes matures. A l'exception du tipranavir, les inhibiteurs de la protéase sont des inhibiteurs peptidomimétiques qui miment avec leur groupement hydroxyéthylène le lien peptidique des polypeptides. Les inhibiteurs de la protéase entrent donc en compétition avec les liens peptidiques des longs polypeptides, se lient avec une plus forte affinité au site catalytique des protéases et bloquent ainsi l'activité enzymatique (De Clercq 2007).

### 2.1.3. Inhibiteurs de l'intégrase

L'intégrase est la troisième enzyme virale qui est impliquée dans le cycle de réplication du VIH. Elle permet d'assembler l'ADN viral près du génome cellulaire et de cliver les bouts 3' des deux brins d'ADN viral pour pouvoir les combiner avec l'ADN génomique. L'intégration du génome viral se déroule environ 15 à 20 heures après l'infection (Arts and Hazuda 2012). Les inhibiteurs d'intégrase vont bloquer cette étape d'intégration du génome viral. Ce sont les seuls antirétroviraux qui interagissent avec deux éléments essentiels

du virus, à savoir l'intégrase et l'ADN viral qui est le substrat de l'enzyme. En effet, les inhibiteurs vont s'intercaler entre l'ADN viral et l'intégrase et se lier aux deux par leur groupement hydrophobe. En plus, ils inhibent le site actif de l'intégrase en interagissant avec les deux ions de magnésium qui sont les cofacteurs essentiels de l'enzyme (Grobler, Stillmock et al. 2002). L'ADN viral est alors soit réparé par des enzymes cellulaires menant à un ADN viral circulaire, soit dégradé par la machinerie cellulaire. Dans les deux cas, le cycle viral est interrompu (Hicks and Gulick 2009). Le raltégravir est le seul inhibiteur qui a été approuvé par la FDA mais d'autres molécules (elvitégravir (GS-9137) ou dolutégravir (GSK1349572)) sont en évaluation clinique (Shimura, Kodama et al. 2008; Garrido, Soriano et al. 2011).

#### **2.1.4. Inhibiteurs de la fusion**

L'enfuvirtide (T-20), qui est le seul inhibiteur de fusion approuvé jusqu'à présent, est un peptide de 36 acides aminés de l'enveloppe du VIH-1 (acides aminés 643 à 678 de la séquence peptidique de la glycoprotéine gp160, le précurseur des glycoprotéines gp120 et gp41). La séquence d'acides aminés du peptide en forme d'hélice est homologue à une partie de la région HR1 de gp41 et est donc en compétition avec les domaines HR2 qui vont s'y lier lors de la fusion. La liaison de l'inhibiteur empêche ainsi le rapprochement de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire (Kilby, Hopkins et al. 1998; Matthews, Salgo et al. 2004). Contrairement aux autres antirétroviraux, ce peptide ne peut pas être pris par voie orale mais doit être injecté en sous-cutané (Myers, Selim et al. 2006).

#### **2.1.5. Inhibiteurs des corécepteurs**

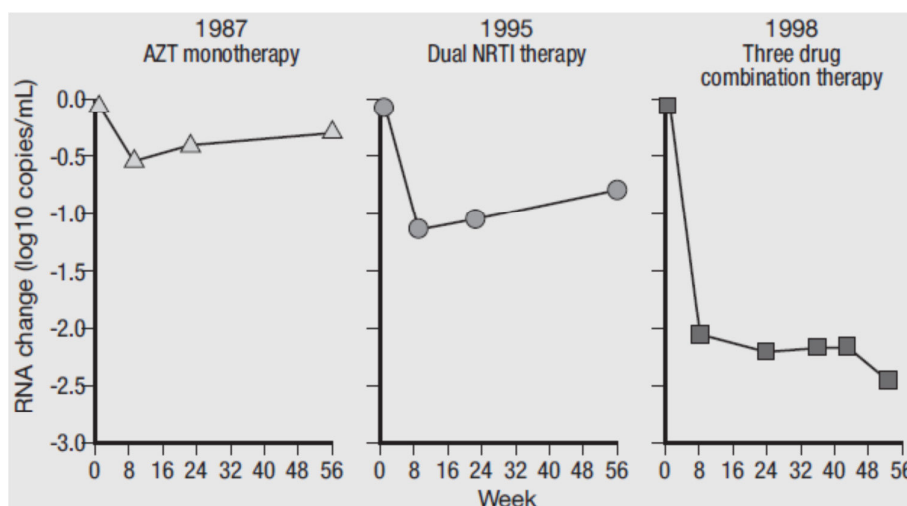
Les corécepteurs cellulaires CCR5 ou CXCR4 sont indispensables au VIH pour réussir l'entrée dans la cellule hôte. Le VIH-1 utilise soit le corécepteur CCR5, soit le CXCR4 soit les deux, ce qui permet de définir leur tropisme (souches R5, X4, dual X4/R5). Une délétion de 32 acides aminés au niveau du corécepteur CCR5 a accordé aux individus homozygotes une résistance contre l'infection aux virus R5 (Paxton, Martin et al. 1996). Les personnes qui présentent la CCR5 $\Delta$ 32 sous une forme hétérozygote vont progresser plus lentement vers le stade SIDA que les patients qui n'ont pas cette délétion (Michael, Chang et al. 1997). Ces observations ont motivé le monde scientifique à développer des inhibiteurs qui bloquent les corécepteurs et miment le phénotype fonctionnel CCR5 $\Delta$ 32. Le maraviroc est jusqu'à présent le seul inhibiteur qui a été approuvé par la FDA pour l'utilisation en clinique. Il s'agit d'un

antagoniste du corécepteur CCR5 qui se lie dans une cavité hydrophobe formée par les domaines transmembranaires du CCR5. Cette liaison change la conformation de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur et empêche ainsi l'interaction avec la boucle V3 de la glycoprotéine gp120 (Dragic, Trkola et al. 2000; Kondru, Zhang et al. 2008). Le maraviroc n'a en revanche pas d'effet sur les corécepteurs CXCR4, ce qui favorise une sélection des virus X4 et/ou X4/R5 car environ 50% des patients infectés au VIH présentent un changement du tropisme R5 vers X4 au cours de l'évolution de l'infection (Westby and van der Ryst 2005; Westby, Lewis et al. 2006). Aucun antagoniste du corécepteur CXCR4 n'a été approuvé cliniquement. L'AMD3100 est le meilleur antagoniste qui a été testé mais son développement a dû être arrêté à cause de ses effets toxiques (Hendrix, Collier et al. 2004).

## **2.2. La Trithérapie Antirétrovirale (ART)**

En 1987, les patients infectés au VIH étaient traités par le zidovudine qui, à l'époque, était le seul antirétroviral pouvant être utilisé en clinique. Mais les scientifiques ont vite remarqué que l'effet de la monothérapie était court et que l'activité antivirale était limitée (**Figure 9**) (Volberding, Lagakos et al. 1995). Après la commercialisation de nouveaux INTI, une bithérapie combinant deux inhibiteurs comme par exemple le zidovudine et le lamivudine a été choisie mais un développement rapide de résistances aux antirétroviraux rendait cette stratégie de traitement inefficace (Hirsch, Steigbigel et al. 1999). Une nouvelle ère de la thérapie antirétrovirale débutait avec l'apparition vers 1995 des premiers inhibiteurs de la protéase. La combinaison de trois antirétroviraux (un inhibiteur de protéase et deux INTI) a pour la première fois pu réduire la charge virale à un taux plasmatique inférieur à la limite de détection de 50 copies d'ARN viral par mL (Perelson, Essunger et al. 1997). En outre, cette trithérapie a permis de réduire la mortalité de l'infection au VIH (Hammer, Squires et al. 1997). Avec l'arrivée des INNTI et la combinaison d'un de ces inhibiteurs avec deux INTI a augmenté l'efficacité de supprimer la réplication virale (Staszewski, Morales-Ramirez et al. 1999). Etant donné son succès de réduire à long terme la charge virale, cette trithérapie a initialement été appelée « highly active antiretroviral therapy » (HAART). Grâce à l'ART, l'infection au VIH fatale a pu être transformée en une maladie chronique chez les patients adhérents aux traitements. Ces personnes peuvent ainsi atteindre une espérance de vie presque identique à celle des individus non infectés, ce qui est une réussite énorme de la médecine moderne (Antiretroviral Therapy Cohort 2008; Mills, Bakanda et al. 2011). L'efficacité de l'ART peut même être augmentée en ajoutant par exemple l'inhibiteur de l'intégrase

raltégravir ou l'inhibiteur de fusion enfuvirtide à une trithérapie classique (Molto, Ruiz et al. 2006; Buzon, Massanella et al. 2010). Il est cependant impossible d'éliminer toutes les particules virales avec l'ART. Des fluctuations de la virémie résiduelle appelées « blips » peuvent toujours apparaître lors d'une libération de virus provenant de cellules latentes activées, de réservoirs stables ou d'une éventuelle réplication de virus dans des régions à faible pénétration d'ARV (Durand, Blankson et al. 2012; Eisele and Siliciano 2012). Une intensification de la thérapie antirétrovirale avec plusieurs médicaments ne provoque pas une baisse de la virémie résiduelle, ce qui indique que l'ART bloque la réplication virale de manière efficace (Trono, Van Lint et al. 2010).



**Figure 9.** Effet de la monothérapie, bithérapie et trithérapie sur la virémie au cours du temps (Perno 2011).

### 2.3. Initialisation du Traitement Antirétroviral

Le « Department of Health and Human Services » aux Etats-Unis conseille dans ses directives sur l'utilisation des ARV chez les adolescents et les adultes infectés au VIH-1 (directives qui ont été révisées en 2012) de démarrer, si possible, l'ART chez tous les individus infectés quel que soit leur taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ceux qui ont un taux de CD4 inférieur à 350 cellules par mm<sup>3</sup> sont les plus atteints et doivent avoir accès à une ART. En effet, des patients ayant un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm<sup>3</sup> ont un plus grand risque de développer des maladies opportunistes et de mourir que les personnes infectées qui ont un taux de CD4 plus élevé. Des études randomisées ont montré que l'ART améliore la survie et retarde la progression vers le stade SIDA (Zolopa, Andersen et al. 2009). Cet effet

est d'autant plus marqué chez des individus ayant un taux de CD4 supérieur à 200 cellules/mm<sup>3</sup> (Collaboration, Cain et al. 2011). Traiter les individus infectés au VIH qui ont un taux de CD4 entre 350 et 500 cellules/mm<sup>3</sup> permet de freiner la progression de la maladie et de diminuer la mortalité face aux patients ayant un taux de CD4 inférieur à 350 cellules/mm<sup>3</sup> (Kitahata, Gange et al. 2009; When To Start, Sterne et al. 2009). En plus, commencer l'ART plus tôt a l'avantage de mieux protéger les partenaires non-infectés des couples discordants en réduisant la transmission du VIH (Cohen, Chen et al. 2011). Démarrer le traitement chez les individus qui ont des taux de CD4 supérieurs à 500 cellules/mm<sup>3</sup> ne donne pas d'avantages en terme de retardement du développement du SIDA ou de diminution de la mortalité comparé aux individus ayant des taux de CD4 inférieurs à 500 cellules/mm<sup>3</sup> (When To Start, Sterne et al. 2009; Writing Committee for the 2011). En revanche, la transmission du VIH et le risque de développer certaines maladies, comme des maladies cardiovasculaires, peuvent être réduits. Indépendante du nombre de CD4, une thérapie antirétrovirale doit être initiée chez des femmes enceintes, des personnes qui ont une néphropathie associée à l'infection au VIH, des individus co-infectés par le virus de l'hépatite B ou C et ceux qui ont eu une maladie liée au SIDA (« AIDS-defining illness »).

#### **2.4. Effets Secondaires de la Thérapie Antirétrovirale**

Bien que les antirétroviraux puissent améliorer la condition de vie des individus infectés au VIH, ils ont aussi une certaine toxicité et peuvent engendrer des effets secondaires. Les premiers effets indésirables se développent généralement deux à six semaines après l'initiation du traitement. L'augmentation rapide du nombre des CD4 sous l'influence de l'ART peut provoquer une variété d'infections cliniques qui définissent le syndrome appelé IRIS (« Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome »). Les patients atteints de ce syndrome subissent des douleurs abdominales, des réactions inflammatoires et de la fièvre (Wilcox and Saag 2008). Selon Obiako *et al.*, les effets secondaires causés par les antirétroviraux stavudine (d4T), zidovudine (ZDV ou AZT), lamivudine (3TC), névirapine (NVP), éfavirenz (EFV), ténofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine (FTC), lopinavir/ritonavir (LPV/r) et didanosine (ddI) apparaissaient entre 10 et 1090 jours après le début du traitement chez des Nigériens infectés au VIH. Les premiers effets indésirables dont les patients se sont plaints étaient des eczémas, une insomnie, une somnolence, de mauvais rêves, des nausées avec vomissement, des céphalées sévères, une diarrhée et un ictère. D'autres effets secondaires ont été rapportés (Obiako, Muktar et al. 2012), mais la sensation



de nausée, le vomissement et la diarrhée sont les effets les plus fréquents quel que soit la trithérapie administrée aux patients. La décoloration des ongles, la douleur musculaire et l'anémie ont été attribuées à la ZDV (Rachlis and Fanning 1993) tandis que la névrite périphérique et la lipodystrophie faciale sont les effets secondaires de la d4T (Dragovic and Jevtovic 2003; Castelnuovo, Kiragga et al. 2011). 3TC et FTC ont été associés à une décoloration de la peau ou une hyperpigmentation de la paume (Saez-Llorens, Violari et al. 2008). La diarrhée peut être entre autres causée par les inhibiteurs de la protéase ritonavir et lopinavir ainsi que par l'inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse TDF (Boesecke and Cooper 2008; Tosini, Muller et al. 2010). De plus, TDF peut être toxique pour les reins et provoquer des dégâts irréversibles comme une augmentation du risque de la protéinurie, une baisse de la fonction rénale et un développement d'une maladie rénale chronique (De Beudrap, Diallo et al. 2010; Scherzer, Estrella et al. 2012).

#### **2.4.1. Effets secondaires des INNTI**

Les effets secondaires observables lors d'un traitement à la NVP sont l'eczéma, l'ictère, le syndrome de Stevens-Johnson mais aussi les troubles hépatiques, psychiatriques et du système nerveux central (Wise, Mistry et al. 2002; AIDS Info 2005). Un taux thérapeutique allant de 3.4 mg/L à 6.0 mg/L a été défini pour la NVP administré à une posologie de 2x200mg par jour. Selon Dahri *et al.*, des patients ayant des concentrations plasmatiques en NVP supérieures à 8 mg/L ont deux fois plus souvent arrêté le traitement à cause d'effets secondaires (Dahri and Ensom 2007). Les facteurs qui ont été significativement liés à la toxicité du traitement NVP sont le poids, le sexe féminin, un taux de CD4 supérieur à 250 cellules/ $\mu$ L, une infection chronique au virus de l'hépatite C, l'âge et la variation génétique (de Maat, Huitema et al. 2002; Penzak, Kabuye et al. 2007; van Griensven, Zachariah et al. 2010; Schipani, Wyen et al. 2011; Obiako, Muktar et al. 2012). Une concentration plasmatique inférieure à 3.5 mg/L augmente en revanche d'un facteur cinq le risque d'un échec virologique (Veldkamp, Weverling et al. 2001). Kappelhoff *et al.* n'ont cependant pas pu observer une association entre les effets secondaires et l'exposition à la NVP.

L'EFV peut aussi provoquer de l'eczéma et des troubles hépatiques avec une augmentation des enzymes hépatiques à laquelle la concentration plasmatique de l'INNTI a été associée (Kappelhoff, van Leth et al. 2005). Mais ce sont surtout les effets secondaires liés aux troubles neuropsychiatriques qui apparaissent le plus souvent chez les patients traités à

l'EFV car ce dernier peut, contrairement à la plupart des antirétroviraux, traverser la barrière hémato-encéphalique (Peyriere, Mauboussin et al. 2001). La présence de cet inhibiteur de la transcriptase inverse au niveau du système nerveux central permet d'inhiber la réplication du VIH et d'empêcher ainsi une inflammation chronique et une dégénérescence neuronale (Cespedes and Aberg 2006). L'inconvénient des antirétroviraux qui traversent la barrière hémato-encéphalique est cependant une augmentation de la prévalence des effets secondaires neuropsychiatriques qui sont dus à la toxicité de ces médicaments. Des études cliniques ont montré qu'environ 61% à 90% des individus soumis à un traitement EFV présentent des troubles psychiatriques au début de leur traitement (Cavalcante, Capistrano et al. 2010). Les symptômes les plus fréquents sont par exemple l'insomnie, la somnolence, les mauvais rêves, les céphalées sévères, le vertige et des problèmes de concentration (Jena, Sachdeva et al. 2009). Certains patients peuvent aussi subir des effets secondaires plus pertinents comme par exemple des hallucinations, des dépressions, une psychose ou des pensées suicidaires (Lochet, Peyriere et al. 2003). La plupart de ces symptômes disparaissent environ quatre semaines après le début du traitement (Munoz-Moreno, Fumaz et al. 2009). Mais certains effets comme par exemple le vertige ou la dépression peuvent persister au cours d'une thérapie continue en EFV sans pourtant perturber la qualité de vie des personnes atteintes (Fumaz, Munoz-Moreno et al. 2005). Selon Bristol-Myers Squibb qui ont commercialisé l'EFV sous le nom commercial Sustiva® en 1998, différentes études cliniques ont montré qu'environ 5.8% des patients traités par une dose journalière de 600mg d'EFV ont arrêté le traitement à cause d'effets indésirables. Parmi ceux-ci, environ 2.1% ont discontinué la prise d'EFV à cause de la présence de troubles du système nerveux central. Une association entre la concentration plasmatique en EFV et l'apparition des troubles du système nerveux central a été observée dans plusieurs études (Marzolini, Telenti et al. 2001; Lowenhaupt, Matson et al. 2007; Gazzard, Balkin et al. 2010). Les concentrations plasmatiques en EFV qui sont supérieures à 4000 µg/L semblent être toxiques pour le système nerveux central tandis que les concentrations inférieures à 1000 µg/L semblent diminuer l'effet thérapeutique. Au contraire, van Luin *et al.* n'ont pas observé une relation entre la concentration en EFV et la discontinuation du traitement à cause d'une toxicité suggérant que les concentrations plasmatiques supérieures à 4 mg/L ne sont pas toujours toxiques (van Luin, Bannister et al. 2009). Les mêmes auteurs proposent aussi une réduction de la dose d'EFV chez les patients qui ont une forte concentration plasmatique, ce qui aboutit à une réduction des effets

secondaires et par conséquent une augmentation de l'adhérence à l'EFV (van Luin, Gras et al. 2009).

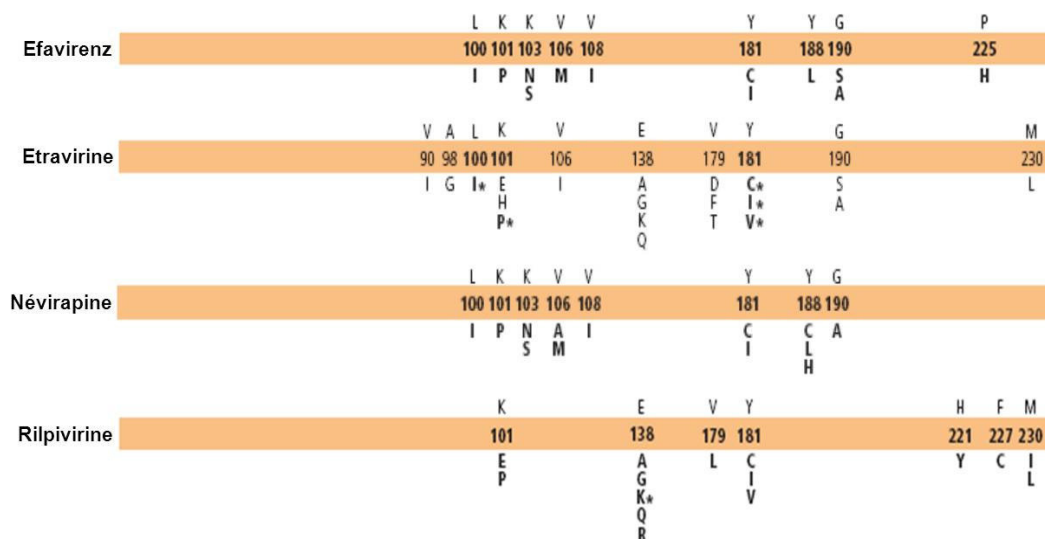
## **2.5. Résistance du Virus aux Traitements Antirétroviraux**

Suite aux différents effets secondaires qui peuvent apparaître lors d'une thérapie antirétrovirale, les patients traités risquent d'arrêter ou de ne pas prendre régulièrement leur traitement pour diminuer les effets secondaires. Cette mauvaise compliance engendre généralement des doses sub-optimales de médicament et provoque un échec de la thérapie qui se traduit par une augmentation de la charge virale (échec virologique) et par conséquent une diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (échec immunologique). Une concentration inadéquate d'un ou de plusieurs antirétroviraux est généralement accompagnée d'une émergence de mutations de résistance au niveau du génome viral. La majorité des mutations de résistance sont des substitutions, mais des duplications, insertions et recombinaisons ont également été décrites. L'adaptation rapide du VIH à la pression thérapeutique résulte de plusieurs propriétés intrinsèques des rétrovirus comme leur taux de mutation et leur taux de réplication élevés. En effet, la transcriptase inverse introduit une erreur tous les 1000 à 10000 nucléotides par cycle de réplication, ce qui signifie que le génome viral avec sa taille d'environ 10kb peut contenir jusqu'à 10 mutations. Le nombre de mutations de résistance peut ainsi être très élevé car environ 10<sup>10</sup> particules virales sont produites par jour chez un individu non-traité (Perelson, Neumann et al. 1996). Il est donc probable qu'il existe déjà au début d'une thérapie antivirale au sein de la quasi-espèce virale des virus qui sont moins susceptibles ou même résistants contre un ou deux antirétroviraux (Coffin 1995). Plus de 70% des patients traités contiennent des virus résistants à au moins un médicament antirétroviral (Scott, Arnold et al. 2004). La transmission de virus porteurs d'une ou de plusieurs mutations semble inévitable et est devenue un problème non négligeable en terme de santé publique (Turner and Wainberg 2006).

### **2.5.1. Résistance aux INNTI**

Une diminution de l'adhérence aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) pour réduire par exemple les effets secondaires neuropsychiatriques peut ainsi créer des virus résistants. Bien que ces inhibiteurs soient très efficaces pour inhiber la réplication du VIH, ils ont une faible barrière génétique, ce qui veut dire qu'une seule

mutation au niveau de la transcriptase inverse est suffisante pour inhiber l'action du médicament (Gardner, Hullsiek et al. 2010). Les substitutions d'acide aminé de la chaîne peptidique de la transcriptase inverse (par exemple: L100, K101, K103, E148, V179, Y181, Y188) qui rendent les virus résistants ont été décrites (**Figure 10**) (Tantillo, Ding et al. 1994; Wainberg 2003; Johnson, Calvez et al. 2011). Les mutations les plus fréquentes sont la K103N et la Y181C qui induisent une résistance contre l'EFV et la NVP (Bachelier, Anton et al. 2000; De Clercq 2004). Ces mutations se trouvent tous dans la région de liaison des inhibiteurs à la transcriptase inverse. La substitution de la lysine en asparagine en position 103 crée par exemple un réseau de ponts H avec les acides aminés avoisinants, ce qui semble empêcher l'interaction de l'inhibiteur avec la zone de liaison (Hsiou, Ding et al. 2001). La plupart des mutations de résistance provoquent en outre des cross-résistances de sorte qu'un traitement à la NVP ne peut pas être remplacé après un échec par de l'EFV (Antinori, Zaccarelli et al. 2002). Les INNTI de la deuxième génération (par exemple étravirine) ont une meilleure barrière génétique (deux mutations sont nécessaires pour inhiber l'action du médicament) et sont moins affectés par les cross-résistances entre INNTI (Croxtall 2012).



**Figure 10.** Mutations au niveau de la transcriptase inverse du VIH-1 qui rendent les virus résistants contre les INNTI (Johnson, Calvez et al. 2011).

Des virus résistants n'apparaissent pas seulement lors d'une mauvaise compliance mais peuvent aussi se développer dans certains compartiments de l'organisme où la concentration en antirétroviraux est plus faible comparée à la concentration plasmatique. Le système nerveux central est un tel exemple, car peu d'antirétroviraux sont capables d'y

accéder. Comme mentionné précédemment, l'EFV est un des seul ARV qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique et réduire la réplication du VIH au sein du système nerveux central (von Giesen, Koller et al. 2002). Chez certains individus traités qui ont une virémie plasmatique indétectable, des taux de virus ont pu être déterminés au niveau du col de l'utérus, du sperme et de l'appareil respiratoire indiquant que les antirétroviraux n'arrivaient pas à inhiber la prolifération du virus dans ces régions (Wagner, Tobin et al. 2009; Cu-Uvin, DeLong et al. 2010; Politch, Mayer et al. 2012). L'inefficacité de certains antirétroviraux au niveau de ces compartiments peut être liée à leurs interactions pharmacocinétiques qui influencent l'absorption, le transport, la distribution, le métabolisme ou l'excrétion des médicaments (de Maat, Ekhart et al. 2003). Ainsi, les INNTI ont une forte affinité pour l'albumine diminuant la biodisponibilité des inhibiteurs libres (non liés), qui sont en fait la forme biologiquement active, capables de traverser les membranes cellulaires (Smith, DiCenzo et al. 2001).

Des concentrations sub-thérapeutiques des ARV peuvent cependant aussi être le résultat d'une interaction avec d'autres substances ou médicaments. Les antibiotiques rifamycine et rifampicine qui sont utilisés dans la thérapie antituberculeuse, les antiépileptiques phénytoïne et carbamazépine, les barbituriques, l'alcool, les extraits d'ail et le millepertuis perforé (l'herbe de la Saint-Jean) ne sont que quelques substances qui, au cas d'une co-médication, influencent la concentration des antirétroviraux comme celle des INNTI (de Maat, Ekhart et al. 2003; Zapor, Cozza et al. 2004; Pozniak, Coyne et al. 2011). Les INNTI sont principalement catabolisés par le cytochrome P450 *CYP3A4* tandis que les inhibiteurs NVP et surtout EFV sont majoritairement métabolisés par le cytochrome *CYP2B6* (Dahri and Ensom 2007). La plupart des médicaments sont catabolisés par les mêmes isozymes et entrent ainsi en compétition avec les INNTI. Si les médicaments pris en parallèle avec la trithérapie ont un effet activateur ou inhibiteur sur l'activité des cytochromes P450, certains patients traités peuvent être mis au risque d'avoir respectivement une concentration en INNTI sub- ou supra-optimale. L'antibiotique rifampicine est un puissant activateur des cytochromes *CYP2B6* et *CYP3A4*. Les activateurs vont interagir avec les récepteurs nucléaires « Pregane X Receptor » (PXR) ou « Constitutive Androstane Receptor » (CAR). Après activation, chaque récepteur forme un hétérodimère avec le « Retinoid X Receptor » (RXR) et se lie à la région régulatrice du promoteur des gènes *CYP2B6* (« Xenobiotic Response Enhancer Module – Phenobarbital-Responsive Enhancer Module », XREM-PBREM) et *CYP3A4* (« Xenobiotic Response Enhancer Module – Pregane X Receptor Response

Element », XREM-PXRE) ce qui augmente la transcription de ces gènes et la quantité de ces isozymes (Honkakoski, Zelko et al. 1998; Wilkinson 2005; Faucette, Sueyoshi et al. 2006). Par ailleurs, les deux inhibiteurs EFV et NVP sont eux-mêmes des activateurs des isozymes CYP2B6 et CYP3A4 et induisent donc leur propre métabolisme (Smith, DiCenzo et al. 2001). Cette auto-induction peut cependant être plus importante que l'expression des deux cytochromes *CYP2B6* et *CYP3A4* induite par un activateur (Kwara, Ramachandran et al. 2010).

Une réduction de 20% à 30% de la concentration en EFV a été observée *in vivo* dans le cas d'une co-administration avec l'antituberculeux rifampicine (Lopez-Cortes, Ruiz-Valderas et al. 2002). Une augmentation de 200mg de la dose journalière en EFV a pu pallier l'effet de la rifampicine chez certains patients (Matteelli, Regazzi et al. 2007). Dans d'autres études cliniques par contre une augmentation de la posologie n'était pas nécessaire (Manosuthi, Kiertiburanakul et al. 2006; Orrell, Cohen et al. 2011).

Les mêmes observations ont pu être faites pour la NVP et la rifampicine qui sont largement utilisées dans les pays de développement parce que la NVP a quelques avantages par rapport à l'EFV : elle existe sous forme combinée à dose fixe avec d'autres antirétroviraux ce qui facilite la posologie et elle n'est pas tératogène. Des études pharmacocinétiques ont montrées que l'activation des cytochromes par l'antibiotique provoque une diminution de 20% à 55% de la concentration plasmatique en NVP. Les concentrations sub-optimales qui en résultent peuvent provoquer un échec thérapeutique (Manosuthi, Sungkanuparph et al. 2009). Une posologie de 400mg par jour lors de l'initiation du traitement NVP ou une dose journalière de 600mg ont été proposées aux patients co-infectés à la tuberculose et sous traitement rifampicine afin de pouvoir augmenter le taux plasmatique de la NVP (Ramachandran, Hemanthkumar et al. 2006; Avihingsanon, Manosuthi et al. 2008). Certaines études cliniques ont par contre montré qu'un ajustement de la dose en NVP n'est pas nécessaire vu que la diminution de la concentration en NVP ne réduit pas l'efficacité du traitement (Ribera, Pou et al. 2001; Sinha, Dhooria et al. 2011).

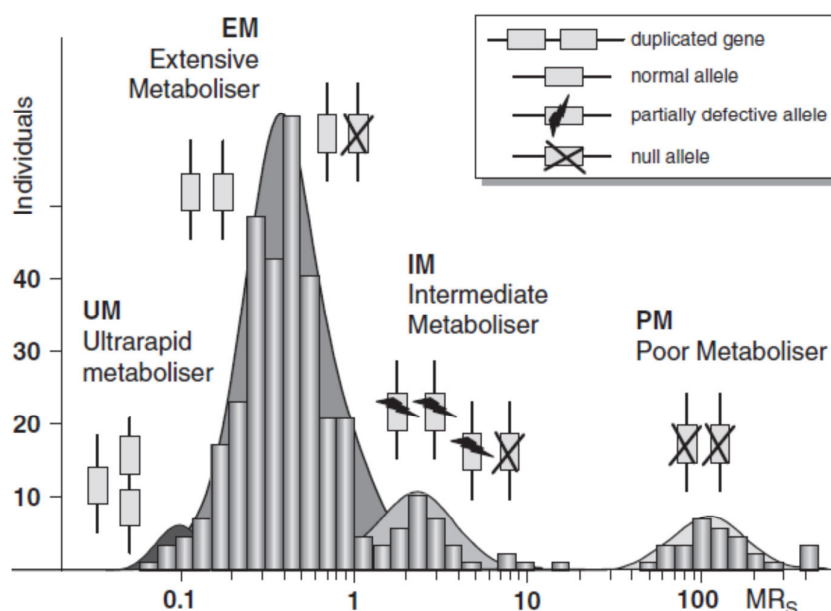
La diminution de la concentration plasmatique en INNTI et la résistance des virus qui en résulte ne peut pas seulement être liée à une faible compliance du patient, à une inaccessibilité d'un ou de plusieurs antirétroviraux dans une région de l'organisme ou des interactions entre différents médicaments, mais peut aussi être provoquée par des variations pharmacocinétiques et des variabilités interindividuelles (Weinshilboum 2003). La pharmacocinétique des médicaments peut varier suivant le sexe des individus (Currier, Spino

et al. 2000); l'absorption de la plupart des médicaments dépend par exemple de l'acide gastrique dont la sécrétion est plus faible chez les femmes que chez les hommes. La distribution des médicaments dans l'organisme est plus importante chez les hommes vu que le rapport entre la masse musculaire et le tissu adipeux est plus élevé chez eux. Au contraire, l'activité enzymatique de l'isozyme CYP3A4 est plus grande chez les femmes que chez les hommes car celle-ci peut être liée au taux de progestérone, un activateur du CYP3A4, étant plus élevé chez les femmes (Smith and Ku 2003). Des variabilités interindividuelles et interethniques de la concentration plasmatique des antirétroviraux ont été constatées qui sont liées aux mutations des gènes du cytochrome P450. Etant donné que les INNTI sont catabolisés par les isozymes du cytochrome P450, des polymorphismes ponctuels (« single nucleotide polymorphisms », SNP) peuvent inhiber ou induire l'activité enzymatique ou même favoriser la transcription du gène (Rotger, Csajka et al. 2006). Ainsi, dans le cas d'une co-médication entre l'EFV et la rifampicine, un ajustement de la dose d'EFV n'est pas toujours conseillée car la concentration plasmatique en EFV peut quand même dépasser le taux thérapeutique supérieur de 4 mg/L chez certains individus présentant un métabolisme des INNTI faible par la présence de SNP affectant l'expression ou l'activité de l'isoenzyme CYP2B6 (Kwara, Lartey et al. 2008).

### **3. La Pharmacogénétique**

La pharmacogénétique est l'étude de la variabilité interindividuelle des réponses de l'organisme à l'égard des médicaments due à des facteurs génétiques. En combinaison avec les facteurs cliniques (par exemple âge, sexe, poids, type de maladie) et environnementaux (par exemple nutrition et co-médication), les facteurs génétiques influencent l'efficacité d'un traitement et peuvent provoquer l'apparition d'effets secondaires (Rotger, Csajka et al. 2006). Le terme pharmacogénétique a été créé en 1959 par le pharmacologiste allemand Friedrich Vogel (Pirmohamed 2011). Suite à des observations cliniques de patients traités qui avaient des concentrations plasmatiques ou urinaires sub- ou supra-optimales, les premières variations interindividuelles ont été identifiées au niveau des gènes responsables du métabolisme des médicaments. Cette approche phénotypique permettant de visualiser les différences du catabolisme d'un médicament au sein d'une population a été utilisée jusqu'à la fin des années 1980 (Meyer 2004). Elle était basée sur la détermination du rapport métabolique entre un médicament et son métabolite. Cette méthode a permis de différencier des individus qui ont un rapport métabolique élevé correspondant à un faible métabolisme (« poor metaboliser »

ayant deux allèles non-fonctionnels), des individus qui ont un rapport métabolique intermédiaire (« intermediate metaboliser » ayant soit un allèle non-fonctionnel et un allèle déficient, soit deux allèles déficients), des individus qui ont un rapport métabolique normal (« extensive metaboliser » ayant deux allèles fonctionnels) et finalement des individus qui ont un rapport métabolique faible correspondant à un métabolisme élevé (« ultrarapid metaboliser » ayant au moins une duplication de gène) (**Figure 11**) (Johansson, Lundqvist et al. 1993; Zanger, Fischer et al. 2001).



**Figure 11.** Distribution phénotypique et génotypique de l'oxydation de la spartéine par le cytochrome P450 *CYP2D6* dans une population de 308 allemands (Raimundo, Toscano et al. 2004). MR, rapport métabolique (« metabolic ratio ») (Zanger 2008).

De nos jours, de plus en plus d'études pharmacocinétiques de population et d'études d'association entre un médicament et le génome humain sont réalisées pour décrire de nouvelles associations pharmacogénétiques permettant d'expliquer la variabilité interindividuelle (Daly 2010; Sanchez, Cabrera et al. 2011). La pharmacogénétique joue un rôle primordial dans la thérapie antirétrovirale car elle permet de déterminer les facteurs génétiques qui rendent les antirétroviraux toxiques ou qui font varier la réponse aux traitements chez les patients traités (Owen, Pirmohamed et al. 2006; Rodriguez-Novoa, Barreiro et al. 2006). L'exemple le plus démonstratif pour les ARV est celui du syndrome d'hypersensibilité à l'inhibiteur de la protéase abacavir. Environ 8% des patients traités à

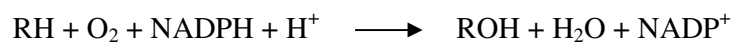


l'abacavir développent le syndrome d'hypersensibilité au cours des quatre à huit semaines qui suivent le début de la thérapie. Les symptômes liés à ce syndrome sont la fièvre, l'eczéma, des douleurs abdominales, la léthargie et des problèmes respiratoires aigus (Clay 2002). Les effets secondaires s'améliorent au cours d'une journée après l'arrêt du traitement. Une nouvelle administration de l'abacavir ne provoque pas seulement une réapparition des symptômes mais peut aussi augmenter le risque d'avoir une hypotension grave ou de mourir (Escaut, Liotier et al. 1999). Des études de pharmacogénétique ont pu associer cette hypersensibilité au locus HLA-B du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), plus précisément à l'haplotype comprenant l'*HLA-B\*5701*, l'*HLA-DR7* et l'*HLA-DQ3* (Mallal, Nolan et al. 2002). Le dépistage de cet haplotype a permis de réduire la prévalence de l'hypersensibilité à l'abacavir. L'INNTI NVP peut aussi provoquer un syndrome d'hypersensibilité caractérisé par le développement d'eczéma et dans certains cas aussi une intoxication du foie. Ce syndrome a pu être associé au nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et à l'haplotype *HLA-DRB1\*0101* (Martin, Nolan et al. 2005). Contrairement à l'abacavir, cet haplotype n'est pas recherché en clinique car l'hypersensibilité causée par la NVP a des conséquences moins graves. Les INNTI NVP et EFV sont très étudiés en pharmacogénétique parce qu'ils sont tous les deux métabolisés par l'isozyme du cytochrome P450 *CYP2B6*. Le gène codant pour cette enzyme est en effet extrêmement polymorphe et des variabilités interindividuelle et interethnique ont été décrites (Klein, Lang et al. 2005; Rotger, Tegude et al. 2007). Etant donné l'usage important des INNTI dans les pays en voie de développement, il est important de déterminer les variations du gène *CYP2B6* dans différentes populations car elles peuvent avoir un impact sur la thérapie anti-VIH. Ceci permettra de dépister les polymorphismes ou haplotypes responsables d'un échec thérapeutique ou d'effets secondaires aboutissant à la non-compliance des patients.

### **3.1. Les Cytochromes P450**

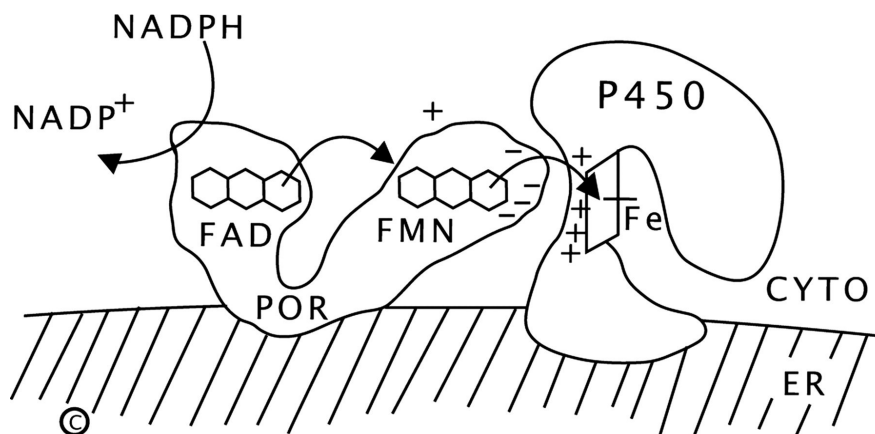
Découverts en 1955 dans les cellules hépatiques de rats, les cytochromes P450 sont présents dans tous les organismes eucaryotes (animaux, plantes et champignons) et dans certains procaryotes (Meunier, de Visser et al. 2004). Environ soixante gènes du cytochrome P450 et soixante pseudogènes, qui sont des gènes de cytochrome inactivés, ont été décrits chez l'être humain et classés suivant la similitude de leur séquence en acides aminés en 18 familles (indiquées par un numéro : 1-5, 7, 8, 11, 17, 19-21, 24, 26, 27, 39, 46 et 51) et 43 sous-familles (indiquées par une lettre : A-G, J, R-U, V-X, Z) (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>). La majorité des isozymes font partie des

familles *CYP1* à *CYP4*. Environ 15 isozymes des familles *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* et *CYP4* interviennent dans la biotransformation en phase I de substances exogènes comme des médicaments et d'autres xénobiotiques. Certaines de ces isozymes jouent aussi un rôle dans le métabolisme de substances endogènes comme les stéroïdes (l'œstradiol et la testostérone). La plupart des substances endogènes (la majorité des stéroïdes, les prostaglandines, les acides gras, les eicosanoïdes et la vitamine D<sub>3</sub>) sont cependant métabolisées par les isozymes des familles *CYP4* à *CYP51* du cytochrome P450 (Lewis 2004). Les isozymes des cytochromes P450 sont exprimées dans plusieurs tissus, mais la majorité est localisée au niveau du foie. Elles sont ancrées par leur partie N-terminale dans la membrane du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et sont ainsi appelées cytochromes microsomaux. Ce sont les principaux acteurs dans l'élimination hépatique des inhibiteurs de la protéase et des INNTI. Leur rôle dans le métabolisme des médicaments consiste à inactiver les substances qui sont généralement de nature lipophile en les transformant en métabolites hydrophiles, ce qui facilite leur élimination par les reins. Il existe deux voies métaboliques différentes : la réaction de phase I permet d'oxyder, de réduire ou d'hydrolyser les substances à éliminer. La phase II regroupe toutes les réactions de conjugaison comme l'acétylation, la glucuronidation, la sulfation et la méthylation. Etant indépendante de la voie métabolique I, la phase II peut précéder la phase I ou transformer des substances par conjugaison sans qu'elles soient préalablement oxydées, réduites ou hydrolysées (Weinshilboum 2003). Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines dont le groupe prosthétique est constitué d'une protoporphyrine IX contenant un ion de fer (III) qui est lié de façon covalente à l'enzyme par l'intermédiaire d'un atome de soufre d'une cystéine. Cet ion de fer (III) intervient dans la réaction métabolique de phase I qui est enclenchée par les isozymes et qui les classe parmi les monooxygénases (Meunier, de Visser et al. 2004). En effet, le cytochrome P450 fixe un atome d'oxygène provenant d'une molécule d'oxygène (O<sub>2</sub>) au substrat (RH) et réduit l'autre atome d'oxygène en une molécule d'eau (H<sub>2</sub>O) selon l'oxydoréduction suivante :



Les deux électrons nécessaires dans cette réaction de transformation et inactivation du substrat sont fournis par l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) ou en partie par le cytochrome b5 qui est le deuxième partenaire rédox de l'isozyme P450 (Im and Waskell 2011). Ils sont pris en charge par la flavoprotéine

cytochrome P450 oxidoréductase (POR) qui, grâce aux cofacteurs flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN), sont transférés vers l'ion fer du groupe prosthétique du cytochrome P450 isozyme (**Figure 12**) (Hu, Zhuo et al. 2012).



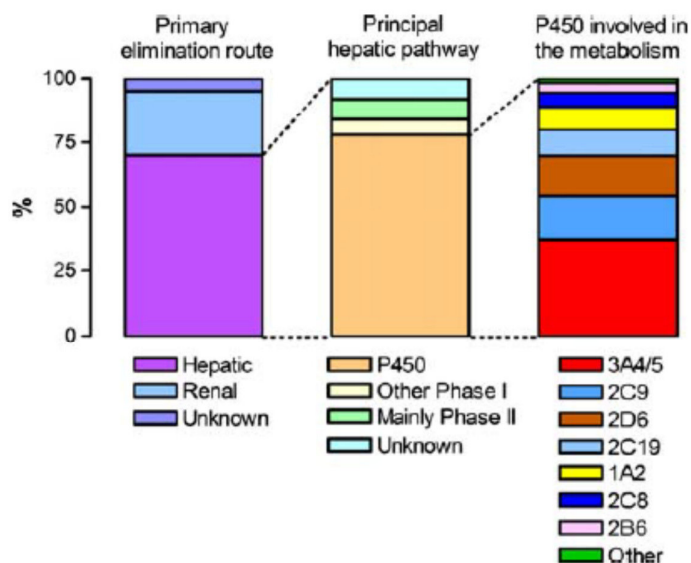
**Figure 12.** Relation entre la P450 oxidoréductase (POR) et une isozyme du cytochrome P450. Les deux électrons libérés lors de la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) sont captés par la flavine adénine dinucléotide (FAD) qui les transfère vers la flavine mononucléotide (FMN). Le domaine acide du POR contenant la FMN se lie ensuite avec le site de liaison basique du cytochrome P450 par des interactions électrostatiques. Les électrons passent du groupe FMN vers l'ion fer de l'hème du cytochrome P450 ce qui permet l'activité catalytique de l'enzyme. Cyto, cytoplasme ; ER, réticulum endoplasmique ; Fe, ion de fer (Huang, Agrawal et al. 2008).

Le métabolite (ROH) est ensuite éliminé par les urines. Les isozymes du cytochrome P450 ne sont pas seulement responsables de l'élimination des substances exogènes, elles permettent également d'activer des cancérogènes et mutagènes chimiques ou au contraire d'activer des prodrogues qui sont utilisées en cancérologie (Hoffman, Nelson et al. 2001; Xu and McLeod 2001).

### 3.1.1. Activité enzymatique des cytochromes P450

Parmi les 200 médicaments les plus prescrits aux Etats-Unis, la majorité sont catabolisés au niveau du foie avant d'être éliminés par les reins. Environ 25% sont sécrétés tels quels dans les urines (**Figure 13**). 80% des médicaments sont métabolisés dans les cellules hépatiques par la réaction de phase I des cytochromes P450. Les enzymes glutathion-

S-transférase et N-acétyltransférase vont cataboliser environ 5% des médicaments par la voie métabolique de phase II. La majorité des médicaments (environ 37%) sont catabolisés par les isozymes de la sous-famille *CYP3A*. Au contraire, l'isozyme *CYP2B6* n'intervient que dans 4% des réactions cataboliques (Zanger, Turpeinen et al. 2008).



**Figure 13.** Voies d'élimination des 200 médicaments les plus prescrits aux Etats-Unis (Rxlist Data 2008). Adapté de (Zanger, Turpeinen et al. 2008).

### 3.1.2. Induction des cytochromes P450

La plupart des cytochromes P450 peuvent être induits par des substances hétérologues augmentant l'activité spécifique de ces isozymes. Le cytochrome P450 *CYP2D6* en est une exception car son potentiel de détoxification est augmenté par la sélection naturelle d'allèles contenant plusieurs copies du même gène (Ingelman-Sundberg, Oscarson et al. 1999). L'induction de l'activité enzymatique constitue un mécanisme de défense de l'organisme contre des xénobiotiques et aboutit à leur détoxification et à leur élimination. Cette induction peut cependant avoir un impact sur le métabolisme des médicaments et des composés endogènes comme les acides gras, les hormones et les prostaglandines (Pustyl'nyak, Gulyaeva et al. 2007). Les récepteurs nucléaires CAR, PXR et le récepteur Ah (« aryl hydrocarbon receptor », AhR) sont responsables de l'activation des isozymes en augmentant le taux de transcription des gènes du cytochrome P450. L'AhR régule les cytochromes de la famille *CYP1*. PXR induit les cytochromes *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C* et *CYP3A*. CAR influence principalement les cytochromes *CYP2B* mais peut aussi induire les cytochromes *CYP2C* et

*CYP3A*. Si les concentrations en xénobiotiques sont élevées, les récepteurs CAR, PXR et AhR favorisent aussi la transcription des enzymes de la voie métabolique II comme par exemple celle des UDP-glucuronosyl-transférases (UGT) pour augmenter l'expression des enzymes qui interviennent dans le catabolisme des substances étrangères. Les récepteurs nucléaires sont activés soit par la voie de signalisation cellulaire après la liaison d'une substance exogène à des récepteurs extracellulaires, soit par l'interaction directe avec le xénobiotique dans le cytoplasme (Ingelman-Sundberg 2004). Après l'activation, les récepteurs nucléaires migrent vers le noyau cellulaire. Au sein du nucléus, CAR et PXR forment des hétérodimères avec le récepteur RXR et se lient aux éléments activateurs en *cis* des promoteurs des gènes *CYP2B6* et *CYP3A4*. L'activateur XREM-PREM du gène *CYP2B6* est reconnu par le facteur de transcription CAR/RXR. Le complexe PXR/RXR se lie à l'activateur XREM-PXRE du gène *CYP3A4* (Honkakoski, Zelko et al. 1998; Wang and Negishi 2003; Wilkinson 2005).

Etant donné qu'un nombre limité de composés chimiques peut activer à la fois les récepteurs nucléaires CAR et PXR, des réactions croisées entre ces facteurs de transcription et les deux promoteurs des gènes *CYP2B6* et *CYP3A4* augmentent l'efficacité du catabolisme (Faucette, Sueyoshi et al. 2006). Le carbamazépine, l'EFV et la NVP sont par exemple des activateurs de CAR et induisent l'enzyme CYP2B6. Les médicaments clotrimazole, phénobarbital, rifampin et ritonavir augmentent aussi la transcription de *CYP2B6* mais en activant les récepteurs PXR (Faucette, Wang et al. 2004; Faucette, Zhang et al. 2007). Il faut cependant noter que l'EFV est aussi selon Bristol-Myers Squibb un inhibiteur des CYP2B6 et CYP3A4 (Bumpus and Hollenberg 2008). Lamba *et al.* ont trouvé que la quantité relative en ARN messager de CAR et de PXR est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Lamba, Lamba et al. 2003; Lamba, Yasuda et al. 2004) et qu'il existe même une corrélation entre l'expression des récepteurs nucléaires et leurs gènes cibles en absence de xénobiotiques (Chang, Bandiera et al. 2003). Des variabilités interindividuelles de l'expression des récepteurs nucléaires peuvent ainsi provoquer des variations dans l'expression des cytochromes P450. L'importance de l'induction des isozymes CYP2B6 par CAR a été soulignée par la découverte du polymorphisme CAR rs2307424C>T. Le génotype CAR-CC a été associé de façon significative à une discontinuation du traitement à l'EFV (Wyen, Hendra et al. 2011; Cortes, Siccardi et al. 2013).

### 3.1.3. Variabilité des cytochromes P450

En plus de l'induction des cytochromes P450 par diverses substances exogènes, leur activité enzymatique dépend aussi des modifications génétiques des gènes codant pour les isozymes. En effet, les cytochromes P450 sont hautement polymorphes. Plus de 660 allèles de 29 cytochromes P450 ont été décrits jusqu'à présent et répertoriés par le « Human CYP allele nomenclature committee » de l'Institut Karolinska ([www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)). Les mutations qui modifient la fonction des cytochromes peuvent être soit des délétions ou des duplications de gènes, soit des mutations délétères comme par exemple des insertions ou délétions qui provoquent un changement du cadre de lecture et par conséquent une production de protéines inactives. Par ailleurs, des mutations ponctuelles peuvent aussi modifier l'activité spécifique de l'enzyme par substitution d'une base nucléotidique dans une région exonique (SNP) pouvant engendrer le changement d'un acide aminé de la séquence peptidique. Les polymorphismes des régions codantes ne sont cependant pas les seuls à avoir un effet sur l'activité des cytochromes. Des mutations dans les régions régulatrices flanquant les gènes et celles dans les introns peuvent par exemple augmenter la transcription et altérer ou créer des sites d'épissage résultant dans des protéines tronquées (Ingelman-Sundberg, Sim et al. 2007). Les substitutions ponctuelles (SNP) sont les variations génétiques les plus fréquentes. Elles peuvent être groupées dans deux catégories : les transitions sont des substitutions d'une purine par une autre purine ( $A \leftrightarrow G$ ) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine ( $C \leftrightarrow T$ ). Les transversions sont des substitutions d'une purine par une pyrimidine ou d'une pyrimidine par une purine ( $A \leftrightarrow T$ ,  $A \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ). Les transitions sont généralement plus fréquentes dans les régions codantes que les transversions parce que ces substitutions ne provoquent guère un changement des acides aminés incorporés dans les séquences polypeptidiques. De plus, une transition ne modifie pas la structure du noyau de la base azotée et peut ainsi passer inaperçue par le système de réparation de l'ADN polymérase. Il semble que la prédominance de la substitution par transition est aussi liée à l'instabilité de la méthyle-cystéine des groupements CpG qui se transforme par déamination en thymidine. Tous ces polymorphismes génèrent des allèles différents des gènes codant pour les isozymes du cytochrome P450. La fréquence de l'allèle mineur, c'est-à-dire de l'allèle le moins représenté dans la population, doit être supérieure ou égale à 0.01. Dans le cas contraire, cet allèle et la variation génétique correspondante sont considérés comme une mutation (Strachan and Read 2004). Chaque SNP existe en principe sous forme de deux allèles, mais de plus en plus de polymorphismes tri- et tétraalléliques ont été décrits ces dernières années (Huebner, Petermann et al. 2007). Parmi

tous les cytochromes P450, les gènes des familles *CYP1*, *CYP2* et *CYP3* présentent le plus grand nombre de polymorphismes. La variabilité de ces isozymes responsables du catabolisme des xénobiotiques leur permet de pouvoir interagir avec de nombreuses substances exogènes et de s'adapter à l'environnement. Gotoh *et al.* ont défini six régions de reconnaissance des substrats (« substrate recognition site », SRS) chez les isozymes *CYP2* qui contiennent plus de SNP que le reste de la séquence (Gotoh 1992). L'accumulation de polymorphismes au sein du site active des isozymes et le nombre élevé de pseudogènes de ces trois familles de cytochromes reflète leur capacité à s'adapter à l'environnement. Contrairement aux cytochromes *CYP1-3*, uniquement les gènes *CYP4A11*, *CYP4B1*, *CYP4F2*, *CYP5A1*, *CYP8A1*, *CYP17A1*, *CYP19A1* et *CYP26A1* des 20 cytochromes les plus importants pour le métabolisme de substances endogènes ont des variations génétiques (Ingelman-Sundberg 2004).

### 3.2. Variations Génétiques intervenant dans le Catabolisme des Antirétroviraux

De nombreux SNP ont été décrits au niveau des gènes impliqués dans le catabolisme des ARV pour influencer ou pour prédire les concentrations plasmatiques de ces médicaments (**Tableau 2**) :

Gène	Allèle	SNP	Effet pharmacocinétique
<i>PXR</i>		63396C>T	<b>Atazanavir :</b> Plus faible concentration minimale (Siccardi, D'Avolio et al. 2008). Augmentation de la clairance de 17% (Schipani, Siccardi et al. 2010).
<i>CAR</i>		rs3003596T>C	<b>EFV :</b> Les génotypes rs3003596CC et rs3003596TC sont significativement associés à de faibles concentrations plasmatiques en EFV (Swart, Whitehorn et al. 2012).
<i>CAR</i>		540C>T	<b>EFV :</b> Association significative du génotype CAR-CC à une discontinuation du traitement EFV (Wyen, Hendra et al. 2011).
<i>UGT2B7</i>	*1a	-1306A>G, -1299T>C, -1112T>C, -900G>A, -327A>G, -161T>C	<b>EFV :</b> Augmentation de la concentration plasmatique (Kwara, Lartey et al. 2009).
<i>UGT2B7</i>	*1c	735A>G	<b>Zidovudine :</b> Augmentation de la clairance (Kwara, Lartey et al. 2009).
<i>UGT2B7</i>	*2a	802C>T	<b>EFV :</b> Diminution de la concentration moyenne (Kwara,

			Lartey et al. 2009).
<i>CYP3A4</i>	*1B	-392A>G	<b>EFV :</b> Diminution de la clairance (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009). Augmentation de l'aire sous la courbe de la concentration d'EFV au cours du temps (AUC) (Haas, Ribaud et al. 2004). Diminution de l'AUC (Saitoh, Singh et al. 2005). <b>Indinavir :</b> Diminution de l'absorption et de la concentration maximale (Bertrand, Treluyer et al. 2009).
<i>CYP3A5</i>	*3	6986A>G	<b>EFV :</b> Augmentation de l'AUC (Haas, Ribaud et al. 2004). <b>Saquinavir :</b> Diminution de l'AUC de 34% (Josephson, Allqvist et al. 2007). <b>Indinavir :</b> Diminution de la clairance de 31% à 40% (Anderson, Lamba et al. 2006; Solas, Simon et al. 2007). <b>Atazanavir :</b> Diminution de la clairance et augmentation de la concentration minimale (Anderson, Aquilante et al. 2009).
<i>CYP3A5</i>	*6	14690G>A	<b>Saquinavir :</b> Augmentation de l'AUC et du rapport métabolique (Josephson, Allqvist et al. 2007). <b>Atazanavir :</b> Diminution de la clairance et une augmentation de la concentration plasmatique minimale (Anderson, Aquilante et al. 2009).
<i>CYP3A5</i>	*7	G27131-32insT	<b>Saquinavir :</b> Augmentation de l'AUC et du rapport métabolique (Josephson, Allqvist et al. 2007). <b>Atazanavir :</b> Diminution de la clairance et une augmentation de la concentration minimale (Anderson, Aquilante et al. 2009).
<i>CYP2C19</i>	*2	681G>A	<b>Nelfinavir :</b> Augmentation de l'AUC (Haas, Smeaton et al. 2005). Diminution de la clairance (Saitoh, Capparelli et al. 2010).
<i>CYP2D6</i>	*3	2549A>del	<b>EFV :</b> Concentrations plasmatiques élevées (Fellay, Marzolini et al. 2002). <b>Nelfinavir :</b> Concentrations plasmatiques élevées (Fellay, Marzolini et al. 2002).
<i>CYP2D6</i>	*4	1846G>A	<b>EFV :</b> Concentrations plasmatiques élevées (Fellay, Marzolini et al. 2002). <b>Nelfinavir :</b>



			Concentrations plasmatiques élevées (Fellay, Marzolini et al. 2002).
<i>CYP2D6</i>	*6	1707T>del	<b>EFV :</b> Augmentation de la concentration plasmatique (Fellay, Marzolini et al. 2002). <b>Nelfinavir :</b> Augmentation de la concentration plasmatique (Fellay, Marzolini et al. 2002).
<i>CYP2A6</i>	*1H, *1J, *2, *4, *5, *7, *9, *10, *12, *13, *15, *17, *19, *34		<b>EFV :</b> Augmentation de l'AUC et diminution du taux en 7-hydroxyéfavirenz en présence d'allèles non fonctionnels ou à fonction réduite et en présence d'allèles <i>CYP2B6</i> aberrants (di Iulio, Fayet et al. 2009). Diminution de la clairance (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009).

**Tableau 2.** Aperçu des variations génétiques des gènes *PXR*, *UGT2B7*, *CYP2A6*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* et *CYP3A5* ayant un effet sur le catabolisme des ARV.

### 3.2.1. *PXR*

#### 3.2.1.1. *PXR* 63396C>T

L'inhibiteur de la protéase du VIH atazanavir est principalement catabolisé par les isozymes *CYP3A4*. La transcription du gène du cytochrome *CYP3A4* est activée par les récepteurs nucléaires *PXR*. Le SNP 63396C>T est situé dans l'intron 1 du gène *PXR* dans le site de liaison du facteur nucléaire hépatique 3β (« hepatocyte nuclear factor 3β », HNF3β). Ce polymorphisme favorise donc l'expression de *PXR* et augmente ainsi l'activité enzymatique du *CYP3A4*. Siccardi *et al.* ont montré que les individus homozygotes TT ont une plus faible concentration minimale en atazanavir que les individus à génotype hétérozygote ou sauvage (Siccardi, D'Avolio et al. 2008). Un modèle de pharmacocinétique de population a pu confirmer cette association significative entre le génotype homozygote *PXR* 63396TT et la concentration plasmatique en atazanavir et a montré une augmentation de la clairance d'atazanavir de 17% chez les individus homozygotes mutés (Schipani, Siccardi et al. 2010).

### **3.2.2. CAR**

#### **3.2.2.1. CAR rs3003596T>C**

Le polymorphisme rs3003596T>C a été découvert dans l'intron 3 du gène CAR chez des individus de l'Afrique du sud. Les formes homozygotes CC et hétérozygotes TC ont été significativement associées à une réduction de la concentration plasmatique en EFV (Swart, Whitehorn et al. 2012).

### **3.2.3. UGT2B7**

#### **3.2.3.1. UGT2B7\*1a**

L'allèle \*1a est la séquence de référence du gène Uridine 5'-diphosphate (UDP)-glucuronosyltransférase 2B7 (*UGT2B7*) suivant l'« UGT Allele Nomenclature Committee » ([www.ugtalleles.ulaval.ca](http://www.ugtalleles.ulaval.ca)). Bien que cet allèle soit considéré comme sauvage, les polymorphismes -1306A>G, -1299T>C, -1112T>C, -900G>A, -327A>G, -161T>C ont pu être déterminés dans la région promotrice du gène. Dans une population ghanéenne, l'*UGT2B7\*1a* a été significativement associé à une augmentation de 475 ng/mL de la concentration plasmatique en EFV. L'allèle \*1a a donc été déterminé comme un prédicteur indépendant de la concentration de cet INNTI (Kwara, Lartey et al. 2009).

#### **3.2.3.2. UGT2B7\*1c (735A>G)**

L'INTI ZDV est principalement éliminé au niveau du foie par glucuronidation des isozymes UGT2B7. Le SNP 735A>G de l'exon 2 qui a été assigné à l'allèle *UGT2B7\*1c* provoque une augmentation de la transcription du gène et favorise la glucuronidation et la clairance de la ZDV chez les individus qui ont cet allèle (Kwara, Lartey et al. 2009).

#### **3.2.3.3. UGT2B7\*2a (802C>T)**

Les porteurs ghanéens du SNP 802C>T de l'exon 2 présentent une diminution de la concentration moyenne en EFV à l'opposé de ceux qui n'ont pas ce polymorphisme (Kwara, Lartey et al. 2009).

### 3.2.4. CYP3A4

#### 3.2.4.1. CYP3A4\*1B (-392A>G)

L'inhibiteur de la protéase indinavir est métabolisé par les isozymes du cytochrome P450 CYP3A. La co-médication avec une faible dose de ritonavir favorise l'exposition à l'indinavir car la structure moléculaire de la ritonavir inhibe l'activité enzymatique des CYP3A. Il existe cependant une large variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique de l'indinavir qui peut partiellement être expliquée par des polymorphismes génétiques. Le SNP -392A>G du promoteur du cytochrome CYP3A4 qui constitue l'allèle \*1B induit la transcription de ce gène *in vitro*. Bien que la corrélation génotype-phénotype ne soit pas connue *in vivo*, l'effet inhibiteur du ritonavir chez les individus homozygotes CYP3A4\*1B/\*1B semble être moins important et aboutit à une diminution significative de la concentration maximale (C<sub>max</sub>) en indinavir. En outre, une diminution de 70% de l'absorption de l'indinavir a été montrée chez les individus homozygotes CYP3A4\*1B/\*1B comparés aux génotypes \*1A/\*1B et \*1A/\*1A (Bertrand, Treluyer et al. 2009).

Haas *et al.* ont étudié le CYP3A4\*1B chez des Américains originaires d'Europe et d'Afrique, ils ont montré que la fréquence du SNP -392A>G était 20 fois supérieur chez les Américains venant de pays africains. Les auteurs ont associé de façon significative ce polymorphisme avec la concentration plasmatique en EFV. L'INNTI EFV est essentiellement catabolisé par le cytochrome CYP2B6 mais aussi dans une moindre mesure par les isozymes de la famille CYP3A. La présence du polymorphisme conduit à une augmentation de l'aire sous la courbe de la concentration d'EFV au cours du temps (AUC) (Haas, Ribaudou et al. 2004). Ceci n'a pas pu être confirmé par Saitoh *et al.* qui trouvaient l'AUC de l'EFV la plus élevée chez des enfants ayant le génotype homozygote sauvage -392AA (Saitoh, Singh et al. 2005). Dans une étude de pharmacogénétique de population, une diminution de la clairance de l'EFV a été attribuée au génotype CYP3A4\*1B/\*1B (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009).

### 3.2.5. CYP3A5

#### 3.2.5.1. CYP3A5\*3 (6986A>G)

La présence du SNP 6986A>G au niveau de l'intron 3 du CYP3A5 crée un site alternatif d'épissage qui résulte dans des ARN messagers contenant 131 bases de l'intron 3. Leur présence provoque un changement du cadre de lecture et la production de protéines

tronquées non-exprimées et par conséquent une importante réduction de l'activité enzymatique. L'allèle *CYP3A5*\*3 est plus fréquent chez les Caucasiens (entre 85% et 98%) que chez les Africains ou Afro-Américains (entre 55% et 64%). Une forte association a pu être mise en évidence entre les génotypes *CYP3A5* 6986AA, AG et GG et les génotypes *CYP3A4* -392GG, AG et AA. Haas *et al.* ont pu trouver une faible association entre ce polymorphisme et la concentration plasmatique en EFV qui provoque une augmentation de l'AUC (Haas, Ribaldo *et al.* 2004). Au contraire, Saitoh *et al.* n'ont pas pu observer des variations pharmacocinétiques de l'EFV entre les différents génotypes de ce SNP (Saitoh, Singh *et al.* 2005).

Le métabolisme de l'inhibiteur de la protéase saquinavir est aussi influencé par les isozymes *CYP3A5*. La médiane de l'AUC de la saquinavir calculée pour des individus ayant deux allèles *CYP3A5* fonctionnels était 34% plus faible que chez les personnes qui ont deux allèles non-fonctionnels \*3/\*3 (Josephson, Allqvist *et al.* 2007). De plus, les auteurs ont constaté que la médiane du rapport métabolique entre la saquinavir et ses deux métabolites M2 et M3 est 2.3 fois supérieure chez les individus homozygotes \*3/\*3 que chez les individus \*1/\*1. Fröhlich *et al.* ont confirmé l'association du polymorphisme *CYP3A5*\*3 et du rapport métabolique bien que les auteurs n'aient pas trouvé de corrélation entre le SNP 6986A>G et l'AUC (Frohlich, Hoffmann *et al.* 2004).

Une diminution de la clairance de 31% à 40% a été observée chez des patients porteurs homozygotes du SNP 6986GG qui ont été traités par l'inhibiteur de la protéase indinavir (Anderson, Lamba *et al.* 2006; Solas, Simon *et al.* 2007).

Les mêmes conclusions ont pu être tirées pour l'inhibiteur de la protéase atazanavir. En effet, la clairance de l'atazanavir après sept jours de traitement était 1.39 fois plus rapide chez les individus qui ont exprimé *CYP3A5* (\*1/\*1 ou \*1/\*3) comparé à ceux qui n'ont pas exprimé *CYP3A5* (\*3/\*3). La concentration plasmatique minimale d'atazanavir était deux fois inférieure chez les gens exprimant *CYP3A5* (87 ng/mL contre 171 ng/mL). Contrairement à la clairance de l'indinavir qui est plus rapide chez les Afro-Américains que chez les non-Afro-Américains, aucune différence significative de la pharmacocinétique de l'atazanavir n'a été observée entre les Afro-Américains exprimant et n'exprimant pas *CYP3A5* (Anderson, Aquilante *et al.* 2009).

### 3.2.5.2. *CYP3A5*\*6 (14690G>A)

Etant donné que l'allèle \*6 du cytochrome *CYP3A5* est aussi non-fonctionnel par un épissage défectueux qui enlève l'exon 7, la médiane de l'AUC de l'inhibiteur de la protéase saquinavir des individus ayant deux allèles fonctionnels équivaut uniquement à 66% de celle des personnes qui ont le génotype *CYP3A5*\*6/\*6. La médiane du rapport métabolique de la saquinavir est ainsi plus élevée chez les individus homozygotes mutés que chez les personnes de génotype *CYP3A5*\*1/\*1 (Josephson, Allqvist et al. 2007).

Anderson *et al.* ont observé une diminution de la clairance et une augmentation de la concentration plasmatique minimale de l'atazanavir chez les individus qui sont incapables d'exprimer *CYP3A5* (Anderson, Aquilante et al. 2009).

### 3.2.5.3. *CYP3A5*\*7 (G27131-32insT)

La variation génétique de l'allèle *CYP3A5*\*7 consiste en une insertion du nucléotide T au niveau de l'exon 11 qui induit un changement du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop et résulte par conséquent dans une incapacité de produire les isozymes *CYP3A5*. A côté des allèles \*3 et \*6 du *CYP3A5*, l'allèle \*7 est donc aussi non-fonctionnel. Josephson *et al.* et Anderson *et al.* ont pu montrer l'effet de cet allèle sur le métabolisme de la saquinavir et de l'atazanavir. Comparés aux génotypes *CYP3A5*\*1/\*1 ou \*1/\*7, les gens porteurs homozygotes de cette insertion ont une AUC de la saquinavir plus élevée et une clairance d'atazanavir plus faible (Josephson, Allqvist et al. 2007; Anderson, Aquilante et al. 2009).

## 3.2.6. *CYP2C19*

### 3.2.6.1. *CYP2C19*\*2 (681G>A)

Le polymorphisme *CYP2C19* 681G>A de l'exon 5 crée un site d'épissage alternatif qui aboutit à la production de protéines tronquées. L'inhibiteur de la protéase nelfinavir est métabolisé par les isozymes *CYP2C19* du foie qui le transforment en nelfinavir hydroxyl-tertbutylamide (M8) qui est un métabolite actif de nelfinavir. La médiane de l'AUC de nelfinavir pour une période de 12 heures était environ 36% supérieure chez les homozygotes mutés AA que chez les homozygotes GG (Haas, Smeaton et al. 2005). En plus, le rapport M8/nelfinavir était significativement associé au *CYP2C19*\*2. Les valeurs des rapports calculés chez les individus homozygotes GG, hétérozygotes GA et homozygotes mutés AA

étaient respectivement 0.45, 0.26 et 0.02 (Saitoh, Capparelli et al. 2010). Cette augmentation de la concentration plasmatique en nelfinavir a été associée à une suppression virologique plus importante chez les porteurs hétérozygotes et homozygotes de ce SNP après 24 semaines de traitement (Haas, Smeaton et al. 2005; Saitoh, Capparelli et al. 2010). Saitoh *et al.* ont montré que le SNP *CYP2C19* 681G>A est fortement associé à la clairance chez des enfants traités à la nelfinavir. La différence de la clairance entre les trois génotypes GG, GA et AA est la plus importante chez les Noirs non-Hispaniques (Saitoh, Capparelli et al. 2010). Aucune différence significative de la clairance en nelfinavir n'a par contre été déterminée entre des individus *CYP2C19*\*1/\*1 et *CYP2C19*\*1/\*2 (Burger, Schwietert et al. 2006).

### **3.2.7. *CYP2D6***

#### **3.2.7.1. *CYP2D6*\*3 (2549A>del)**

La délétion de la désoxyadénosine 2549 de l'exon 5 du *CYP2D6*, qui a été assigné à l'allèle \*3, modifie le cadre de lecture de l'ARN messager et fait apparaître un codon stop prématuré. Ainsi, selon les génotypes \*3/\*3 ou \*1/\*3, le gène du *CYP2D6* n'est pas ou peu exprimé. Les antirétroviraux nelfinavir et EFV peuvent donc atteindre des concentrations plasmatiques supérieures à celles des individus \*1/\*1 (Fellay, Marzolini et al. 2002).

#### **3.2.7.2. *CYP2D6*\*4 (1846G>A)**

L'allèle *CYP2D6*\*4 est un allèle non-fonctionnel qui est très fréquent chez les Caucasiens (25%). La fréquence de l'allèle \*4 n'est que de 7% pour les Africains et Afro-Américains et de 1% pour les populations de l'Orient. La substitution de la désoxyguanosine par la désoxyadénosine à la position 1846 du gène *CYP2D6* provoque un décalage d'une base de la jonction intron exon en 3' du site d'épissage se trouvant dans l'intron 3 ce qui résulte dans des ARN messagers qui ont une base supplémentaire et un cadre de lecture altéré codant pour un codon stop prématuré (Zanger, Raimundo et al. 2004). Les individus porteurs de ce SNP sous forme hétérozygote ou homozygote ont le phénotype appelé « poor metaboliser ». Les médianes des concentrations plasmatiques de nelfinavir et EFV déterminées chez ces personnes sont ainsi plus élevées que chez les individus au génotype *CYP2D6*\*1/\*1 (Fellay, Marzolini et al. 2002).

### 3.2.7.3. *CYP2D6*\*6 (1707T>del)

L'allèle \*6 du *CYP2D6* est aussi un allèle aberrant car la délétion de la thymidine à la position 1707 de l'exon 3 change le cadre de lecture et crée un codon stop prématuré. Une diminution (\*1/\*6) ou une absence totale (\*6/\*6) de l'activité enzymatique et une augmentation de la concentration plasmatique des antirétroviraux nelfinavir et EFV sont la conséquence (Fellay, Marzolini et al. 2002).

### 3.2.8. *CYP2A6*

38 allèles différents du cytochrome *CYP2A6* ont été décrits montrant que ce gène est très polymorphe. Il intervient entre autres dans le catabolisme de toxines, de médicaments et dans l'activation de cancérogènes. L'INNTI EFV est métabolisé en 7-hydroxyéfavirenz par les isozymes *CYP2A6*. Bien que la fonction des allèles *CYP2A6* n'ait qu'un effet limité sur l'exposition à l'EFV qui est principalement dégradé par les isozymes *CYP2B6*, environ 12% de la variation totale de la concentration plasmatique en EFV est associée au *CYP2A6*. Les allèles \*1H, \*1J, \*2, \*4, \*5, \*7, \*9, \*10, \*12, \*13, \*15, \*17, \*19 et \*34 du cytochrome *CYP2A6* ont cependant pu être liés à des variations de la concentration plasmatique d'EFV. Les allèles \*2 et \*4 qui vont dégrader la fonction métabolique des isozymes sont appelés « loss of function » (LOF). Les polymorphismes des autres allèles provoquent une diminution de l'activité enzymatique. L'allèle \*2 induit une substitution de l'acide aminé leucine de la position 160 en histidine, ce qui empêche l'incorporation de l'hème au sein de la protéine. L'allèle \*4 regroupe toutes les délétions du gène *CYP2A6* qui résultent d'une recombinaison inégale avec le cytochrome *CYP2A7* au niveau de l'intron 8. Une réduction de l'activité enzymatique est par exemple due au polymorphisme de l'allèle \*5 qui substitue la désoxyguanosine de la position 1436 de l'exon 9 en thymidine et déstabilise ainsi la protéine. Le SNP -48T>G du promoteur est assigné à l'allèle \*9. Cette substitution transforme la boîte TATA en TAGA et diminue ainsi la transcription du gène (Xu, Goodz et al. 2002). Di Iulio *et al.* ont montré qu'en présence de deux allèles non-fonctionnel du cytochrome *CYP2B6*, l'AUC de l'EFV augmente et la concentration du métabolite 7-hydroxyéfavirenz diminue si le génotype du *CYP2A6* est constitué d'un allèle LOF et d'un allèle qui réduit l'activité enzymatique. Quatre allèles LOF (*CYP2B6*\*LOF/\*LOF et *CYP2A6*\*LOF/\*LOF) vont donc donner des concentrations en EFV extrêmement élevées (di Iulio, Fayet et al. 2009). Contrairement à cette étude, il a été montré que des Ghanéens porteurs des allèles *CYP2A6*\*9

et *\*17* ont des concentrations plasmatique en EFV qui sont 1.8 fois supérieures à celles des personnes n'ayant pas ce génotype et que cette augmentation est indépendante des polymorphismes du cytochrome *CYP2B6* (Kwara, Lartey et al. 2009). Une diminution de la clairance moyenne de l'EFV est associée à la présence hétérozygote ou homozygote des allèles LOF du *CYP2A6*. En effet, dans une étude de pharmacocinétique de population, Arab-Alameddine *et al.* ont observé que la clairance moyenne de l'EFV pour les génotypes LOF homozygotes mutés, hétérozygotes et sauvages était respectivement 7.0, 10.8 et 12.1 l/h (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009). La clairance de l'EFV peut même diminuer de 90% par rapport à celle d'un individu de génotype *\*1/\*1* si les trois gènes *CYP2A6*, *CYP2B6* et *CYP3A4* des voies métaboliques communes de l'EFV présentent tous deux allèles LOF.

### 3.2.9. *CYP2B6*

Le cytochrome P450 *CYP2B* humain a été isolé pour la première fois à la fin des années 1980. Il est constitué d'un gène fonctionnel *CYP2B6* et d'un pseudogène *CYP2B7P* qui résulte d'une duplication de gènes du *CYP2B6*. Le *CYP2B* est localisé sur le brin long du chromosome 19 (19q13.2) et fait partie du groupe *CYP2ABFGST* de 350kb qui contient les gènes et pseudogènes des cytochromes *CYP2A*, *2B*, *2F*, *2G*, *2S* et *2T* (Hoffman, Nelson et al. 2001). Au début des années 2000, peu de données étaient connues sur l'isozyme *CYP2B6*. Peu d'études pharmacocinétiques avaient été menées parce qu'il n'existait ni de substrats, ni d'inhibiteurs spécifiques du *CYP2B6*. On pensait alors que le cytochrome *CYP2B6* jouait un rôle mineur dans le métabolisme des substances exogènes car on avait montré que le gène était peu exprimé au niveau hépatique représentant moins de 0.2% de l'ensemble des cytochromes P450 (Ekins and Wrighton 1999). La quantité hépatique de l'isozyme *CYP2B6* est cependant plus élevée et peut atteindre entre 6% et 10% de la quantité totale des cytochromes présents au niveau du foie (Stresser and Kupfer 1999; Wang and Tompkins 2008). L'expression hépatique du *CYP2B6* est très variable et le taux de protéines peut différer de plus de 100 fois entre les individus. Cette variabilité n'est pas seulement due aux médicaments et aux substances chimiques et environnementales qui ont un effet activateur sur le *CYP2B6* mais dépend aussi des variations génétiques. En effet, après la découverte en 2001 des premiers SNP qui étaient associés à une diminution de l'expression ou de l'activité enzymatique (Lang, Klein et al. 2001), une centaine de polymorphismes ont été décrits jusqu'à présent et assignés à 37 allèles différents ([www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm)). Les variations de séquence peuvent être des SNP faux-sens, non-sens ou silencieux et peuvent



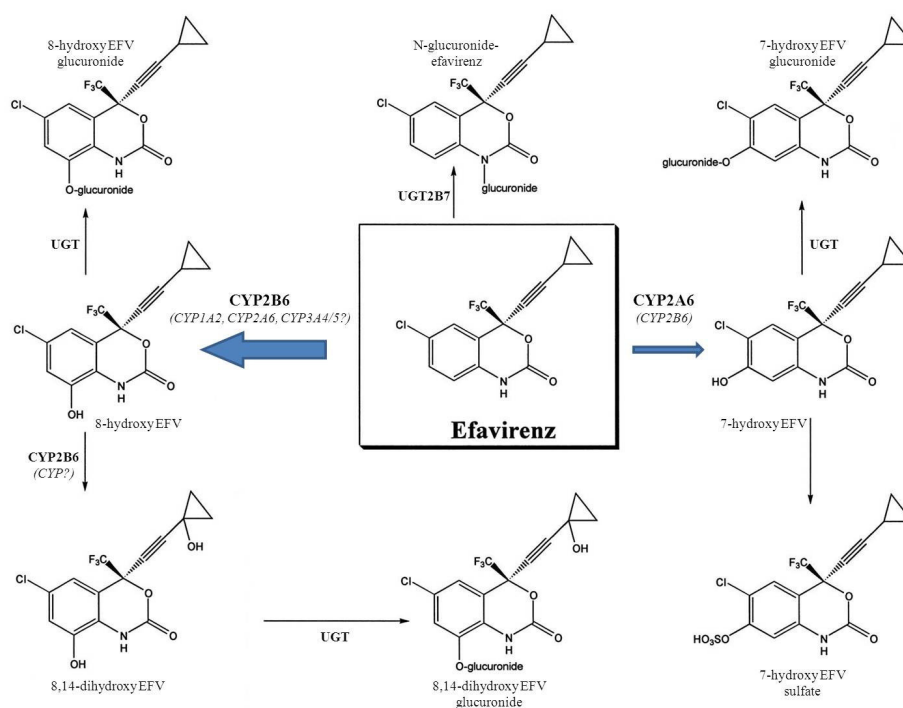
modifier le promoteur ou les régions introniques. La plupart de ces polymorphismes sont en déséquilibre de liaison (« linkage disequilibrium ») formant des haplotypes qui ont des effets importants sur la fonction de l'isozyme CYP2B6, comme par exemple les allèles non-fonctionnels, les allèles à fonction ou expression réduite et les allèles ayant une activité enzymatique plus élevée. La majorité des polymorphismes du *CYP2B6* sont plutôt rares dans les populations caucasiennes. Certains SNP par contre sont plus communs que d'autres ayant des fréquences de 5% à plus de 50% selon les différentes ethnies (Zanger, Klein et al. 2007). L'isozyme CYP2B6 n'est pas seulement exprimée au niveau du foie mais a aussi été mise en évidence à des taux plus faibles dans certains tissus extrahépatiques comme le cerveau, le rein, l'intestin, l'endomètre, la peau, les macrophages broncho-alvéolaires et les lymphocytes du sang circulant (Ekins and Wrighton 1999; Gervot, Rochat et al. 1999; Janmohamed, Dolphin et al. 2001). Le rôle des isozymes CYP2B6 consiste à cataboliser des substances exogènes dont le nombre a considérablement augmenté ces dernières années. Ils interviennent par exemple dans la dégradation de la nicotine, de la méthylènedioxy-méthamphétamine et de la méthylènedioxy-éthamphétamine qui sont deux drogues mieux connues sous le nom 'Ecstasy' et 'Eve'. Ils activent les procancérogènes aflatoxin B1, 6-aminochrysène et dibenzanthracène et les substances anticancéreuses cyclophosphamide et ifosfamide. Les médicaments comme l'analgésique méthadone, l'antiestrogène tamoxifène, les benzodiazépines diazépam, témazépame et midazolam, les anesthésiques kétamine et propofol, l'antiépileptique S-méphobarbital, l'inhibiteur de recapture de la dopamine bupropionne et les INNTI EFV et NVP ne sont que quelques exemples de médicaments qui sont partiellement ou complètement (uniquement bupropionne) catabolisés par les isozymes CYP2B6 (Lang, Klein et al. 2001; Turpeinen, Raunio et al. 2006). Le cytochrome *CYP2B6* joue aussi un rôle important dans le métabolisme de certains pesticides et d'autres xénobiotiques environnementaux (Hodgson and Rose 2007). Certains médicaments ont un effet inhibiteur sur le CYP2B6. L'agent anticancéreux thiotépa (triéthylènediéthylphosphoramidate) est par exemple un inhibiteur très sélectif de l'isozyme tandis que les antiagrégants plaquettaires ticlopidine et clopidogrel et la mémantine, qui est un traitement de la maladie d'Alzheimer, sont des inhibiteurs relativement sélectifs du CYP2B6. Les antirétroviraux nelfinavir et EFV sont des inhibiteurs qui sont modérément sélectifs des isozymes CYP2B6 (Turpeinen, Raunio et al. 2006). D'autres facteurs peuvent influencer l'activité enzymatique du CYP2B6. Une association significative entre la consommation chronique en alcool (plus de 14 verres par semaine) et l'augmentation de l'ARN messager du

CYP2B6, de la quantité en protéines CYP2B6 et par conséquent de l'activité hydroxylique a été reportée (Hesse, He et al. 2004). Le sexe semble aussi avoir une influence sur l'isozyme CYP2B6 bien qu'elle soit contestable. La quantité d'ARN messenger et de protéines CYP2B6 ainsi que l'activité enzymatique de CYP2B6 mesurée dans du tissu hépatique provenant de femmes étaient supérieures à celles déterminées chez des hommes, ce qui peuvent être expliquées par une quantité relative d'ARN messenger CAR plus élevée chez les femmes (Lamba, Lamba et al. 2003). Contrairement à ces résultats, une augmentation de la concentration plasmatique en EFV des femmes par rapport à celle des hommes a été observée (Burger, van der Heiden et al. 2006) tandis que d'autres études ne montraient pas de lien entre le sexe et la concentration plasmatique ou même la réponse virologique (Haas, Gebretsadik et al. 2009; Kwara, Lartey et al. 2009; Soon, Min et al. 2012).

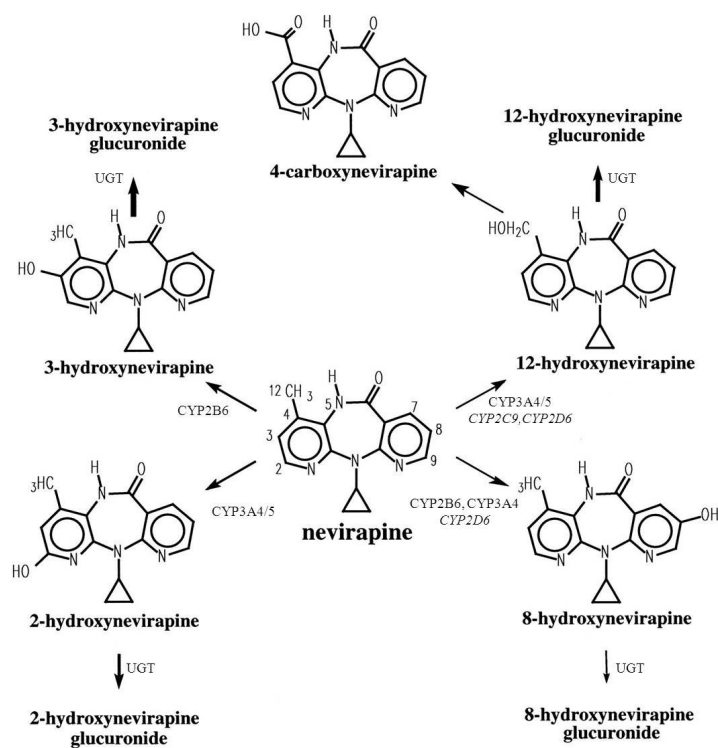
### 3.2.9.1. Catabolisme des INNTI EFV et NVP

Les INNTI EFV et NVP sont deux substrats du CYP2B6. Deux voies de métabolisme de l'EFV ont été décrites *in vivo* et *in vitro* en utilisant des préparations microsomales de foie humain. La première est la voie principale de l'oxydation de l'EFV et permet de transformer entre 77% et 92% de celui-ci en métabolite 8-hydroxyéfavirenz (**Figure 14**). Cette étape du catabolisme de l'EFV est principalement réalisée par l'action du CYP2B6 avec une faible participation des CYP1A2, CYP2A6 et CYP3A4/5. Le métabolite 8-hydroxyéfavirenz est soumis à une deuxième étape d'oxydation qui ajoute un groupement hydroxyle à la position 14 résultant dans le métabolite 8,14-dihydroxyéfavirenz (Ward, Gorski et al. 2003). Ce dernier peut cependant aussi se former lors de l'hydroxylation en position 14 du métabolite 8-hydroxyéfavirenz glucuronide qui résulte de la glucuronidation rapide du 8-hydroxyéfavirenz *in vivo* (Ogburn, Jones et al. 2010). La deuxième voie de métabolisme qui transforme moins de 8% à 23% de l'EFV en 7-hydroxyéfavirenz est due à l'action principale du CYP2A6 et, dans une moindre mesure, par l'activité enzymatique du CYP2B6. Une conjugaison directe de l'EFV avec l'acide glucuronique initiée par l'UDP-glucuronosyltransférase UGT2B7 résulte dans le métabolite N-glucuronide-éfavirenz qui est le métabolite le plus représenté dans l'urine après la première dose d'EFV. Après de multiples doses d'EFV, le 8-hydroxyéfavirenz glucuronide devient le métabolite le plus prédominant dans l'urine. Les métabolites 7-hydroxyéfavirenz et 8,14-dihydroxyéfavirenz sont eux glucuronidés entre autres par l'UGT2B7 et éliminés par l'urine (Mutlib, Chen et al. 1999; Desta, Saussele et al. 2007; Belanger, Caron et al. 2009; Bae, Jeong et al. 2011).

La biotransformation de la NVP par hydroxylation crée les métabolites 2-, 3-, 8- et 12-hydroxynévirapine qui sont ultérieurement glucuronidés et éliminés en majeure partie par les reins (**Figure 15**). Les cytochromes CYP3A4/5 et CYP2B6 produisent respectivement les métabolites 2- et 3-hydroxynévirapine. Le 8-hydroxynévirapine résulte de l'action enzymatique des cytochromes CYP2B6, CYP2D6 et CYP3A4. Le 12-hydroxynévirapine est formé par les CYP3A4/5, CYP2D6 et CYP2C9. Les cytochromes CYP2D6 et CYP2C9 ne jouent cependant qu'un rôle mineur dans le catabolisme de la NVP (Riska, Lamson et al. 1999; Kwara, Ramachandran et al. 2010).



**Figure 14.** Voies métaboliques proposées pour l'INNTI EFV. Modifié de (Mutlib, Chen et al. 1999).



**Figure 15.** Biotransformation de l'INNTI NVP. Modifié de (Riska, Lamson et al. 1999).

### 3.2.9.2. Impact des polymorphismes du CYP2B6 sur le catabolisme des INNTI

Alors que le cytochrome CYP2B6 n'est que faiblement représenté par rapport aux autres isozymes du cytochrome P450, une grande variabilité génétique a pu être mise en évidence qui a un impact sur le métabolisme des xénobiotiques comme pour les INNTI EFV et NVP (**Tableau 3**). La voie métabolique du CYP2B6 est cependant capable de s'adapter aux modifications de l'activité enzymatique provoquées par différents SNP. En effet, une inactivation du CYP2B6 est associée à une diminution du taux des métabolites hydroxylés de l'EFV et une augmentation de la concentration du métabolite N-glucuronide-éfavirenz indiquant une orientation du métabolisme vers des voies alternatives. En outre, une diminution de l'activité enzymatique du CYP2A6 en présence de *CYP2B6* LOF/LOF a été associée à une diminution du taux de 7-hydroxyéfavirenz. Cette observation a montré que dans le cas d'une perturbation de l'activité de l'isozyme CYP2B6, le catabolisme de l'EFV est repris par le CYP2A6 et l'UGT2B7 qui le transforment respectivement en 7-hydroxyéfavirenz et N-glucuronide-éfavirenz (di Iulio, Fayet et al. 2009). Les changements de l'activité enzymatique de CYP2B6 semblent avoir moins d'effets sur la concentration en NVP que sur

celui de l'EFV car la NVP est moins exclusivement métabolisée par le CYP2B6 (Haas, Gebretsadik et al. 2009).

Allèle <i>CYP2B6</i>	SNP <i>CYP2B6</i>	Effet sur les INNTI EFV & NVP
*11	136A>G	Augmentation des concentrations plasmatiques en EFV (Rotger, Tegude et al. 2007).
*6, *26, *29	c.516G>T	Variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques et intracellulaires (Rotger, Saumoy et al. 2007; Mahungu, Smith et al. 2009; Elens, Vandercam et al. 2010). Association à des concentrations plasmatiques élevées en EFV et à une augmentation du risque de développer des effets secondaires neurotoxiques (Gatanaga, Hayashida et al. 2007; Rakhmanina and van den Anker 2010).
*27, *29	c.593T>C	Taux plasmatique élevé en EFV (Rotger, Saumoy et al. 2007; Rotger, Tegude et al. 2007).
*4	c.785A>G	Augmentation de l'activité hydroxylase et du taux de 8-hydroxyéfavirenz (Ariyoshi, Ohara et al. 2011).
*16, *18	c.983T>C	Concentrations plasmatiques élevées (Wang, Sonnerborg et al. 2006; Wyen, Hendra et al. 2008).
*28	c.1132C>T	Augmentation de l'AUC en présence d'un deuxième allèle non fonctionnel ou à fonction réduite (Rotger, Tegude et al. 2007).
	g.18492T>C	Diminution des concentrations plasmatiques (Chantarangsu, Cressey et al. 2009; Sukasem, Cressey et al. 2012).
	g.21563C>T	Augmentation du taux plasmatique (Chantarangsu, Cressey et al. 2009; Sukasem, Cressey et al. 2012).

**Tableau 3.** Liste des variations génétiques du *CYP2B6* qui influencent les concentrations plasmatiques et intracellulaires des INNTI EFV et NVP.

Le polymorphisme 516G>T de l'exon 4 du cytochrome *CYP2B6* est un des SNP les plus importants du métabolisme des INNTI EFV et NVP. En effet, plusieurs études ont pu déterminer une association du SNP avec une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques et intracellulaires en EFV et NVP (Rotger, Colombo et al. 2005; Penzak, Kabuye et al. 2007; Saitoh, Fletcher et al. 2007; Mahungu, Smith et al. 2009; Puthanakit, Tanpaiboon et al. 2009; Elens, Vandercam et al. 2010). Le SNP 516G>T provoque la substitution de l'acide aminé glutamine (Gln) de nature neutre par l'acide aminé histidine (His) qui est basique. La glutamine de la position 172 se trouve entre les sites de

reconnaissance des substrats SRS-1 et SRS-2. Le changement Gln172His ne semble donc pas altérer la spécificité de substrats de l'isozyme CYP2B6 (Ariyoshi, Miyazaki et al. 2001). L'activité spécifique de ces enzymes n'est pas non plus modifiée ce qui montre que la substitution de l'acide aminé glutamine n'a pas de conséquence majeure sur la fonction enzymatique. En revanche, le polymorphisme *CYP2B6* 516G>T induit un épissage aberrant qui clive la région allant de l'exon 4 à l'exon 6 des ARN messagers du *CYP2B6*. Cette altération a évidemment un impact sur le nombre d'ARN messagers fonctionnels, ce qui réduit la quantité de protéines et l'activité enzymatique (Hofmann, Blievernicht et al. 2008). Le SNP 516G>T est en déséquilibre de liaison avec plusieurs SNP et a été assigné aux allèles \*6 (516G>T, 785A>G), \*7 (516G>T, 785A>G, 1459C>T), \*9 (516G>T), \*13 (415A>G, 516G>T, 785A>G), \*19 (516G>T, 785A>G, 1006C>T), \*20 (503C>T, 516G>T, 785A>G), \*26 (499C>G, 516G>T, 785A>G) et \*29 (*CYP2B7/CYP2B6* hybride). Alors que l'allèle \*9 est plutôt rare (fréquence de moins de 1%) dans la plupart des ethnies, l'allèle \*6 est bien représenté au sein de différentes populations et sa fréquence est hautement variable. La prévalence de cet allèle est de 16% chez les Coréens et peut atteindre une valeur de 60% chez les Papouasie-Nouveau Guinéens. Des fréquences de 25% et 46% ont été déterminées respectivement chez les Caucasiens et les Africains (Klein, Lang et al. 2005; Rotger, Tegude et al. 2007). Seul le SNP 516G>T de l'allèle \*6 est responsable de la réduction de la fonction du *CYP2B6* (Hofmann, Blievernicht et al. 2008). Etant donné que l'EFV est quasi majoritairement métabolisé par le *CYP2B6*, plusieurs études pharmacogénétiques sur des patients infectés au VIH ont été réalisées qui ont pu montrer que l'allèle \*6 sous sa forme homozygote est associé à des concentrations plasmatiques élevées en EFV et à une augmentation du risque de développer des effets secondaires qui touchent le système nerveux central. En effet, la forme homozygote du SNP 516G>T a été associée à une concentration plasmatique en EFV élevée qui provoque une neurotoxicité (Rakhmanina and van den Anker 2010). Rodriguez-Novoa *et al.* ont même proposé le polymorphisme 516G>T comme marqueur génétique qui permet de prédire le développement de troubles du système nerveux central chez les porteurs homozygotes (Rodriguez-Novoa, Barreiro et al. 2005). Rotger *et al.* n'ont pas identifié une corrélation entre le taux plasmatique d'EFV et la toxicité, mais ils décrivent une association entre les effets secondaires neuropsychiatriques et la concentration intracellulaire d'EFV qui reflète la concentration présente dans un autre compartiment cellulaire comme notamment le cerveau où l'EFV exerce ses effets toxiques (Rotger, Colombo et al. 2005). Gounden et ses collaborateurs ont trouvé une relation significative entre

les individus *CYP2B6* 516TT à faible métabolisme (« poor metabolizer »), la concentration plasmatique en EFV et une augmentation du nombre de troubles neuropsychiatriques que les patients ont reportés au cours de la première semaine de traitement (Gounden, van Niekerk et al. 2010). Une certaine tolérance du système nerveux central aux différents effets secondaires a été observée bien que le SNP 516G>T soit associé à une augmentation de la concentration plasmatique en EFV durant les 24 premières semaines de la thérapie antirétrovirale (Haas, Ribaudou et al. 2004). Au cours d'un traitement continu d'EFV administré pendant plus de trois ans, il a été montré qu'une concentration élevée en EFV est liée chez certains patients à des symptômes faibles mais persistants comme par exemple une augmentation du stress, de l'angoisse et de rêves inaccoutumés (Clifford, Evans et al. 2009). Une réduction de la dose d'EFV pour diminuer les effets secondaires a été proposée; une réduction de la dose d'EFV de 35% chez les Africains ayant le génotype *CYP2B6*\*6/\*6 permettrait d'obtenir une concentration plasmatique en EFV qui ne dépasse pas le taux thérapeutique (Nyakutira, Roshammar et al. 2008). Gatanaga et ses collaborateurs ont reporté que tous les Japonais ayant le SNP 516G>T sous sa forme homozygote présentent des concentrations plasmatique en EFV supérieures à 6000 ng/mL et que 71% d'entre eux ressentent des effets secondaires affectant le système nerveux central. Une réduction de la posologie habituelle d'EFV de 600mg par jour à une dose journalière de 400mg ou de 200mg chez ces patients a permis de rapprocher la concentration plasmatique d'EFV de son taux thérapeutique en améliorant les symptômes neuropsychiatriques tout en conservant une charge virale indétectable (Gatanaga, Hayashida et al. 2007).

Le SNP 785A>G de l'exon 5 du *CYP2B6* induit la substitution de la lysine 262 en arginine. Ce polymorphisme apparaît dans toutes les populations, à des fréquences allant de 20% à 60%. Il a été assigné aux allèles \*4 (qui correspond à la variante K262R seul), \*6 (516G>T, 785A>G), \*7 (516G>T, 785A>G, 1459C>T), \*13 (415A>G, 516G>T, 785A>G), \*16 (785A>G, 983T>C), \*19 (516G>T, 785A>G, 1006C>T) , \*20 (503C>T, 516G>T, 785A>G) et \*26 (499C>G, 516G>T, 785A>G). Dans la plupart des gens porteurs du SNP 785A>G, ce dernier est lié au polymorphisme 516G>T. Le SNP 785A>G seul de l'allèle \*4 est cependant plus rare et n'a pu être mis en évidence chez les Caucasiens et les Asiatiques qu'à une fréquence de 2% à 6%. De plus, cet allèle semble être absent chez les Africains et les Afro-Américains (Klein, Lang et al. 2005; Rotger, Tegude et al. 2007; Zanger, Klein et al. 2007). Hofman *et al.* ont montré que l'allèle \*4 n'influence pas l'expression du gène *CYP2B6* et présente même une légère augmentation de l'activité hydroxylase comparé à l'allèle

sauvage \*1 (Hofmann, Blievernicht et al. 2008). Un modèle pharmacocinétique de population basé sur des données *in vivo* a montré que l'allèle CYP2B6\*4 a une clairance du bupropion qui est 1.7 fois supérieure à celle de l'allèle \*1 (Kirchheiner, Klein et al. 2003). La même observation a été faite pour la transformation de l'EFV en 8-hydroxyéfavirenz (Ariyoshi, Ohara et al. 2011). Une incubation des protéines CYP2B6.1 et CYP2B6.4 avec l'EFV a révélé que la protéine CYP2B6.4 n'est plus inactivé par l'INNTI (Bumpus, Kent et al. 2006).

L'allèle *CYP2B6\*16* et l'allèle *CYP2B6\*18* sont constitués respectivement des polymorphismes 785A>G/983T>C et 983T>C. L'allèle \*16 a été déterminé chez des Tanzaniens à une fréquence de 6.9% (Wang, Sonnerborg et al. 2006). Une fréquence de l'allèle \*18 de 3.1% et de 2.9% a été calculée respectivement pour des Ghanéens et des Afro-Américains (Klein, Lang et al. 2005). Le SNP 983T>C de l'exon 7 semble toutefois être spécifique des populations africaines car il n'a pu être mis en évidence ni chez des Asiatiques ni chez des Caucasiens. La substitution de l'isoleucine 328 hydrophobe par une thréonine polaire et non chargé change l'hydrophobicité de la protéine. En outre, l'isoleucine de la position 328 qui se trouve dans une région hélicoïdale de l'isozyme est hautement conservée dans d'autres cytochromes P450. Cette mutation n'a pas d'effet sur l'activité enzymatique du CYP2B6 et ne réduit que faiblement la quantité en ARN messenger. La substitution I328T déstabilise en revanche la protéine CYP2B6 ce qui aboutit à un taux de dégradation qui est supérieur à la synthèse de l'isozyme expliquant l'augmentation de la concentration plasmatique en EFV. Le taux d'EFV est d'autant plus élevé si les SNP 983T>C et 516G>T sont liés (*CYP2B6\*6/\*18*) (Wang, Sonnerborg et al. 2006). Wyen *et al.* ont déterminé une association significative entre des concentrations élevées en EFV et NVP et les SNP *CYP2B6* 983TC et *CYP2B6* 983TT (Wyen, Hendra et al. 2008).

Le polymorphisme C>T à la position 1459 de l'exon 9 du gène *CYP2B6* présente aussi une variabilité interethnique importante. Alors que ce SNP n'a pas été détecté chez des populations coréennes et taiwanaises et n'est que faiblement représenté chez les Japonais (2.9%) et les Ghanéens (2.9%), la fréquence chez les Afro-Américains et les Caucasiens atteint 10% (Klein, Lang et al. 2005). Les allèles \*5 (1459C>T) et \*7 (516G>T, 785A>G, 1459C>T) ont été assignés à la variante CYP2B6 R487C. Le SNP à la position 1459 est cependant triallélique. Jamshidi et ses collègues ont détecté chez un Ougandais que la déoxycytosine de la position 1459 est substituée en déoxyadénosine ce qui résulte dans la variante CYP2B6 R487S. La fréquence de ce polymorphisme est 0.7% (Jamshidi, Moreton et al. 2010). Le SNP 1459C>T réduit l'expression de l'isozyme CYP2B6. Le taux protéinique



était huit fois inférieur entre les porteurs homozygotes du SNP 1459TT et les individus à génotype sauvage. Par conséquent, l'activité enzymatique des individus homozygotes et hétérozygotes était inférieure à celle des personnes n'ayant pas ce polymorphisme, bien que cette différence soit moins prononcée que celle de l'expression protéinique (Lang, Klein et al. 2001). Malgré que la variante CYP2B6.5 ne soit que faiblement exprimée, aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence sur le métabolisme ou la clairance des INNTI EFV et NVP (Wyen, Hendra et al. 2008). Suite au catabolisme normal d'EFV des microsomes humains de porteurs *CYP2B6*\*5/\*5, Desta *et al.* ont proposé une augmentation de l'activité spécifique de la variante envers les médicaments (Desta, Saussele et al. 2007).

Le SNP 593T>C de l'exon 4 du *CYP2B6* induit la substitution de la méthionine hydrophobe en thréonine polaire à la position 198. Le polymorphisme a été assigné aux allèles \*27 (593T>C) et \*29 (hybride CYP2B7/CYP2B6). Le SNP a été décrit chez des Africains et Afro-Américains ayant une concentration plasmatique en EFV très élevée et une fréquence de 0.6% a été calculée. L'expression de la variante CYP2B6.27 dans des cellules COS-1 était significativement plus faible que celle de la protéine sauvage CYP2B6.1. L'activité enzymatique était plus que 85% réduite par rapport à celle des isozymes CYP2B6.1 (Rotger, Tegude et al. 2007).

Le polymorphisme 136A>G de l'exon 1 a été décrit dans une population caucasienne à une fréquence de 0.6%. Le SNP, qui a été assigné à l'allèle \*11, induit la substitution de la méthionine en valine dans une région permettant d'ancrer le CYP2B6 dans la membrane du réticulum endoplasmique. Une expression inférieure à 20% de la variante CYP2B6.11 dans des cellules COS-1 a été observée (Lang, Klein et al. 2004). Des concentrations supra-optimales en EFV ont été mises en évidence chez des individus porteurs de l'allèle \*11 (Rotger, Tegude et al. 2007).

L'allèle *CYP2B6*\*28 est le seul allèle qui est constitué d'une mutation non-sens. Le SNP 1132C>T de l'exon 7 introduit un codon stop dans la séquence d'acides aminés à la position 387 résultant dans une protéine tronquée qui n'a pas le site de liaison de l'hème. La fréquence de cet allèle est rare (0.6%) et a été découvert chez des Africains et des Afro-Américains (Rotger, Tegude et al. 2007).

Des polymorphismes présents dans les introns et les régions flanquant le gène *CYP2B6* peuvent aussi influencer l'expression du gène et l'activité de l'isozyme. Le SNP -82T>C du promoteur par exemple modifie la boîte TATA et la transforme en un site de liaison d'un

activateur de la transcription. Le changement de la séquence TATA en CATA défavorise la liaison de la protéine TBP (« TATA box-binding protein ») tout en augmentant l'affinité de la protéine C/EBP (« CCAAT/enhancer-binding protein »). La liaison de ce facteur de transcription active un deuxième motif TATA (GATAAA) à la position -55 et stabilise la liaison de la protéine TBP et du complexe de la polymérase II. Le SNP -82T>C favorise donc la production de transcrits qui sont 20 paires de bases plus courts que les ARN messager provenant du gène *CYP2B6* sauvage. Par conséquent, le taux d'apoprotéine est 66% plus élevé chez les individus porteurs du polymorphisme et l'activité enzymatique est deux fois supérieure chez les individus *CYP2B6* -82TC comparé aux individus *CYP2B6* -82TT (Zukunft, Lang et al. 2005). La fréquence de l'allèle \*22 auquel est assigné le SNP -82T>C est 3.3% chez les Caucasiens, 1.1% chez les Afro-Américains et 1.2% chez les Ghanéens (Klein, Lang et al. 2005).

Le SNP *CYP2B6* g.21563C>T de l'intron 8 a été associé à des concentrations plasmatiques élevées en EFV et NVP. Le cas contraire a été observé pour le SNP *CYP2B6* g.18492T>C de l'intron 5. En plus, ce polymorphisme exerce un effet inverse sur l'activité enzymatique par rapport à d'autres SNP : alors que le SNP homozygote muté g.21563TT induit une augmentation du taux plasmatique en EFV ou NVP, les concentrations les plus élevées des deux INNTI ont été révélées chez les individus *CYP2B6* g.18492TT à génotype sauvage. Les deux polymorphismes sont situés dans des régions activatrices des introns, mais il est cependant peu probable qu'ils exercent un effet direct sur la fonction du gène. Leur contribution semble plutôt être indirecte par déséquilibre de liaison avec d'autres SNP fonctionnels du gène *CYP2B6* (Chantarangsu, Cressey et al. 2009; Carr, la Porte et al. 2010; Sukasem, Cressey et al. 2012).

#### **4. La République Démocratique du Rwanda**

Contrairement au continent Européen et Américain où l'ART était déjà accessible en 1996, le continent Africain a eu accès à une trithérapie à grande échelle vers les années 2003-2004 à travers des programmes nationaux de prise en charge du VIH. Le Rwanda est un petit pays situé en Afrique de l'est. Il est entouré par l'Uganda au nord, le Burundi au sud, la Tanzanie à l'est et la République Démocratique du Congo à l'ouest. Avec une population de plus de 11 millions d'habitants et une surface d'environ 26000 km<sup>2</sup>, le Rwanda est le pays africain le plus densément peuplé. Environ 83% de la population vivent dans les régions rurales. Le Rwanda était un des premiers pays africains à documenter des cas de SIDA en

1983. En 1984, les premiers systèmes de surveillance du VIH/SIDA ont été mis en place dans les hôpitaux et les centres de santé. En 1986, la prévalence du VIH dans les régions urbaines et rurales était respectivement 17.8% et 1.3%. Depuis lors, une diminution de la prévalence dans les régions urbaines et une légère croissance de la prévalence dans les régions rurales ont été observées au Rwanda (Kayirangwa, Hanson et al. 2006). En janvier 2004, le gouvernement du Rwanda a augmenté l'investissement du système de santé tout en agrandissant le nombre de personnel du secteur médical, le nombre d'infrastructures et les produits et services médicaux (Rich, Miller et al. 2012). Ainsi, le programme national ART s'est vite étendu de quatre cliniques ou centres de santé en 2002 à 328 en 2010 (Elul, Basinga et al. 2013). Selon le dernier « Country Progress Report » du Rwanda de 2011, la prévalence du VIH de la population générale âgée de 15 à 49 ans est de 3% et est restée stable ces dernières cinq années. La prévalence est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (3.7% contre 2.2%) et est supérieure dans les régions urbaines par rapport aux régions rurales (7.1% contre 2.3%). Les populations à risque du VIH sont les prostituées, les HRSH, les camionneurs et les prisonniers. Seule la prévalence du VIH des prostituées a pu être déterminée et vaut 50.8%. Le taux des relations sexuelles avec de multiples partenaires a diminué au cours des dernières années chez les hommes (5.1% reporté en 2005 et 3.9% reporté en 2010) tout en restant stable chez les femmes (0.6%). L'utilisation de préservatifs par les hommes (27.5%) et les femmes (28.9%) ayant plusieurs partenaires est cependant rare. Plus de 96000 individus infectés au VIH ont eu accès aux antirétroviraux en 2011 ce qui correspond à environ 91% de tous les Rwandais qui ont droit à la thérapie antirétrovirale. De nos jours, plus de la moitié de tous les ARV prescrits en Afrique Sub-Saharienne sont des antirétroviraux sous la forme de génériques. Les génériques ont permis de réduire les dépenses des gouvernements des pays en développement tout en diminuant de façon dramatique la morbidité et la mortalité de l'infection au VIH et du SIDA (Byakika-Tusiime, Chinn et al. 2008). Au Rwanda, comme dans de nombreux pays d'Afrique Sub-Saharienne suivant les recommandations de l'OMS, la thérapie antirétrovirale de première ligne a tout d'abord été constituée de deux INTI (ZDV, D4T ou 3TC) et d'un INNTI (EFV ou NVP). Les patients Rwandais sont traités par des combinaisons à dose fixe des génériques 3TC, D4T et NVP (Triviro 30), 3TC, ZDV et NVP (Duovir N), 3TC et D4T (Coviro) et 3TC et ZDV (Duovir). Les deux dernières combinaisons sont co-administrées avec l'EFV qui jusqu'alors n'était pas distribué sous forme de générique. Lowrance et ses collègues ont montré en 2009 que le programme ART mis à disposition au Rwanda donnait d'excellents résultats

immunologiques (Lowrance, Ndamage et al. 2009) et un faible taux de mortalité après 6 et 12 mois de traitement. De plus, la rétention des patients au traitement antirétroviral au cours des deux ans de suivi était élevée ce qui est un bon indicateur de la qualité du programme d'ART. Suite à un suivi et un soutien intense des patients infectés, les mêmes résultats ont pu être mis en évidence dans les régions rurales du Rwanda (Rich, Miller et al. 2012). Elul *et al.* ont déterminé une bonne adhérence des Rwandais après 6, 12 et 18 mois de traitement et ont reporté une importante suppression virale chez 83% des participants (Elul, Basinga et al. 2013). Van Griensven et ses collaborateurs ont cependant observé une importante toxicité des antirétroviraux D4T et NVP issue d'un traitement par la combinaison à dose fixe de ces génériques (van Griensven, Zachariah et al. 2010). Ainsi, les recommandations nationales émanant du Ministère de la Santé Rwandais ont été modifiées fin 2010 et une nouvelle première ligne de traitement (TDF+3TC+NVP) pour éliminer la toxicité liée au D4T a été introduite avec un régime existant déjà au Rwanda depuis 2006, la combinaison AZT+3TC+NVP. Le TDF a été ainsi associé à la NVP car cet INNTI se présentait sous forme de générique.

La stratégie de santé publique développée par l'OMS et appliquée au Rwanda n'envisage qu'un suivi biologique minimum par la mesure des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulant qui peut orienter les médecins sur la réponse aux ARV administrés. Dans ce suivi biologique, deux bilans majeurs font défaut, la mesure de la charge virale et l'évaluation de la résistance du virus au traitement administré au patient. Par ailleurs, les travaux de recherche se sont concentrés sur le VIH de sous-type B prévalent en Europe et en Amérique du Nord par rapport au sous-type A ou sous-type C prévalent en Afrique. Depuis 2009, un médecin infectiologue Rwandais, le Dr Jean-Claude Karasi a débuté une thèse au laboratoire de Rétrovirologie du CRP-Santé au Luxembourg avec le soutien financier du Ministère des Affaires Etrangères du Luxembourg. Le premier but de cette thèse était d'organiser une cohorte longitudinale de suivi de l'ART dans 8 formations sanitaires afin d'inclure des patients vivant en milieu urbain et en milieu rural. Cette cohorte de 840 patients a été suivie pendant une période de trois années avec le support technique de Lux-Development, l'agence de coopération luxembourgeoise, en parallèle d'un projet de coopération visant à la mise en place des techniques de génotypage du VIH-1 au Laboratoire National de Référence du Rwanda pour appuyer la surveillance épidémiologique de la résistance aux ARV dans le pays. Cette étude s'est organisée sur une période de 4 ans dans les formations sanitaires suivantes :

Dans la ville de Kigali :

Centre de santé de Gitega, centre de santé de Kacyru, centre de santé de Kimironko, centre de Santé de Kinyinya et la clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Kigali (CHUK).

Dans la province du Nord :

Hôpital de District de Rutongo, hôpital de District de Rwamagana, hôpital de District de Musanze (Ruhengeri).

Dans la province de l'Est :

Hôpital de District de Rwamagana

Au cours de cette étude, le profil phylogénétique des souches de VIH circulant au Rwanda, la réponse immunologique et virologique ainsi que l'apparition et l'évolution des résistances primaires et secondaires aux ARV utilisés dans le pays ont été évaluées. Il a ainsi été observé que les deux régimes de première ligne (TDF+3TC+NVP et AZT+3TC+NVP) offraient une forte réponse virologique comparable. Cependant, chez les patients ayant une charge virale supérieure à 100 000 copies/mL à l'initiation du traitement, le groupe traité au régime comprenant le TDF montrait une plus faible réponse virologique que le groupe traité par le régime basé sur l'AZT (44% de suppression virologique versus 56%,  $p= 0,001$ ). Les résultats de ces études ont permis l'élaboration du futur plan stratégique santé pour la lutte contre le VIH/SIDA du Rwanda de 2011 à 2016 par le Ministère de la Santé rwandais.

C'est dans ce contexte de recherche sur l'efficacité des traitements ARV au Rwanda et d'un projet de transfert de technologie et de formation par le Laboratoire de Rétrovirologie en partenariat avec Lux-Development que notre projet de thèse a été initié. Ce projet a été accepté par la Comité National de Lutte contre le SIDA, il a reçu l'accord du comité national d'éthique rwandais et a bénéficié du soutien technique de Lux-Development, des infirmières des centres de santé et des techniciens du Laboratoire National de Référence à Kigali.

## **II. Objectifs de Recherche**

Le but de ce travail de thèse est l'étude des variations génétiques du cytochrome P450 *2B6* et leur effet sur le catabolisme des INNTI éfavirenz (EFV) et névirapine (NVP) chez des individus rwandais infectés par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

La première partie de notre travail a été consacrée à la découverte et la caractérisation *in vitro* de nouveaux polymorphismes ponctuels (« single nucleotide polymorphism », SNP) du gène *CYP2B6* chez des individus du Rwanda car le gène *CYP2B6* est hautement polymorphe entraînant des variabilités interindividuelles et même interethniques du métabolisme des substances exogènes. A l'initiation de ce projet, la majorité des variations génétiques avaient été décrites chez des populations caucasiennes ou afro-américaines et peu d'études avait été menées dans des populations africaines. Nous avons ainsi réalisé un séquençage des neuf exons et des jonctions intron exon du gène *CYP2B6* chez 39 individus d'une première cohorte de PMTCT (« prevention of mother-to-child HIV-1 transmission ») rwandaise, ce qui nous a permis d'identifier cinq nouveaux allèles et huit SNP faux-sens dont trois n'avaient jamais été décrits. Leur effet sur l'expression et la fonction enzymatique a été caractérisé *in vitro* par recombinaison des huit variantes *CYP2B6* dans des cellules COS-1 et par quantification des métabolites des substrats bupropione et EFV.

Ces études ont révélé quatre SNP induisant une perte de la fonctionnalité de *CYP2B6* *in vitro* et quatre n'ayant aucun effet. Les résultats obtenus *in vitro* ont ensuite servi à vérifier la capacité prédictive de huit programmes informatiques qui utilisent différents algorithmes pour prédire la fonction de l'enzyme après un changement de sa séquence en acides aminés. Pour compléter ces prédictions, avec l'interaction du substrat avec le site actif de l'enzyme et la structure tertiaire du *CYP2B6* qui n'est pas considérée dans les algorithmes, des modèles de liaison du substrat à son site actif (« docking ») et des simulations de dynamique moléculaire à long terme ont été réalisés pour la modification de chaque acide aminé. Ces analyses ont suggéré de fortes modifications de la structure tertiaire du *CYP2B6* et une perte de la stabilité du complexe substrat-protéine pour les SNP entraînant une perte de fonction de l'enzyme.

La deuxième partie de notre travail a consisté à analyser l'impact du génotype *CYP2B6* *in vivo* sur le métabolisme des INNTI EFV et NVP en étudiant les variations interindividuelles de leurs concentrations plasmatiques. Le gène *CYP2B6* de 806 patients rwandais sous traitement antirétroviral a été génotypé afin de pouvoir déterminer la fréquence et le rôle des huit nouveaux SNP et de 22 autres polymorphismes ayant un impact majeur sur l'expression et l'activité de l'isozyme *CYP2B6* ou étant décrits chez d'autres populations

africaines. En outre, les métabolites 7-hydroxy-, 8-hydroxy-, 8,14-dihydroxyéfavirenz et 2-hydroxy-, 3-hydroxynévirapine ont été quantifiés pour élucider si une voie métabolique alternative (CYP2A6, CYP3A4) était favorisée en cas de déficience partielle ou complète de la fonction du CYP2B6. Nous avons confirmé des SNP et des allèles du *CYP2B6* qui sont associés à une forte concentration du taux plasmatique des deux INNTI et de leurs métabolites et identifié un nouvel allèle qui a été significativement associé à de faibles concentrations en EFV et NVP. Chez les individus présentant une déficience de l'activité de CYP2B6, les concentrations des métabolites hydroxylés n'ont pas révélé de compensation par d'autres voies métaboliques. Une analyse multivariée des différents génotypes de *CYP2B6* a montré que certains SNP ou haplotypes pourraient par la suite servir comme marqueurs génétiques afin de prédire les concentrations plasmatiques de l'EFV mais pas de la NVP chez les individus Rwandais.



## **III. Résultats**

# 1. Nouvelles variantes de l'enzyme CYP2B6 dans une population rwandaise: caractérisation fonctionnelle et valorisation d'outils de prédiction *in silico*

## 1.1. Introduction

Le cytochrome P450 CYP2B6 est une enzyme hautement polymorphe qui intervient dans la bioactivation et le métabolisme de plusieurs xénobiotiques environnementaux (comme les pesticides, les insecticides) et d'un grand nombre de médicaments. Les substances qui sont majoritairement inactivées par le CYP2B6 sont le cyclophosphamide, l'artémisinine, le bupropione, le propofol, l'éfavirenz (EFV) et la névirapine (NVP). Une grande variabilité interindividuelle du *CYP2B6* a été décrite, elle est entre autres due à de nombreux polymorphismes génétiques. Certains allèles ont été associés à des concentrations plasmatiques en EFV supra-optimales aboutissant à une augmentation de la toxicité neuropsychiatrique et de l'interruption du traitement. La caractérisation *in vitro* de l'effet de tout nouveau SNP est laborieuse. La prédiction *in silico* de la fonction enzymatique de chaque nouvelle variante CYP2B6 peut être une alternative intéressante.

Dans cette étude, nous avons séquencé le gène *CYP2B6* de 39 individus rwandais et nous avons découvert huit SNP faux-sens non-caractérisés auparavant dont trois n'ont jamais été décrits. Leur effet sur l'activité enzymatique a été déterminé *in vitro* par expression dans des cellules COS-1 et par hydroxylation des substances bupropione et EFV. Ces résultats ont été utilisés pour déterminer le potentiel prédictif de huit algorithmes librement accessibles sur le net. De plus, des modèles de la structure tertiaire du CYP2B6 et de la liaison entre chaque substrat et l'isozyme ont été réalisés pour comprendre l'impact de chaque variante.

## 1.2. Résultats

En séquençant les neuf exons et les jonctions intron exon du *CYP2B6* de 39 individus du Rwanda, trois nouveaux polymorphismes [c.548T>G (p.V183G), c.637T>C (p.F213L), c.758G>A (p.R253H)] et cinq SNP dont la fonction n'a pas été décrite jusque-là [c.329G>T (p.G110V), c.341T>C (p.I114T), c.444G>T (p.E148D), c.835G>C (p.A279P), c.1459C>A (p.R487S)] ont été découverts par alignement de séquences et assignés aux cinq nouveaux allèles *CYP2B6*\*33 – *CYP2B6*\*37. La transfection de cellules COS-1 par chacune des variantes a montré une réduction maximale de 80% de leur expression sauf pour la variante I114T pour qui une croissance de 70% de l'expression a été révélée. La détermination de l'activité enzymatique par quantification des métabolites 4-hydroxybupropione et 8-

hydroxyfavirenz a montré que les variantes 148D, 253H, 279P et 487S sont fonctionnelles tandis que la variante 213L a une activité réduite et les variantes 110V, 114T et 183G sont non-fonctionnelles. Aucun des outils de prédiction SIFT Human Protein, SNAP, SNPs&GO, PhD-SNP qui sont basés sur l'alignement des séquences d'acides aminés et PolyPhen2, SNPs3D, nsSNPAnalyzer, MutPred qui en plus prennent en compte la structure tertiaire des protéines, n'a pas pu prédire correctement la fonction de toutes les variantes. Entre 60% à 80% des prédictions étaient correctes. Pour mieux comprendre l'effet de chaque substitution de l'acide aminé sur la structure et la fonction de la protéine, des simulations de liaison des substrats bupropione et EFV ont été réalisées. Alors que les substrats gardent la même probabilité de se lier au site actif de l'enzyme, les variantes G110V, I114T, E148D, V183G et F213L présentent des énergies d'interactions plus importantes pour chaque substrat comparé à l'enzyme sauvage, ce qui suggère une diminution de la stabilité du complexe substrat-CYP2B6. Les quatre variantes délétères G110V, I114T, V183G et F213L induisent des changements de conformation identiques de la structure tertiaire de CYP2B6 autour du site actif de l'enzyme, ce qui peut expliquer la perte de la fonction enzymatique.

### **1.3. Conclusions**

Notre étude a identifié cinq nouveaux allèles dans la population rwandaise et quatre nouvelles variantes de CYP2B6 affectant l'activité de l'isozyme *in vitro*. Certains programmes de prédiction peuvent être utiles pour déterminer l'effet de SNP non caractérisés, mais leur efficacité n'est pas satisfaisante dans tous les cas. L'identification de nouveaux SNP faux-sens du *CYP2B6* qui sont assignés à des allèles codant pour des enzymes à activité réduite est extrêmement importante pour la thérapie anti-VIH au Rwanda - étant donné que ces allèles sont associés à une altération du métabolisme d'EFV et à des effets secondaires non négligeables -, mais également en vue d'un traitement antirétroviral personnalisé.

### **1.4. Publication**

Article publié dans *Human Mutation*, mai 2013; 34(5): 725-734

# Novel CYP2B6 Enzyme Variants in a Rwandese Population: Functional Characterization and Assessment of In Silico Prediction Tools

Robert Radloff,<sup>1†</sup> Alain Gras,<sup>2†</sup> Ulrich M. Zanger,<sup>1</sup> Cécile Masquelier,<sup>2</sup> Karthik Arumugam,<sup>2</sup> Jean-Claude Karasi,<sup>3</sup> Vic Arendt,<sup>4</sup> Carole Seguin-Devaux,<sup>2</sup> and Kathrin Klein<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, and University of Tuebingen, Tuebingen, Germany; <sup>2</sup>Laboratory of Retrovirology, CRP- Santé, Luxembourg, Luxembourg; <sup>3</sup>Rwandese Biomedical Center at Kigali, Rwanda; <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg, Luxembourg

Communicated by Daniel W. Nebert

Received 26 September 2012; accepted revised manuscript 5 February 2013.

Published online 15 February 2013 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22295

**ABSTRACT:** Cytochrome P450 CYP2B6 is a highly polymorphic enzyme that metabolizes numerous drugs, pesticides, and environmental toxins. Sequence analysis of a Rwandese population identified eight functionally uncharacterized nonsynonymous variants c.329G>T (p.G110V), c.341T>C (p.I114T), c.444G>T (p.E148D), c.548T>G (p.V183G), c.637T>C (p.F213L), c.758G>A (p.R253H), c.835G>C (p.A279P), and c.1459C>A (p.R487S), and five novel alleles termed CYP2B6\*33 to CYP2B6\*37 were assigned. Recombinant expression in COS-1 cells and functional characterization using the antidepressant bupropion and the antiretroviral efavirenz (EFV) as substrates demonstrated complete or almost complete loss-of-function for variants p.G110V, p.I114T, p.V183G, and p.F213L, whereas p.E148D, p.R253H, p.A279P, and p.R487S variants were functional. The data were used to assess the predictive power of eight online available functional prediction programs for amino-acid changes. Although none of the programs correctly predicted the functionality of all variants, substrate docking simulation analyses indicated similar conformational changes by all four deleterious mutations within the enzyme's active site, thus explaining lack of enzymatic function for both substrates. Because low-activity alleles of CYP2B6 are associated with impaired EFV metabolism and adverse drug response, these results are of potential utility for personalized treatment strategies in HIV/AIDS therapy.

Hum Mutat 00:1–10, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** cytochrome P450; CYP2B6; efavirenz; docking; molecular dynamics

## Introduction

Among the human drug metabolizing cytochrome P450s (CYP), CYP2B6 (MIM #123930) is one of the minor forms in human liver, constituting approximately about 1%–5% of the total hepatic microsomal P450 pool but exhibiting approximately 300-fold variability of expression (Gervot et al. 1999; Lang et al. 2001; Zanger et al. 2007; Hofmann et al. 2008; Ohtsuki et al. 2012). Nevertheless there is an increasing number of clinically relevant CYP2B6 drug substrates, which may either be bioactivated or inactivated (Turpeinen et al. 2006; Wang and Tompkins 2008). Substrates with a predominant participation of this enzyme for oxidative metabolism include cyclophosphamide, artemisinin, bupropion (Faucette et al. 2000), propofol, efavirenz (EFV) (Ward et al. 2003) and nevirapine. Furthermore, CYP2B6 plays a major role in the bioactivation or metabolism of many environmental xenobiotics such as pesticides and insecticides (e.g., chlorpyrifos, carbaryl, DEET) (Foxenberg et al. 2007; Hodgson and Rose 2007; Crane et al. 2012).

The large interindividual variability of CYP2B6 is mainly due to inducible regulation of gene expression by ligand-dependent nuclear receptors CAR and PXR, as well as extensive genetic polymorphism (Zanger et al. 2007). Of 29 major haplotypes listed at the CYPallele Website (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm>), at least 16 alleles have been described with proven effects on activity (Desta et al. 2007; Zanger et al. 2007; Watanabe et al. 2010). In particular, the common \*6 allele harboring two nonsynonymous SNPs (c.516G>T/p.Q172H, c.785G>A/p.K262R) with a frequency of 20%–31% in Caucasian populations and up to 60% in African and other populations has been consistently associated with higher plasma EFV concentrations in clinical studies and increased incidence of EFV-associated neuropsychological toxicity and treatment discontinuation was reported in these patients (Haas et al. 2004; Tsuchiya et al. 2004; Rotger et al. 2007; Telenti and Zanger 2008; Wyen et al. 2011). In contrast, subtherapeutic EFV concentrations were found in 20% of subjects with wild-type (WT) genotype (Rodriguez-Novoa et al. 2005). Importantly, not only homozygosity for \*6 allele, but also compound heterozygosity for the \*6 and a second low-activity allele predicts high EFV plasma levels (Rotger et al. 2007; Ribaudo et al. 2010). CYP2B6 genotype-based dose reduction of EFV was recently successfully applied in a clinical setting and the majority of patients exhibited improved central nervous system-related symptoms while suppressive antiretroviral therapy was maintained, emphasizing the potential of CYP2B6 pharmacogenetics for clinical applications (Gatanaga et al. 2007).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

†These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Kathrin Klein, Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology Stuttgart and University Tuebingen, Auerbachstr 112, D-70376 Stuttgart, Germany. E-mail: kathrin.klein@ikp-stuttgart.de

Contract grant sponsors: Luxembourg Fonds National de la Recherche (FNR grant TR-PHD BFR08/072); the German Federal Ministry of Education and Research (Virtual Liver Network grant 0315755); the Robert Bosch Foundation, Stuttgart, Germany.

Despite the discovery of numerous functional polymorphisms, prediction of CYP2B6 function in a patient is still challenging, particularly in less well-characterized ethnicities. Among the major human races, Africans show the highest genetic diversity (Tishkoff et al. 2009). This is also becoming apparent in the 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/home>), where African populations contribute the largest numbers of new variants, and have the largest proportions of rare variants (Raska and Zhu 2011). Although these new variants may have a significant impact on drug treatment they pose a great challenge, as the experimental characterization of newly discovered SNPs is very labor and cost intensive. In silico prediction of the functional effects of amino-acid changes provides an alternative approach, but software tools differ greatly in algorithms and performance (Thusberg et al. 2011) and their application to specific protein or enzyme classes such as drug transporters and P450 enzymes may be challenging. Recently, the structures of several mammalian P450 enzymes have become available including CYP2B6 (Zhao and Halpert 2007; Gay et al. 2010), which may help to improve the performance of the in silico prediction tools. However, direct comparisons between different tools and functional verification are rare, especially for P450s (Wang et al. 2009; Zou et al. 2011).

In this study, we sequenced CYP2B6 in a prevention of mother-to-child transmission cohort from Rwanda and we identified eight novel and/or uncharacterized nonsynonymous SNPs. Using the sequencing data, new alleles could be assigned (\*33 to \*37), carrying undescribed SNP combinations (\*36) or at least one new amino-acid change (\*33, \*34, \*35, \*37). For experimental analysis, new amino-acid variants were recombinantly expressed and functionally characterized using Western blot as well as bupropion and EFV hydroxylation activities. We performed phenotype prediction with a selection of eight different algorithms, revealing differences and similarities in their performance. Additional structural CYP2B6 information as well as ligand binding modeling for both experimental substrates was used to further understand the functional impact of specific variants and to enhance prediction. These findings should be of relevance for the treatment with antiretroviral drugs, especially in Africans, which represent the majority of the HIV-infected population worldwide.

## Materials and Methods

### Study Population

From a Rwandese-cohort for prevention of mother-to-child HIV-1 transmission (Masquelier et al. 2007), 39 DNA samples were selected for this study. Approval of the National Ethics Committee of Rwanda was obtained and each mother signed an informed consent. Four related samples (mother/child) were present in the sample set (see Supp. Table S1).

### Sequencing

The nine exons of CYP2B6 were amplified with the primers located in adjacent introns as described by (Lang et al. 2001) using the following PCR mastermix: 1× PCR Buffer, 1.5–2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μM of each primer, and 1U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Life Technologies Europe BV, Belgium). The amplification program consisted of three

parts: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 0.5 min, annealing at 50–60°C for 0.5 min, and extension at 68°C for 1–3.83 min, and a final elongation step at 68°C for 10 min. The size of each amplicon was verified on a 2% agarose gel and by sequencing on an ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer using the BigDye terminator cycle-sequencing chemistry v3.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described (Lang et al. 2001). The sequences were aligned against the CYP2B6 reference sequence AC023172 and analyzed with the Applied Biosystems SeqScape Software v2.7. Resolved adjacent intronic sequences spanned at least 150 bp up to 1,330 bp, complete introns 2, 5, 7, and about 200 bp each of 5'/3' UTR.

### Mutagenesis

CYP2B6 reference cDNA inserted in pCMV4 (pIKAT15) was used as target for site directed mutagenesis using QuickChange Lightning Kit (Agilent, Waldbronn, Germany) and the primers listed in Supp. Table S2. cDNA nucleotide positions were given relative to A of the translation start site (reference sequence NM.000767.4) and nucleotide changes as reference nucleotide > variant nucleotide. The mutant cDNA sequences were generated as single site variants. Plasmids were propagated in *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and the whole CYP2B6 cDNA sequence was confirmed (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany) using primer pairs previously described (Lang et al. 2004) or listed in Supp. Table S2. All new variant cDNAs as well as cDNAs of WT (\*1), \*6 (516T, 785G), and \*5 (1459T) alleles were cloned into pcDNA3 vector (Invitrogen).

### SNP linkage

Confirmation of SNP linkage within exons 2 and 3 was performed by cloning a 1.3 kB sized PCR fragment starting from genomic DNA of sample GLC269 (Figure 1, Supp. Table S1). Primers CYP2B6–2F and CYP2B6–3R described in Lang et al. (2001) have been used for amplification. Amplicons were ligated into the pGEM®-T Easy Vector System (Promega Benelux BV, Leiden, The Netherlands) and transformed into JM109 Competent Cells. Sequencing of 46 resulting clones was performed using seqCYP2B6–2F, -2R, -3F, and -3R primers (Lang et al. 2001). Novel exonic nucleotide changes were submitted to dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) and ss# identifiers are included in Figure 1 and Supp. Table S1. Deduced novel alleles were accepted and numbered from CYPallele nomenclature committee (Figure 2) and submitted on their homepage (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm>).

### Recombinant Expression and Western Blot Analysis

Variant proteins were transiently expressed in COS-1 cells. Transfection efficiency was controlled by cotransfection of β-galactosidase carrying pCMV vector and quantification of activity using luminescence based assay basically as described in Lang et al. (2004). Cells were transfected in T75 cell culture flasks using turbofect reagent (Fermentas, St Leon-Rot, Germany). Cells were harvested 48 hr after transfection and microsomal fractions were prepared by differential centrifugation. Protein concentration was determined using the BioRad Protein Assay (BioRad, Munich, Germany) and

dbSNP	rs34223104	rs35303484	rs142657251	rs149403002	rs186335453	rs139801276	rs145884402	rs138652715	rs3745274	<b>ss539003292</b>	rs36079186	ss539003293	<b>ss539003294</b>	<b>ss539003295</b>	rs2279343	rs139029625	ss539003296		
Genomic position <sup>b</sup>	-82	136	12725	12788	12853	12998	13101	13122	15631	<b>15663</b>	15708	15716	<b>15752</b>	<b>18026</b>	18053	18701	25505		
eSNP <sup>a</sup>	-82 T>C	136 A>G	201 G>A	264 T>G	329 G>T	341 T>C	444 G>T	465 G>A	516 G>T	<b>548</b> T>G	593 T>C	601 T>C	<b>637</b> T>C	<b>758</b> G>A	785 A>G	835 G>C	1459 C>A		
Location	5'	ex1	ex2	ex2	ex2	ex3	ex3	ex3	ex4	<b>ex4</b>	ex4	ex4	<b>ex4</b>	<b>ex5</b>	ex5	ex6	ex9		
Amino acid change <sup>c</sup>		M46V	T67	L88	G110V	I114T <sup>d</sup>	E148D <sup>d</sup>	E155	Q172H	<b>V183G</b>	M198T	L201	<b>F213L</b>	<b>R253H</b>	K262R	A279P	R487S <sup>e</sup>		
Cypallele	*22	*11A	*35	*35	*35	*35	*35	*35	*6, *9, *34, *37	*37	*27, *35	n.d.	n.d.	n.d.	*6, *34, *37	*35	*33, *34	proposed genotype	
KLM164	al1																		*33
	al2																		*33
KLC675	al1																		*33
	al2																		*34
KLC286	al1																		*35
	al2																		*37
KLM684	al1																		*35
	al2																		*36
KLC264 GLC269	al1																		*35
	al2																		*1
KLM688																			SNP allocation unclear
KLM178																			SNP allocation unclear

**Figure 1.** DNA variants, allelic composition, and deduced genotypes of eight samples with new amino-acid variants. Variant positions are shown in grey: silent mutations, light grey; amino-acid changes, dark grey; proposed genotypes are based on complete sequence analysis of all exons and position -82 (*CYP2B6*\*22). <sup>a</sup>cDNA nucleotide position relative to ATG of the reference sequence NM\_000767.4 (reference nucleotide>variant nucleotide); newly characterized SNPs found in this study are highlighted in grey, novel SNPs are marked in bold; <sup>b</sup>genomic nucleotide position relative to ATG of the reference sequence AC023172.1; <sup>c</sup>reference residue (position, variant amino acid) according to NP\_000758.1/P20813; <sup>d</sup>variant described in Zimbabwean (Jamshidi et al., 2010); <sup>e</sup>variant described in Ugandan (Jamshidi et al., 2010); n.d., not defined.

BSA as a standard. Equal protein amounts (10 µg) were analyzed on a 10% SDS-PAGE, immunoblotted, and expressed CYP2B6 protein was quantified using anti CYP2B6 mab2B6 (BD Gentest, Heidelberg, Germany) and lymphoblast expressed standard protein dilutions on each blot as previously described (Lang et al. 2004).

### Measurement of Enzyme Activities

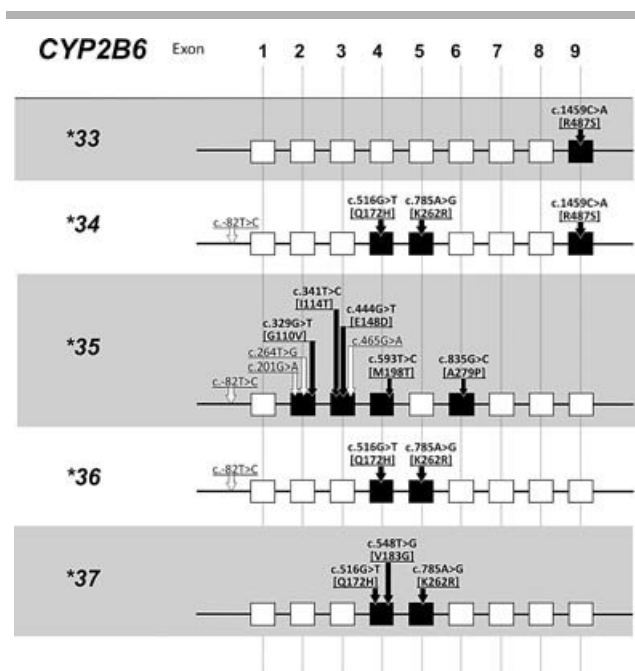
Bupropion hydroxylation activity was determined using 1 mM bupropion and 15 µg microsomal protein in a 50 µl total assay volume as described in Richter et al. (2004). Kinetic parameters of bupropion hydroxylation were determined in a concentration range from 5 µM up to 1.5 mM bupropion as described in Lang et al. (2004). Efavirenz-8-hydroxylation was determined from 0.1 µM up to 200 µM EFV (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) with 10 µg of microsomal protein in a total volume of 90 µl. EFV dilutions in incubation buffer (0.1 M sodiumphosphate buffer pH7.4) were always prepared freshly from the stock solution (10 mg/ml methanol). The reaction was started by the addition of 10 µl NADPH regenerating system (consisting of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM glucose-6-phosphate, 5 mM NADP<sup>+</sup>, 40 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7.4) and incubated for 20 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 20 µl 250 mM formic acid and 110 µl acetonitrile containing the internal standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-8-hydroxyefavirenz (Toronto Research Chemicals). 8-Hydroxyefavirenz formation was quanti-

fied by negative electrospray LC-MS-MS analysis with an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) coupled to an Agilent 1200 HPLC system. HPLC and mass spectrometer conditions are detailed in the Supp. Methods. Calibration curves based on internal standard calibration were obtained by weighted (1/x) linear regression for the peak-area ratio of 8-hydroxyefavirenz to the internal standard against the amount of the analyte. The concentration of 8-hydroxyefavirenz in unknown samples was obtained from the regression line.

Kinetic parameters ( $V_{max}$ ,  $K_M$ ) for bupropion-4-hydroxylation and EFV-8-hydroxylation were calculated using Graphpad Prism (V5.04; Graphpad Software Inc., La Jolla, CA). Specific activity was calculated relative to CYP2B6 apoprotein content determined by Western blot.

### In Silico Phenotype Prediction Tools

Phenotype prediction was performed with a selection of eight publicly available online tools using different algorithms, which were chosen because they had been evaluated previously with a large number of variants (Wang et al. 2009; Thusberg et al. 2011). Four methods use algorithms based on protein alignments (SIFT Human Protein, SNAP, SNPs&GO, and PhD-SNP), and the four others consider also 3D structural features (PolyPhen2, SNPs3D, nsSNPAnalyzer, and MutPred). CYP2B6 protein sequence information was derived from Uniprot entry P20813 (Bairoch and Apweiler 1997; <http://www.uniprot.org/uniprot/P20813>). All predictions were



**Figure 2.** Schematic representation of novel alleles. Boxes indicate exons; affected exons are shown black; amino-acid changes are marked with filled arrows, silent and 5' mutations are marked with open arrows; numbers indicate cDNA positions, amino-acid changes are depicted. Star-allele nomenclature assignment was obtained in agreement with the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

performed with default parameters unless otherwise mentioned. Scores and reliability parameters, if available, were regarded as discussion basis, but the overall interpretation of the phenotype prediction was determined by the tool itself. Prediction outcomes were categorized into two classes: loss or strongly impaired enzyme function (damaging substitution, D) or unimpaired function (neutral substitution, n). Some prediction tools also include prediction reliability measures (Supp. Table S3). Short descriptions of the tools and Web-links for accession are given in the Supp. Methods.

### Molecular Dynamics simulation on protein–ligand complex

To estimate positional impact of variant amino acids on substrate binding, molecular dynamic (MD) simulations were employed to dock DrugBank (Wishart et al. 2008) structures bupropion (DB01156) and EFV (DB00625) into available CYP2B6 crystal structure (PDB31BD) using CHARMM35 (Brooks et al. 1983) all-atom force field and AUTODOCK4.2 (Morris et al. 2009). The detailed procedure is described in the Supp. Methods. All amino-acid changes were introduced and binding energy was derived from docking analysis. The best protein–ligand complex conformations based on the lowest binding free energy were selected from the top ranked clusters of conformations. The concerted protein–ligand complex dynamics and the perennity of the essential motions along the MD trajectory were determined by means of the essential dynamics analysis method including secondary structure analysis, total and potential energy terms, and the backbone atom coordinates. Root mean square deviation from the initial coordinates was measured during the dynamics to control the stability of the proteins. The total interaction energy ( $E_{tot}$ ) between all active site residues of the CYP2B6 proteins and the bupropion and EFV ligands were calculated. Structure graphical views were generated with

the Visual Molecular Dynamics (VMD) graphical software support (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). VMD is developed with NIH support by the Theoretical and Computational Biophysics group at the Beckman Institute, University of Illinois at Urbana-Champaign.

## Results

### New CYP2B6 Variants and Haplotype Assignment

Complete exonic and adjacent intronic (at least 150 bp) sequences were determined from 39 samples. Six of these showed no exonic polymorphisms. The frequency of the \*6 allele was 28% in this group of selected samples, five samples were heterozygous for \*17 (6.4%), and three samples carried \*2B heterozygously (4%). Eight samples carried three novel amino-acid variants (V183G, F213L, and R253H) and five amino-acid variants, which had not been functionally characterized to date (G110V, I114T, E148D, R487S, and A279P; Figure 1 and Supp. Table S1). These variants occurred in different combinations, together with other known variants, or alone, which indicated the presence of novel haplotypes (Figs. 1 and 2).

Two samples from a mother (KLM164) and her child (KLC675) allowed unequivocal definition of two novel alleles \*33 and \*34: the known polymorphic position c.1459 in \*5 (C>T, p.R487C) was homozygously mutated to A (C>A, p.R487S) in both samples, thus representing a triallelic polymorphism. The single occurrence of this variant, coding for the new protein variant 487S, was termed \*33. Comparison of the mother/child couple allowed definition of a further allele \*34 present in sample KLC675, which comprised 1459A together with –82C, 516T, and 785A, resulting in a variant protein carrying 172H, 262R, and 487S (Fig. 1, Fig. 2). The resulting deduced genotypes of the two samples were thus \*33/\*33 (mother) and \*33/\*34 (child).

Using sequence information of four independent samples (KLC286, KLM684, KLC264, and GLC269) carrying the –82C (\*22) variant together with several mutations in exons 2/3/4/6, and both key mutations of the \*6 allele, further alleles could be defined: the simultaneous occurrence of nine heterozygous nucleotide changes (positions c.–82, c.201, c.264, c.329, c.341, c.444, c.465, c.593, and c.835) within these four independent samples strongly indicated the presence of a combination haplotype \*35, coding for a variant protein 2B6.35 carrying amino-acid changes G110V, I114T, E148D, M198T, and A279P (Figs. 1 and 2). DNA from sample GLC269 was used to confirm linkage of all SNPs in exons 2 and 3 (covering positions 201–465) by cloning PCR fragments spanning both exons. A total of 46 clones were sequenced in both directions and nearly 40% of clones carried all six exonic mutations, confirming the strong linkage in this region and the presence of \*35.

With respect to sample KLM684 with homozygous –82C, a new haplotype \*36, which combines known alleles \*22 and \*6, most plausibly explained the occurrence of all mutations in this sample (genotype \*35/\*36). Similarly, sample KLC286 most plausibly carries the \*35 allele and a tentative allele \*37, derived from the common \*6 harboring the novel amino-acid variant V183G. Another new variant 758G>A, resulting in the novel amino-acid change R253H, occurred heterozygously in sample KLM688 together with the heterozygous 516G>T (Q172H, \*9). Because \*9 is a rather rare variant, the most probable genotype would be a combination of \*9 with a novel, yet unnamed allele carrying only c.758G>A (p.R253H). Finally, the new non-synonymous SNP c.637T>C (p.F213L) occurred heterozygously together with the new silent c.601T>C and the key

**Table 1. Apparent Kinetic Characteristics of CYP2B6 Variants Expressed in COS-1 Cells**

Variant	Apoprotein % of 2B6.1	Bupropion				Efavirenz <sup>a</sup>			
		$K_M$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/[mg min]) (% of 2B6.1)	$V_{max}/K_M$ (% of 2B6.1)	Specific activity <sup>b</sup> (% of 2B6.1)	$K_M$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/[mg min]) (% of 2B6.1)	$V_{max}/K_M$ (% of 2B6.1)	Specific activity <sup>c</sup> (% of 2B6.1)
CYP2B6.1	100 <sup>d</sup>	87	134 (100)	100	100	2.07	18.3 (100)	100	100
CYP2B6.6	40	72	109 (81)	98	211	1.21	19.6 (107)	183	269
CYP2B6.5	22	65	59 (44)	59	215	1.15	8.5 (46)	83	213
G110V	64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I114T	171	>400	6.7 (35)	n.d.	n.d.	10	13.82	2.6 (14)	2.13
E148D	44	70	133 (99)	123	237	1.57	3.4 (19)	24	42
V183G	32	>400	n.d.	n.d.	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F213L	41	>400	n.d.	n.d.	38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
R253H	18	105	24 (18)	15	105	1.81	2.6 (14)	16	78
A279P	34	65	73 (54)	73	182	1.77	10.3 (56)	66	167
R487S	42	59	83 (62)	91	151	1.26	12.2 (70)	109	158

<sup>a</sup>Values derived from Michaelis–Menten kinetics from 0.1 to 50  $\mu$ M efavirenz.

<sup>b</sup>Specific activity calculated at 1 mM substrate concentration relative to the apoprotein determined by Western blotting (pmol/[min mg] apoprotein).

<sup>c</sup>Specific activity calculated from  $V_{max}$  relative to the apoprotein determined by Western blotting ( $V_{max}/mg$  apoprotein).

<sup>d</sup>100% apoprotein corresponds to 17.0 pmol/mg microsomal protein.

n.d., not detectable.

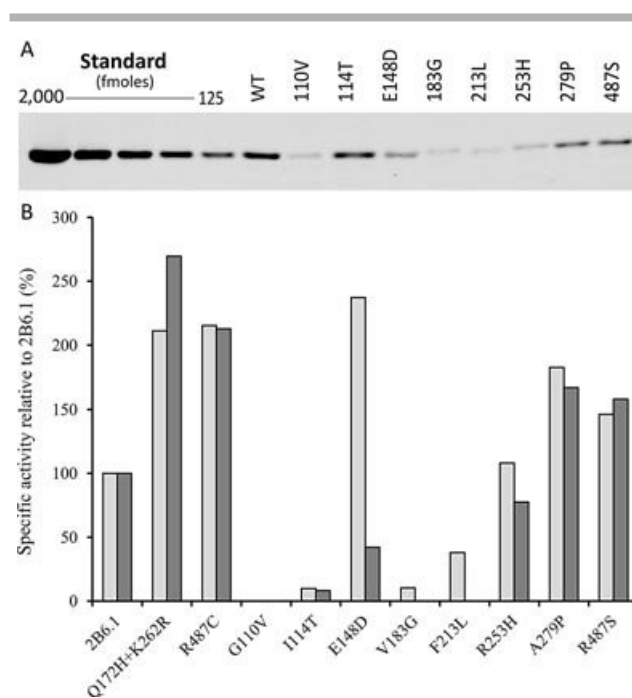
mutations of the \*11A and \*6 alleles, thus not allowing unambiguous haplotype assignment (Fig. 1).

### Recombinant Expression and Function of Novel CYP2B6 Variants

To analyze the impact of the mutations on CYP2B6 function, the individual amino-acid variants were recombinantly expressed in COS-1 cells and CYP2B6.6, CYP2B6.5, and WT CYP2B6.1 proteins (Lang et al. 2004; Klein et al. 2005) were analyzed in parallel for comparison (Table 1, Figure 3). Protein expression in microsomal fractions was reduced for all variants by up to 80%, except for I114T, which showed about 70% increased expression in the COS-1 cell system. The enzymatic activity of the variant proteins was determined with two different substrates, bupropion and EFV (Table 1). The activity and kinetic parameters for both substrates generally correlated well for all variants (Figure 3B). The variants 148D, 253H, 279P, and 487S were functional and the latter two showed even higher specific activity of up to 182% compared with the reference protein, consistent for both substrates. Variant 148D had slightly decreased  $K_M$  values for both substrates, but displayed significantly higher enzymatic activity with bupropion compared with EFV (Table 1, Fig. 3B). The variant proteins 110V, 114T, and 183G were classified as loss-of-function variants, because they did not show any quantifiable amounts of metabolites. Variant 213L was significantly compromised and had less than 40% of the reference activity for bupropion hydroxylation (Table 1, Figure 3).

### Functional Prediction of Novel CYP2B6 Variants

In silico prediction using a range of bioinformatic phenotype prediction tools was performed individually for each of the eight amino-acid variants (Table 2, Supp. Table S3). For comparison, the well characterized variants p.R487C (\*5), as well as p.Q172H (\*9) and p.K262R (\*4) were analyzed together with the new variants. All tools predicted the amino-acid changes constituting the \*6 allele (Q172H, K262R) correctly as neutral substitutions. It should be noted here that the well-documented association of the \*6 allele to low activity is primarily based on erroneous splicing and decreased protein expression in liver (Hofmann et al. 2008). All tools except nsSNPAnalyzer classified p.R487C (\*5) also correctly as neutral. In



**Figure 3. A:** Western blot of recombinant expressed CYP2B6 variants: representative blot of the microsomal fractions is shown with 10  $\mu$ g protein per lane (not adjusted to transfection efficiency). **B:** Specific activities (normalized to expressed protein) of CYP2B6 variants toward bupropion and efavirenz. Values are given in % of CYP2B6.1 activity (100%; bupropion: 7.1 pmol/[mg min]; efavirenz: 1.1 pmol/[mg min]); light bars, bupropion 4-hydroxylation; dark bars, efavirenz-8-hydroxylation.

contrast, the new damaging variant p.I114T was consistently classified by all tools as neutral. G110V was correctly predicted to be damaging by seven out of eight tools. Prediction for R487S was identical to R487C by all tools except for SNAP, which classified R487S as deleterious and R487C as neutral. The results for the other variants (E148D, V183G, F213L, R253H, and A279P) were more discordant, as for F213L damaging predictions were obtained with SIFT, PhD-SNP, nsSNPAnalyzer, and MutPred, whereas the other tools classified this exchange to be neutral. In summary, there were considerable differences between the individual programs regarding



**Table 2. In Silico Predictions of Functional Impact of New CYP2B6 Amino-Acid Substitutions by Different Software Tools**

Amino-acid change	SIFT human protein	SNAP	SNPs&GO	PhD SNP	PP2 <sup>a</sup>	nsSNP analyzer <sup>b</sup>	SNPs3D	MutPred <sup>c</sup>	NoD <sup>d</sup>
Q172H	n	n	n	n	n	n	n	n	0
K262R	n	n	n	n	n	n	n	n	0
R487C	n	n	n	n	n	D	n	n	1
G110V	D	n	D	D	D	D	D	D	7
I114T	n	n	n	n	n	n	n	n	0
E148D	D	n	n	D	n	n	D	D	4
V183G	D	D	D	n	D	n	D	D	6
F213L	D	n	n	D	n	D	n	D	4
R253H	D	n	n	n	n	n	n	D	2
A279P	n	n	n	D	n	n	n	n	1
R487S	n	D	n	n	n	D	n	n	2
Correctly predicted <sup>e</sup>	8	7	9	7	9	7	8	8	

<sup>a</sup>PolyPhen2 (version v2.2.2r394, accessed Feb. 23, 2012; HumDiv Dataset).

<sup>b</sup>nsSNP Analyzer (under use of pdb entry 3IBD).

<sup>c</sup>MutPred probability threshold for deleterious classification > 0.5.

<sup>d</sup>NoD: number of deleterious predictions (total  $n = 8$ ).

<sup>e</sup>Comparison with experimental data; total number of predictions  $n = 11$ .

n, neutral; D, damaging.

the individual amino-acid exchanges predicted as damaging or neutral. In general, functionality was predicted at a rate of 60%–80% of correct predictions (Table 2).

### MD Simulation on Protein–Ligand Complexes

We performed computational docking and long-term MD simulations to investigate if the new variants may affect substrate binding within the active site of the enzyme or the CYP2B6 secondary structure.

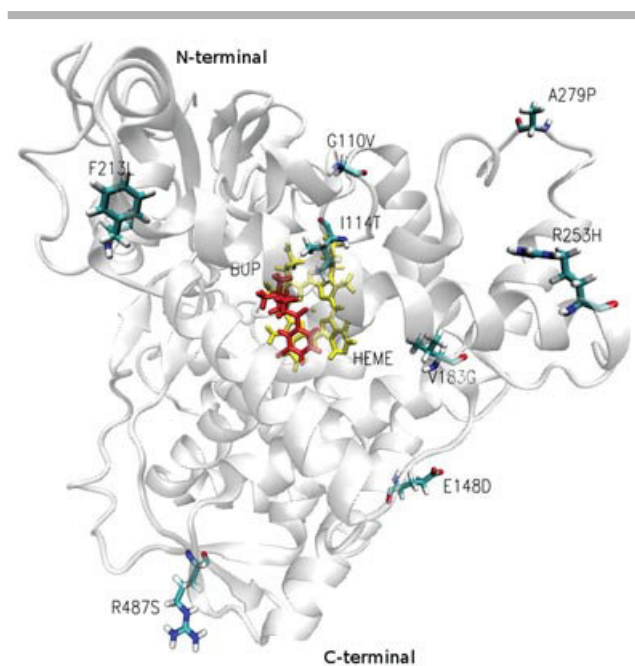
### Rigid Protein and Flexible Ligand Docking Analysis

Before the docking analysis, MD simulations of each variant without substrate showed that the structure of the predicted proteins were stable. For the docking procedure the binding pocket size was set at 1386 Å<sup>3</sup> to include the amino-acids I101, F297, A298, E301, T302, L363, V367, P368, V477, and G478 previously reported as being critical for binding both, bupropion and EFV (Niu et al. 2011), as well as the surrounding residues (K100, A102, F296, G299, T300, T306, L362, P364, G366, G476, and K479). Although the whole CYP2B6 structure adopted a close conformation, the cavity was wide open toward the heme iron, allowing the substrates to enter the active site.

None of the variants were located within the active site of both, bupropion and EFV. However, the variant positions 110, 114, 183, and 213 were rather close to the active site (in particular 114) as compared with the 148, 253, 279, and 487 residues (Figure 4). Based on binding free energy, our docking analyses revealed that both bupropion and EFV had a high probability to bind within the active site cavity of the WT and each variant structure.

### Flexible Protein–Ligand Complex MD Simulation

To further consider the flexibility of the proteins and ligands, explicit solvent MD simulation was conducted for each ligand–protein complex obtained from the docking analysis (Table 3). The R253H, A279P, and R487S variants displayed the most favorable interaction energies ( $E_{int}$ ) with both, bupropion (<–33.27 kcal/mol) and EFV (<–25.79 kcal/mol), comparable to the WT protein and the Q172H/K262R and R487C variants. In contrast, the five variants



**Figure 4.** Ribbon diagram of the three-dimensional structural model of CYP2B6 in complex with bupropion. Heme group (light gray/yellow, center of ribbon diagram); bupropion (BUP; dark gray/red, center of diagram); mutant residues (gray/blue, labeled on ribbon diagram). This image was generated with VMD.

G110V, I114T, E148D, V183G, and F213L showed higher interaction energies ranging from –8.73 to –25.66 kcal/mol for bupropion and –14.16 to –18.36 kcal/mol for EFV suggesting a decreased stability of the ligand–CYP2B6 complex.

Interaction energies between each residue at the CYP2B6 binding site suggested that amino-acid residues F206, F297, A298, E301, and V367 were the key interaction residues of the 253H, 279P, and 487S variants with bupropion, whereas the 110V, 114T, 148D, 183G, and 213L variants showed no strong interaction with any residues within the cavity site (interaction energy higher than –4 kcal/mol). For EFV binding, the F297, E301, T302, and V367 residues were found to be the critical residues for 253H, 279P, and 487S. Similarly to bupropion, no relevant binding residues were found for 110V, 114T,

**Table 3. Total Interaction Energy ( $E_{\text{tot}}$ ) Between all Active Site Residues (ASR) and the Ligands Bupropion (BUP) and Efavirenz (EFV)**

Amino-acid variant	$E_{\text{tot}}$ BUP-ASR (kcal/mol)	$E_{\text{tot}}$ EFV-ASR (kcal/mol)
WT	-34.16	-30.53
Q172H, K262R	-36.09	-26.77
R487C	-31.41	-31.7
G110V	-16.97	-16.67
I114T	-8.73	-17.42
E148D	-10.78	-14.79
V183G	-25.66	-14.16
F213L	-16.71	-18.36
R253H	-42.67	-25.79
A279P	-33.27	-35.78
R487S	-45.25	-29.25

148D, 183G, and 213L. These results emphasized that these five amino-acid changes may induce decreased stability of the ligand-protein complexes.

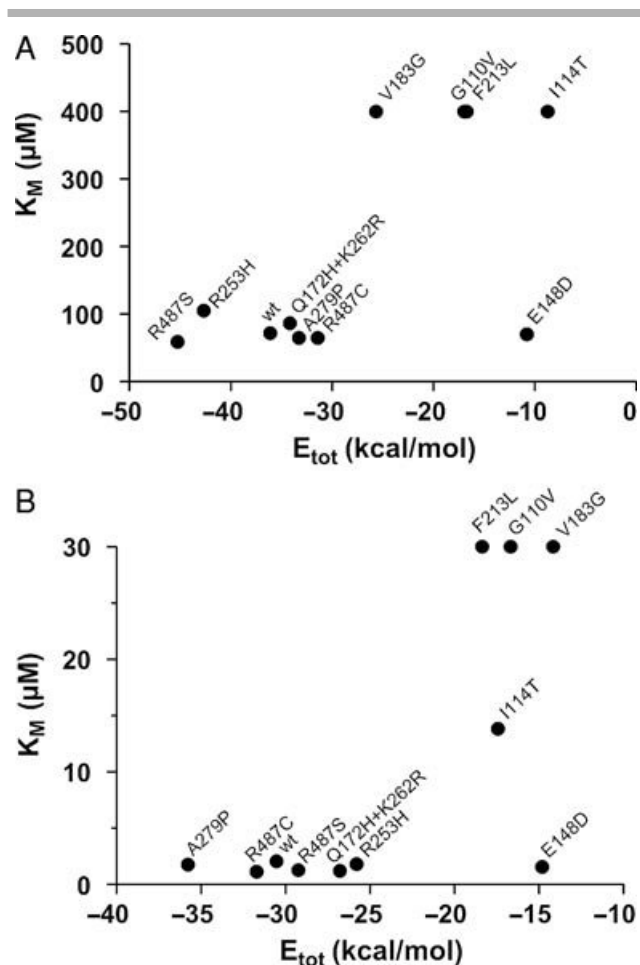
### Secondary Structure Considerations on the Variant CYP2B6 Proteins

Analysis of the secondary structure along the MD trajectory over the bupropion-protein complex revealed the disturbance of the G110V, I114T, F213L, and V183G structural conformations when compared with the WT conformation. These variants undergo a disappearance of two different  $\alpha$ -helices turning into 3–10 helices (3 turn helices) in the region 221–225 and 313–317 (Supp. Fig. S1A/B and S3). In addition,  $\beta$ -strand turning into coils or  $\beta$ -bridges (single pair of  $\beta$ -sheet hydrogen bond formation) in the region 478–480 was observed after MD simulation, whereas the E148D, R253H, A279P, and R487S showed relatively stable conformation as compared with the WT conformation. Interestingly, the loss of structural integrity occurred in the surrounding region of the CYP2B6 binding pocket and might impact on the interactions of bupropion with their critical binding residues.

In case of the EFV-protein complex, two different  $\alpha$ -helices were missing and formed instead 3–10 helices in the regions 104–109 and 221–225, respectively. Formation of coils was also observed in the region 478–480 instead of  $\beta$ -strand in the WT structure for the G110V, I114T, F213L, and V183G variants (Supp. Fig. S2A/B and S3). In contrast, the E148D, R253H, A279P, and R487S variants displayed a similar conformation as the WT structure. Taken together, our data suggest that both, structural modifications occurring in the G110V, I114T, V183G, and F213L variants and decreased stability of the substrate-protein complex might explain the loss of enzyme activity observed experimentally. The E148D structure model displayed no major conformational changes but decreased stability of the BUP- and EFV-CYP2B6 complexes (Table 3).

### Comparison of Prediction and Function

To compare prediction results with experimental data on the variants, the total interaction energy ( $E_{\text{tot}}$ ), the number of deleterious predictions (NoD), and  $K_M$  values determined for bupropion and EFV were correlated and pairwise Pearson coefficients calculated (Fig. 5, Supp. Table S4). Function in terms of  $K_M$  was generally well predicted using the online tools ( $r_{\text{pear}} > 0.57$ ), with stronger correlations observed for EFV.  $E_{\text{tot}}$  values derived from substrate docking analysis better reflected experimentally determined  $K_M$  values, when E148D was not considered (Fig. 5, Supp. Table S4). In particular,



**Figure 5.** Correlation of total interaction energy ( $E_{\text{tot}}$ ) to functional  $K_M$  data of CYP2B6 variants. **A:** bupropion; **B:** efavirenz.  $K_M$  values of variants without metabolite formation were set at 400  $\mu\text{M}$  (bupropion) and 30  $\mu\text{M}$  (efavirenz) for graphical purposes.

the WT like kinetic parameters  $K_M$  and the difference in enzymatic activity of this variant with bupropion compared with EFV could not be rationalized conclusively by any of the modeling approaches (Fig. 3B).

### Discussion

In the present study, we identified eight previously uncharacterized and partially novel nonsynonymous polymorphisms within the *CYP2B6* gene in a Rwandese population. By sequence and haplotype analysis we deduced five different alleles (\*33, \*34, \*35, \*36, and \*37), which carry between one and five of these SNPs, in part combined with other known mutations (Fig. 2). We functionally characterized individual amino-acid variants, rather than the combined haplotypes, because some of the alleles also carried a functionally relevant promoter SNP (-82T>C, \*22), which cannot be analyzed by recombinant protein expression alone, and because not all haplotypes could be deduced with absolute certainty. The fact that four amino-acid substitutions, G110V, I114T, V183G, and F213L, lead to a complete or significantly compromised loss-of-function with both substrates allows for rather good prediction of the functionality of haplotype alleles. To complement these analyses, we assessed the predictive power of two different in silico tools, namely phylogenetics-based

programs that predict the impact of individual amino-acid substitutions, and structure-based substrate docking simulation, which allows to analyze variants with several mutations.

The most C-terminally situated amino-acid substitution, R487S was found in homozygous condition in the absence of any other mutations, allowing unequivocal definition of novel allele \*33, which is part of a triallelic polymorphism (c.1459C>T,A), with the T-variant occurring in the known alleles \*5 and \*7 (Lang et al. 2001; Hesse et al. 2004; Zukunft et al. 2005). The R487S variant was previously described in an Ugandan population with a frequency of 0.7% (Jamshidi et al. 2010). The variant proteins R487C and R487S revealed ~2.1- and 1.5-fold increased specific activity for bupropion- and efavirenz-hydroxylation, respectively, when compared with 2B6.1 on the basis of expressed protein (Table 1). Interestingly, these data are in accordance with an intrinsic compensation of lower expression by higher specific activity, in agreement with previous observations with bupropion and EFV in human liver microsomes of \*5/\*5 carriers (Desta et al. 2007) and 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin (7-EFC) *O*-deethylation activity of \*5 and \*7 alleles expressed in COS-1 cells (Hiratsuka 2012).

Allele \*34 could be definitively deduced from the genotypes of the mother/child pair and represents a combination haplotype consisting of the -82T>C (\*22) promoter variant, the common \*6 allele, and the novel R487S variant. Interestingly, a novel haplotype representing a combination between \*22 and \*6 (termed \*36) was also detected as well as other similar variants, suggesting that a \*22-\*6 recombination allele is the origin of these variants. To predict the in vivo activity of these alleles, liver expression has to be taken into consideration. In the case of \*34, R487S confers increased specific activity and \*22 increases expression (Zukunft et al. 2005). These effects should intrinsically compensate, at least in part, for the \*6-related decrease of functional splice product (Hofmann et al. 2008). We thus speculate that this previously undescribed haplotype should be functionally comparable to the WT allele.

The \*35 allele could not be deduced with absolute certainty, but the presence of two identical heterozygous samples with all nine polymorphic changes and two other samples, including one homozygous for \*22, strongly suggests that this haplotype exists in this population. In addition, molecular haplotyping, providing evidence that all SNPs in exons 2 and 3 are located on the same chromosomal strand, and concurrent occurrence of these SNPs in two samples of the Luhya tribe of western Kenya further supported this haplotype (data accessed on 1000 Genomes project data browser <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>). The single amino-acid changes, G110V and I114T resulted in almost complete loss-of-function of the expressed proteins versus both substrates, although I114T displayed very low residual metabolite formation. The \*35 allele should therefore be considered as a null allele, because it is very unlikely that either the presence of \*22 or any of the other variants could reverse this phenotype. The \*37 allele was deduced as a combined \*6 + V183G haplotype, as this easily explained the genotype of sample KLC286. The expressed 183G variant was functionally completely deficient with both substrates, suggesting that \*37 is a null allele in vivo. Finally, F213L and R253H could not unequivocally be assigned to any allele. F213L showed severely compromised functional properties, whereas R253H displayed a specific activity that was almost identical to that of WT CYP2B6 for both substrates, suggesting normal function. However, it should be noted that expression of the latter variant in COS-1 cells was reduced by >80% compared with WT. The carrier allele may therefore also be expressed at low levels in liver.

These results as well as available data in SNP repositories (dbSNP, 1000 Genomes) demonstrate that a large number of uncharacterized polymorphic P450 enzyme variants exists. Because the functional characterization of new amino-acid variants is a “low-throughput” method, expensive and time consuming, we used the experimental data generated here to compare experimental results with predicted outcome of a number of freely available in silico programs. Two of these programs, SIFT and PolyPhen2, are also implemented in the 1000 Genomes browser. Prediction accuracy was generally best for SNPs&GO and PolyPhen2, which both achieved 82% prediction rate (nine of eleven correct predictions, Table 2), directly followed by SIFT, SNPs3D, and MutPred (72%; eight of eleven). This is of interest, because one of these tools is based only on multiple sequence alignment (SIFT), whereas others (PolyPhen2, MutPred) use additional secondary/3D structural information or gene ontology (SNPs&GO). Prediction was generally better for non-damaging compared with damaging variants. Specifically, the I114T variant was predicted to be functional by all programs. Our data are in good agreement with those of Wang et al. (2009) who evaluated a large number of experimentally characterized nonsynonymous SNPs in human P450 enzymes using PolyPhen and SIFT. Correct prediction of damaging SNPs was about 70%, compared with 60%–80% in our study (Table 2).

Finally, we analyzed whether substrate docking using long-term MD simulation analysis enhances functional prediction. Interestingly, G110V, I114T, F213L, and V183G are located within or near the substrate recognition sites SRS1 and SRS2 (Supp. Figure S4; according to (Gotoh 1992; Nguyen et al. 2008)) but only two of them (G110V and V183G) were predicted correctly by most tools. In contrast, damage prediction for I114T (0%) and F213L (50%) was less satisfactory, although these two positions are directly located within SRS1 and SRS2, respectively (Supp. Figure S4). Interestingly, a former study showed that I114 can be substituted by the less bulky valine resulting in normal protein expression and  $V_{max}$  values but higher  $K_M$  for cyclophosphamide activation (Nguyen et al. 2008), highlighting that the global hydrophobic nature in this area of the active site is important.

For all variants, the docking analysis and long-term MD simulations indicated that both bupropion and EFV may bind to the same binding cavity sites as in the WT. Key interaction residues were defined in case of 253H, 279P, and 487S that are in accordance to previous analysis (Niu et al. 2011). As a consequence of a significant decrease of the interaction energies for the changes G110V, I114T, E148D, V183G, and F213L, no critical binding residues could be assigned, indicating a decreased stability of the ligand–protein complex. In addition, the four variants G110V, I114T, V183G, and F213L induced the same major structural changes of the CYP2B6 conformation upon binding to bupropion or EFV and both events might explain the impaired enzyme function of the G110V, I114T, V183G, and F213L variants. The E148D variant displayed decreased ligand binding but no notable change of secondary structure, in agreement with retention of enzyme activity. However, we cannot explain the observed difference in enzymatic activity toward bupropion and EFV. These results demonstrate that long-term MD simulations of structure–ligand interaction, which are not reflected in the phenotype prediction tools, can give more reliable results. However, it has to be recognized that these analyses are time consuming and cannot be routinely and easily performed for prediction as compared with the in silico prediction online tools.

In summary, we have identified novel non-synonymous SNPs in a cohort of Rwandese HIV patients. Functional characterization in a recombinant system using bupropion and EFV as substrates

classified four amino-acid variants (G110V, I114T, V183G, and F213L) as severely damaged. As compound heterozygosity for low-activity alleles predicts poor metabolism of CYP2B6 substrates, these data are of potential importance for drug therapy of HIV infection in African populations, particularly in Rwanda. The prediction of damaging SNPs by some software tools may be useful for uncharacterized mutations, but is still not satisfactory in all cases. Consideration of substrate–protein interactions greatly improves in silico function prediction and enhances understanding of the mutation’s effects.

## Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the Rwandese patients for taking part in the study, to the healthcare workers for collecting the samples and to Lux-Development for their assistance. The excellent technical assistance of Monika Seiler, Sonja Seefried, and Britta Klumpp is gratefully acknowledged. Dr. Ute Hofmann is gratefully acknowledged for helpful discussions.

*Disclosure statement:* The authors declare no conflict of interest.

## References

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- Bairoch A, Apweiler R. 1997. The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research. *J Mol Med* 75:312–316.
- Bromberg Y, Rost B. 2007. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res* 35:3823–3835.
- Brooks B, Bruceleri R, Olafson B, States D, Swaminathan S, Karplus M. 1983. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. 4:187–217.
- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. 2009. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat* 30:1237–1244.
- Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. 2006. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 22:2729–2734.
- Crane AL, Klein K, Olson JR. 2012. Bioactivation of chlorpyrifos by CYP2B6 variants. *Xenobiotica* 42:1255–1262.
- Destá Z, Saussele T, Ward B, Bliedernicht J, Li L, Klein K, Flockhart DA, Zanger UM. 2007. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* 8:547–558.
- Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM. 2000. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* 28:1222–1230.
- Foxenberg RJ, McGarrigle BP, Knaak JB, Kostyniak PJ, Olson JR. 2007. Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metab Dispos* 35:189–193.
- Frishman D, Argos P. 1995. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23:566–579.
- Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, et al. 2007. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clin Infect Dis* 45:1230–1237.
- Gay SC, Shah MB, Talakad JC, Maekawa K, Roberts AG, Wilderman PR, Sun L, Yang JY, Huelga SC, Hong W-X, Zhang Q, Stout CD, et al. 2010. Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution. *Mol Pharmacol* 77:529–538.
- Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, Berardinis V de, Martin H, Beaune P, Waziers I de. 1999. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 9:295–306.
- Gotoh O. 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267:83–90.
- Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB, Tierney C, Wilkinson GR, Gulick RM, Clifford DB, Hulgren T, Marzolini C, Acosta EP. 2004. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 18:2391–2400.
- Hesse LM, He P, Krishnaswamy S, Hao Q, Hogan K, Moltke LL von, Greenblatt DJ, Court MH. 2004. Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* 14:225–238.
- Hiratsuka M. 2012. In vitro assessment of the allelic variants of cytochrome p450. *Drug Metab Pharmacokin* 27:68–84.
- Hodgson E, Rose RL. 2007. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol Ther* 113:420–428.
- Hofmann MH, Bliedernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM. 2008. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther* 325:284–292.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graphics* 14:33–38, 27–28.
- Jamshidi Y, Moreton M, McKeown DA, Andrews S, Nithiyananthan T, Tinworth L, Holt DW, Sadiq ST. 2010. Tribal ethnicity and CYP2B6 genetics in Ugandan and Zimbabean populations in the UK: implications for efavirenz dosing in HIV infection. *J Antimicrob Chemother* 65:2614–2619.
- Klein K, Lang T, Saussele T, Barbosa-Sicard E, Schunck W-H, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2005. Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet Genomics* 15:861–873.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1081.
- Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2001. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 11:399–415.
- Lang T, Klein K, Richter T, Zibat A, Kerb R, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2004. Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 311:34–43.
- Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. 2009. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25:2744–2750.
- Masquelier C, Servais J-Y, Rusanganwa E, Roman F, Havuga E, Servais J, Tuyizere S, Omes C, Karasi J-C, Coruteille O, Karita E, Allen S, et al. 2007. A novel 24-base pair deletion in the coding region of CCR5 in an African population. *AIDS* 21:1111–1113.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791.
- Nguyen T-A, Tychoopoulos M, Bichat F, Zimmermann C, Flinois J-P, Diry M, Ahlberg E, Delaforge M, Corcos L, Beaune P, Dansette P, André F, et al. 2008. Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo. *Mol Pharmacol* 73:1122–1133.
- Nishikawa K, Ishino S, Takenaka H, Norioka N, Hirai T, Yao T, Seto Y. 1994. Constructing a protein mutant database. *Protein Eng* 7:733.
- Niu R-J, Zheng Q-C, Zhang J-L, Zhang H-X. 2011. Analysis of clinically relevant substrates of CYP2B6 enzyme by computational methods. *J Mol Model* 17:2839–2846.
- Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwelling E, Ebner T, Terasaki T. 2012. Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos* 40:83–92.
- Raska P, Zhu X. 2011. Rare variant density across the genome and across populations. *BMC Proc* 5:S39.
- Ribaud HJ, Liu H, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Motsinger-Reif AA, Ritchie MD, Zanger UM, Acosta EP, Morse GD, Gulick RM, Robbins GK, et al. 2010. Effect of CYP2B6, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms on efavirenz pharmacokinetics and treatment response: an AIDS Clinical Trials Group study. *J Infect Dis* 202:717–722.
- Richter T, Mürdter TE, Heinkle G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. 2004. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 308:189–197.
- Rodríguez-Novoa S, Barreiro P, Rendón A, Jiménez-Nacher I, González-Lahoz J, Soriano V. 2005. Influence of 516G>T polymorphisms at the gene encoding the CYP450-2B6 isoenzyme on efavirenz plasma concentrations in HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis* 40:1358–1361.
- Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Décosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Günthard HF, Schwab M, Eichelbaum M, Telenti A, et al. 2007. Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther* 81:557–566.
- Saunders CT, Baker D. 2002. Evaluation of structural and evolutionary contributions to deleterious mutation prediction. *J Mol Biol* 322:891–901.

- Telenti A, Zanger UM. 2008. Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:227–256.
- Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. 2011. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat* 32:358–368.
- Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, Hirbo JB, Awomoyi AA, Bodo J-M, Doumbo O, Ibrahim M, Juma AT, et al. 2009. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 324:1035–1044.
- Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. 2004. Homozygous CYP2B6\*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1322–1326.
- Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O. 2006. The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr Drug Metab* 7:705–714.
- Wang H, Tompkins LM. 2008. CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab* 9:598–610.
- Wang L-L, Li Y, Zhou S-F. 2009. A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 37:977–991.
- Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z. 2003. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 306:287–300.
- Watanabe T, Sakuyama K, Sasaki T, Ishii Y, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. 2010. Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2–CYP2B6.28, except CYP2B6.22). *Pharmacogenet Genomics* 20:459–462.
- Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. 2008. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* 36:D901–D906.
- Wyen C, Hendra H, Siccardi M, Platten M, Jaeger H, Harrer T, Esser S, Bogner JR, Brockmeyer NH, Bieniek B, Rockstroh J, Hoffmann C, et al. 2011. Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) and constitutive androstane receptor (CAR) polymorphisms are associated with early discontinuation of efavirenz-containing regimens. *J Antimicrob Chemother* 66:2092–2098.
- Yue P, Li Z, Moulton J. 2005. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol* 353:459–473.
- Zanger UM, Klein K, Saussele T, Blievernicht J, Hofmann MH, Schwab M. 2007. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* 8:743–759.
- Zhao Y, Halpert JR. 2007. Structure-function analysis of cytochromes P450 2B. *Biochim Biophys Acta* 1770:402–412.
- Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Parhar RS, Al-Mohanna FA, Meyer BF, Shi Y. 2011. Mutation prediction by PolyPhen or functional assay, a detailed comparison of CYP27B1 missense mutations. *Endocrine* 40:14–20.
- Zukunft J, Lang T, Richter T, Hirsch-Ernst KI, Nussler AK, Klein K, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. 2005. A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol Pharmacol* 67:1772–1782.

## Supporting Material, overview

Radloff, Gras et al.

Novel CYP2B6 enzyme variants in a Rwandese population: functional characterization and assessment of *in silico* prediction tools

## Supporting Methods

Measurement of enzyme activities

Short description of tools for functional prediction of amino acid changes

Molecular Dynamics simulation on protein-ligand complex

## References

**Supporting Table S1:** Sequencing/genotyping results from 39 samples of Rwandese Study cohort

**Supporting Table S2:** Primers used for site-directed mutagenesis of CYP2B6 cDNA and sequencing

**Supporting Table S3:** Prediction results from 8 different algorithms.

**Supporting Table S4:** Correlation of phenotype prediction, total interaction energy and functional data

**Supporting Figure S1:** Schematic representation of the secondary structures of the WT (A) and I114T (B) variant in complex with bupropion

**Supporting Figure S2:** Schematic representation of the secondary structures of the WT (A) and V183G (B) variant in complex with efavirenz

**Supporting Figure S3:** Secondary structure elements

**Supporting Figure S4:** Multiple sequence alignment of mammalian CYP2B protein sequences

## Supporting Methods

### Measurement of enzyme activities

8-Hydroxyfavirenz formation was quantified by negative electrospray LC-MS-MS analysis with an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent, Waldbronn, Germany) coupled to an Agilent 1200 HPLC system. HPLC separation was achieved on an Uptisphere Pro column (100×2.1 mm I.D., 5 µm particle size, Interchim, France) using 0.1 % formic acid in water (A) and in acetonitrile (B) at a flow rate of 0.5 ml/min. Gradient runs were programmed as follows: linear increase from 50 % to 70 % B in 3 min, remaining at 70 % B to 3.5 min, then re-equilibration. The mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with a collision energy of 12 and a fragmentor of 105, using the precursor / product ion pairs of m/z 330/258, and 334/258 for 8-hydroxyfavirenz and [2H4]-8-hydroxyfavirenz, respectively. Calibration curves based on internal standard calibration were obtained by weighted (1/x) linear regression for the peak-area ratio of 8-hydroxyfavirenz to the internal standard against the amount of the analyte. The concentration of 8-hydroxyfavirenz in unknown samples was obtained from the regression line.

### Short description of tools for functional prediction of amino acid changes

The **SIFT Human Protein** (Sorting Intolerant From Tolerant) algorithm collects closely related sequences through PSI-BLAST (Altschul et al. 1997) and calculates the degree of conservation at each amino acid position in a multiple sequence alignment (MSA). On this basis amino acids were categorized as tolerated or not tolerated. Sequence databases UniRef90, Uniprot/Swiss-Prot 57.15 and Uniprot/TrEMBL were used for phenotype prediction ((Kumar et al. 2009); [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)). **PolyPhen2** (PP2, Polymorphism Phenotyping v2.2.2) is based on a Bayesian classification and a PSIC profiles conservation analysis. This algorithm considers the structure and function together

with physical and sequence conservation analysis to predict the possible impact of protein variants. Protein sequences from UniProtKB/UniRef100 Release 2011\_12 (14-Dec-2011), structures from PDB/DSSP Snapshot 03-Jan-2012 (78,304 entries) and UCSC MultiZ multiple alignments of 45 vertebrate genomes with hg19/GRCh37 human genome (08-Oct-2009) were the basis for predictions. Values from HumDiv model was used which is preferred for evaluating rare alleles ((Adzhubei et al. 2010); <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; v2.2.2r394 – 23 Feb 12). **nsSNPAnalyzer** is based on random forest classification and uses SIFT MSA conservation values together with the 3D structural information of CYP2B6 [pdb 3IBD] ((Saunders and Baker 2002); <http://snpanalyzer.uthsc.edu/>). **SNPs3D** is based on a support vector machine (SVM) and uses structural or sequence conservation features ((Yue et al. 2005); <http://www.snps3d.org/>). **SNPs&GO** uses SVM and accounts for sequence environment, sequence profiles and the Panther library for functional annotations (GeneOntology/GO terms) ((Calabrese et al. 2009); <http://snps.uib.es/snps-and-go/snps-and-go.html>). **SNAP** (screening for non-acceptable polymorphisms) is based on neural network, and trained on the protein mutant database (Nishikawa et al. 1994). It uses *in silico* derived protein information (e.g. secondary structure, conservation, solvent accessibility, etc.) in order to make predictions regarding functionality of mutated proteins ((Bromberg and Rost 2007); <http://rostlab.org/services/snap/>). **MutPred** is based on SIFT and reports on gain/loss of 14 different structural and functional protein properties. It was trained using the deleterious mutations from the Human Gene Mutation Database and neutral polymorphisms from Swiss-Prot. The output of MutPred contains a general score (g) which is the probability that the amino acid substitution is damaging. A second score, a so called top 5 property scores (p), refers to a certain structural and functional property. A general score of >0.5 and/or a property score of <0.05 was regarded as possibly damaging mutations (Li et al. 2009); <http://mutpred.mutdb.org>, v1.2). **PhD-SNP2.0** (Predictor of human Deleterious Single



Nucleotide Polymorphisms) is based on SVM, and uses sequence conservation, environment and profile information around the position of interest ((Capriotti et al. 2006); <http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html> ).

### **Molecular Dynamics simulation on protein-ligand complex**

The initial atomic coordinates of CYP2B6 were retrieved from a crystal structure in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl) imidazole and the heme group containing the naturally occurring K262R mutation (PDB ID: 3IBD) (Gay et al. 2010). The 4-(4-chlorophenyl) imidazole truncated coordinates of the CYP2B6 along with the heme group were optimized using CHARMM35 (Brooks et al. 1983). The wild-type Lysine was introduced at the position 262 instead of Arginine and no significant modification of the crystal structure was observed as previously described (Halpert 2011). The structure was relaxed by a 2000-step energy minimization using the conjugated gradient method with the heme constraint fixed until the root-mean-square (RMS) gradient energy was lower than 0.1 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>. The G110V, I114T, V183G, F213L, R253H, A279P and R487S mutations were introduced and refined through energy minimization followed by short molecular dynamics simulation using Langevin dynamics in a 5ns total simulation time with a time step of 2 fs to obtain a stable conformation. The AutoDock 4.2 software package (Morris et al. 2009) was employed to dock the stabilized structural conformations of the variants with the initial structures of efavirenz (DrugBank: DB00625) and bupropion (DrugBank: DB01156) (Wishart et al. 2008). All CYP2B6 structures were kept rigid and the ligands flexible during the docking process to produce binding energy as a scoring function. The lowest binding free energy ( $\Delta G$  value) of each complex was obtained using AutoDock Tools, version 4.2. The final protein-ligand complex structures were chosen by virtue of the best binding energy score and used as a starting conformation for all MD simulations. MD simulations were performed

with the CHARMM program using the CHARMM35 all-atom force field. Counter-ions (chloride or sodium) were added to the systems when necessary to keep them electrically neutral, and were initially placed to minimize their electrostatic interaction with the protein. Proteins were solvated with TIP3P water molecules in an orthorhombic box to stabilize the biomolecular complex. Water molecules with oxygen atom closer than 2.4Å to any protein heavy atom (*i.e.* non-hydrogen atom) were deleted. The systems were energy-minimized and the protein heavy atoms were first constrained with a harmonic force constant of 1 kcal.mol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup> for 5 ps. Then, it was decreased to zero in 0.2 kcal.mol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup> step every 5 ps. The systems were equilibrated for 30 ps at constant temperature (300 K) with periodic boundary conditions using the particle mesh Ewald method for calculation of long-range electrostatic interactions. Langevin dynamics with a friction coefficient of 3 ps<sup>-1</sup> for all protein non-hydrogen atoms was used. After the 30 ps equilibration, the temperature of the system was kept at 300K with a Nosé-Hoover thermostat and the pressure was maintained around 1 atm with a Langevin piston. The area of the system was kept constant (NPAT ensemble) in the Y and Z directions while the X dimension (and thus the volume) was allowed to vary. Pressure was adjusted through the CPT module in CHARMM and a piston mass of 750 amu in the X direction. SHAKE was used to constrain all covalent bonds involving hydrogen atoms at their equilibrium length. All simulations employed the leapfrog Verlet algorithm with a 2-fs integration time-step and consisted of 30 ps equilibration followed by 5 ns production dynamics. The binding modes and interactions of bupropion and efavirenz with the functional residues of the CYP2B6 binding pocket were further analyzed by visually inspecting the docked complexes using VMD (Humphrey et al. 1996) and the CYP2B6 secondary structure was investigated with Stride (Frishman and Argos 1995). Graphical structure views were generated with the Visual Molecular Dynamics (VMD) graphical software support (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). VMD is developed with

NIH support by the Theoretical and Computational Biophysics group at the Beckman Institute, University of Illinois at Urbana-Champaign.

## References

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7: 248–249.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25: 3389–3402.
- Bromberg Y, Rost B. 2007. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Research* 35: 3823–3835.
- Brooks B, Bruccleri R, Olafson B, States D, Swaminathan S, Karplus M. 1983. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. 4: 187–217.
- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. 2009. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Human Mutation* 30: 1237–1244.
- Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. 2006. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 22: 2729–2734.
- Frishman D, Argos P. 1995. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23: 566–579.
- Gay SC, Shah MB, Talakad JC, Maekawa K, Roberts AG, Wilderman PR, Sun L, Yang JY, Huelga SC, Hong W-X, Zhang Q, Stout CD, et al. 2010. Crystal Structure of a Cytochrome P450 2B6 Genetic Variant in Complex with the Inhibitor 4-(4-Chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å Resolution. *Molecular Pharmacology* 77: 529–538.
- Halpert JR. 2011. The 2010 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure and Function of Cytochromes P450 2B: From Mechanism-Based Inactivators to X-ray Crystal Structures and Back. *Drug Metabolism and Disposition*.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14: 33–38, 27–28.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4: 1073–1081.
- Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. 2009. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25: 2744–2750.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry* 30: 2785–2791.

Nishikawa K, Ishino S, Takenaka H, Norioka N, Hirai T, Yao T, Seto Y. 1994. Constructing a protein mutant database. *Protein engineering* 7: 733.

Saunders CT, Baker D. 2002. Evaluation of structural and evolutionary contributions to deleterious mutation prediction. *Journal of molecular biology* 322: 891–901.

Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. 2008. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Research* 36: D901–D906.

Yue P, Li Z, Moulton J. 2005. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *Journal of molecular biology* 353: 459–473.

**Supporting Table S1:** Sequencing/genotyping results from 39 samples of Rwandese Study cohort

Only exonic polymorphic sites are shown. Given are exon, genomic position (with +1 corresponding to ATG reference sequence AC023172.1), cDNA position (reference sequence NM\_000767.4) nucleotide change (reference>variant), amino acid (reference, position, variant; nonsynonymous changes are shown in bold)

dbSNP #	genomic position	cDNA position	amino acid	GLC269	GLC69
rs34223104		-82T>C	5'Flank	C/T	C/T
rs8192709	64	64C>T	<b>R22C</b>	C	C
rs33973337	76	76A>T	<b>T26S</b>	A	A
rs33980385	83	83A>G	<b>D28G</b>	A	A
rs33926104	85	85C>A	<b>R29S</b>	C	C
rs34284776	86	86G>C	<b>R29P</b>	G	G
rs35303484	136	136A>G	<b>M46V</b>	A	A
rs142657251	12725	201G>A	T67	G/A	G
rs2279341, rs28399485	12740	216G>C	P72	G	G
rs149403002	12788	T64T>G	L88	T/G	T
rs186335453	12853	329G>T	<b>G110V</b>	G/T	G
rs139801276	12998	341T>C	<b>I114T</b>	T/C	T
rs1053569, rs145884402	13101	444G>T/C	<b>E148D</b>	G/T	G
rs138652715	13122	465G>A	E155	G/A	G
rs3745274, rs56308434	15631	516G>T	<b>Q172H</b>	G	G
rs45459594	15662	546C>G	<b>I182M</b>	C	C
ss539003292	15663	548T>G	<b>V183G</b>	T	T
rs36079186	15708	593T>C	<b>M198T</b>	T/C	T
ss539003293	15716	601T>C	L201	T	T
ss539003294	15752	637T>C	<b>F213L</b>	T	T
rs34331652	17991	714G>A	L238	G	G
ss539003295	18026	758G>A	<b>R253H</b>	G	G
rs2279343, rs28399497	18053	785A>G	<b>K262R</b>	A	A
rs139029625	18701	835C>C	<b>A279P</b>	G/C	G
rs35468935	18799	933C>T	F311	C	C
rs28399499	21011	983T>C	<b>I328T</b>	T	T
rs3211371, rs28399500	25505	1459C>T	<b>R487C</b>	C	C
ss539003296	25505	1459C>A	<b>R487S</b>	C	C

GLM149	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
GLM225	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
GLM4	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	T	C	T	T	T	T	G	G	G	G	C	T	C	C
GLM5	T	C/T	A	A	C	G	A	G	G/C	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
GLM93	C	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLC264	C/T	C	A	A	C	G	A	G/A	G	T/G	G/T	T/C	G/T	G/A	G	C	T	T/C	T	T	G	G	A	G/C	C	T	C	C
KLC286	C/T	C	A	A	C	G	A	G/A	G	T/G	G/T	T/C	G/T	G/A	G/T	C	T/G	T/C	T	T	G	G	A/G	G/C	C	T	C	C
KLC356 <sup>b</sup>	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLC371 <sup>c</sup>	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C/G	T	T/C	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLC439	T	C	A	A	C	G	A/G	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLC495	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	T	C	T	T	T	T	G	G	G	G	C	T	C	C
KLC669	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLC675 <sup>a</sup>	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	A	A
KLC714 <sup>d</sup>	C/T	C	A/T	A/G	C/A	G/C	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLM121	C/T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM146	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM154	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C

KLM164 <sup>a</sup>	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	A	A
KLM178	T	C	A	A	C	G	A/G	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T/C	T/C	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLM182 <sup>c</sup>	T	C	A	A	C	G	A/G	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM207	T	C	A/T	A/G	C/A	G/C	A	G	G/C	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM216	T	C/T	A	A	C	G	A	G	G/C	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLM220	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	T	C	T	T	T	T	G	G	G	G	C	T	C	C
KLM282	C/T	C	A/T	A/G	C/A	G/C	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM288	T	C	A/T	A/G	C/A	G/C	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C/T	T	C	C
KLM362	T	C	A	A	C	G	A	G	G/C	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T/C	C	C
KLM376	T	C	A	A	C	G	A/G	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T/C	C	C
KLM378	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T/C	C	C
KLM379	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T/C	C	C
KLM381	T	C/T	A/T	A/G	C/A	G/C	A	G	G/C	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM387	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	T	C	T	T	T	T	G	G	G	G	C	T	C	C
KLM428 <sup>b</sup>	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	T	C	C
KLM448	T	C	A	A	C	G	A/G	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T	C	C
KLM453	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G	A/G	G	C	T/C	C	C

KLM593	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G	C	T	T	T	T	G	G	A	G	C	C	C	C
KLM684 <sup>d</sup>	C	C	A	A	C	G	A	G/A	G	T/G	G/T	T/C	G/T	G/A	G/T	C	T	T/C	T	T	G	G	A/G	G/C	C	T	C	C
KLM688	T	C	A	A	C	G	A	G	G	T	G	T	G	G	G/T	C	T	T	T	T	G	G/A	A	G	C	T	C	C

a,b,c,d pairs of mother/child;



**Supporting Table S2:** Primers used for site-directed mutagenesis of CYP2B6 cDNA and sequencing

cDNA position <sup>a</sup>	Variant	direction	Purpose <sup>b</sup>	Sequence (5' – 3') <sup>c</sup>	length
329G>T	G110V	fw	m	cgaccattcttccgggTatatggtgatctttg	35
		rev	m	caaagatcacaccatatAcccgaagaatgggtcg	35
341T>C	I114T	fw	m	ccggggatatggtgtgaCctttgccaatgaaacc	35
		rev	m	ggtttccattggcaaagGtcacaccatatccccgg	35
329G>T, 341T>C	G110V, I114T	fw	m	ttcttccgggTatatggtgtgaCctttgccaatgg	35
		rev	m	ccattggcaaagGtcacaccatatAcccgaagaa	35
444G>T	E148D	fw	m	ggagcggattcaggaTgaggctcagtgctg	31
		rev	m	cagacactgagcctcAtcctgaatccgctcc	31
548T>G	V183G	fw	m	catcatctgctccatcgGctttgaaaacgattcc	35
		rev	m	ggaatcgttttcaaagCcgatggagcagatgatg	35
637T>C	F213L	fw	m	cttttactcatcagctctgtaCtcggccagctgt	36
		rev	m	acagctggccgaGtacagagctgatgagtgaaaaag	36
758G>A	R253H	fw	m	gtgtggagaagcaccAtgaaacctggacc	31
		rev	m	gggtccagggttcaTggtgcttctccacac	31
835G>C	A279P	fw	m	gaaaaagagaaatccaacCcacacagtgaattcagcc	37
		rev	m	ggctgaattcactgtgtgGgttgatttctcttttc	37
1459C>A	R487S	fw	m	caacataccagatcAgcttctgccccgc	29
		rev	m	gcggggcaggaagcTgatctggtatgttg	29
seq2B6_663-686		fw	seq	TGGCTTCTTGAAATACTTTCCTGG	24
seq2B6_810-792		rev	seq	GAGCAGGTAGGTGTCGATG	19

<sup>a</sup> according to reference sequence NM\_000767.4

<sup>b</sup> primer used for m (mutagenesis) or seq (sequencing)

<sup>c</sup> capital letters indicate the nucleotide change

**Supporting Table S3:** Prediction results from 8 different algorithms. Highlighted in yellow/red are the damage predictions. For interpretation/description of the values and abbreviations please refer to the corresponding homepages:

[http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)

<http://rostlab.org/services/snap/>

<http://snps.uib.es/snps-and-go/snps-and-go.html>

<http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

<http://snpanalyzer.uthsc.edu/>

<http://www.snps3d.org/>

<http://mutpred.mutdb.org>

	SIFT		SNAP		SNPs&GO		PhD-SNP		PolyPhen2		nsSNP Analyzer					SNPs-3D		MutPred		
	SIFT score	Predicton	SNAP prediction	Reliability Index (% Expected Accuracy)	SNPs&GO	Reliability index	Effect	Reliability index	Effect	PP2-HumVar score	PP2-HumDiv score	Phenotype	Environment	AreaBuried	FracPolar	Secondary structure	SVM score	Effect	Probability of deleterious mutation	Interpretation
<b>Q172H</b>	0.12	tolerated	Neutral	2 (69%)	Neutral	9	neutral	6	benign	0.005	0.001	Neutral	B2H	0.616	0.438	H	1.61	non-deleterious	0.177	neutral
<b>K262R</b>	1	tolerated	Neutral	5 (89%)	Neutral	10	neutral	9	benign	0.001	0	Neutral	B3C	0.549	0.781	C	1.74	non-deleterious	0.209	neutral
<b>R487C</b>	1	tolerated	Neutral	1 (60%)	Neutral	9	neutral	6	benign	0.01	0.025	Disease	B3S	0.506	0.573	S	3.8	non-deleterious	0.229	neutral
<b>G110V</b>	0	damaging	Neutral	0 (53%)	Disease	2	disease	7	probably damaging	0.754 (possibly)	0.973	Disease	EC	0.108	0.844	C	-1.7	deleterious	0.779	deleterious
<b>I114T</b>	0.09	tolerated	Neutral	0 (53%)	Neutral	6	neutral	1	benign	0.059	0.007	Neutral	B1C	0.641	0.188	C	1.57	non-deleterious	0.493	neutral
<b>E148D</b>	0.01	damaging	Neutral	3 (78%)	neutral	8	disease	0	benign	0.008	0.001	neutral	P2H	0.33	0.698	H	-0.43	deleterious	0.706	deleterious
<b>V183G</b>	0	damaging	Non-neutral	2 (70%)	Disease	0	neutral	0	probably damaging	0.995	0.98	Neutral	B1H	0.544	0.104	H	-1.53	deleterious	0.678	deleterious
<b>F213L</b>	0.03	damaging	Neutral	3 (78%)	Neutral	8	disease	3	benign	0.028	0.025	Disease	B3H	0.58	0.458	H	0.26	non-deleterious	0.542	deleterious
<b>R253H</b>	0.05	damaging	Neutral	5 (89%)	Neutral	5	neutral	3	benign	0.049	0.182	Neutral	P1H	0.459	0.531	H	0.71	non-deleterious	0.649	deleterious
<b>A279P</b>	1	tolerated	Neutral	8 (96%)	Neutral	9	disease	2	benign	0	0	Neutral	EC	0.094	0.844	C	3.23	non-deleterious	0.346	neutral
<b>R487S</b>	0.29	tolerated	Non-neutral	0 (58%)	Neutral	9	neutral	3	benign	0.03	0.048	Disease	B3S	0.506	0.573	S	1.05	non-deleterious	0.465	neutral

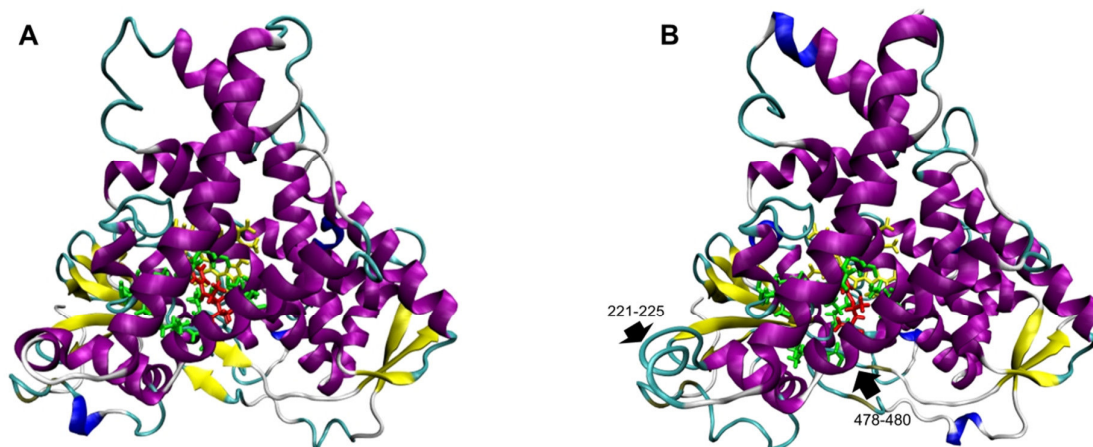
**Supporting Table S4:** Correlation of phenotype prediction, total interaction energy and functional data.

Comparison	$K_M(\text{BUP})$ - NoD	$K_M(\text{BUP})$ - $E_{\text{tot}}(\text{BUP})$	$K_M(\text{EFV})$ - NoD	$K_M(\text{EFV})$ - $E_{\text{tot}}(\text{EFV})$	NoD- $E_{\text{tot}}(\text{BUP})$	NoD- $E_{\text{tot}}(\text{EFV})$
$r_{(\text{Pear})}^{\text{a}}$	0.57	0.64	0.67	0.6	0.38	0.68
95% CI <sup>a</sup>	[-0.04, 0.87]	[0.07, 0.89]	[0.12, 0.91]	[-0.4, 0.74]	[-0.28, 0.80]	[0.14, 0.91]
P value <sup>a</sup>	0.065	0.032	0.02	0.05	0.25	0.02
$r_{(\text{Pear})}^{\text{b}}$	0.66	0.87	0.80	0.80	0.33	0.67
95% CI <sup>b</sup>	[0.52, 0.91]	[0.52, 0.97]	[0.28, 0.94]	[0.34, 0.95]	[-0.38, 0.79]	[0.07, 0.91]
P value <sup>b</sup>	0.038	0.0012	0.0087	0.0056	0.36	0.034

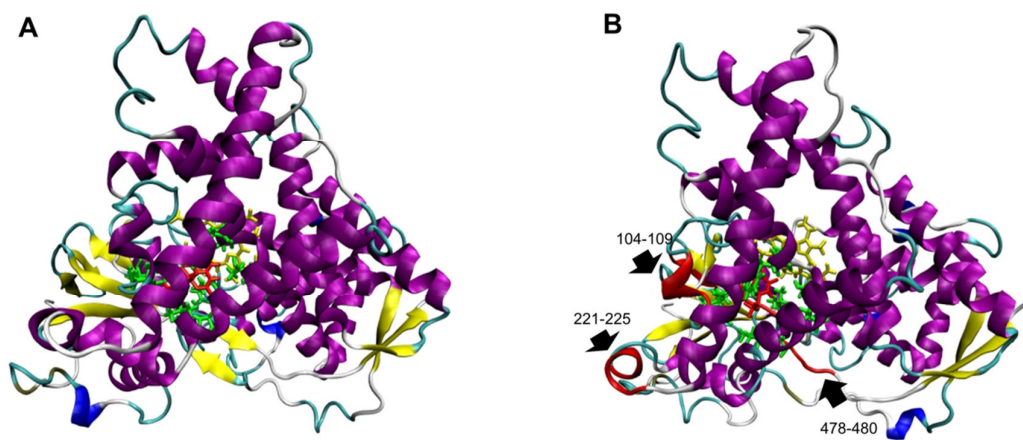
<sup>a</sup> Pearson correlation coefficients ( $r_{(\text{Pear})}$ ) for 11 pairs of comparisons, 95% confidence intervals (CI) and two-tailed P values were calculated using Prism Software V5.04;

<sup>b</sup> Pearson correlation coefficients ( $r_{(\text{Pear})}$ ) for 10 pairs of comparisons (E148D excluded), 95% confidence intervals (CI) and two-tailed P values were calculated using Prism Software V5.04;  $K_M$  values of variants without metabolite formation were set at 400  $\mu\text{M}$  (BUP) and 30 $\mu\text{M}$  (EFV) for analysis purposes. NoD, number of deleterious predictions (see also Table 2 in the main manuscript)

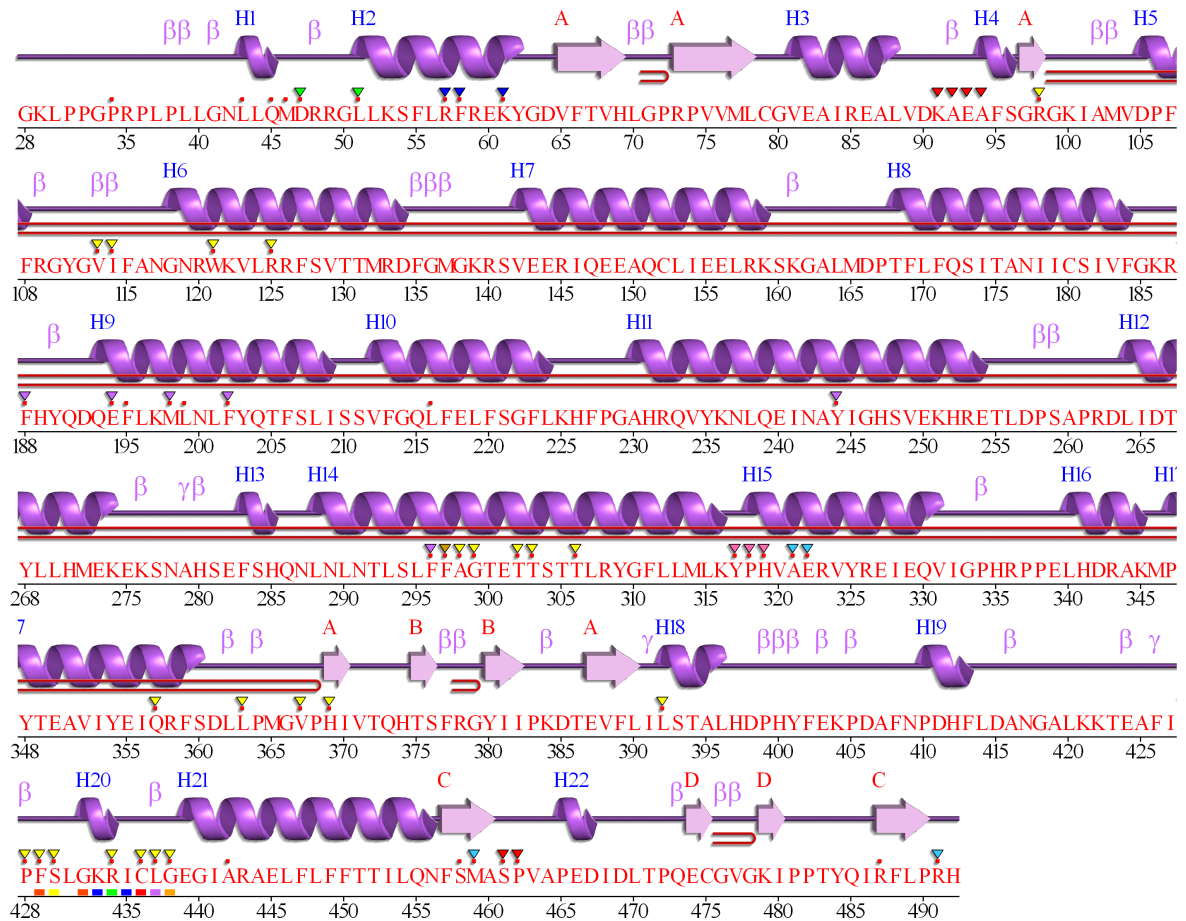
**Supporting Figure S1: Schematic representation of the secondary structures of the WT (A) and I114T (B) variant in complex with bupropion.** The heme group, bupropion and its binding residues are represented by yellow, red and green sticks, respectively. Black arrows indicate disappearance of the  $\alpha$ -helix in the region 221-225 and the formation of single pair of  $\beta$ -sheet hydrogen bonds in the region 478-480 within variant I114T; the 313-317 region is located behind the cavity side surrounding the active site cavity with the two former regions. Figures were generated with the program VMD



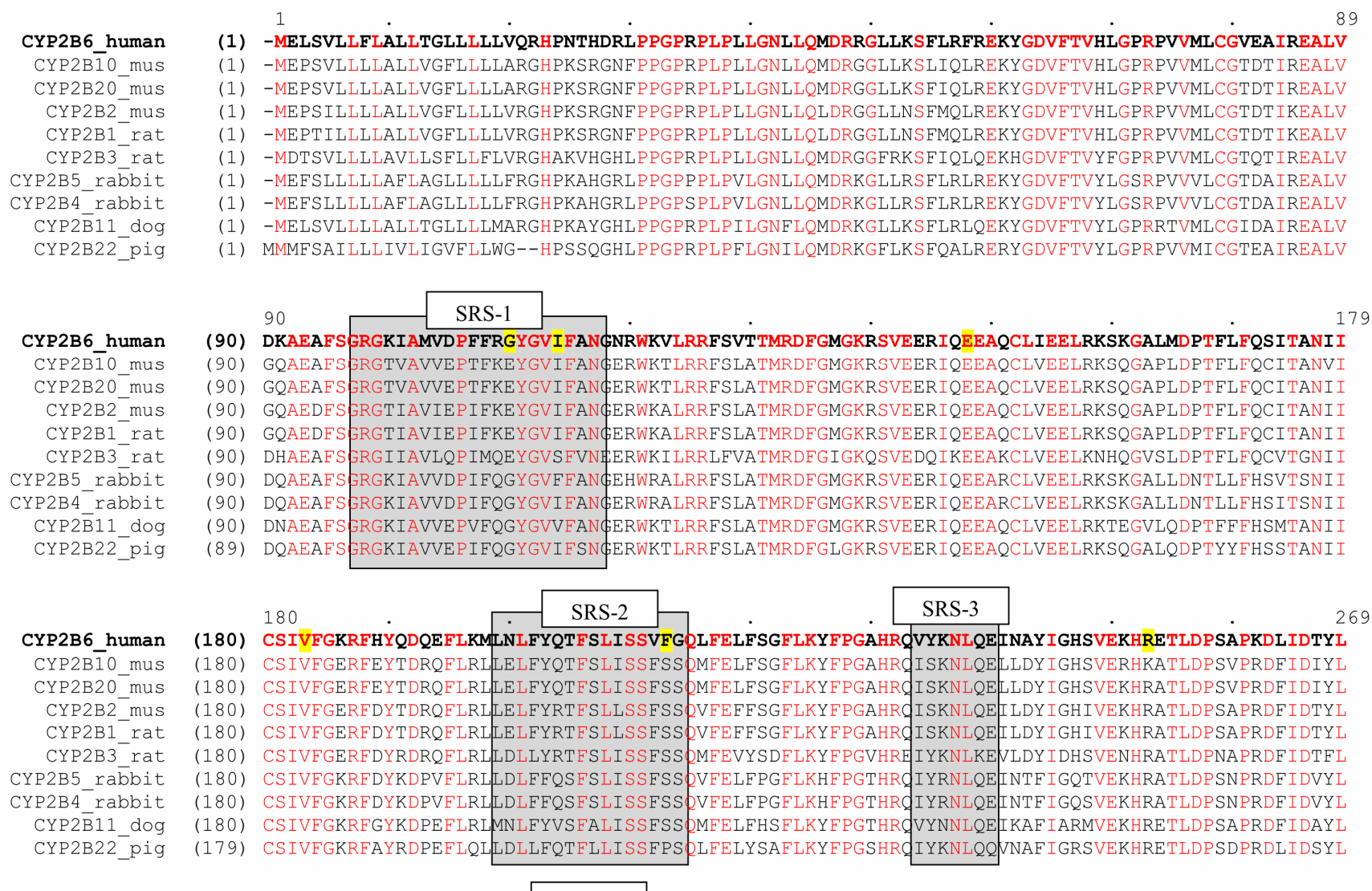
**Supporting Figure S2: Schematic representation of the secondary structures of the WT (A) and V183G (B) variant in complex with efavirenz.** The heme group, efavirenz and its binding residues are represented by yellow, red and green sticks, respectively. In the V183G structure, the disappearance of the  $\alpha$ -helix in the region 104-109 and 221-225 and the formation of single pair of  $\beta$ -sheet hydrogen bonds in the region 478-480 are marked with black arrows. These regions are surrounding the active site cavity of efavirenz. Figures were generated with the program VMD



**Supporting Figure S3:** Secondary structure elements received using PDBsum and 3IBD.



**Supporting Figure S4:** Multiple sequence alignment of mammalian CYP2B protein sequences using AlignX tool (VectorNTI Advance 11.5.1; Invitrogen Life Technologies). Red letters indicate identical residues; variant positions described in this paper are marked in yellow; grey boxes indicate substrate recognition sites (SRS) adopted from Nguyen et al., 2008; residue numbers according to CYP2B6\_human sequence NP\_000758.1 (P20813)





SRS-4

270 379

CYP2B6\_human (270) **LHMEKESNAHSEFHHQNLNLNTLSLFFAGTETTSSTTLRYGFLMLLKYPHVAERVYREIEQVIGPHRPPPELHDKAMPYTEAVIYEIQRF**

CYP2B10\_mus (270) LRMEKEKSNQNAEFHHQNLMMMSVLSLFFVGTETSSSTLHYGFLMLLKYPHVTEKVQKEIDQVIGSHRLPTLDDRTKMPYSDAVIHEIQRF

CYP2B20\_mus (270) LRMEKEKSNQHTEFHHQNLMMMSVLSLFFAGTETSSSTTLRYGFLMLLKYPHVAEKVQKEIDQVIGSHRLPTLDDRTKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B2\_mus (270) LRMEKEKSNHHTEFHHENLMISLLSLFFAGTETGSTTLRYGFLMLLKYPHVTEKVQKEIDQVIGSHRPPSLDDRTKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B1\_rat (270) LRMEKEKSNHHTEFHHENLMISLLSLFFAGTETSSSTTLRYGFLMLLKYPHVAEKVQKEIDQVIGSHRLPTLDDRSKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B3\_rat (270) LHMEKEKLNHYTEFHHWNLMSVLSLFFLAGTETSSNTLCYGFLMLLKYPHVAEKVQKEIDQVIGSQRVPTLDDRSKMPYTEAVIHEIQRF

CYP2B5\_rabbit (270) LRMEKDKSDPSEFHHRNLIILTVLTLFFAGTETTSSTTLRYGFLMLLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDRAKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B4\_rabbit (270) LRMEKDKSDPSEFHHQNLILTVLSLFFAGTETTSSTTLRYGFLMLLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDRAKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B11\_dog (270) IRMDKEKAEPSEFHHRNLIIDTALSLLFFAGTETTSSTTLRYGFLMLLKYPHIAERIYKEIDQVIGPHRLPSLDDRAKMPYTDAVIHEIQRF

CYP2B22\_pig (269) LRMDKEKSNPNSEFHEQNLILTVLSLFFAGTETTSSTTLRYGFLMLLKYPHITERIHKEIDRVIGSHRPPALDDRAKMPYMDAVIHEMQRF

SRS-5

360 440

CYP2B6\_human (360) **SDLLPMGVPHIVTQHTSFRGYIIPKDETEVFLILSTALHDPHYFEKPDAFNPDHFLDANGALKKTEAFIPFSL-----GKRICLGE**

CYP2B10\_mus (360) SDLIPIGVPHRVTKDTLFRGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFEQ PDSFNPDQFLDANGALKKSEAF LPFSTGQIFDQKSVGKRICLGE

CYP2B20\_mus (360) SDLIPIGVPHRVTKDTFMFRGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFEQ PDSFNPDHFLDANGALKKSEAF LPFST-----GKRICLGE

CYP2B2\_mus (360) ADLAPIGLPHRVTKDTFMFRGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFDHPDPTFNPEHFLDADGTLKKSEAFMPFST-----GKRICLGE

CYP2B1\_rat (360) SDLVPIGVPHRVTKDTFMFRGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFDHPDPTFNPEHFLDANGALKKSEAFMPFST-----GKRICLGE

CYP2B3\_rat (360) SDVSPMGLPCRI TKDTLFRGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFEQ PDTFNPEHFLDANGALKKCEAFMPFSI-----GKRMCLGE

CYP2B5\_rabbit (360) GDLVDFGAPHMVTKDTFMFRGYVI PKNTEVFPVLSSALHDPQYFETPNTFNPGHFLDADGALKRNEGFMFSL-----GKRICLGE

CYP2B4\_rabbit (360) GDLIPFGVPHIVTKDTFMFRGYVI PKNTEVFPVLSSALHDPQYFETPNTFNPGHFLDANGALKRNEGFMFSL-----GKRICLGE

CYP2B11\_dog (360) GDLLPIGVPHMVTKDTCFRGYIIPKGTVEVFPILHSA LNDPHYFEKPDVFNPDHFLDANGALKKNEAFIPFSI-----GKRICLGE

CYP2B22\_pig (359) GDLIPMGVPHIVTKDTHFRGYLLPKGTVEVYPI LSSALHDPQYFENPEAFNPDHFLDANGALKKNDAFMFSSI-----GKRICLGE

SRS-6

441 491

CYP2B6\_human (441) **IARAEFLFFTTILQNFMSASPVAPEDIDLTPQECGVGKIPPTYQIRFLPR---**

CYP2B10\_mus (450) IARSELFFFTSILQNFVASHVAPKDIDLTPKESGIGKIPPTYQICFLAR---

CYP2B20\_mus (441) IARPWMKPMKG-----ATPVPGPTMIT-----G-VVGP EFE-----

CYP2B2\_mus (441) IARNELFFFTTILQNFVSSHLAPKDIDLTPKESGIAKIPPTYQICFSAR---

CYP2B1\_rat (441) IARNELFFFTTILQNFVSSHLAPKDIDLTPKESGIGKIPPTYQICFSAR---

CYP2B3\_rat (441) IARSELFFFTTILQNFVSSPVDNPTIDMTPKESGLAKVAVPYKICFVAR---

CYP2B5\_rabbit (441) IARTEFLFFFTTILQNFVSPVPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR---

CYP2B4\_rabbit (441) IARTEFLFFFTTILQNFVSPVPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR---

CYP2B11\_dog (441) IARMELFFFTTILQNFVSPMAPEDIDLTPQEIGVGLKPPVYQISFLSRGGC

CYP2B22\_pig (440) LARTEFLFFFTTILQNFVSPVAPEDIDLTPQAVGVGTVPVPPYQIQFLPRQRG

## 2. Impact de variantes nouvelles et connues du CYP2B6 sur les concentrations plasmatiques d'éfavirenz, de névirapine et de leurs métabolites chez des patients du Rwanda sous thérapie antirétrovirale

### 2.1. Introduction

Le cytochrome P450 CYP2B6 est la principale isoenzyme responsable du métabolisme de l'éfavirenz (EFV) et de la névirapine (NVP). Nous avons récemment caractérisé l'effet de 8 polymorphismes ponctuels (SNP) identifiés dans une population rwandaise sur l'activité CYP2B6 *in vitro*. Le but de cette étude est de déterminer l'influence des huit SNP nouvellement caractérisés et de 22 autres SNP connus de *CYP2B6* sur les concentrations plasmatiques de l'EFV et de la NVP ainsi que de leurs métabolites hydroxylés chez des patients du Rwanda traités par une thérapie antirétrovirale (ART).

### 2.2. Résultats

La fréquence des huit nouveaux polymorphismes dans la population rwandaise s'est révélée être inférieure à 0.9% ce qui les a classés comme variantes rares. Le SNP g.-750T>C du promoteur était prédominant (86.5%) suivi par une fréquence élevée des SNP g.18492T>C (75%), g.21563C>T (36%), c.516G>T (p.Q172H, 35%) et c.785A>G (p.K262R, 34.5%). L'allèle \*6 (c.516G>T, c.785A>G) était le plus abondant (33.5%) suivi des allèles \*18 (c.983T>C, 6%) et \*22 (g.-82T>C, 4.5%). Un nouvel allèle *CYP2B6Rwa7* constitué entre autres des SNP c.341T>C, c.444G>T et c.835G>C a été assigné à huit patients de la cohorte ART. L'haplotype « *CYP2B6-TGT* » (c.516G>T, c.785A>G et g.21563C>T) a été trouvé chez 128 patients sous EFV et 108 patients sous NVP.

Les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre de l'EFV, de la NVP et de leurs principaux métabolites hydroxylés 7-OH-, 8-OH, 8,14-OH EFV et 2-OH-, 3-OH NVP ont été quantifiées par une méthode LC/MS-MS. 71% des 219 patients sous traitement EFV avaient des concentrations supra-optimales tandis que 42% des 212 patients traités par la NVP présentaient des concentrations sub-thérapeutiques. Malgré sa faible représentativité, le nouvel allèle *CYP2B6Rwa7* a été significativement associé à de faibles concentrations en EFV et NVP. Le SNP homozygote g.-750CC et le SNP hétérozygote c.983TC ont été en revanche associés de façon significative à des concentrations élevées en EFV. Des concentrations plasmatiques élevées en EFV et faibles en 7-OH-, 8-OH EFV et 2-OH NVP ont été corrélées de façon significative avec le SNP g.18492T>C de l'intron 5. Par ailleurs, nous avons pu



confirmer que l'haplotype « *CYP2B6*-TGT » (c.516T, c.785G et g.21563T) est fortement associé à des concentrations plasmatiques élevées d'EFV dans notre population et nous avons montré de manière identique son association avec des concentrations élevées de NVP et des faibles taux plasmatiques en 8-OH EFV et 3-OH NVP. La voie métabolique majeure du *CYP2B6* produisant les métabolites 8-OH EFV et 3-OH NVP a été conservée chez tous les patients quel que soit leur génotype, une compensation par une autre voie métabolique n'a pas été révélée chez les patients présentant un allèle déficient (\*6/\*6 ou \*6/\*18 par exemple). Dans des analyses multivariées, le génotype \*6/\*18, le polymorphisme homozygote g.21563TT ainsi que l'haplotype TGT sous sa forme homozygote ont été identifiés comme les principaux facteurs indépendants responsables des concentrations plasmatiques élevées en EFV. Aucun SNP ou génotype du *CYP2B6* n'a pu être mis en évidence dans les analyses multivariées afin de prédire les concentrations plasmatiques de NVP.

### **2.3. Conclusions**

Notre étude a révélé que la majorité des patients traités par l'EFV au Rwanda présentent des concentrations supra-thérapeutiques, tandis qu'un tiers des patients traités à la NVP présente des concentrations sub-thérapeutiques. Nous avons identifié un nouvel allèle *CYP2B6*, nommé *CYP2B6Rwa7*, qui a été significativement associé à des concentrations faibles d'EFV et de NVP. Nous avons confirmé l'existence de marqueurs génétiques permettant de prédire des concentrations supra-thérapeutiques en EFV et souligné le rôle de SNP présents dans les régions introniques dans le métabolisme de l'EFV et de la NVP. Nos résultats ont mis en exergue le rôle de certains SNP en tant que marqueurs des différences interindividuelles du métabolisme de l'EFV et de la NVP dans la population rwandaise. Ils suggèrent une stratégie de génotypage individualisée afin de soutenir l'efficacité et la persistance de l'ART en Afrique Sub-Saharienne.

### **2.4. Publication**

Soumission du manuscrit au Journal of Antimicrobial Chemotherapy

## **IV. Discussion Générale**

L'infection au VIH est une pandémie qui touche plus de 34 millions d'individus dont 23 millions vivent en Afrique Sub-Saharienne. Le plus grand succès de la lutte contre le SIDA peut être attribué à la trithérapie antirétrovirale. Bien que les traitements antirétroviraux ne permettent pas l'éradication complète du virus et la guérison du patient, le développement de différentes classes d'antirétroviraux a diminué la morbidité de l'infection au VIH tout en diminuant le taux de mortalité des personnes infectées. L'accès aux ARV en Afrique Sub-Saharienne s'est nettement amélioré grâce aux antirétroviraux sous la forme de générique et en combinaison fixe. Le Rwanda est un exemple dans la lutte contre le SIDA en Afrique puisque la prévalence du VIH s'est stabilisée dans les 5 dernières années dans le pays et 80% des personnes en besoin d'une thérapie antirétrovirale en bénéficient. La bonne gérance des fonds et des stocks de médicaments ainsi qu'une décentralisation organisée des services de santé en milieu rural par des infirmières qui délivrent les ARV et suivent au plus près l'évolution des patients sont probablement les clés de cette réussite. La thérapie antirétrovirale de première ligne utilisée au Rwanda est constituée de deux INTI (3TC, d4T, ZDV ou TDF) et d'un INNTI (EFV ou NVP). De grandes variabilités interindividuelles et interethniques des concentrations plasmatiques en EFV et NVP ont été décelées (Csajka, Marzolini et al. 2003). Ces fluctuations peuvent être liées en partie aux variations génétiques des cytochromes P450 intervenant dans la dégradation et l'élimination de ces ARV.

Au cours de cette thèse, nous avons décrit trois nouveaux polymorphismes faux-sens dont deux induisent la perte de la fonction enzymatique et caractérisé cinq autres polymorphismes de l'isozyme CYP2B6. Nous avons identifié un nouvel allèle « *CYP2B6Rwa7* » que nous avons associé à des concentrations plasmatiques faibles d'EFV et de NVP chez des patients séropositifs venant du Rwanda. La quantification de l'INNTI EFV a montré que la majorité des concentrations plasmatiques des Rwandais (71%) sont supra-thérapeutiques et très élevées. Le génotype *\*6/\*18*, le polymorphisme homozygote g.21563TT de l'intron 8 et l'haplotype homozygote du *CYP2B6* se sont montrés être les principaux facteurs indépendants responsables des concentrations plasmatiques élevées en EFV. Les concentrations plasmatiques de NVP sont en revanche moins élevées et 42% des patients présentent même une concentration sub-optimale. Aucun génotype du *CYP2B6* ne s'est révélé être prédicteur des concentrations plasmatiques de NVP.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée au séquençage de tous les exons et des jonctions intron/exon du gène *CYP2B6* de 39 individus rwandais. Trois nouveaux

polymorphismes faux-sens [c.548T>G (p.V183G), c.637T>C (p.F213L) et c.758G>A (p.R253H)] et cinq polymorphismes faux-sens [c.329G>T (p.G110V), c.341T>C (p.I114T), c.444G>T (p.E148D), c.835G>C (p.A279P) et c.1459C>A (p.R487S)] récemment enregistrés dans la base de données dbSNP mais dont l'effet sur la fonction du CYP2B6 n'avait pas encore été défini, ont été identifiés dans la population rwandaise. De plus, cinq nouveaux allèles *CYP2B6* nommés *CYP2B6*\*33-\*37 ont pu être définis. La mise en évidence de ces huit SNP chez un nombre restreint d'individus suggérait que ces polymorphismes pouvaient avoir une prévalence élevée dans la population. Le génotypage des SNP dans 2 cohortes rwandaises, sur un total de 806 individus, a cependant montré que leur fréquence est inférieure à 0.9% et qu'il s'agit en fait de polymorphismes rares. En effet, comparé à d'autres populations, les Africains présentent un taux plus important de polymorphismes rares avec des fréquences inférieures à 1% (Raska and Zhu 2011). De plus, une majorité de variations génétiques ayant un impact fonctionnel est incorporée dans le génome africain qui est d'ailleurs connu pour sa grande diversité (Tishkoff, Reed et al. 2009). Les SNP c.329G>T, c.341T>C, c.444G>T, c.835G>C et c.1459C>A ont été décrits récemment dans d'autres populations africaines avec une fréquence comparable. Selon la base de données 1000 Genomes, le SNP c.329G>T de l'exon 2 a été détecté chez deux individus de la tribu Luhya du Kenya de l'ouest à une fréquence de 0.1%. L'allèle mineur C du SNP c.341T>C de l'exon 3 a été trouvé chez un Afro-Américain, trois Kényans et un Nigérian (1000 Genomes) ainsi que dans des populations américaine (NHLBI GO Exome Sequencing Project, ESP), européenne (ClinSeq Project) et zimbabwéenne (Jamshidi, Moreton et al. 2010) à des fréquences variant de 0.2 à 1.3%. Jamshidi *et al.* ont décrit le SNP c.444G>T de l'exon 3 dans une population zimbabwéenne à une fréquence de 1.3% (Jamshidi, Moreton et al. 2010). D'autres fréquences variant de 0.2% (1000 Genomes) à 0.4% (NHLBI GO Exome Sequencing Project, ESP) ont été déterminées pour le même polymorphisme dans des populations d'origine africaine ou caucasienne. Des fréquences de 0.2% (ClinSeq Project), 0.4% (NHLBI GO Exome Sequencing Project, ESP) et 0.3% (1000 Genomes) ont été calculées pour le SNP c.835G>C qui est apparu sous sa forme hétérozygote chez cinq Nigériens, un Kényan et un Afro-Américain dans la base de données 1000 Genomes. Le SNP c.1459C>A de l'exon 9 a été décrit dans une population ougandaise avec une fréquence de 0.7% (Jamshidi, Moreton et al. 2010).

La variante E148D du CYP2B6 résultant du SNP c.444G>T a été décrite en 2007 par Rotger et ses collègues lorsqu'ils ont assigné l'allèle *CYP2B6*\*29 qui correspond à la forme hybride du gène *CYP2B7/CYP2B6* (Rotger, Saumoy et al. 2007). Ce gène résulte d'une

recombinaison croisée au niveau de l'intron 4 entre le pseudogène *CYP2B7* et le gène *CYP2B6* qui provoque un échange des quatre premiers exons du gène *CYP2B6* par ceux du *CYP2B7*. Contrairement à la variante E148D déterminée au sein de la population rwandaise, la variante codée par l'allèle \*29 résulte du polymorphisme c.444G>C, la deuxième possibilité de substitution de ce SNP triallélique. Les quatre premiers exons du pseudogène *CYP2B7* présentent d'autres polymorphismes qui sont adjacents à ceux décrits chez les Rwandais. Ainsi, les SNP c.340A>C, c.547G>A et c.638T>C de l'allèle \*29 codent pour les variantes I114L, V183I et F213S. Etant donné que l'allèle *CYP2B6*\*29 contient entre autres les variantes Q172H et M198T qui sont respectivement les marqueurs des allèles non-fonctionnels \*6 et \*27, les auteurs ont conclu que l'allèle \*29 est inactif et n'ont pas analysé la fonction des autres variantes.

La plupart des variations génétiques rares, même sous leur forme hétérozygote, peuvent avoir un effet délétère sur la structure protéinique et modifient le phénotype (Marth, Yu et al. 2011; Raska and Zhu 2011). Nous avons déterminé *in vitro* l'expression et l'activité enzymatique de chacun des huit polymorphismes c.329G>T, c.341T>C, c.444G>T, c.548T>G, c.637T>C, c.758G>A, c.835G>C et c.1459C>A. Les quatre SNP c.329G>T, c.341T>C, c.548T>G et c.637T>C codent pour des protéines à fonction réduite ou complètement inactives ce qui confirme les observations faites par Marth *et al.* (Marth, Yu et al. 2011). Les SNP c.444G>T, c.758G>A, c.835G>C et c.1459C>A diminuent l'expression de la protéine *CYP2B6* de plus de 80% par rapport à la protéine sauvage mais les isozymes ont présenté une activité catabolique normale.

Nos résultats soulignent le fait qu'il existe de nombreux polymorphismes non-caractérisés au sein des gènes des cytochromes P450. Le projet 1000 Genomes a par exemple montré que chaque génome humain contient environ 250 à 300 gènes qui ont perdu leur fonction à cause de variations génétiques (Genomes Project, Abecasis et al. 2010). Les méthodes d'analyse classiques qui permettent de déterminer *in vitro* la fonction enzymatique d'une nouvelle variante *CYP* sont cependant coûteuses, longues et ne permettent pas l'analyse simultanée d'un grand nombre de polymorphismes.

Une alternative est la prédiction *in silico* de la fonction des variantes d'isozymes en se basant sur des données phylogénétiques ou sur une combinaison entre plusieurs alignements de séquence et des paramètres structurels de la protéine (Adzhubei, Schmidt et al. 2010; Thusberg, Olatubosun et al. 2011). Néanmoins, tous les programmes informatiques utilisés pour prédire le phénotype diffèrent dans la composition de leur algorithme. Peu d'études ont été réalisées pour comparer le pouvoir prédictif des algorithmes avec la fonction des variantes

déterminée *in vitro* bien qu'il soit important de connaître l'exactitude de la prédiction (To, Liu et al. 2009; Thusberg, Olatubosun et al. 2011; Zou, Baitei et al. 2011). Nous avons ainsi comparé la fonction enzymatique des huit variantes CYP2B6 avec la prédiction de leur phénotype provenant des huit algorithmes SIFT human protein, SNAP, SNPs&GO, PhD SNP, PolyPhen2, nsSNP Analyzer, SNPs3D et MutPred. L'exactitude de la prédiction des programmes informatiques s'est avérée être entre 60% et 80% et la meilleure valeur était obtenue par les algorithmes SNPs&GO et PolyPhen2. Ces résultats sont identiques à ceux de la littérature où l'exactitude de la prédiction des programmes informatiques validés se situe entre 60% (nsSNP Analyzer) et 82% (SNPs&GO) (To, Liu et al. 2009; Thusberg, Olatubosun et al. 2011).

Afin de mieux comprendre l'impact des huit variantes sur la fonction du CYP2B6, des modèles de liaison substrat-enzyme (analyses de docking) et des simulations de dynamique moléculaire à long terme ont été réalisés par le Dr Karthik Arumugam du Laboratoire de Rétrovirologie. Ainsi, l'effet de chaque variante sur la liaison du substrat au niveau du site catalytique de l'enzyme ou sur la structure secondaire du CYP2B6 a été étudié sur un modèle de l'enzyme basée sur la structure cristallographique du CYP2B6 (en conformation avec un substrat) ainsi que sur la description des sites de reconnaissance des substrats et du site actif de l'enzyme (Gotoh 1992; Gay, Shah et al. 2010; Niu, Zheng et al. 2011). Cette analyse s'avère importante car environ la moitié de toutes les variations génétiques de la population humaine déstabilise la structure protéinique et même 74% des variations responsables d'une maladie perturbent la structure secondaire de la protéine (Yue, Li et al. 2005; Allali-Hassani, Wasney et al. 2009). Bien que les analyses de docking aient montré que les substrats avaient une forte probabilité de se lier dans le site actif de chaque variante, nous avons constaté que la stabilité du complexe ligand-protéine des variantes p.G110V, p.I114T, p.E148D, p.V183G et p.F213L était diminuée parce qu'aucune interaction forte entre les ligands EFV et bupropione et l'un des acides aminés du site actif du CYP2B6 n'a pu être déterminée. De plus, les variantes p.G110V, p.I114T, p.V183G et p.F213L induisent des changements structuraux d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  dans la région qui entoure le site de liaison de l'enzyme CYP2B6. Nous pouvons spéculer que les changements de ces acides aminés situés à proximité du site actif de l'enzyme ont entraîné des modifications de la structure secondaire qui ont alors perturbé le mode de liaison de l'enzyme avec son substrat et affecté l'activité catabolique de CYP2B6. En effet, la plasticité de toute la protéine CYP et la réorientation structurale de résidus du site actif jouent un rôle non négligeable dans l'activité des isozymes du cytochrome P450 (Zhao and Halpert 2007; Shah, Pascual et al. 2011). Finalement, les

analyses de docking, par la mesure de l'énergie totale de liaison entre le substrat et le site actif, se sont révélées être plus exactes que les outils de prédiction pour prédire l'impact des polymorphismes sur la fonction de l'enzyme (notamment pour prédire le Km des variantes) car seule la fonction de la variante E148D n'a pas été correctement corrélée aux résultats des approches de modélisation. Cependant, ces analyses sont trop longues et trop laborieuses pour être utilisées facilement comme outil de prédiction de l'activité des cytochromes.

Suite à la découverte des nouvelles variantes chez quelques individus rwandais et la détermination *in vitro* et *in silico* de leur phénotype, la deuxième partie de la thèse a consisté à définir chez des patients rwandais infectés au VIH la fréquence des nouveaux polymorphismes et d'un ensemble de SNP connus pour affecter soit l'expression, soit l'activité de l'isozyme CYP2B6 ainsi que d'associer ces polymorphismes aux concentrations plasmatiques d'EFV et de NVP et de leur métabolites hydroxylés.

Selon UNAIDS, une des interventions les plus fructueuses dans le domaine de la santé publique a été la mise à la disposition d'une thérapie antirétrovirale en combinaison à dose fixe à plus de 6.2 million de patients infectés au VIH en Afrique Sub-Saharienne. Des études menées entre 2000 et 2011 au KwaZulu-Natal de l'Afrique du sud ont montré qu'une thérapie antirétrovirale permet d'augmenter l'espérance de vie des patients infectés et de diminuer la transmission du VIH (Bor, Herbst et al. 2013; Tanser, Barnighausen et al. 2013). Ces résultats ne peuvent cependant être atteints que si les patients sont adhérents au traitement car toute augmentation de l'adhérence est fortement associée à une meilleure réponse virologique. Dans le cas contraire, des virus résistants peuvent facilement émerger, surtout si les différents antirétroviraux ont des demi-vies différentes. Etant donné que les INNTI ont une faible barrière génétique qui facilite la sélection rapide de virus résistants, un traitement aux INNTI est non conseillé chez des personnes ayant une adhérence inférieure à 90% (Nachega, Hislop et al. 2007). Des interruptions de la thérapie dues par exemple à un épuisement du stock d'antirétroviraux ne peuvent malheureusement pas être exclues dans les pays en voie de développement (Lamorde, Byakika-Kibwika et al. 2008). D'autres facteurs, comme des contraintes financières, mais aussi la consommation excessive d'alcool, la prise de substances issues de la médecine traditionnelle et les effets secondaires des INNTI EFV et NVP peuvent influencer l'ART et provoquer la diminution de l'adhérence aux antirétroviraux (Kip, Ehlers et al. 2009). L'interruption des traitements EFV et NVP peut aussi être associée aux variations génétiques des gènes *CYP2B6*, *CYP2A6* et *CYP3A4*. En effet, une corrélation entre la diminution du métabolisme de l'EFV et l'interruption de l'ART a été observée (Lubomirov,

Colombo et al. 2011). Cette corrélation est encore plus nette en cas de concentrations plasmatiques très élevées résultant de deux allèles *CYP2B6* non-fonctionnels et d'une diminution ou perte de la fonction des voies métaboliques alternatives (*CYP2A6* et *CYP3A4*). A l'opposé, une interruption de traitement à cause de symptômes neuropsychiatriques n'est pas toujours associée à une augmentation de la concentration plasmatique en EFV due par exemple à la présence du polymorphisme 516G>T de l'allèle non-fonctionnel *CYP2B6*\*6 (Powers, Ward et al. 2009; Read, Carey et al. 2009; To, Liu et al. 2009).

La médiane des concentrations plasmatiques de l'EFV et la concentration maximale en EFV déterminées chez nos patients sont respectivement de 5.94 µg/mL et de 68.75 µg/mL. Comparées à la littérature, ces concentrations sont élevées et dépassent largement le taux thérapeutique de l'EFV allant de 1 à 4 µg/mL (Marzolini, Telenti et al. 2001). Des médianes de 1.6 µg/mL, 2.2 µg/mL, 2.4 µg/mL et 3.9 µg/mL ont été mises en évidence chez des Ghanéens, des Caucasiens et des individus Noirs d'Afrique du Sud (Marzolini, Telenti et al. 2001; Kwara, Lartey et al. 2009; Gounden, van Niekerk et al. 2010; Orrell, Cohen et al. 2011). Tandis qu'une concentration maximale en EFV de 15.23 µg/mL a été mesurée chez un Caucasien, des concentrations maximales allant de 23 µg/mL à 60 µg/mL ont également été détectées chez d'autres populations africaines (Marzolini, Telenti et al. 2001; Nyakutira, Roshammar et al. 2008; Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009; Gounden, van Niekerk et al. 2010). Par comparaison, au Ghana, la médiane des concentrations plasmatiques d'EFV liées au *CYP2B6* 516TT était cinq fois supérieure aux médianes calculées pour les génotypes 516GT et 516GG. Au Rwanda, elle était 3.4 et 4.1 fois supérieure aux médianes des personnes hétérozygotes 516GT et homozygotes sauvages 516GG. Les concentrations plasmatiques en NVP mesurées dans la population rwandaise (médiane de 3.84 µg/mL et moyenne de 3.48 µg/mL) se sont révélées comparables (Mahungu, Smith et al. 2009) ou inférieures (Rendon, Nunez et al. 2005; Penzak, Kabuye et al. 2007; Byakika-Tusiime, Chinn et al. 2008) à celles décrites chez des Caucasiens et des Africains, notamment pour les homozygotes 516TT (4.53 µg/mL pour les Rwandais versus 8.2 µg/mL pour les Caucasiens (Mahungu, Smith et al. 2009)).

A notre connaissance, nous avons quantifié pour la première fois les métabolites 7-hydroxy-, 8-hydroxy- et 8,14-dihydroxyefavirenz ainsi que les métabolites 2-hydroxy- et 3-hydroxynévirapine chez des individus africains infectés par le VIH et associé significativement leur concentration à la variabilité génétique du *CYP2B6*. Ogburn *et al.* ont montré que l'isozyme *CYP2B6* est le principal acteur dans la formation du métabolite 8-



hydroxyefavirenz. En effet, l'AUC du 8-hydroxyefavirenz était supérieure à celle du 7-hydroxyefavirenz qui était plus élevée que celle du 8,14-dihydroxyefavirenz (Ogburn, Jones et al. 2010). Nous avons pu faire la même observation chez les patients rwandais qui ont également des concentrations plasmatiques plus élevées en 8-hydroxyefavirenz qu'en 7-hydroxy- ou 8,14-dihydroxyefavirenz. A l'opposé, Avery *et al.* ont quantifié l'EFV et ses trois métabolites chez 12 Afro-Américains qui étaient tous sous traitement d'EFV pendant au moins quatre semaines (Avery, VanAusdall et al. 2013). Parmi les métabolites, le 8-hydroxyefavirenz était le plus abondant chez ces patients, suivi par les métabolites 8,14-dihydroxyefavirenz et 7-hydroxyefavirenz en accord avec une autre étude (Jiang, Desta et al. 2013).

Etant donné que la concentration plasmatique en 8-hydroxyefavirenz des patients rwandais était toujours plus élevée que celle du 7-hydroxyefavirenz quel que fût le génotype du *CYP2B6*, même en présence des allèles défectueuses \*6/\*6 ou \*6/\*18, une compensation de la voie métabolique principale par le *CYP2A6* ainsi proposée par di Iulio *et al.* en présence d'allèles non-fonctionnels du *CYP2B6* n'a pas pu être clairement démontrée (di Iulio, Fayet et al. 2009). Cependant, étant donné que la prévalence d'allèles du *CYP2A6* à fonction réduite ou non-fonctionnels est relativement élevée chez les Africains (22% comparée à 9% chez les Caucasiens), la présence d'allèles LOF du gène *CYP2A6* ou la combinaison de ces allèles avec des variantes non-fonctionnelles du gène *CYP2B6* et *CYP3A4* pourrait expliquer les concentrations plasmatiques très élevées de l'EFV observées chez nos patients rwandais (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009; di Iulio, Fayet et al. 2009; Kwara, Lartey et al. 2009). Rowland et ses collègues ont constaté que la concentration moyenne du 3-hydroxynévirapine résultant de l'action des isozymes *CYP2B6* était supérieure à celle du 2-hydroxynévirapine produit par les isozymes *CYP3A* (646 ng/mL versus 186 ng/mL) (Rowland, MacGregor et al. 2007). Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par Cammett *et al.* (Cammett, MacGregor et al. 2009). Chez les patients rwandais, la concentration moyenne du métabolite 3-hydroxynévirapine (32 ng/mL) était aussi supérieure à celle du métabolite 2-hydroxynévirapine (14 ng/mL). Ces concentrations sont néanmoins plus faibles que celles rapportées précédemment. Ceci est probablement dû à une concentration moyenne plus faible de NVP, à la variabilité interethnique et au fait que nous avons quantifié les métabolites hydroxylés sans déconjuguer les métabolites glucuronés par l'action de la  $\beta$ -glucuronidase à l'inverse de ces travaux.

Etant donné la grande variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique des INNTI EFV et NVP qui peut conduire à des concentrations plasmatiques supra-optimales voir toxiques, certains auteurs ont proposé une réduction de la posologie de ces inhibiteurs afin d'en diminuer les effets secondaires et de ramener les concentrations plasmatiques vers leur taux thérapeutique. Le polymorphisme *CYP2B6* 516G>T a été fortement associé à des concentrations plasmatiques élevées en EFV et à une augmentation des effets neurotoxiques (Haas, Ribaldo et al. 2004; Rotger, Colombo et al. 2005; Rakhmanina and van den Anker 2010). Le SNP 516G>T a aussi été lié à une prolongation du temps d'élimination due à la demi-vie et au risque de développer des résistances après une interruption du traitement à l'EFV. Nous avons trouvé une fréquence élevée de ce SNP dans la population rwandaise (35%) comme dans d'autres populations africaines (49%) comparé aux Afro-Américains (28%), aux Caucasiens (26%) et aux Japonais (14%) (Klein, Lang et al. 2005). Une optimisation de la dose dans les pays de l'Afrique Sub-Saharienne peut s'avérer utile, notamment dans le cas de concentrations d'EFV très élevées. Nyakutira *et al.* ont mis en évidence dans un modèle pharmacocinétique de population appliqué au Zimbabwe qu'une réduction de 35% de la dose en EFV chez les individus homozygotes de l'allèle *CYP2B6*\*6 (516TT-785GG) permettrait de maintenir la concentration plasmatique en EFV entre les concentrations limites du taux thérapeutique sans réduire l'effet thérapeutique de la trithérapie (Nyakutira, Roshammar et al. 2008). Suite aux résultats obtenus par un modèle pharmacocinétique de population basé sur la diversité allélique des gènes *CYP2B6*, *CYP2A6* et *CYP3A4/5*, Arab-Alameddine et ses collègues ont proposé une dose journalière de 200 mg d'EFV chez les individus à fonction réduite du *CYP2B6* afin d'obtenir des concentrations plasmatiques qui ne dépassent pas le taux thérapeutique (Arab-Alameddine, Di Iulio et al. 2009). Gatanaga et ses collègues ont constaté que les Japonais à génotypes *CYP2B6* \*6/\*6 et \*6/\*26 (499CG, 516GT et 785AG) présentent des concentrations plasmatique en EFV supérieures à 6 µg/mL (Gatanaga, Hayashida et al. 2007). Une réduction de la dose à 400 mg ou 200 mg par jour a permis d'améliorer chez la plupart des patients les symptômes liés au système nerveux central tout en conservant une charge virale indétectable. Van Luin *et al.* ont observé qu'un nombre plus faible de patients qui reçoivent une dose journalière de 400 mg d'EFV, interrompe le traitement à cause de la neurotoxicité par rapport à des patients traités par la dose habituelle de 600 mg par jour (van Luin, Gras et al. 2009). Ainsi, la diminution de la médiane des concentrations plasmatiques en EFV a permis l'amélioration de l'adhérence chez ces patients. De plus, la réduction de la posologie n'a pas diminué l'efficacité de la suppression virale et n'a pas engendré de concentrations plasmatiques sub-thérapeutiques.

Dans le cas de la NVP, Schipani *et al.* ont déterminé dans un modèle pharmacocinétique et pharmacogénétique de population que le SNP homozygote 516TT et le SNP hétérozygote 983TC du gène *CYP2B6* diminuent la clairance de la NVP alors que le poids de l'individu l'augmente (Schipani, Wyen et al. 2011). Ainsi, une simulation d'un changement de la posologie journalière de 2 x 200 mg à 1 x 400 mg de NVP dans le but d'améliorer l'adhérence pourrait aboutir à des taux sub-thérapeutiques. Cet effet a été compensé chez les patients porteurs des polymorphismes 516TT ou 983TC qui présentent alors des concentrations thérapeutiques.

Un tel ajustement de la dose des INNTI EFV et NVP pourrait aussi être envisagé au Rwanda car la fréquence des SNP 516G>T et 983T>C y est respectivement de 34.9% et 6.1% et les concentrations d'EFV sont très élevées. Cependant, de nouvelles études doivent être menées pour démontrer si ces fortes concentrations sont associées à des effets toxiques et à une diminution de l'adhérence des patients. Une diminution de la posologie ne permet pas seulement de soulager les symptômes des patients, symptômes dus aux effets secondaires des INNTI, mais diminue aussi le risque de développer des particules virales résistantes suite à des interruptions de thérapie. Cette stratégie permettrait de réduire les coûts de traitement car les antirétroviraux de deuxième ligne sont chers et rarement disponibles au Rwanda comme dans tous les pays en voie de développement.

Toute adaptation de la dose doit néanmoins être combinée à des analyses de pharmacovigilance et ne peut guère être appliquée à la population entière. Rodriguez-Novoa *et al.* ont par exemple constaté que 19% des patients porteurs sauvages du SNP 516G>T présentent déjà des concentrations sub-thérapeutiques de l'EFV lors d'un traitement à posologie normale (Rodriguez-Novoa, Barreiro et al. 2005). De plus, la rifampicine qui est souvent co-administrée avec l'EFV en Afrique Sub-Saharienne peut provoquer une réduction de 20% à 30% de la concentration d'EFV (Lopez-Cortes, Ruiz-Valderas et al. 2002). Une posologie de 400 mg en EFV engendrerait dans ces cas des concentrations plasmatiques sub-optimales et une inefficacité de la suppression antivirale. La surveillance du taux thérapeutique des inhibiteurs de protéases et des INNTI permet d'obtenir des informations sur l'exposition de ces antirétroviraux et d'adapter la dose selon les besoins pour augmenter l'efficacité et réduire la toxicité du traitement (Rendon, Nunez et al. 2005). Afin de renforcer l'ajustement de la posologie, la pharmacovigilance peut être combinée à la pharmacogénomique. Les différences phénotypiques observées chez certains patients, à savoir les variations des concentrations d'antirétroviraux et les effets secondaires, sont ainsi liées au

génotype des patients. Figueroa *et al.* ont souligné le grand pouvoir diagnostique obtenu grâce à la combinaison de la pharmacovigilance et des tests pharmacogénétiques (Cabrera Figueroa, Fernandez de Gatta et al. 2010). En effet, 79.2% des patients qui avaient des concentrations plasmatiques d'EFV situées au-delà du taux thérapeutique présentaient une anomalie génétique à la position 516 du cytochrome P450 *CYP2B6*. Selon les auteurs, la caractérisation du génotype facilite aussi le choix de la meilleure dose d'EFV lors de l'initiation d'un traitement. Etant donné que le profil génétique ne change pas au cours du temps, le génotypage réalisé pour améliorer un traitement peut servir à choisir ultérieurement d'autres agents pharmacologiques et leurs doses adéquates (Haas 2005). Il a été estimé que 76% de la variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques en EFV ne sont pas expliquables par le génotype du *CYP2B6* (Nyakutira, Roshammar et al. 2008). La pharmacocinétique de population est un bon modèle qui permet d'identifier les facteurs non-génétiques comme l'alimentation, l'interaction entre médicaments, l'adhérence, l'âge et le poids qui influencent la cinétique des antirétroviraux (Cabrera Figueroa, Fernandez de Gatta et al. 2010; Gervasini, Benitez et al. 2010; Schipani, Wyen et al. 2011). Parmi ces facteurs, l'interaction entre différents médicaments semble être la plus importante parce qu'elle a une grande influence sur la réponse médicamenteuse par inhibition ou induction de l'activité des isozymes du cytochrome P450 permettant ainsi d'expliquer la différence qui peut exister entre le génotype et le phénotype. La surveillance du taux thérapeutique des antirétroviraux a aussi son importance dans la vérification de la qualité des antirétroviraux sous forme de générique et de leur efficacité dans la population cible (Byakika-Kibwika, Lamorde et al. 2008; Byakika-Tusiime, Chinn et al. 2008). La pharmacovigilance permet aussi de surveiller l'adhérence du patient au traitement d'EFV ou de NVP (Acosta, Gerber et al. 2002). Il faut cependant noter que la concentration plasmatique mesurée lors d'un examen médical peut être adéquate alors que le patient n'a pris ses médicaments que quelques jours avant sa visite médicale. Un tel résultat peut provoquer un ajustement de dose inapproprié (Podsadecki, Vrijens et al. 2008). La pharmacovigilance ne peut donc pas déterminer l'adhérence à long terme d'un patient sur base d'un seul échantillon plasmatique. Selon Gandhi *et al.*, l'utilisation du plasma comme matrice pour suivre la concentration d'EFV a encore d'autres inconvénients : étant donné que la concentration plasmatique varie selon la durée entre la prise du médicament et la prise de sang, la pharmacovigilance dépend de l'information exacte fournie par le patient sur la dernière prise des antirétroviraux (Gandhi, Greenblatt et al. 2012). En outre, des variations intraindividuelles de la nutrition, de la prise d'autres médicaments et de la consommation de drogues peuvent influencer les taux plasmatiques et requièrent le prélèvement de plusieurs

échantillons de plasma récoltés sur plusieurs jours pour en tirer des conclusions correctes. Comme cette pratique s'avère difficile en routine, les auteurs ont proposé de suivre les concentrations d'EFV dans les cheveux qui ne sont pas influencé par ces facteurs et qui ont accumulé pendant quelques semaines à plusieurs mois les concentrations de l'EFV présentes dans la circulation systémique. Une autre limitation de la pharmacovigilance en thérapie antirétrovirale est l'interprétation de la concentration de différents ARV présents dans le même échantillon plasmatique, surtout si les médicaments ont des propriétés pharmacocinétiques différentes [Nettles 2006].

L'utilisation de la pharmacovigilance en routine dans les pays développés est plutôt limitée car de nombreuses classes d'ARV sont maintenant disponibles et peuvent remplacer les antirétroviraux en cas de toxicité ou d'échec thérapeutique (Boffito, Acosta et al. 2005). Au contraire, au Rwanda, le choix d'ARV de deuxième ligne est restreint. Des tests de pharmacovigilance et de pharmacogénomique sont à conseiller, mais ces analyses sont encore trop coûteuses et ne peuvent pas être réalisées en routine. L'analyse de certains marqueurs génétiques comme par exemple les SNP c.516G>T, c.983T>C ou g.21563C>T du *CYP2B6* pourrait déjà être une alternative pour améliorer l'efficacité de l'ART et pour choisir la bonne dose au moment de l'initiation du traitement.

En tant que perspectives de ce travail de thèse, nous proposons le génotypage d'autres gènes du cytochrome P450 chez les patients traités au Rwanda. La mise en évidence d'éventuels polymorphismes au niveau de ces gènes permettra de mieux élucider les voies métaboliques des INNTI EFV et NVP et d'expliquer les fortes concentrations d'EFV ou les faibles concentrations de NVP mesurées chez les patients rwandais. Au cours de cette thèse, nous avons par ailleurs séquencé les gènes *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP3A5* et le gène de l'UDP-glucuronosyltransférase *UGT2B7* de 34 patients rwandais par séquençage à haut débit (GS FLX, Roche) afin d'évaluer la variabilité génétique de ces gènes et d'identifier de nouveaux polymorphismes ou allèles. Ces données seront analysées dans un futur projet de recherche. L'analyse génétique pourra par la suite s'étendre sur les gènes de transporteurs membranaires comme par exemple l'*ABCC10* (*MRP7*) dont le SNP rs2125739 a été significativement associé à une faible concentration plasmatique en NVP (Liptrott, Pushpakom et al. 2012).

Lors du séquençage des neuf exons et des jonctions intron exon du *CYP2B6*, nous avons identifié une série de nouveaux polymorphismes introniques qui pourraient eux-aussi avoir un

impact sur les concentrations plasmatiques des INNTI car ils semblent être liés à d'autres polymorphismes de CYP2B6 ayant un effet sur le métabolisme des INNTI. La mise en évidence de leur présence dans différents haplotypes peut être envisagée. Finalement, en collaboration avec le « Kenya Medical Research Institute », nous allons rechercher la présence du nouvel allèle *CYP2B6Rwa7* dans une deuxième population africaine venant cette fois-ci du Kenya afin de confirmer ou non son association avec des concentrations faibles d'EFV et de NVP. Dans cette nouvelle étude, les données cliniques (charge virale, taux de CD4<sup>+</sup>, âge, sexe, poids, adhérence, effets toxiques) vont être collectées, ce qui permettra d'analyser l'impact de ces facteurs sur les concentrations plasmatiques ainsi que le lien entre le génotype des patients et les effets thérapeutiques des INNTI EFV et NVP.

# **Bibliographie**

- Abdool Karim, Q., S. S. Abdool Karim, et al. (2010). "Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women." Science **329**(5996): 1168-1174.
- Acosta, E. P., J. G. Gerber, et al. (2002). "Position paper on therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents." AIDS Research and Human Retroviruses **18**(12): 825-834.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, et al. (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." Nat Methods **7**(4): 248-249.
- AIDS Info (2005). Side effects of anti-HIV medications. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents, U.S. Department of Health and Human Services: 14.
- Allali-Hassani, A., G. A. Wasney, et al. (2009). "A survey of proteins encoded by non-synonymous single nucleotide polymorphisms reveals a significant fraction with altered stability and activity." Biochemical Journal **424**(1): 15-26.
- Anderson, P. L., C. L. Aquilante, et al. (2009). "Atazanavir pharmacokinetics in genetically determined CYP3A5 expressors versus non-expressors." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **64**(5): 1071-1079.
- Anderson, P. L., J. Lamba, et al. (2006). "Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **42**(4): 441-449.
- Antinori, A., M. Zaccarelli, et al. (2002). "Cross-resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling efavirenz after nevirapine failure." AIDS Research and Human Retroviruses **18**(12): 835-838.
- Antiretroviral Therapy Cohort, C. (2008). "Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies." Lancet **372**(9635): 293-299.
- Arab-Alameddine, M., J. Di Iulio, et al. (2009). "Pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of efavirenz in HIV-1-infected individuals." Clinical Pharmacology and Therapeutics **85**(5): 485-494.
- Ariyoshi, N., M. Miyazaki, et al. (2001). "A single nucleotide polymorphism of CYP2b6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation." Biochemical and Biophysical Research Communications **281**(5): 1256-1260.
- Ariyoshi, N., M. Ohara, et al. (2011). "Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **39**(11): 2045-2048.
- Arts, E. J. and D. J. Hazuda (2012). "HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(4): a007161.
- Autar, R. S., F. W. Wit, et al. (2005). "Nevirapine plasma concentrations and concomitant use of rifampin in patients coinfecting with HIV-1 and tuberculosis." Antivir Ther **10**(8): 937-943.
- Avery, L. B., J. L. VanAusdall, et al. (2013). "Compartmentalization and antiviral effect of efavirenz metabolites in blood plasma, seminal plasma, and cerebrospinal fluid." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **41**(2): 422-429.
- Avihingsanon, A., W. Manosuthi, et al. (2008). "Pharmacokinetics and 48-week efficacy of nevirapine: 400 mg versus 600 mg per day in HIV-tuberculosis coinfection receiving rifampicin." Antivir Ther **13**(4): 529-536.
- Bachelor, L. T., E. D. Anton, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(9): 2475-2484.
- Bae, S. K., Y. J. Jeong, et al. (2011). "Identification of human UGT isoforms responsible for glucuronidation of efavirenz and its three hydroxy metabolites." Xenobiotica **41**(6): 437-444.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
- Bekker, L. G., C. Beyrer, et al. (2012). "Behavioral and biomedical combination strategies for HIV prevention." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(8).
- Belanger, A. S., P. Caron, et al. (2009). "Glucuronidation of the antiretroviral drug efavirenz by UGT2B7 and an in vitro investigation of drug-drug interaction with zidovudine." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **37**(9): 1793-1796.
- Bertrand, J., J. M. Treluyer, et al. (2009). "Influence of pharmacogenetics on indinavir disposition and short-term response in HIV patients initiating HAART." European Journal of Clinical Pharmacology **65**(7): 667-678.
- Blievernicht, J. K., E. Schaeffeler, et al. (2007). "MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of CYP2B6 single-nucleotide polymorphisms." Clinical Chemistry **53**(1): 24-33.
- Boesecke, C. and D. A. Cooper (2008). "Toxicity of HIV protease inhibitors: clinical considerations." Curr Opin HIV AIDS **3**(6): 653-659.
- Boffito, M., E. Acosta, et al. (2005). "Current status and future prospects of therapeutic drug monitoring and applied clinical pharmacology in antiretroviral therapy." Antivir Ther **10**(3): 375-392.



- Bor, J., A. J. Herbst, et al. (2013). "Increases in adult life expectancy in rural South Africa: valuing the scale-up of HIV treatment." Science **339**(6122): 961-965.
- Borrow, P., H. Lewicki, et al. (1997). "Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus." Nature Medicine **3**(2): 205-211.
- Bumpus, N. N. and P. F. Hollenberg (2008). "Investigation of the mechanisms underlying the differential effects of the K262R mutation of P450 2B6 on catalytic activity." Molecular Pharmacology **74**(4): 990-999.
- Bumpus, N. N., U. M. Kent, et al. (2006). "Metabolism of efavirenz and 8-hydroxyefavirenz by P450 2B6 leads to inactivation by two distinct mechanisms." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **318**(1): 345-351.
- Burger, D., I. van der Heiden, et al. (2006). "Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism." Br J Clin Pharmacol **61**(2): 148-154.
- Burger, D. M., H. R. Schwietert, et al. (2006). "The effect of the CYP2C19\*2 heterozygote genotype on the pharmacokinetics of nelfinavir." British Journal of Clinical Pharmacology **62**(2): 250-252.
- Butler, I. F., I. Pandrea, et al. (2007). "HIV genetic diversity: biological and public health consequences." Curr HIV Res **5**(1): 23-45.
- Buzon, M. J., M. Massanella, et al. (2010). "HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects." Nature Medicine **16**(4): 460-465.
- Byakika-Kibwika, P., M. Lamorde, et al. (2008). "Steady-state pharmacokinetic comparison of generic and branded formulations of stavudine, lamivudine and nevirapine in HIV-infected Ugandan adults." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62**(5): 1113-1117.
- Byakika-Tusiime, J., L. W. Chinn, et al. (2008). "Steady state bioequivalence of generic and innovator formulations of stavudine, lamivudine, and nevirapine in HIV-infected Ugandan adults." PLoS One **3**(12): e3981.
- Cabrera Figueroa, S., M. Fernandez de Gatta, et al. (2010). "The convergence of therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic testing to optimize efavirenz therapy." Therapeutic Drug Monitoring **32**(5): 579-585.
- Cammett, A. M., T. R. MacGregor, et al. (2009). "Pharmacokinetic assessment of nevirapine and metabolites in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with hepatic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(10): 4147-4152.
- Campbell, M. C. and S. A. Tishkoff (2010). "The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa." Current Biology **20**(4): R166-173.
- Carr, D. F., C. J. la Porte, et al. (2010). "Haplotype structure of CYP2B6 and association with plasma efavirenz concentrations in a Chilean HIV cohort." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(9): 1889-1893.
- Castelnuovo, B., A. Kiragga, et al. (2011). "Stavudine toxicity in women is the main reason for treatment change in a 3-year prospective cohort of adult patients started on first-line antiretroviral treatment in Uganda." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **56**(1): 59-63.
- Cavalcante, G. I., V. L. Capistrano, et al. (2010). "Implications of efavirenz for neuropsychiatry: a review." International Journal of Neuroscience **120**(12): 739-745.
- Centers for Disease, C. (1981). "Pneumocystis pneumonia--Los Angeles." MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report **30**(21): 250-252.
- Cespedes, M. S. and J. A. Aberg (2006). "Neuropsychiatric complications of antiretroviral therapy." Drug Safety **29**(10): 865-874.
- Chang, T. K., S. M. Bandiera, et al. (2003). "Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor gene expression in human liver: interindividual variability and correlation with CYP2B6 mRNA levels." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **31**(1): 7-10.
- Chantarangsu, S., T. R. Cressey, et al. (2009). "Influence of CYP2B6 polymorphisms on the persistence of plasma nevirapine concentrations following a single intra-partum dose for the prevention of mother to child transmission in HIV-infected Thai women." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **64**(6): 1265-1273.
- Chen, J., J. Sun, et al. (2010). "CYP2B6 polymorphism and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in Chinese HIV-infected patients." Therapeutic Drug Monitoring **32**(5): 573-578.
- Clay, P. G. (2002). "The abacavir hypersensitivity reaction: a review." Clinical Therapeutics **24**(10): 1502-1514.
- Clifford, D. B., S. Evans, et al. (2009). "Long-term impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals (ACTG 5097s)." HIV Clin Trials **10**(6): 343-355.
- Coffin, J., A. Haase, et al. (1986). "Human immunodeficiency viruses." Science **232**(4751): 697.
- Coffin, J. M. (1995). "HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy." Science **267**(5197): 483-489.
- Cohen, M. S., Y. Q. Chen, et al. (2011). "Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy." New England Journal of Medicine **365**(6): 493-505.

- Collaboration, H.-C., L. E. Cain, et al. (2011). "When to initiate combined antiretroviral therapy to reduce mortality and AIDS-defining illness in HIV-infected persons in developed countries: an observational study." Annals of Internal Medicine **154**(8): 509-515.
- Collins, K. B., B. K. Patterson, et al. (2000). "Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract." Nature Medicine **6**(4): 475-479.
- Cortes, C. P., M. Siccardi, et al. (2013). "Correlates of efavirenz exposure in Chilean patients affected with human immunodeficiency virus reveals a novel association with a polymorphism in the constitutive androstane receptor." Therapeutic Drug Monitoring **35**(1): 78-83.
- Croxtall, J. D. (2012). "Etravirine: a review of its use in the management of treatment-experienced patients with HIV-1 infection." Drugs **72**(6): 847-869.
- Csajka, C., C. Marzolini, et al. (2003). "Population pharmacokinetics and effects of efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection." Clinical Pharmacology and Therapeutics **73**(1): 20-30.
- Cu-Uvin, S., A. K. DeLong, et al. (2010). "Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load." AIDS **24**(16): 2489-2497.
- Currier, J. S., C. Spino, et al. (2000). "Differences between women and men in adverse events and CD4+ responses to nucleoside analogue therapy for HIV infection. The Aids Clinical Trials Group 175 Team." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **24**(4): 316-324.
- Dahri, K. and M. H. Ensom (2007). "Efavirenz and nevirapine in HIV-1 infection : is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring?" Clinical Pharmacokinetics **46**(2): 109-132.
- Daly, A. K. (2010). "Genome-wide association studies in pharmacogenomics." Nat Rev Genet **11**(4): 241-246.
- De Beaudrap, P., M. B. Diallo, et al. (2010). "Changes in the renal function after tenofovir-containing antiretroviral therapy initiation in a Senegalese cohort (ANRS 1215)." AIDS Research and Human Retroviruses **26**(11): 1221-1227.
- De Clercq, E. (2004). "Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): past, present, and future." Chem Biodivers **1**(1): 44-64.
- De Clercq, E. (2005). "Emerging anti-HIV drugs." Expert Opin Emerg Drugs **10**(2): 241-273.
- De Clercq, E. (2007). "The design of drugs for HIV and HCV." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 1001-1018.
- De Clercq, E. (2010). "Antiretroviral drugs." Curr Opin Pharmacol **10**(5): 507-515.
- de Maat, M. M., G. C. Ekhart, et al. (2003). "Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents." Clinical Pharmacokinetics **42**(3): 223-282.
- de Maat, M. M., A. D. Huitema, et al. (2002). "Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals." Br J Clin Pharmacol **54**(4): 378-385.
- de Vries-Sluijs, T. E., J. P. Dieleman, et al. (2003). "Low nevirapine plasma concentrations predict virological failure in an unselected HIV-1-infected population." Clinical Pharmacokinetics **42**(6): 599-605.
- Desta, Z., T. Saussele, et al. (2007). "Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro." Pharmacogenomics **8**(6): 547-558.
- di Iulio, J., A. Fayet, et al. (2009). "In vivo analysis of efavirenz metabolism in individuals with impaired CYP2A6 function." Pharmacogenet Genomics **19**(4): 300-309.
- Dieffenbach, C. W. and A. S. Fauci (2011). "Thirty years of HIV and AIDS: future challenges and opportunities." Annals of Internal Medicine **154**(11): 766-771.
- Dragic, T., A. Trkola, et al. (2000). "A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(10): 5639-5644.
- Dragovic, G. and D. Jevtovic (2003). "Nucleoside reverse transcriptase inhibitor usage and the incidence of peripheral neuropathy in HIV/AIDS patients." Antiviral Chemistry and Chemotherapy **14**(5): 281-284.
- Durand, C. M., J. N. Blankson, et al. (2012). "Developing strategies for HIV-1 eradication." Trends Immunol **33**(11): 554-562.
- Eisele, E. and R. F. Siliciano (2012). "Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication." Immunity **37**(3): 377-388.
- Ekins, S. and S. A. Wrighton (1999). "The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism." Drug Metabolism Reviews **31**(3): 719-754.
- Elens, L., B. Vandercam, et al. (2010). "Influence of host genetic factors on efavirenz plasma and intracellular pharmacokinetics in HIV-1-infected patients." Pharmacogenomics **11**(9): 1223-1234.
- Elul, B., P. Basinga, et al. (2013). "High levels of adherence and viral suppression in a nationally representative sample of HIV-infected adults on antiretroviral therapy for 6, 12 and 18 months in Rwanda." PLoS One **8**(1): e53586.
- Escaut, L., J. Y. Liotier, et al. (1999). "Abacavir rechallenge has to be avoided in case of hypersensitivity reaction." AIDS **13**(11): 1419-1420.

- Faucette, S. R., T. Sueyoshi, et al. (2006). "Differential regulation of hepatic CYP2B6 and CYP3A4 genes by constitutive androstane receptor but not pregnane X receptor." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **317**(3): 1200-1209.
- Faucette, S. R., H. Wang, et al. (2004). "Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **32**(3): 348-358.
- Faucette, S. R., T. C. Zhang, et al. (2007). "Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **320**(1): 72-80.
- Fellay, J., C. Marzolini, et al. (2002). "Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study." Lancet **359**(9300): 30-36.
- Fink, A. J. (1986). "In defense of circumcision." Pediatrics **77**(2): 265-267.
- Fletcher, P. S. and R. J. Shattock (2008). "PRO-2000, an antimicrobial gel for the potential prevention of HIV infection." Curr Opin Investig Drugs **9**(2): 189-200.
- Frohlich, M., M. M. Hoffmann, et al. (2004). "Association of the CYP3A5 A6986G (CYP3A5\*3) polymorphism with saquinavir pharmacokinetics." British Journal of Clinical Pharmacology **58**(4): 443-444.
- Fumaz, C. R., J. A. Munoz-Moreno, et al. (2005). "Long-term neuropsychiatric disorders on efavirenz-based approaches: quality of life, psychologic issues, and adherence." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **38**(5): 560-565.
- Gandhi, M., R. M. Greenblatt, et al. (2012). "A single-nucleotide polymorphism in CYP2B6 leads to >3-fold increases in efavirenz concentrations in plasma and hair among HIV-infected women." Journal of Infectious Diseases **206**(9): 1453-1461.
- Gardner, E. M., K. H. Hullsiek, et al. (2010). "Antiretroviral medication adherence and class- specific resistance in a large prospective clinical trial." AIDS **24**(3): 395-403.
- Garrido, C., V. Soriano, et al. (2011). "Resistance associated mutations to dolutegravir (S/GSK1349572) in HIV-infected patients--impact of HIV subtypes and prior raltegravir experience." Antiviral Research **90**(3): 164-167.
- Gatanaga, H., T. Hayashida, et al. (2007). "Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26." Clinical Infectious Diseases **45**(9): 1230-1237.
- Gay, S. C., M. B. Shah, et al. (2010). "Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-A resolution." Molecular Pharmacology **77**(4): 529-538.
- Gazzard, B., A. Balkin, et al. (2010). "Analysis of neuropsychiatric adverse events during clinical trials of efavirenz in antiretroviral-naive patients: a systematic review." AIDS Rev **12**(2): 67-75.
- Genomes Project, C., G. R. Abecasis, et al. (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." Nature **467**(7319): 1061-1073.
- Gervasini, G., J. Benitez, et al. (2010). "Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy." European Journal of Clinical Pharmacology **66**(8): 755-774.
- Gervot, L., B. Rochat, et al. (1999). "Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities." Pharmacogenetics **9**(3): 295-306.
- Gilbert, P. B., M. L. Peterson, et al. (2005). "Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial." Journal of Infectious Diseases **191**(5): 666-677.
- Gonzalez de Requena, D., S. Bonora, et al. (2005). "Nevirapine plasma exposure affects both durability of viral suppression and selection of nevirapine primary resistance mutations in a clinical setting." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(9): 3966-3969.
- Gotoh, O. (1992). "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences." Journal of Biological Chemistry **267**(1): 83-90.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, et al. (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." New England Journal of Medicine **305**(24): 1425-1431.
- Gounden, V., C. van Niekerk, et al. (2010). "Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients." AIDS Res Ther **7**: 32.
- Gray, G., S. Buchbinder, et al. (2010). "Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine." Curr Opin HIV AIDS **5**(5): 357-361.

- Gray, R. H., N. Kiwanuka, et al. (2000). "Male circumcision and HIV acquisition and transmission: cohort studies in Rakai, Uganda. Rakai Project Team." *AIDS* **14**(15): 2371-2381.
- Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." *Nature Medicine* **8**(7): 673-680.
- Grobler, J. A., K. Stillmock, et al. (2002). "Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(10): 6661-6666.
- Gupta, P., J. Mellors, et al. (1997). "High viral load in semen of human immunodeficiency virus type 1-infected men at all stages of disease and its reduction by therapy with protease and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." *Journal of Virology* **71**(8): 6271-6275.
- Haas, D. W. (2005). "Will pharmacogenomic discoveries improve HIV therapeutics?" *Top HIV Med* **13**(3): 90-95.
- Haas, D. W., T. Gebretsadik, et al. (2009). "Associations between CYP2B6 polymorphisms and pharmacokinetics after a single dose of nevirapine or efavirenz in African americans." *Journal of Infectious Diseases* **199**(6): 872-880.
- Haas, D. W., H. J. Ribaud, et al. (2004). "Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study." *AIDS* **18**(18): 2391-2400.
- Haas, D. W., L. M. Smeaton, et al. (2005). "Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study." *Journal of Infectious Diseases* **192**(11): 1931-1942.
- Hammer, S. M., K. E. Squires, et al. (1997). "A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." *New England Journal of Medicine* **337**(11): 725-733.
- Hang, J. Q., Y. Li, et al. (2007). "Substrate-dependent inhibition or stimulation of HIV RNase H activity by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**(2): 341-350.
- Harrigan, P. R., M. Whaley, et al. (1999). "Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy." *AIDS* **13**(8): F59-62.
- Hemelaar, J. (2012). "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic." *Trends Mol Med* **18**(3): 182-192.
- Hemelaar, J., E. Gouws, et al. (2011). "Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007." *AIDS* **25**(5): 679-689.
- Hendrix, C. W., A. C. Collier, et al. (2004). "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **37**(2): 1253-1262.
- Heneine, W. and A. Kashuba (2012). "HIV Prevention by Oral Preexposure Prophylaxis." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(3): a007419.
- Hesse, L. M., P. He, et al. (2004). "Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes." *Pharmacogenetics* **14**(4): 225-238.
- Hicks, C. and R. M. Gulick (2009). "Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor." *Clinical Infectious Diseases* **48**(7): 931-939.
- Hirsch, M., R. Steigbigel, et al. (1999). "A randomized, controlled trial of indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with advanced human immunodeficiency virus type 1 infection and prior antiretroviral therapy." *Journal of Infectious Diseases* **180**(3): 659-665.
- Hladik, F. and M. J. McElrath (2008). "Setting the stage: host invasion by HIV." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 447-457.
- Hodgson, E. and R. L. Rose (2007). "The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals." *Pharmacology and Therapeutics* **113**(2): 420-428.
- Hoffman, S. M., D. R. Nelson, et al. (2001). "Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19." *Pharmacogenetics* **11**(8): 687-698.
- Hofmann, M. H., J. K. Bliedernicht, et al. (2008). "Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **325**(1): 284-292.
- Honkakoski, P., I. Zelko, et al. (1998). "The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene." *Molecular and Cellular Biology* **18**(10): 5652-5658.
- Hsiou, Y., J. Ding, et al. (2001). "The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance." *Journal of Molecular Biology* **309**(2): 437-445.

- Hu, L., W. Zhuo, et al. (2012). "Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: implications in drug metabolism and therapy." Pharmacogenet Genomics **22**(11): 812-819.
- Huang, N., V. Agrawal, et al. (2008). "Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(5): 1733-1738.
- Huebner, C., I. Petermann, et al. (2007). "Triallelic single nucleotide polymorphisms and genotyping error in genetic epidemiology studies: MDR1 (ABCB1) G2677/T/A as an example." Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention **16**(6): 1185-1192.
- Im, S. C. and L. Waskell (2011). "The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5)." Archives of Biochemistry and Biophysics **507**(1): 144-153.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004). "Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 89-104.
- Ingelman-Sundberg, M., M. Oscarson, et al. (1999). "Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment." Trends in Pharmacological Sciences **20**(8): 342-349.
- Ingelman-Sundberg, M., S. C. Sim, et al. (2007). "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects." Pharmacology and Therapeutics **116**(3): 496-526.
- Jamshidi, Y., M. Moreton, et al. (2010). "Tribal ethnicity and CYP2B6 genetics in Ugandan and Zimbabwean populations in the UK: implications for efavirenz dosing in HIV infection." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(12): 2614-2619.
- Janmohamed, A., C. T. Dolphin, et al. (2001). "Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450." Biochemical Pharmacology **62**(6): 777-786.
- Jena, A., R. K. Sachdeva, et al. (2009). "Adverse drug reactions to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral regimen: a 24-week prospective study." J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic) **8**(5): 318-322.
- Jiang, F., Z. Desta, et al. (2013). "Effects of clopidogrel and itraconazole on the disposition of efavirenz and its hydroxyl metabolites: exploration of a novel CYP2B6 phenotyping index." British Journal of Clinical Pharmacology **75**(1): 244-253.
- Johansson, I., E. Lundqvist, et al. (1993). "Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(24): 11825-11829.
- Johnson, V. A., V. Calvez, et al. (2011). "2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1." Top Antivir Med **19**(4): 156-164.
- Josephson, F., A. Allqvist, et al. (2007). "CYP3A5 genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir." Clinical Pharmacology and Therapeutics **81**(5): 708-712.
- Kanki, P. J., J. R. Hopper, et al. (1987). "The origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2." Annals of the New York Academy of Sciences **511**: 370-375.
- Kannangai, R., S. David, et al. (2012). "Human immunodeficiency virus type-2-A milder, kinder virus: an update." Indian J Med Microbiol **30**(1): 6-15.
- Kappelhoff, B. S., F. van Leth, et al. (2005). "Are adverse events of nevirapine and efavirenz related to plasma concentrations?" Antivir Ther **10**(4): 489-498.
- Kassutto, S. and E. S. Rosenberg (2004). "Primary HIV type 1 infection." Clinical Infectious Diseases **38**(10): 1447-1453.
- Kayirangwa, E., J. Hanson, et al. (2006). "Current trends in Rwanda's HIV/AIDS epidemic." Sexually Transmitted Infections **82** **Suppl 1**: i27-31.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, et al. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nature Medicine **4**(11): 1302-1307.
- Kilewo, C., K. Karlsson, et al. (2009). "Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breastfeeding by treating mothers with triple antiretroviral therapy in Dar es Salaam, Tanzania: the Mitra Plus study." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **52**(3): 406-416.
- Kip, E., V. J. Ehlers, et al. (2009). "Patients' adherence to anti-retroviral therapy in Botswana." J Nurs Scholarsh **41**(2): 149-157.
- Kirchheiner, J., C. Klein, et al. (2003). "Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6." Pharmacogenetics **13**(10): 619-626.
- Kitahata, M. M., S. J. Gange, et al. (2009). "Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival." New England Journal of Medicine **360**(18): 1815-1826.

- Klein, K., T. Lang, et al. (2005). "Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz." *Pharmacogenet Genomics* **15**(12): 861-873.
- Klimas, N., A. O. Koneru, et al. (2008). "Overview of HIV." *Psychosomatic Medicine* **70**(5): 523-530.
- Kondru, R., J. Zhang, et al. (2008). "Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists." *Molecular Pharmacology* **73**(3): 789-800.
- Kromdijk, W., J. W. Mulder, et al. (2012). "Use of dried blood spots for the determination of plasma concentrations of nevirapine and efavirenz." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**(5): 1211-1216.
- Kromdijk, W., J. W. Mulder, et al. (2012). "Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs at home using dried blood spots: a proof of concept study." *Antivir Ther*.
- Kwara, A., M. Lartey, et al. (2009). "CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 genetic polymorphisms are predictors of efavirenz mid-dose concentration in HIV-infected patients." *AIDS* **23**(16): 2101-2106.
- Kwara, A., M. Lartey, et al. (2009). "CYP2B6 (c.516G-->T) and CYP2A6 (\*9B and/or \*17) polymorphisms are independent predictors of efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients." *British Journal of Clinical Pharmacology* **67**(4): 427-436.
- Kwara, A., M. Lartey, et al. (2008). "Pharmacokinetics of efavirenz when co-administered with rifampin in TB/HIV co-infected patients: pharmacogenetic effect of CYP2B6 variation." *Journal of Clinical Pharmacology* **48**(9): 1032-1040.
- Kwara, A., G. Ramachandran, et al. (2010). "Dose adjustment of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors during concurrent rifampicin-containing tuberculosis therapy: one size does not fit all." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**(1): 55-68.
- Kwong, P. D., J. R. Mascola, et al. (2012). "The changing face of HIV vaccine research." *J Int AIDS Soc* **15**(2): 17407.
- Lamba, V., J. Lamba, et al. (2003). "Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression." *J Pharmacol Exp Ther* **307**(3): 906-922.
- Lamba, V., K. Yasuda, et al. (2004). "PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators." *Toxicology and Applied Pharmacology* **199**(3): 251-265.
- Lamorde, M., P. Byakika-Kibwika, et al. (2008). "Antiretroviral therapy in developing countries: pharmacologic considerations." *Curr Opin HIV AIDS* **3**(3): 252-257.
- Lang, T., K. Klein, et al. (2001). "Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver." *Pharmacogenetics* **11**(5): 399-415.
- Lang, T., K. Klein, et al. (2004). "Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(1): 34-43.
- Lewis, D. F. (2004). "57 varieties: the human cytochromes P450." *Pharmacogenomics* **5**(3): 305-318.
- Lihana, R. W., D. Ssemwanga, et al. (2012). "Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review." *AIDS Rev* **14**(2): 83-100.
- Liptrott, N. J., S. Pushpakom, et al. (2012). "Association of ABCC10 polymorphisms with nevirapine plasma concentrations in the German Competence Network for HIV/AIDS." *Pharmacogenet Genomics* **22**(1): 10-19.
- Lochet, P., H. Peyriere, et al. (2003). "Long-term assessment of neuropsychiatric adverse reactions associated with efavirenz." *HIV Med* **4**(1): 62-66.
- Lopez-Cortes, L. F., R. Ruiz-Valderas, et al. (2002). "Pharmacokinetic interactions between efavirenz and rifampicin in HIV-infected patients with tuberculosis." *Clinical Pharmacokinetics* **41**(9): 681-690.
- Lowenhaupt, E. A., K. Matson, et al. (2007). "Psychosis in a 12-year-old HIV-positive girl with an increased serum concentration of efavirenz." *Clinical Infectious Diseases* **45**(10): e128-130.
- Lowrance, D. W., F. Ndamage, et al. (2009). "Adult clinical and immunologic outcomes of the national antiretroviral treatment program in Rwanda during 2004-2005." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **52**(1): 49-55.
- Lubomirov, R., S. Colombo, et al. (2011). "Association of pharmacogenetic markers with premature discontinuation of first-line anti-HIV therapy: an observational cohort study." *Journal of Infectious Diseases* **203**(2): 246-257.
- Mahungu, T., C. Smith, et al. (2009). "Cytochrome P450 2B6 516G-->T is associated with plasma concentrations of nevirapine at both 200 mg twice daily and 400 mg once daily in an ethnically diverse population." *HIV Med* **10**(5): 310-317.
- Mallal, S., D. Nolan, et al. (2002). "Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir." *Lancet* **359**(9308): 727-732.
- Manosuthi, W., S. Kiertiburanakul, et al. (2006). "Efavirenz 600 mg/day versus efavirenz 800 mg/day in HIV-infected patients with tuberculosis receiving rifampicin: 48 weeks results." *AIDS* **20**(1): 131-132.

- Manosuthi, W., S. Sungkanuparph, et al. (2009). "A randomized trial comparing plasma drug concentrations and efficacies between 2 nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based regimens in HIV-infected patients receiving rifampicin: the N2R Study." *Clinical Infectious Diseases* **48**(12): 1752-1759.
- Marth, G. T., F. Yu, et al. (2011). "The functional spectrum of low-frequency coding variation." *Genome Biol* **12**(9): R84.
- Martin, A. M., D. Nolan, et al. (2005). "Predisposition to nevirapine hypersensitivity associated with HLA-DRB1\*0101 and abrogated by low CD4 T-cell counts." *AIDS* **19**(1): 97-99.
- Marzolini, C., A. Telenti, et al. (2001). "Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients." *AIDS* **15**(1): 71-75.
- Masquelier, C., J. Y. Servais, et al. (2007). "A novel 24-base pair deletion in the coding region of CCR5 in an African population." *AIDS* **21**(1): 111-113.
- Matteelli, A., M. Regazzi, et al. (2007). "Multiple-dose pharmacokinetics of efavirenz with and without the use of rifampicin in HIV-positive patients." *Curr HIV Res* **5**(3): 349-353.
- Matthews, T., M. Salgo, et al. (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." *Nat Rev Drug Discov* **3**(3): 215-225.
- McCullum, D. L. (2011). "Update of the past year: a review from IDSA 2011." *Top Antivir Med* **19**(5): 187-192.
- McKnight, A., M. T. Dittmar, et al. (1998). "A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4." *Journal of Virology* **72**(5): 4065-4071.
- Mehlotra, R. K., M. J. Bockarie, et al. (2007). "CYP2B6 983T>C polymorphism is prevalent in West Africa but absent in Papua New Guinea: implications for HIV/AIDS treatment." *Br J Clin Pharmacol* **64**(3): 391-395.
- Meunier, B., S. P. de Visser, et al. (2004). "Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes." *Chemical Reviews* **104**(9): 3947-3980.
- Meyer, U. A. (2004). "Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity." *Nat Rev Genet* **5**(9): 669-676.
- Michael, N. L., G. Chang, et al. (1997). "The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression." *Nature Medicine* **3**(3): 338-340.
- Mills, E. J., C. Bakanda, et al. (2011). "Life expectancy of persons receiving combination antiretroviral therapy in low-income countries: a cohort analysis from Uganda." *Annals of Internal Medicine* **155**(4): 209-216.
- Molto, J., L. Ruiz, et al. (2006). "Increased antiretroviral potency by the addition of enfuvirtide to a four-drug regimen in antiretroviral-naive, HIV-infected patients." *Antivir Ther* **11**(1): 47-51.
- Munoz-Moreno, J. A., C. R. Fumaz, et al. (2009). "Neuropsychiatric symptoms associated with efavirenz: prevalence, correlates, and management. A neurobehavioral review." *AIDS Rev* **11**(2): 103-109.
- Murphy, R. A., H. Sunpath, et al. (2007). "Antiretroviral therapy-associated toxicities in the resource-poor world: the challenge of a limited formulary." *Journal of Infectious Diseases* **196** Suppl 3: S449-456.
- Mutlib, A. E., H. Chen, et al. (1999). "Identification and characterization of efavirenz metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry and high field NMR: species differences in the metabolism of efavirenz." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* **27**(11): 1319-1333.
- Mutwa, P. R., Q. Fillekes, et al. (2012). "Mid-dosing interval efavirenz plasma concentrations in HIV-1-infected children in Rwanda: treatment efficacy, tolerability, adherence, and the influence of CYP2B6 polymorphisms." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **60**(4): 400-404.
- Myers, S. A., A. A. Selim, et al. (2006). "A prospective clinical and pathological examination of injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide." *Antivir Ther* **11**(7): 935-939.
- Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells." *Nature* **326**(6114): 711-713.
- Nachega, J. B., M. Hislop, et al. (2007). "Adherence to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based HIV therapy and virologic outcomes." *Annals of Internal Medicine* **146**(8): 564-573.
- Niu, R. J., Q. C. Zheng, et al. (2011). "Analysis of clinically relevant substrates of CYP2B6 enzyme by computational methods." *J Mol Model* **17**(11): 2839-2846.
- Nuesch, R., P. Srasuebku, et al. (2006). "Monitoring the toxicity of antiretroviral therapy in resource limited settings: a prospective clinical trial cohort in Thailand." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**(3): 637-644.
- Nyakutira, C., D. Roshammar, et al. (2008). "High prevalence of the CYP2B6 516G-->T(\*6) variant and effect on the population pharmacokinetics of efavirenz in HIV/AIDS outpatients in Zimbabwe." *European Journal of Clinical Pharmacology* **64**(4): 357-365.
- O'Connor, T. J., D. Kinchington, et al. (1995). "The activity of candidate virucidal agents, low pH and genital secretions against HIV-1 in vitro." *International Journal of STD and AIDS* **6**(4): 267-272.

- Obiako, R. O., H. M. Muktar, et al. (2012). "Adverse Reactions Associated with Antiretroviral Regimens in Adult Patients of a University Teaching Hospital HIV Program in Zaria, Northern Nigeria: An Observational Cohort Study." *J Antivir Antiretrovir* **4**(1): 006-013.
- Ogburn, E. T., D. R. Jones, et al. (2010). "Efavirenz primary and secondary metabolism in vitro and in vivo: identification of novel metabolic pathways and cytochrome P450 2A6 as the principal catalyst of efavirenz 7-hydroxylation." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* **38**(7): 1218-1229.
- Ogundele, M. O. and J. B. Coulter (2003). "HIV transmission through breastfeeding: problems and prevention." *Annals of Tropical Paediatrics* **23**(2): 91-106.
- Orrell, C., K. Cohen, et al. (2011). "Efavirenz and rifampicin in the South African context: is there a need to dose-increase efavirenz with concurrent rifampicin therapy?" *Antivir Ther* **16**(4): 527-534.
- Owen, A., M. Pirmohamed, et al. (2006). "Pharmacogenetics of HIV therapy." *Pharmacogenet Genomics* **16**(10): 693-703.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection." *New England Journal of Medicine* **328**(5): 327-335.
- Patterson, B. K., A. Landay, et al. (2002). "Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture." *American Journal of Pathology* **161**(3): 867-873.
- Paxton, W. A., S. R. Martin, et al. (1996). "Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure." *Nature Medicine* **2**(4): 412-417.
- Peltier, C. A., G. F. Ndayisaba, et al. (2009). "Breastfeeding with maternal antiretroviral therapy or formula feeding to prevent HIV postnatal mother-to-child transmission in Rwanda." *AIDS* **23**(18): 2415-2423.
- Penzak, S. R., G. Kabuye, et al. (2007). "Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) G516T influences nevirapine plasma concentrations in HIV-infected patients in Uganda." *HIV Med* **8**(2): 86-91.
- Perelson, A. S., P. Essunger, et al. (1997). "Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy." *Nature* **387**(6629): 188-191.
- Perelson, A. S., A. U. Neumann, et al. (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." *Science* **271**(5255): 1582-1586.
- Perno, C. F. (2011). "The discovery and development of HIV therapy: the new challenges." *Annali dell Istituto Superiore di Sanita* **47**(1): 41-43.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." *Molecular Cell* **23**(3): 297-305.
- Peyriere, H., J. M. Mauboussin, et al. (2001). "Management of sudden psychiatric disorders related to efavirenz." *AIDS* **15**(10): 1323-1324.
- Pfister, M., L. Labbe, et al. (2003). "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of efavirenz, nelfinavir, and indinavir: Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(1): 130-137.
- Pilcher, C. D., H. C. Tien, et al. (2004). "Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV." *Journal of Infectious Diseases* **189**(10): 1785-1792.
- Pinkerton, S. D. and P. R. Abramson (1997). "Effectiveness of condoms in preventing HIV transmission." *Social Science and Medicine* **44**(9): 1303-1312.
- Pirmohamed, M. (2011). "Pharmacogenetics: past, present and future." *Drug Discov Today* **16**(19-20): 852-861.
- Pitisuttithum, P., P. Gilbert, et al. (2006). "Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand." *Journal of Infectious Diseases* **194**(12): 1661-1671.
- Podsadecki, T. J., B. C. Vrijens, et al. (2008). "'White coat compliance' limits the reliability of therapeutic drug monitoring in HIV-1-infected patients." *HIV Clin Trials* **9**(4): 238-246.
- Politch, J. A., K. H. Mayer, et al. (2012). "Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men." *AIDS* **26**(12): 1535-1543.
- Pomerantz, R. J. and D. L. Horn (2003). "Twenty years of therapy for HIV-1 infection." *Nature Medicine* **9**(7): 867-873.
- Powers, V., J. Ward, et al. (2009). "CYP2B6 G516T genotyping in a UK cohort of HIV-positive patients: polymorphism frequency and influence on efavirenz discontinuation." *HIV Med* **10**(8): 520-523.
- Pozniak, A. L., K. M. Coyne, et al. (2011). "British HIV Association guidelines for the treatment of TB/HIV coinfection 2011." *HIV Med* **12**(9): 517-524.
- Preston, B. D., B. J. Poiesz, et al. (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." *Science* **242**(4882): 1168-1171.
- Pustyl'nyak, V. O., L. F. Gulyaeva, et al. (2007). "Induction of cytochrome P4502B: role of regulatory elements and nuclear receptors." *Biochemistry* **72**(6): 608-617.



- Puthanakit, T., P. Tanpaiboon, et al. (2009). "Plasma efavirenz concentrations and the association with CYP2B6-516G>T polymorphism in HIV-infected Thai children." Antivir Ther **14**(3): 315-320.
- Rachlis, A. and M. M. Fanning (1993). "Zidovudine toxicity. Clinical features and management." Drug Safety **8**(4): 312-320.
- Radloff, R., A. Gras, et al. (2013). "Novel CYP2B6 Enzyme Variants in a Rwandese Population: Functional Characterization and Assessment of In Silico Prediction Tools." Human Mutation **34**(5): 725-734.
- Raimundo, S., C. Toscano, et al. (2004). "A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects." Clinical Pharmacology and Therapeutics **76**(2): 128-138.
- Rakhmanina, N. Y. and J. N. van den Anker (2010). "Efavirenz in the therapy of HIV infection." Expert Opin Drug Metab Toxicol **6**(1): 95-103.
- Ramachandran, G., A. K. Hemanthkumar, et al. (2006). "Increasing nevirapine dose can overcome reduced bioavailability due to rifampicin coadministration." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **42**(1): 36-41.
- Ramachandran, G., K. Ramesh, et al. (2009). "Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **63**(4): 841-843.
- Raska, P. and X. Zhu (2011). "Rare variant density across the genome and across populations." BMC Proc **5 Suppl 9**: S39.
- Read, T. R., D. Carey, et al. (2009). "Efavirenz plasma concentrations did not predict cessation of therapy due to neuropsychiatric symptoms in a large randomized trial." AIDS **23**(16): 2222-2223.
- Rendon, A., M. Nunez, et al. (2005). "Clinical benefit of interventions driven by therapeutic drug monitoring." HIV Med **6**(5): 360-365.
- Requejo, H. I. (2006). "Worldwide molecular epidemiology of HIV." Revista de Saude Publica **40**(2): 331-345.
- Reynell, L. and A. Trkola (2012). "HIV vaccines: an attainable goal?" Swiss Med Wkly **142**: w13535.
- Ribera, E., L. Pou, et al. (2001). "Pharmacokinetic interaction between nevirapine and rifampicin in HIV-infected patients with tuberculosis." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **28**(5): 450-453.
- Rich, M. L., A. C. Miller, et al. (2012). "Excellent clinical outcomes and high retention in care among adults in a community-based HIV treatment program in rural Rwanda." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **59**(3): e35-42.
- Richey, L. E. and J. Halperin (2012). "Acute Human Immunodeficiency Virus Infection." American Journal of the Medical Sciences.
- Richman, D. D., T. Wrin, et al. (2003). "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(7): 4144-4149.
- Riska, P., M. Lamson, et al. (1999). "Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans." Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals **27**(8): 895-901.
- Rizzuto, C. D., R. Wyatt, et al. (1998). "A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding." Science **280**(5371): 1949-1953.
- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." Science **288**(5463): 55-56.
- Rodriguez-Novoa, S., P. Barreiro, et al. (2006). "Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy." Pharmacogenomics J **6**(4): 234-245.
- Rodriguez-Novoa, S., P. Barreiro, et al. (2005). "Influence of 516G>T polymorphisms at the gene encoding the CYP450-2B6 isoenzyme on efavirenz plasma concentrations in HIV-infected subjects." Clinical Infectious Diseases **40**(9): 1358-1361.
- Romano, J. W., M. Robbiani, et al. (2012). "Non-specific microbicide product development: then and now." Curr HIV Res **10**(1): 9-18.
- Roquebert, B., F. Damond, et al. (2009). "[HIV genetic diversity and its consequences]." Pathologie Biologie **57**(2): 142-148.
- Rotger, M., S. Colombo, et al. (2005). "Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients." Pharmacogenet Genomics **15**(1): 1-5.
- Rotger, M., C. Csajka, et al. (2006). "Genetic, ethnic, and gender differences in the pharmacokinetics of antiretroviral agents." Curr HIV/AIDS Rep **3**(3): 118-125.
- Rotger, M., M. Saumoy, et al. (2007). "Partial deletion of CYP2B6 owing to unequal crossover with CYP2B7." Pharmacogenet Genomics **17**(10): 885-890.
- Rotger, M., H. Tegude, et al. (2007). "Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals." Clin Pharmacol Ther **81**(4): 557-566.

- Rowland, L. S., T. R. MacGregor, et al. (2007). "Quantitation of five nevirapine oxidative metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography B **856**(1-2): 252-260.
- Saez-Llorens, X., A. Violari, et al. (2008). "Long-term safety and efficacy results of once-daily emtricitabine-based highly active antiretroviral therapy regimens in human immunodeficiency virus-infected pediatric subjects." Pediatrics **121**(4): e827-835.
- Saitoh, A., E. Capparelli, et al. (2010). "CYP2C19 genetic variants affect nelfinavir pharmacokinetics and virologic response in HIV-1-infected children receiving highly active antiretroviral therapy." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **54**(3): 285-289.
- Saitoh, A., C. V. Fletcher, et al. (2007). "Efavirenz pharmacokinetics in HIV-1-infected children are associated with CYP2B6-G516T polymorphism." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **45**(3): 280-285.
- Saitoh, A., K. K. Singh, et al. (2005). "An MDR1-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children." AIDS **19**(4): 371-380.
- Sanchez, A., S. Cabrera, et al. (2011). "Population pharmacokinetic/pharmacogenetic model for optimization of efavirenz therapy in Caucasian HIV-infected patients." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**(11): 5314-5324.
- Scarlatti, G., E. Tresoldi, et al. (1997). "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." Nature Medicine **3**(11): 1259-1265.
- Scherzer, R., M. Estrella, et al. (2012). "Association of tenofovir exposure with kidney disease risk in HIV infection." AIDS **26**(7): 867-875.
- Schipani, A., M. Siccardi, et al. (2010). "Population pharmacokinetic modeling of the association between 63396C->T pregnane X receptor polymorphism and unboosted atazanavir clearance." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(12): 5242-5250.
- Schipani, A., C. Wyen, et al. (2011). "Integration of population pharmacokinetics and pharmacogenetics: an aid to optimal nevirapine dose selection in HIV-infected individuals." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(6): 1332-1339.
- Schneider, S., A. Peltier, et al. (2008). "Efavirenz in human breast milk, mothers', and newborns' plasma." J Acquir Immune Defic Syndr **48**(4): 450-454.
- Scott, P., E. Arnold, et al. (2004). "Surveillance of HIV antiretroviral drug resistance in treated individuals in England: 1998-2000." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **53**(3): 469-473.
- Shah, M. B., J. Pascual, et al. (2011). "Structures of cytochrome P450 2B6 bound to 4-benzylpyridine and 4-(4-nitrobenzyl)pyridine: insight into inhibitor binding and rearrangement of active site side chains." Molecular Pharmacology **80**(6): 1047-1055.
- Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS Pandemic." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006841.
- Shattock, R. J. and Z. Rosenberg (2012). "Microbicides: Topical Prevention against HIV." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a007385.
- Shetty, A. K. and Y. Maldonado (2013). "Antiretroviral Drugs to Prevent Mother-to-Child Transmission of HIV During Breastfeeding." Curr HIV Res **11**(2): 102-125.
- Shimura, K., E. Kodama, et al. (2008). "Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137)." Journal of Virology **82**(2): 764-774.
- Siccardi, M., A. D'Avolio, et al. (2008). "Association of a single-nucleotide polymorphism in the pregnane X receptor (PXR 63396C->T) with reduced concentrations of unboosted atazanavir." Clinical Infectious Diseases **47**(9): 1222-1225.
- Sinha, S., S. Dhooria, et al. (2011). "The antiretroviral efficacy of highly active antiretroviral therapy and plasma nevirapine concentrations in HIV-TB co-infected Indian patients receiving rifampicin based antituberculosis treatment." AIDS Res Ther **8**(1): 41.
- Sluis-Cremer, N., N. A. Temiz, et al. (2004). "Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding." Curr HIV Res **2**(4): 323-332.
- Smith, P. F., R. DiCenzo, et al. (2001). "Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Clinical Pharmacokinetics **40**(12): 893-905.
- Smith, P. F. and Y. M. Ku (2003). Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Pharmacotherapy Self-Assessment Program, 4th Edition, American College of Clinical Pharmacy: 23.
- Solas, C., N. Simon, et al. (2007). "Minimal effect of MDR1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of indinavir in HIV-infected patients." British Journal of Clinical Pharmacology **64**(3): 353-362.

- Soon, G. G., M. Min, et al. (2012). "Meta-analysis of gender differences in efficacy outcomes for HIV-positive subjects in randomized controlled clinical trials of antiretroviral therapy (2000-2008)." *Aids Patient Care and STDS* **26**(8): 444-453.
- Spence, R. A., W. M. Kati, et al. (1995). "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors." *Science* **267**(5200): 988-993.
- Staszewski, S., J. Morales-Ramirez, et al. (1999). "Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team." *New England Journal of Medicine* **341**(25): 1865-1873.
- Stebbing, J., B. Gazzard, et al. (2004). "Where does HIV live?" *New England Journal of Medicine* **350**(18): 1872-1880.
- Stevenson, M. (2003). "HIV-1 pathogenesis." *Nature Medicine* **9**(7): 853-860.
- Strachan, T. and A. P. Read (2004). *Human Molecular Genetics, Third Edition*, Garland Science.
- Stresser, D. M. and D. Kupfer (1999). "Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* **27**(4): 517-525.
- Sudharshan, S. and J. Biswas (2008). "Introduction and immunopathogenesis of acquired immune deficiency syndrome." *Indian Journal of Ophthalmology* **56**(5): 357-362.
- Sukasem, C., T. R. Cressey, et al. (2012). "Pharmacogenetic markers of CYP2B6 associated with efavirenz plasma concentrations in HIV-1 infected Thai adults." *British Journal of Clinical Pharmacology* **74**(6): 1005-1012.
- Swart, M., H. Whitehorn, et al. (2012). "PXR and CAR single nucleotide polymorphisms influence plasma efavirenz levels in South African HIV/AIDS patients." *BMC Med Genet* **13**: 112.
- Tanser, F., T. Barnighausen, et al. (2013). "High coverage of ART associated with decline in risk of HIV acquisition in rural KwaZulu-Natal, South Africa." *Science* **339**(6122): 966-971.
- Tantillo, C., J. Ding, et al. (1994). "Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance." *Journal of Molecular Biology* **243**(3): 369-387.
- Tebit, D. M., N. Ndambi, et al. (2012). "Mucosal transmission of human immunodeficiency virus." *Curr HIV Res* **10**(1): 3-8.
- Telenti, A. and U. M. Zanger (2008). "Pharmacogenetics of anti-HIV drugs." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**: 227-256.
- Thurman, A. R., M. R. Clark, et al. (2011). "Multipurpose prevention technologies: biomedical tools to prevent HIV-1, HSV-2, and unintended pregnancies." *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **2011**: 1-10.
- Thusberg, J., A. Olatubosun, et al. (2011). "Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants." *Human Mutation* **32**(4): 358-368.
- Tishkoff, S. A., F. A. Reed, et al. (2009). "The genetic structure and history of Africans and African Americans." *Science* **324**(5930): 1035-1044.
- To, K. W., S. T. Liu, et al. (2009). "Pharmacokinetics of plasma efavirenz and CYP2B6 polymorphism in southern Chinese." *Therapeutic Drug Monitoring* **31**(4): 527-530.
- Tosini, W., P. Muller, et al. (2010). "Tolerability of HIV postexposure prophylaxis with tenofovir/emtricitabine and lopinavir/ritonavir tablet formulation." *AIDS* **24**(15): 2375-2380.
- Trono, D., C. Van Lint, et al. (2010). "HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals." *Science* **329**(5988): 174-180.
- Turner, D. and M. A. Wainberg (2006). "HIV transmission and primary drug resistance." *AIDS Rev* **8**(1): 17-23.
- Turpeinen, M., H. Raunio, et al. (2006). "The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico." *Curr Drug Metab* **7**(7): 705-714.
- Vahlne, A. (2009). "A historical reflection on the discovery of human retroviruses." *Retrovirology* **6**: 40.
- van Griensven, J., R. Zachariah, et al. (2010). "Stavudine- and nevirapine-related drug toxicity while on generic fixed-dose antiretroviral treatment: incidence, timing and risk factors in a three-year cohort in Kigali, Rwanda." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **104**(2): 148-153.
- van Luin, M., W. P. Bannister, et al. (2009). "Absence of a relation between efavirenz plasma concentrations and toxicity-driven efavirenz discontinuations in the EuroSIDA study." *Antivir Ther* **14**(1): 75-83.
- van Luin, M., L. Gras, et al. (2009). "Efavirenz dose reduction is safe in patients with high plasma concentrations and may prevent efavirenz discontinuations." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **52**(2): 240-245.
- Veldkamp, A. I., G. J. Weverling, et al. (2001). "High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals." *AIDS* **15**(9): 1089-1095.
- Volberding, P. A., S. W. Lagakos, et al. (1995). "A comparison of immediate with deferred zidovudine therapy for asymptomatic HIV-infected adults with CD4 cell counts of 500 or more per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group." *New England Journal of Medicine* **333**(7): 401-407.

- von Giesen, H. J., H. Koller, et al. (2002). "Therapeutic effects of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on the central nervous system in HIV-1-infected patients." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **29**(4): 363-367.
- Wagner, T. A., N. H. Tobin, et al. (2009). "Increased mutations in Env and Pol suggest greater HIV-1 replication in sputum-derived viruses compared with blood-derived viruses." AIDS **23**(8): 923-928.
- Wainberg, M. A. (2003). "HIV resistance to nevirapine and other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **34 Suppl 1**: S2-7.
- Wang, H. and M. Negishi (2003). "Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors." Curr Drug Metab **4**(6): 515-525.
- Wang, H. and L. M. Tompkins (2008). "CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme." Curr Drug Metab **9**(7): 598-610.
- Wang, J., A. Sonnerborg, et al. (2006). "Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz." Pharmacogenet Genomics **16**(3): 191-198.
- Ward, B. A., J. C. Gorski, et al. (2003). "The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **306**(1): 287-300.
- Weinshilboum, R. (2003). "Inheritance and drug response." New England Journal of Medicine **348**(6): 529-537.
- Weiss, H. A., S. L. Thomas, et al. (2006). "Male circumcision and risk of syphilis, chancroid, and genital herpes: a systematic review and meta-analysis." Sexually Transmitted Infections **82**(2): 101-109; discussion 110.
- Westby, M., M. Lewis, et al. (2006). "Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir." Journal of Virology **80**(10): 4909-4920.
- Westby, M. and E. van der Ryst (2005). "CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection." Antiviral Chemistry and Chemotherapy **16**(6): 339-354.
- When To Start, C., J. A. Sterne, et al. (2009). "Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies." Lancet **373**(9672): 1352-1363.
- Wilcox, C. M. and M. S. Saag (2008). "Gastrointestinal complications of HIV infection: changing priorities in the HAART era." Gut **57**(6): 861-870.
- Wilkinson, G. R. (2005). "Drug metabolism and variability among patients in drug response." New England Journal of Medicine **352**(21): 2211-2221.
- Wise, M. E., K. Mistry, et al. (2002). "Drug points: Neuropsychiatric complications of nevirapine treatment." BMJ **324**(7342): 879.
- Writing Committee for the, C. C. (2011). "Timing of HAART initiation and clinical outcomes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters." Archives of Internal Medicine **171**(17): 1560-1569.
- Wyen, C., H. Hendra, et al. (2011). "Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) and constitutive androstane receptor (CAR) polymorphisms are associated with early discontinuation of efavirenz-containing regimens." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(9): 2092-2098.
- Wyen, C., H. Hendra, et al. (2008). "Impact of CYP2B6 983T>C polymorphism on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in HIV-infected patients." J Antimicrob Chemother **61**(4): 914-918.
- Xu, C., S. Goodz, et al. (2002). "CYP2A6 genetic variation and potential consequences." Adv Drug Deliv Rev **54**(10): 1245-1256.
- Xu, G. and H. L. McLeod (2001). "Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy." Clinical Cancer Research **7**(11): 3314-3324.
- Yue, P., Z. Li, et al. (2005). "Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease." Journal of Molecular Biology **353**(2): 459-473.
- Zanger, U. M. (2008). The CYP2D Subfamily. Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics. C. Ioannides, Royal Society of Chemistry: 23.
- Zanger, U. M., J. Fischer, et al. (2001). "Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6." Pharmacogenetics **11**(7): 573-585.
- Zanger, U. M. and K. Klein (2013). "Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance." Front Genet **4**: 24.
- Zanger, U. M., K. Klein, et al. (2007). "Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance." Pharmacogenomics **8**(7): 743-759.
- Zanger, U. M., S. Raimundo, et al. (2004). "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 23-37.

- Zanger, U. M., M. Turpeinen, et al. (2008). "Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation." Anal Bioanal Chem **392**(6): 1093-1108.
- Zapor, M. J., K. L. Cozza, et al. (2004). "Antiretrovirals, Part II: focus on non-protease inhibitor antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and fusion inhibitors)." Psychosomatics **45**(6): 524-535.
- Zhao, Y. and J. R. Halpert (2007). "Structure-function analysis of cytochromes P450 2B." Biochimica et Biophysica Acta **1770**(3): 402-412.
- Zolopa, A., J. Andersen, et al. (2009). "Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial." PLoS One **4**(5): e5575.
- Zou, M., E. Y. Baitei, et al. (2011). "Mutation prediction by PolyPhen or functional assay, a detailed comparison of CYP27B1 missense mutations." Endocrine **40**(1): 14-20.
- Zukunft, J., T. Lang, et al. (2005). "A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T--> C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site." Mol Pharmacol **67**(5): 1772-1782.

# **Annexe**

## 1. Publications Supplémentaires

- **Efavirenz in human breast milk, mothers' and newborns' plasma.**  
Serge Schneider, Alexandra Peltier, Alain Gras, Christine Karasi – Omes, Vic Arendt, Anastasie Mujawamariwa, Patrick Ndimubanzi Cyaga, Robert Wennig  
*J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Aug 1; 48(4): 450-4*
- **Evaluation of Saliva as an Alternative Matrix for Monitoring Plasma Zidovudine, Lamivudine and Nevirapine Concentrations in Rwanda**  
Alain Gras, Serge Schneider, Jean-Claude Karasi, Anne-Marie Ternes, Nicolas Sauvageot, Christine Karasi-Omes, Anne-Pascale Henry, Jean-Claude Schmit, Carole Seguin-Devaux and Vic Arendt  
*Current HIV Research, 2011, 9(4):223-8*
- **Simultaneous quantification of zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography**  
Alain Gras, Michel Yegles, Jean-Claude Karasi, Jean-Claude Schmit, Carole Seguin-Devaux, Serge Schneider.  
*Annales de Toxicologie Analytique, 2012 ; 24(4) : 177-183*

## 2. Présentation à des Congrès Internationaux

### Communication orale:

- **Efavirenz and efavirenz metabolite quantification in human serum using LC-MS/MS and correlation with neurological and psychiatric symptoms.**  
Tina Binz, Alain Gras, Michel Vaillant, Carole Devaux, Kurt Wimmer and Serge Schneider  
*12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Stuttgart, Germany, October 2-6, 2011*  
*Data published as abstract in Therapeutic Drug Monitoring – Volume 33, Number 4, August 2011*
- **Antiretroviral drug concentrations in saliva and plasma in patients from Rwanda.**  
Alain Gras, Serge Schneider, Anne-Pascale Henry, Vic Arendt, Christine Omes, Marie-Josée Maliboli, Anne-Marie Ternes, Jean-Claude Karasi, Carole Devaux, Jean-Claude Schmit, Robert Wennig  
*5th European Conference on Clinical and Social Research on Aids and Drugs, Vilnius, Lithuania, 28-30 April 2009*

### Communication sous forme de poster scientifique:

- **Novel CYP2B6 Polymorphisms and their Impact on Efavirenz and Bupropion Metabolism**  
Kathrin Klein, Robert Radloff, Alain Gras, Cécile Masquelier, Karthik Arumugam, Jean-Claude Karasi, Carole Seguin-Devaux, Ulrich M. Zanger  
*Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxicologie, DGPT 2013*  
*Halle/Saale, Germany, 05-07 March 2013*
- **Novel CYP2B6 Polymorphisms: How precise are Functional Predictions?**

Kathrin Klein, Robert Radloff, Alain Gras, Cécile Masquelier, Karthik Arumugam, Jean-Claude Karasi, Carole Seguin-Devaux, Ulrich M. Zanger  
*19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations & 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting*  
*Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 17-21 June 2012*

- **Identification of New CYP2B6 Non-Synonymous SNPs Affecting CYP2B6 Activity in HIV-Infected Patients from Rwanda.**

Alain Gras, Robert Radloff, Cécile Masquelier, Karthik Arumugam, Jean-Claude Karasi, Jean-Claude Schmit, Kathrin Klein, Ulrich Zanger, Carole Devaux  
*19<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*  
*Seattle, Washington, USA, 5-8 March 2012*

- Awarded a Young Investigator Award, CROI 2012

- **Quantification of efavirenz and efavirenz metabolites in human plasma using LC/MS: correlation to neuropsychiatric symptoms.**

Tina Binz, Alain Gras, Michel Vaillant, Carole Devaux, Kurt Wimmer and Serge Schneider

*6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*  
*Rome, Italy, 17-20 July 2011*

- **Simultaneous determination of HIV-retrotranscriptase inhibitors zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography.**

Alain Gras, Michel Yegles, Serge Schneider, Jean-Claude Schmit, Carole Devaux, Robert Wennig

*5th European Conference on Clinical and Social Research on Aids and Drugs, Vilnius, Lithuania, 28-30 April 2009*

- **Use of saliva for TDM and compliance monitoring in HIV positive patients in Rwanda.**

Alain Gras, Serge Schneider, Anne-Pascale Henry, Vic Arendt, Christine Omes, Marie-Josée Maliboli, Anne-Marie Ternes, Jean-Claude Karasi, Carole Devaux, Jean-Claude Schmit, Robert Wennig

*10th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy, Amsterdam, Netherland, 15-17 April 2009;*

*Data published as abstract in the Review in Antiviral Therapy – Volume 2; 2009*



# Efavirenz in Human Breast Milk, Mothers', and Newborns' Plasma

Serge Schneider, PhD,\* Alexandra Peltier, MD,† Alain Gras, MSc,\* Vic Arendt, MD,‡  
Christine Karasi-Omes, PharmD,† Anastasie Mujawamariwa, MD,†  
Patrick C. Ndimubanzi, MD,† Gilles Ndayisaba, MD,† and Robert Wennig, PhD\*

**Background and Methods:** Highly active antiretroviral therapy with efavirenz (EFV) has been prescribed to HIV-positive pregnant women in Rwanda (HIV status 1 and CD4 cell count > 350 cells/mm<sup>3</sup>) during the last trimester of pregnancy and for 6 months after delivery. The EFV concentrations in maternal plasma, breast milk and in newborns' plasma of 13 women and their children between 6 weeks and 6 months post partum are reported.

**Results:** Results show a mean EFV plasma concentration of 6.55 mg/L in maternal plasma, 3.51 mg/L in skim milk, and 0.85 mg/L in infant plasma. Significant linear correlations between maternal plasma and skim milk ( $r = 0.8666$ ,  $P < 0.0001$ ) and between skim milk and infant plasma ( $r = 0.6646$ ,  $P < 0.02$ ) were found, but no significant correlation was observed between maternal and infant plasma concentrations ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions:** After 6 months of breast-feeding, no child out of the 13 had been infected with HIV and all had good psychomotor and growth development. Our results suggest that EFV may be an alternative to nevirapine (NVP) during the third trimester of pregnancy and during the breast-feeding period. Further studies on larger groups of newborns will be necessary to get a better understanding of possible prophylactic protection of the newborns by highly active antiretroviral therapy with EFV given to the mothers.

**Key Words:** breast-feeding, efavirenz, prevention of mother-to-child transmission, HIV

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48:450–454)

## INTRODUCTION

Prevention of mother-to-child transmission of HIV type 1 through human breast milk remains a controversially discussed topic. World Health Organization guidelines recommend avoidance of breast-feeding (BF) and use of replacement

feeding if it is “acceptable, feasible, affordable, sustainable, and safe.”<sup>1</sup> Consequently, in many industrialized countries, BF is strongly discouraged or even prohibited to HIV-positive mothers and a drop of mother-to-child transmission below 2% has been observed in these regions.<sup>2,3</sup> In many resource-limited countries, however, formula feeding (FF) encounters major problems, including high costs of the formula diets,<sup>4</sup> reduced availability of clean drinking water, no stable supply of electricity, and low acceptance among mothers and family members. It has also been reported that in some resource-limited countries only a minority of women are able to breast-feed their children exclusively for more than 6 months.<sup>5</sup> In these regions, World Health Organization recommends exclusive BF during the first months of life and use of replacement feeding as soon as possible.<sup>1</sup> Major advantages of BF versus FF in developing countries include an optimal composition of the milk, adequate water content even in dry regions, and the anti-infectious properties of human milk. As a result, BF is still widespread among HIV-infected women in sub-Saharan countries, and up to 15% of children born to HIV-positive mothers are infected through BF.<sup>6</sup>

Efavirenz (EFV)<sup>7</sup> and NVP are the 2 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors commonly used in first-line highly active antiretroviral therapy (HAART) in resource-limited countries.<sup>1</sup> Both are associated with important side effects. NVP has an increased risk of hepatotoxicity for women with a CD4 count of >250 cells/mm<sup>3</sup> at treatment initiation.<sup>8–10</sup> EFV has been linked to birth defects in animals and to neural tube defects in humans in the case of exposure during the first trimester of pregnancy. Although the prevalence of abnormalities in humans reported in literature is low,<sup>11,12</sup> consensus recommendation is that EFV treatment should be avoided during the first trimester of pregnancy.<sup>13–15</sup> No data about treatment of newborns with EFV are available; treatment of older children was generally well tolerated, and EFV showed a sustained antiviral effect.<sup>16–20</sup>

We here report the detection of EFV in mothers' plasma, infants' plasma, and mothers' breast milk in 13 HIV-positive women and their children taking part in the “AMATA” prospective feasibility study in Rwanda. AMATA stands for Allaitement Maternal sons Trithérapie Antirétrovirante and also means “milk” in the local kinyarwanda language. The determination of EFV blood levels of non infected breast-fed children may give important information not only about possible toxicity and side effects due to HAART with EFV but also about the possibility to provide supplementary protection.

Received for publication August 13, 2007; accepted April 1, 2008.

From the \*Laboratoire National de la Santé, Division de Toxicologie, Université du Luxembourg, Luxembourg, Luxembourg; †Lux-Development, ESTHER Project Luxembourg, Kigali, Rwanda; and ‡Centre Hospitalier Luxembourg, Service des Maladies Infectieuses, Luxembourg, Luxembourg.

Correspondence to: Serge Schneider, PhD, Laboratoire National de la Santé, Division de Toxicologie, Université du Luxembourg, 162a, avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Luxembourg (e-mail: serge.schneider@lns.etat.lu).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

## METHODS

### Study Group

All patients were part of the nonrandomized AMATA feasibility study. This study was conducted from May 2005 to November 2007 in Rwanda. It has been approved by the National Ethical Committee and was carried out in collaboration with Rwandan Ministry of Health. All patients had signed a “written informed consent” before enrolling into the study.

The main objective of the AMATA study was to compare exclusive BF with systematic maternal HAART for a maximum duration of 6 months to exclusive FF for the prevention of postnatal mother-to-child transmission of HIV. The study was open to all pregnant women with confirmed HIV infection. Advantages and disadvantages of BF versus FF were explained to the women before delivery. After receiving these information, they had to choose between FF and BF. If not already on HAART, all women received HAART during pregnancy starting from week 28 of gestation irrespective of the study arm or the CD4 cell count: national treatment regimen (D4T-3TC-NVP) if eligible for HAART or AMATA treatment regimen (AZT-3TC-EFV) if not eligible for HAART according to national guidelines (HIV stage 1 and CD4 cell count  $>350/\text{mm}^3$ ). If they chose to breast-feed, then they received systematic antiretroviral (ARV) triple therapy during the BF period; otherwise, formula diet was given free of charge. Thirteen women coming for their regular follow-up were chosen randomly for the determination of EFV levels. To be eligible, they had to be outside the perinatal period ( $>45$  days) and in good general health condition (including breast condition). Adherence to the ARV treatment was controlled by questionnaires, pill counts, and education. Determination of the viral load of the breast milk has not been performed.

The mean age of the selected women was 27.8 years (SD: 4.0 years, range 21–34 years). All were in HIV clinical stage 1 and had a mean CD4 count of  $631 \text{ cells}/\text{mm}^3$  (SD:  $261 \text{ cells}/\text{mm}^3$ , range  $371\text{--}1232 \text{ cells}/\text{mm}^3$ ). Viral loads were measured at delivery and after 6 months using polymerase chain reaction. Results were below detection level ( $<40 \text{ copies}/\text{mm}^3$ ) or in the low titer region (Table 1). Of the 13 women, 12 received AZT (600 mg/d), 3TC (300 mg/d), and EFV (600 mg/d). One woman received D4T (60 mg/d) instead of AZT. No mother was eligible for HAART after weaning.

The newborns (9 boys, 4 girls) were checked for their HIV status immediately after birth ( $<48$  hours of age), at day 45, at month 3, and at month 7 by DNA-polymerase chain reaction. Newborns received a single dose (2 mg/kg) of NVP in the 72 hours after birth and AZT ( $2 \times 4 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$ ) for 7 days. Physical examination of infants was systematic with notification of weight, height, head circumference, and neurological examination. The mean age of the infants at the moment of blood collection was 15.8 weeks (SD: 6.3 weeks, range: 6–25 weeks).

### Sample Collection and Preparation

Blood and milk samples were collected at the health structure during the morning AMATA routine consultation and immediately after BF. All were collected 3–4 hours after the last drug intake. Plasma was obtained by centrifugation, frozen, shipped on dry ice to Luxembourg, and kept at  $-20^\circ\text{C}$

until analysis. Measurement of CD4 cell counts was performed with a FacsCalibur counter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). HIV-1 levels were determined using Amplicor Monitor Assay (Version 1.5, Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Sample preparation and operating conditions of the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) system have been described earlier.<sup>21</sup> About 40 mL of maternal milk was manually and cleanly extracted (disinfection of breast and use of sterile gloves). Milk was stored in sterile vials and kept in an icebox before being frozen at  $-20^\circ\text{C}$  (maximum 3 hours after sampling). Acetonitrile and hexobarbital (internal standard) were added to the milk and calibration samples. Each solution was vortexed and centrifuged for 5 minutes of 5000 rpm. The supernatant (skim milk) was removed and used in the extraction steps. Extraction of free EFV consisted of 2 liquid–liquid steps followed by a solid phase extraction as described earlier.<sup>21</sup> GC/MS operating conditions were the same as for plasma samples. Validation of the plasma samples has been described previously.<sup>21</sup> Validation for the skim milk was performed using the same parameters and acceptance limits as for plasma samples. Statistical evaluation of the results was performed using GraphStat software (Version 3.06).

## RESULTS

Concentrations of EFV in plasma samples and in skim milk are given in Table 1. Using Kolmogorov–Smirnov test, a Gaussian distribution of the 3 groups of results (skim milk, maternal, and infant plasma) was verified. The mean concentration of EFV was 6.55 mg/L (median 6.03 mg/L, range 1.62–14.43 mg/L, SD: 3.12 mg/L) in maternal plasma, 3.51 mg/L (median 3.45 mg/L, range 1.33–7.44 mg/L, SD: 1.72 mg/L) in skim milk, and 0.86 mg/L (median 0.87 mg/L, range 0.31–1.51 mg/L, SD: 0.41 mg/L) in infant plasma.

EFV concentrations were significantly higher in maternal plasma than in skim milk and higher in skim milk than in infant plasma (Wilcoxon signed ranked test,  $P = 0.0005$  and  $P = 0.0002$ , respectively). The ratios were 0.54 (mean skim milk to mean maternal plasma concentration, M/P) and 4.08, respectively (mean skim milk to mean newborn plasma concentration). The newborn plasma concentration of EFV was an average 13.1% (range: 5.6%–26.8%) of the maternal plasma concentration.

Significant linear correlation between maternal plasma and skim milk (correlation coefficient  $r = 0.8666$ ,  $P < 0.0001$ , Pearson correlation) and between infant plasma and skim milk ( $r = 0.6646$ ,  $P < 0.02$ , Pearson correlation) was observed. However, no significant linear correlation was observed between maternal and infant plasma concentrations ( $r = 0.5441$ ,  $P > 0.05$ ) (Fig. 1).

After 6 months of BF, no child out of the 13 included in this report has been infected with HIV and no clinical side effects due to HAART with EFV treatment of their mothers have been detected. All children show a normal intellectual, psychomotorical (following with eyes, holding head), and growth (length, weight, and head circumference) evolution.

## DISCUSSION

The mean concentration of EFV in maternal plasma was 61% above the  $C_{\text{max}}$  measured in HIV-positive patients

**TABLE 1.** Age, CD4 Cell Count, and Viral Load (VL) at Delivery and After 6 Months of the 13 Mothers

Patient	Age (yrs)	CD4 at Delivery (cells/mm <sup>3</sup> )	VL at Delivery (log 10)	VL After 6 Months (log 10)	EFV Concentration (mg/L)		
					Mother Plasma	Skim Milk	Infant Plasma
1	23	667	1.94	1.68	5.88	2.11	0.85
2	29	427	<1.60	<1.60	6.47	2.77	1.03
3	33	450	<1.60	<1.60	7.86	4.72	1.51
4	34	688	2.46	<1.60	9.97	5.13	1.04
5	21	437	<1.60	<1.60	6.03	2.14	0.53
6	29	512	<1.60	1.82	3.11	1.33	0.31
7	23	1232	<1.60	<1.60	5.77	2.27	0.32
8	25	579	<1.60	<1.60	6.96	4.33	0.59
9	29	534	np	<1.60	1.62	1.67	0.43
10	25	1033	<1.60	np	5.59	3.77	1.5
11	32	841	<1.60	<1.60	4.93	4.56	0.91
12	31	371	2.08	<1.60	14.43	7.44	1.25
13	28	427	<1.60	np	6.48	3.45	0.87
Mean	27.8	630.6	—	—	6.55	3.51	0.86
Median	29	534	—	—	6.03	3.45	0.87
SD	4.14	261.2	—	—	3.12	1.72	0.41

EFV concentrations in mother plasma, skim milk, and infant plasma.  
np, not performed.

receiving a daily dose of 600 mg of EFV.<sup>22</sup> This may be explained by parameters such as nutritional status, age, enzymatic activity, and genetic specificity of the local population. Ribaud et al,<sup>23</sup> for example, have shown a slower clearance rate of EFV in black and Hispanic patients than in white patients.

The M/P ratio of EFV is not documented in the literature, and M/P ratios of drugs often have high intra- and interindividual variability.<sup>24</sup> Several antagonistic processes may explain the measured ratio of 0.54: Diffusion of EFV into milk is favored by its lipophilic properties but disfavored by a relatively high molecular weight (315 g/mol), a high pKa (10.2), and a high volume of distribution (252 L for a 600-mg dose).

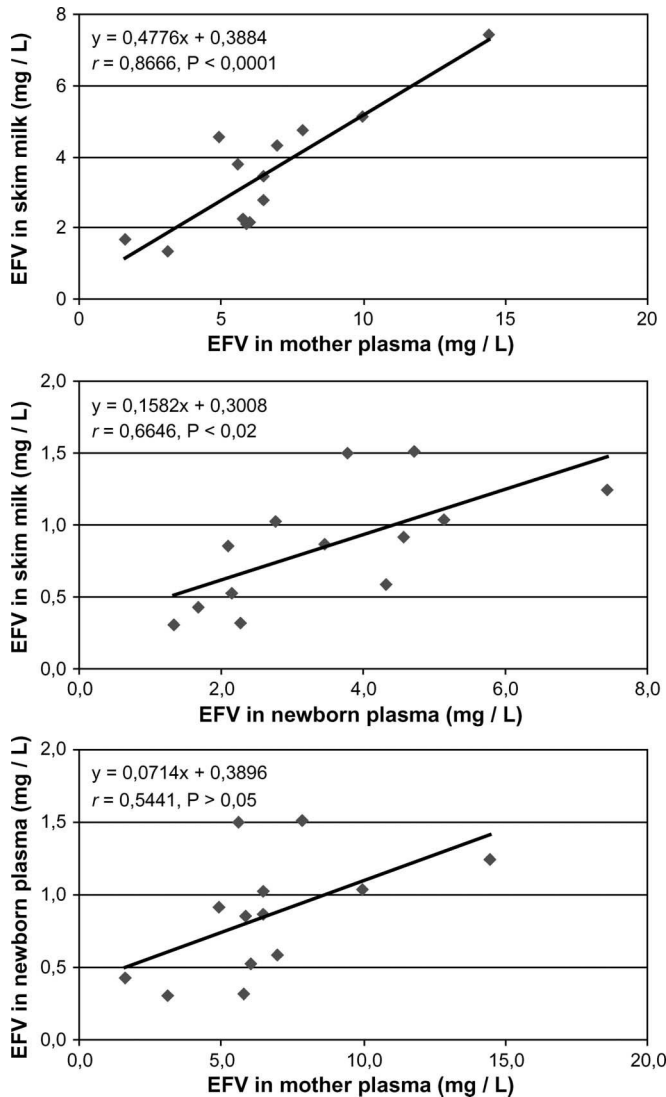
EFV concentration in the infant plasma compared with the breast milk depends on elimination efficiency and protein binding in the newborn and on EFV protein binding in the milk. Several authors reported lower than expected area under the curve (AUC) values in young children treated with doses based on pharmacokinetic data of older children and concluded that these dose definitions may not be applicable.<sup>25,26</sup> EFV is mainly metabolized in the liver by the CYP3A4 and CYP2B6 enzymes. No data about CYP2B6 increase or decrease during the post partum period or its activity in newborns have been published.<sup>27</sup> Some studies imply that the liver from infants at 1 month of age possesses only 30% of the CYP3A4 activity associated with adult livers.<sup>28</sup> This activity seems to approach adult levels by 6–12 months of age.<sup>29</sup> It has also been reported that total plasma protein-binding levels are lower in newborns than in adults<sup>30</sup> and that human serum albumin concentrations are only 75%–80% of adult levels. If these results suggest that EFV in newborns should be relatively high, then it is also known that pharmacokinetic processes in children undergo important changes during their growth,

making ab initio estimation of the free versus bound ratio of EFV very difficult.<sup>31</sup> No data are available about the binding interactions of breast milk proteins and EFV.

Giuliano et al<sup>32</sup> have reported that triple therapy (AZT, 3TC and NVP) given during pregnancy and after delivery significantly reduces breast milk viral load, thus reducing viral exposure through breast milk in breast-fed newborns. Of the 13 newborns, 8 in this study have EFV concentrations below the lower therapeutic level recommended for adults. In case of HIV infection, subtherapeutic EFV levels may lead to development of resistance. However, no data about the minimum EFV concentrations necessary for effective protection in neonates for prevention of mother-to-child transmission have been published. Further studies on larger groups of women and children will be necessary to clarify if breast milk concentrations of EFV are sufficient to inhibit viral replication and if the dose given to the infants through breast milk is sufficient for protection against virus present in breast milk.

## CONCLUSIONS

EFV passes into breast milk and is present in the blood of breast-fed infants. Mean infant plasma concentrations of EFV were 13.1% of maternal plasma concentrations and slightly below the lower therapeutic level generally considered necessary for effective treatment in adults. Because of the low number of patients included in this study, it was not possible to draw conclusions about protective effects or health risks for the children associated with the antiretroviral therapy treatment of the mothers. However, considering the good health status of the mothers and of the infants, our results suggest that EFV may be an alternative to NVP to women in the third trimester of pregnancy and during BF. No data about EFV in neonates are currently available, so additional studies on a



**FIGURE 1.** Correlation of EFV concentrations in mother plasma/skim milk, newborn plasma/skim milk, and mother plasma/infant plasma (*r*, correlation coefficient; *P*, Pearson correlation).

larger group of patients will be necessary for a better understanding of long-term benefits and risks of EFV administration to neonates through breast milk.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr Annemie Otto for helpful discussion and Dr Marc Schumann for review of this manuscript.

**REFERENCES**

1. WHO. *Antiretroviral Drugs for Treating Pregnant Women and Preventing HIV Infection in Infants: Towards Universal Access. Recommendations for a Public Health Approach.* Geneva, Switzerland; 2006. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/pmtctguidelines3.pdf>. Accessed May 19, 2008.
2. Palombi L, Marazzi M, Voetberg A, et al. Treatment acceleration program and the experience of the DREAM program in prevention of mother-to-child transmission of HIV. *AIDS.* 2007;4:65–71.

3. Suksomboon N, Poolsup N, Ket-Aim S. Systematic review of the efficacy of antiretroviral therapies for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *J Clin Pharm Ther.* 2007;32:293–311.
4. Ogundele M, Coulter J. HIV transmission through breastfeeding: problems and prevention. *Ann Trop Paediatr.* 2003;23:91–106.
5. Magoni M, Okong P, Bassani L, et al. Mode of infant feeding and HIV infection in children in a program for prevention of mother-to-child transmission in Uganda. *AIDS.* 2005;19:433–437.
6. UNAIDS. *2006 Report on the Global AIDS Epidemic.* Geneva, Switzerland; 2006.
7. Vrounenraets SM, Wit FW, van Tongeren J, et al. Efavirenz: a review. *Expert Opin Pharmacother.* 2007;8:851–871.
8. Lyons F, Hopkins S, Kelleher B, et al. Maternal hepatotoxicity with nevirapine as part of combination antiretroviral therapy in pregnancy. *HIV Med.* 2006;7:255–260.
9. Rivero A, Mira JA, Pineda JA. Liver toxicity induced by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:342–346.
10. Shibuyama S, Gevorkyan A, Yoo U, et al. Understanding and avoiding antiretroviral adverse events. *Curr Pharm Des.* 2006;12:1075–1090.
11. Jeantils V, Khuong M, Delassus J, et al. Efavirenz (Sustiva) in pregnancy: a study about 12 HIV patients. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006;34:593–596.
12. Bussmann H, Wester CW, Wester CN, et al. Pregnancy rates and birth outcomes among women on efavirenz-containing highly active antiretroviral therapy in Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:269–273.
13. Waters L, John L, Nelson M. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review. *Int J Clin Pract.* 2007;61:105–118.
14. Watts D. Treating HIV during pregnancy: an update on safety issues. *Drug Saf.* 2006;29:467–490.
15. Thorne C, Newell ML. The safety of antiretroviral drugs in pregnancy. *Expert Opin Drug Saf.* 2005;4:323–335.
16. Funk MB, Notheis G, Schuster T, et al. Effect of first line therapy including efavirenz and two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-infected children. *Eur J Med Res.* 2005;10:503–508.
17. Engelhorn C, Hoffmann F, Notheis G, et al. Effect of antiretroviral combination therapies including efavirenz in heavily pretreated HIV-infected children. *Eur J Med Res.* 2002;7:30–34.
18. Starr SE, Fletcher CV, Spector SA, et al. Combination therapy with efavirenz, nelfinavir, and nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in children infected with human immunodeficiency virus type 1. Pediatric AIDS Clinical Trials Group 382 Team. *N Engl J Med.* 1999;341:1874–1881.
19. Wamalwa DC, Farquhar C, Obimbo EM, et al. Early response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected Kenyan children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:311–317.
20. Scherpbier HJ, Bekker V, Pajkrt D, et al. Once-daily highly active antiretroviral therapy for HIV-infected children: Safety and efficacy of an efavirenz-containing regimen. *Pediatrics.* 2007;119:e705–715.
21. Lemmer P, Schneider S, Schuman M, et al. Determination of nevirapine and efavirenz in plasma using GC/MS in selected ion monitoring mode. *Ther Drug Monit.* 2005;27:521–525.
22. EMEA. Stocrin, European Public Assessment Report, Annexe 1. Available at: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Stocrin/H-250-PI-fr.pdf>. Accessed February 20, 2008.
23. Ribaud H, Clifford D, Gulick R, et al. Relationships between efavirenz pharmacokinetics, side effects, drug discontinuation, virologic response, and race: results from ACTG A5095/A5097s. In: *11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* San Francisco, CA; 2004.
24. Anderson G. Using pharmacokinetics to predict the effects of pregnancy and maternal-infant transfer of drugs during lactation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2:947–960.
25. Brundage R, Fletcher C, Fenton T. Efavirenz (EFV) and nelfinavir (NFV) pharmacokinetics (PK) in HIV-infected children under 2 years of age. *7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* San Francisco, CA; 2000.

26. Mirochnick M, Stek A, Acevedo M, et al. Safety and pharmacokinetics of nelfinavir coadministered with zidovudine and lamivudine in infants during the first 6 weeks of life. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;39:189–194.
27. Mirochnick M, Capparelli E. Pharmacokinetics of antiretrovirals in pregnant women. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:1071–1087.
28. Pearce R, Gotschall R, Kearns G, et al. Cytochrome P450 involvement in the biotransformation of cisapride and racemic norcisapride in vitro: differential activity of individual human CYP3A isoforms. *Drug Metab Dispos*. 2001;29:1548–1554.
29. Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, et al. Expression of CYP3A in the human liver—evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem*. 1997;247:625–634.
30. Alcorn J, McNamara P. Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:667–686.
31. Back D, Gatti G, Fletcher C, et al. Therapeutic drug monitoring in HIV infection. *AIDS*. 2002;16:S5–S37.
32. Giuliano M, Guidotti G, Andreotti M, et al. Triple antiretroviral prophylaxis administered during pregnancy and after delivery significantly reduces breast milk viral load: a study within the Drug Resource Enhancement Against AIDS and Malnutrition Program. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;44:286–291.

# Evaluation of Saliva as an Alternative Matrix for Monitoring Plasma Zidovudine, Lamivudine and Nevirapine Concentrations in Rwanda<sup>§</sup>

Alain Gras<sup>\*,1</sup>, Serge Schneider<sup>2</sup>, Jean-Claude Karasi<sup>1</sup>, Anne-Marie Ternes<sup>1</sup>, Nicolas Sauvageot<sup>3</sup>, Christine Karasi-Omes<sup>4</sup>, Anne-Pascale Henry<sup>5</sup>, Jean-Claude Schmit<sup>1,6</sup>, Carole Seguin-Devaux<sup>1</sup> and Vic Arendt<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>CRP-Santé, Laboratory of Retrovirology, Luxembourg; <sup>2</sup>Laboratoire National de Santé (LNS), Division of Toxicology, Luxembourg; <sup>3</sup>CRP-Santé, Centre d'Etudes en Santé, Luxembourg; <sup>4</sup>Lux-Development, Luxembourg; <sup>5</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Kigali, Rwanda; <sup>6</sup>Centre Hospitalier Luxembourg, Service National des Maladies Infectieuses, Luxembourg

**Abstract:** Saliva may provide interesting advantages as matrix for compliance measurements, pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring in resource limited countries. We investigated the feasibility of using saliva for compliance monitoring of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and nevirapine (NVP) in 29 HIV-1 infected patients from Rwanda. ZDV, 3TC and NVP drug levels were quantified by an LC/MS-MS method in plasma and stimulated saliva samples and compared using Bland-Altman analysis. Seven patients demonstrated undetectable saliva ZDV levels while five out of these seven also showed no 3TC salivary concentrations. For the other samples, we observed a good agreement between salivary and plasma concentrations of each antiretroviral drug. A significant relation between the difference in saliva and plasma ZDV concentrations and the average ZDV concentration in the two matrices was deduced as follows:  $y = -380.15 + 1.79 x$ . The log saliva and plasma concentration difference of both 3TC and NVP was consistent across the range of average log concentration. Overall, we showed large agreement limits suggesting a wide inter patient variability that may result in non-reliable plasma level predictions from saliva drug measurements. Therefore, our results indicate that saliva may serve as a valuable tool only for NVP compliance testing because of its high salivary concentration.

**Keywords:** Developing countries, HAART, lamivudine, nevirapine, patient compliance, saliva, zidovudine.

## INTRODUCTION

Oral fluids have been introduced since the early eighties as a matrix for detection and quantification of drugs and drugs of abuse. Compared to blood sampling, whole saliva has several important advantages: fluid collection is non-invasive, skin irritation or bruising in patients with poor venous access can be avoided and sample collection is safe. Further, saliva is a cost-effective tool for screening a large population and allows multiple sample collections at any time of the day [1]. However, saliva cannot be used as a simple substitute for blood testing since pharmacokinetic characteristics of many drugs are more complex in saliva than in blood [2].

Few studies investigated the use of saliva for therapeutic drug monitoring (TDM) and/or compliance control studies in HIV infected patients undergoing antiretroviral therapy (HAART) [3-6]. Rolinski and collaborators have shown a good correlation between plasma and salivary concentrations of zidovudine (ZDV) in ten HIV-infected patients suggesting that stimulated saliva might be an appropriate specimen for ZDV-TDM [3]. Plasma nevirapine (NVP) concentrations were strongly correlated with stimulated saliva levels from

NVP-treated adults [4]. Although indinavir concentrations in saliva were shown to be related to plasma concentrations, the authors of the study did not recommend saliva for TDM because of significant intra and inter individual variations [5]. However, a correlation between two matrix values does not automatically imply a good agreement between two methods of measurement. The Bland and Altman method [7] is the method of choice to assess graphically agreement between two body fluids. Using this method, agreement between plasma and non stimulated NVP saliva levels in children on multi-HAART regimen was reported [6].

The majority of HIV-infected individuals are living in Sub-Saharan Africa. More than 75 000 individuals received HAART in Rwanda in 2009. Although virological and immunological outcomes to HAART in Rwanda were comparable to western countries [8-10], routine supervision and adherence data are limited [10]. The aim of our study was to investigate the agreement between salivary and plasma concentrations of ZDV, lamivudine (3TC) and NVP for adherence and pharmacokinetic studies in resource limited settings.

## MATERIAL AND METHODS

### Study Group

The study was a cross-sectional design in a prospective cohort initiated by the ESTHER ("Ensemble de Solidarité Thérapeutique Hospitalière en Réseau") project at the HIV clinic of the Treatment Research AIDS Center (TRAC) in Kigali. All participants signed a written consent form before

\*Address correspondence to this author at the Laboratory of Retrovirology, CRP-Santé, Rue Val Fleuri, 84, L-1526 Luxembourg; Tel: 00352 26 970 319; Fax: 00352 26 970 221; E-mail: alain.gras@crp-sante.lu

<sup>§</sup>Data previously presented in part at the 10<sup>th</sup> International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy; 15<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> April 2009, Amsterdam, The Netherlands (Review in Antiviral Therapy – Volume 2; 2009).

being enrolled into the survey. HAART treatment consisted of ZDV/3TC (Combivir<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline, London) and NVP (Viramune<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) taken twice daily. The total daily dose was 600 mg ZDV, 300 mg 3TC and 400 mg NVP. Adherence to the antiretroviral (ARV) treatment was controlled by frequent questionnaires and pill counts. Patient characteristics are summarized in Table 1.

**Table 1. Characteristics of the 29 HIV-1 Infected Patients**

Patient Characteristics		Value
<b>Gender, n</b>	Women	23
	Men	6
<b>Age, years</b>	Mean (SD)	40.7 (8.1)
	Range	27 – 60
<b>Body weight, kg</b>	Mean (SD)	57.1 (9.1)
	Range	40 – 75
<b>CD4 cell count<sup>a</sup>, cells/mm<sup>3</sup></b>	Mean (SD)	195.0 (122.4)
	Range	3 – 588
<b>WHO clinical stage, n (%)</b>	1	1 (3)
	2	4 (14)
	3	19 (66)
	4	5 (17)

<sup>a</sup>CD4 cell counts were measured using a FACScalibur<sup>™</sup> Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA); n, number of patients; SD, standard deviation; WHO, World Health Organization.

### Sample Collection and Preparation

Blood and saliva samples were collected during a routine consultation, 3 to 5 hours (mean 225 min) after the last drug intake. Saliva was collected using a Salivette<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) containing a roll-shaped saliva collector impregnated with citric acid to stimulate salivation. The swab was chewed for one to two minutes and placed back in the insert. Plasma and salivettes were shipped on dry ice to Luxembourg and stored at -20°C before analysis. Then the salivettes were centrifuged for 5 minutes at 3 500 g to collect the saliva while the swabs were washed with an ethyl acetate/methanol mixture (1/1, v/v). Extracts were evaporated and the residual saliva added to the previously collected saliva. One milliliter of saliva or plasma was then mixed to 1 ml ammonium buffer at pH 9.5 and Mebeverine which served as internal standard. Unbound ARVs were extracted with solid phase extraction cartridges as described earlier [11, 12]. After evaporating the extracts to dryness under nitrogen at 40°C, the residues were reconstituted in 100 µl ammonium formate buffer (pH 3.8) for quantitative analysis.

### Antiretroviral Drug Concentration Measurements

Detection and quantification of ARV drugs was carried out on a high performance liquid chromatography system coupled to a LCQ<sup>™</sup> Duo Ion Trap Detector (Thermo Electron, Zellik, Belgium) equipped with an electrospray ionization interface and operated in both positive and negative ion mode. The separation of sample components

was achieved on an XTerra<sup>®</sup> MS C18 column (5 µm particle size, 3.9 x 150 mm, Waters, Overijse, Belgium), equipped with a similar pre-column (10 mm). The mobile phase consisted of a mixture of 5 mM ammonium formate buffer at pH 3.8 and acetonitrile. Validation parameters for the quantification method included determination of extraction yield, establish interday and intraday accuracy and repeatability as well as verification of absence of ion suppression in the calibration range. Six point calibration curves covering the therapeutic ranges of the ARV drugs were established and all  $r^2$  were  $\geq 0.98$ .

### Statistics

ARV concentrations were analyzed using R v.2.10.1. Applying the Bland-Altman method [13], log differences between saliva and plasma measurements were plotted against their average log concentration to determine the bias and the 95% limits of agreement (bias  $\pm$  1.96 standard deviation, SD). The Shapiro-Wilk test was used to assess normality of log differences, one condition of the Bland-Altman method. A linear regression analysis was used to confirm the lack of relationship between the two measurements and the average concentration (both expressed in log). If saliva minus plasma levels were still related to the average concentration after log transformation, a regression approach for non-uniform differences was applied [14] and regression based limits of agreement for the difference in drug concentrations were calculated. According to the Bland and Altman's recommendation, 95% limits of agreement for a saliva/plasma (S/P) ratio with back-transformed log values was then calculated.

### RESULTS

Mean and median concentrations of unbound ZDV, 3TC and NVP in saliva and plasma of the 29 HIV-1 infected Rwandan patients are given in Table 2. Seven patients demonstrated saliva ZDV concentrations below the detection limit with two also showing undetectable plasma ZDV. Among these seven patients, five had indiscernible 3TC salivary levels. One patient was considered as an outlier for saliva ZDV concentrations because the range observed was 10 fold higher than the physiological concentrations. These saliva and plasma concentrations have not been included in the statistical analysis. NVP was detected in all plasma and saliva samples (concentrations ranging from 207 to 9 730 ng/ml in saliva and from 417 to 8 917 ng/ml in plasma).

Average unbound ZDV was higher in the saliva compartment than in the plasma with a mean S/P ratio of  $4.0 \pm 9.8$  (mean  $\pm$  SD) whereas unbound 3TC plasma concentrations were higher than salivary concentrations in all patients (mean S/P ratio =  $0.3 \pm 0.2$ , Table 2). Mean concentrations of unbound NVP were similar in plasma and in saliva with a mean S/P ratio of  $1.5 \pm 2.1$ . For NVP, 15/29 patients had a S/P ratio  $< 1$  indicating a high heterogeneity of the blood-saliva diffusion between individuals. Interestingly, most patients (10/15) with a ratio  $< 1$  for NVP had also a ratio  $< 1$  for ZDV.

A relationship between the differences of plasma and saliva drug concentrations and the average concentrations in the two measurements was established for each drug

**Table 2. Mean and Median of Antiretroviral Drug Concentrations in Plasma and Saliva**

	Zidovudine	Lamivudine	Nevirapine
<b>Plasma concentrations<sup>a</sup></b>	<i>n</i> = 26	<i>n</i> = 29	<i>n</i> = 29
<b>Mean (SD)</b>	205 (179)	1 349 (759)	3 045 (2 302)
<b>Median (IQR)</b>	148 (107 - 286)	1 213 (837 - 1 965)	2 707 (914 - 4 586)
<b>Salivary concentrations<sup>b</sup></b>	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 24	<i>n</i> = 29
<b>Mean (SD)</b>	498 (789)	372 (438)	2 769 (2 513)
<b>Median (IQR)</b>	238 (84 - 612)	197 (161 - 350)	1 558 (462 - 4 547)
<b>Saliva/Plasma ratio</b>	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 24	<i>n</i> = 29
<b>Mean (SD)</b>	4.0 (9.8)	0.3 (0.2)	1.5 (2.1)

<sup>a</sup>Unbound plasma concentrations in ng/ml; <sup>b</sup>Unbound saliva concentrations in ng/ml; IQR, interquartile range; *n*, number of patients; SD, standard deviation.

( $p < 0.05$ ; Table 3). Therefore, each sample was finally defined by the log saliva (S) – log plasma (P) difference and the average log concentrations [7, 13, 14]. The log-transformed measurement differences followed the normal distribution for each drug. The ZDV plot revealed a linear relationship between the log difference and average log concentration whereas the log difference of 3TC and NVP were consistent across the range of average log concentrations (Fig. 1). The log-based linear regression model confirmed the independence of the log(S)-log(P) differences and log average for both 3TC and NVP (Table 3). The plots revealed a good agreement between salivary and plasma concentrations with only one sample outside the limits of agreement for NVP (Fig. 1). However, the estimated limits of agreement between the two matrices were relatively high for both 3TC and NVP (within 0.03 and 1.13 for the 3TC S/P ratio and 0.06 and 9.09 for the NVP S/P ratio). Using linear regression analyses, we could confirm a significant relationship between the log(S) – log(P) differences and the average ZDV log concentration ( $p < 0.05$ , Table 3). Therefore, regression based limits of agreement for non-uniform differences in ZDV concentrations were calculated as previously described [14]. As shown in Fig. (2), the differences in ZDV saliva and plasma concentrations increased with increasing drug concentrations. The statistical relation between the ZDV difference saliva – plasma ( $y$ ) and the mean concentrations ( $x$ ) was expressed as follows:  $y = -380.15 + 1.79 x$ . A good agreement between the two values was observed; only one ZDV sample was outside the limits of agreement but large 95% limits of agreement were obtained ( $-1\ 104.84 + 1.79 x$ ,  $344.54 + 1.79 x$ ).

## DISCUSSION

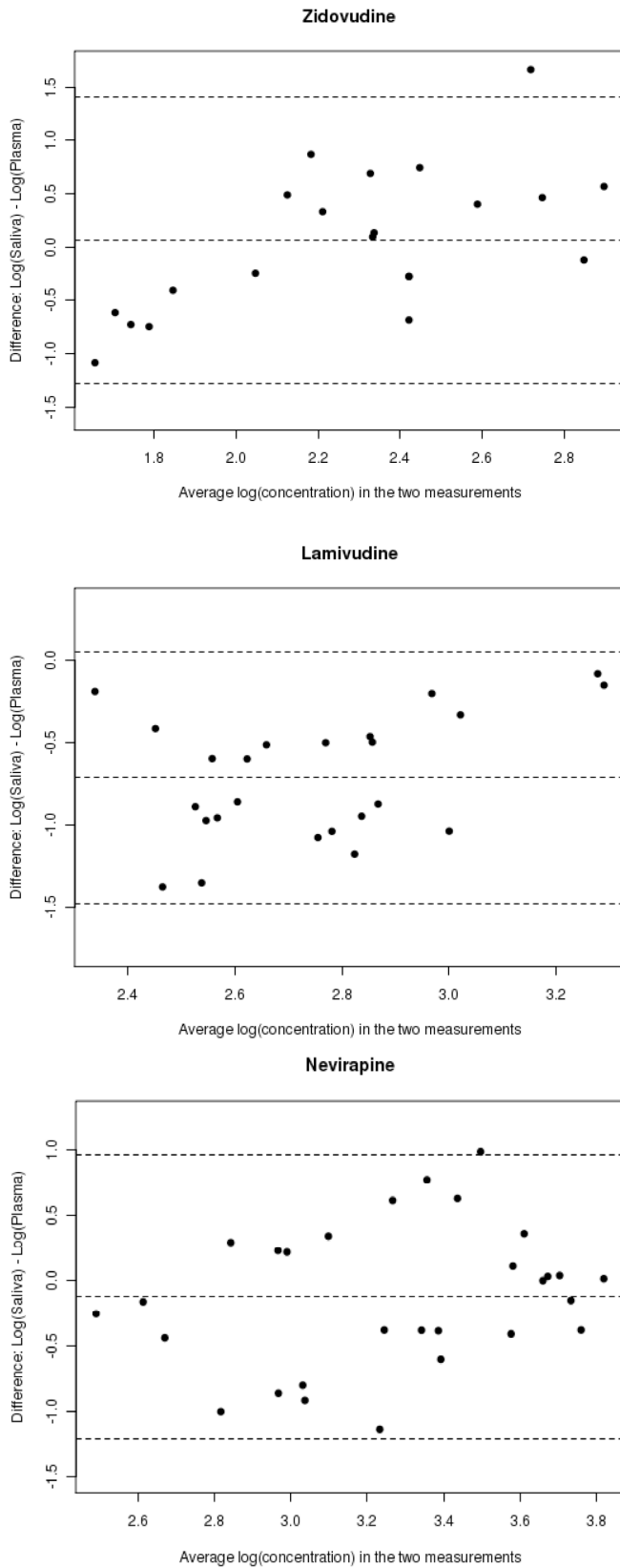
A number of clinical trials have demonstrated that plasma concentrations of antiretroviral drugs are an important factor for treatment response [15]. Concentration based antiretroviral drug dose reduction might increase access to safer therapy while preserving viral load suppression [16, 17]. In contrast, inadequate drug concentrations, often due to drug adherence failure, may lead to appearance of toxicity or drug resistance mutations. Lack of compliance of HAART-treated patients is estimated to occur between 40% and 60% of patients [18]. Combined with resistance tests, assessment of adherence may prove to be useful in developing countries [19] to preserve limited

second line treatment. Genotypic resistance testing has been initiated in Rwanda [8, 9, 20] and close monitoring of patients at risk has been proposed as a relevant strategy [21]. To our knowledge, our study is the first study evaluating the utility of saliva in a Sub-Saharan population for which specific genetic background, medications and diet might influence differently antiretroviral pharmacokinetics both in plasma and saliva.

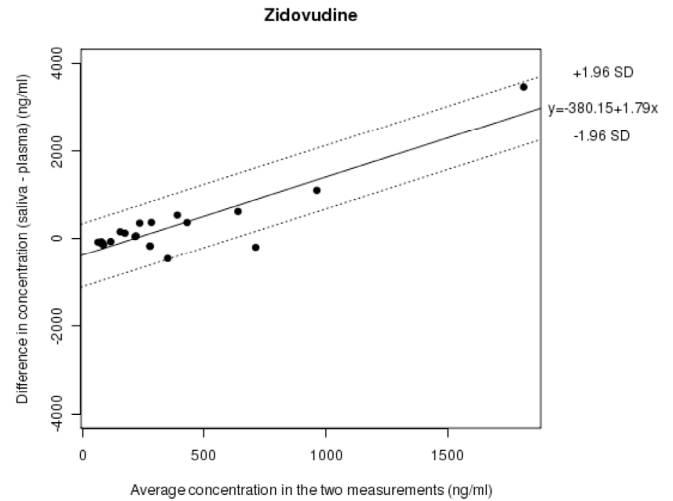
Although we showed a good agreement between saliva and plasma levels of ZDV, 3TC and NVP, the high inter individual variability represented by large 95% limits of agreement does not allow an accurate quantitative deduction of plasma ARV levels based on saliva ARV concentrations. In plasma, the inter patient variability of antiretroviral drugs has been reported by us [11, 12] and by others [22, 23] and has been attributed to genetic influences, diet and/or presence of other drugs and diseases [24-26]. In saliva, the parameters responsible for drug concentration variations may be salivary flow rate, salivary pH, and drug pharmacokinetics. The salivary flow rate varies as a function of nutritional and emotional state, age, presence of diseases and/or presence of other drugs [27]. High inter individual but low intra individual variation of saliva pH has been described [28]. Variations in S/P ratios between individuals may also be linked to differences in bound and unbound drug concentrations in plasma. This variation was reported to be high for NVP [29], relatively low for ZDV [30] and to vary as a function of age for 3TC [31].

Predicting plasma ARV concentrations from saliva is based on the assumption that saliva drug concentrations are related to unbound blood levels of the drug. The blood – saliva transfer of drugs appears to be a passive diffusion process. The S/P ratio has been described as a function of drug pKa, of differences in drug protein binding in blood and saliva and the pH in the saliva and plasma [32]. In normal physiological conditions (blood pH of 7.4 and a saliva pH range from 5.5 – 7.9), considering a pKa of 9.7 and an unbound drug fraction of 0.81 for ZDV, 4.3 and 0.64 for 3TC and 2.8 and 32 for NVP respectively, the S/P ratios for the three drugs were estimated to vary from 0.3 to 64 for ZDV, 0.1 to 2.0 for 3TC and 0.1 to 1.0 for NVP depending on the saliva pH. In our study, the average S/P values of unbound ZDV, 3TC and NVP were 4.0, 0.3 and 1.5 respectively. With its pKa of 9.7, ZDV is present in plasma in a non-ionized form and has fewer difficulties to diffuse





**Fig. (1).** Zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and nevirapine (NVP) Bland-Altman plots representing the differences between log saliva and log plasma as a function of the average log concentrations. The ZDV plot showed a relationship between the log differences and the mean log concentrations. A good agreement between the two body fluids for 3TC and NVP was observed.



**Fig. (2).** Linear regression plot between the saliva minus plasma concentration differences and the average concentrations in the two matrices following the equation  $y = -380.15 + 1.79x$ . One sample was outside the limits of agreement.

**Table 3.** Statistical p-Values of the Linear Regression Analysis for Zidovudine, Lamivudine and Nevirapine Bland-Altman Plots

	Zidovudine	Lamivudine	Nevirapine
p-value <sup>a</sup>	8.62 E-10	0.02	0.04
p-value <sup>b</sup>	0.00224	0.055	0.171

<sup>a</sup>Relation between saliva minus plasma difference and average concentrations; <sup>b</sup>Relation between difference of log saliva and log plasma and average log concentrations.

through the cell membranes than the ionized 3TC (pKa of 4.3). Thus, unbound 3TC concentrations were found to be higher in plasma than in saliva. Independent of the presence of ionized NVP molecules at pH 7.4, the mean unbound salivary concentration of NVP was as high as the plasma levels that might be a consequence of its greater lipophilicity as compared to ZDV and 3TC.

Based on correlation coefficients, ZDV and NVP concentrations were previously significantly related in the two matrices [3, 4, 6]. We also observed a significant correlation by the non parametric Spearman correlation rank test for each ARV (data not shown). However, the use of correlation coefficients to compare two different biological compartments is misleading [7, 13, 14] as the physiological parameters modulating the drug concentrations in the two body fluids are diverse. Using the Bland-Altman analysis, the 3TC and NVP plots indicated a non equal distribution in the two matrices among the patients, while the ZDV plot revealed a linear relationship between the log difference in saliva and plasma concentrations and the mean log concentrations. Although an accurate prediction of ZDV plasma concentrations can be deduced from a linear equation, the large 95% limits of agreement as well as the 7 samples without detectable saliva concentrations have to be taken into account and may hint towards other influent parameters in these patients.

TDM is recommended to decipher drug interactions or to explain poor response to treatment and side-effects related to high dose of antiretroviral drugs in HIV-infected patients. Considering that we did not address the question of TDM in our study that only included a limited number of patients, the usability of saliva seems ambiguous. In conclusion, our data suggest that saliva may only be used for NVP as a valuable tool for compliance testing in resource limited countries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to the Rwandan patients for taking part in the study and to the health-care workers for collecting the samples. The authors also acknowledge Lux-Development, the “Fonds National de la Recherche” (FNR) of Luxembourg for its financial support [TR-PHD BFR08/072] as well as the “Fonds de lutte contre le trafic de stupéfiants” for the LC/MS-MS. No potential conflict of interest exists.

The design of this research study was carried out by Vic Arendt and Jean-Claude Schmit. Christine Omes and Jean-Claude Karasi selected the patients, collected the clinical data and submitted the project to the Rwandese Ethical Committee. The blood sample collection was supervised by Anne-Pascale Henry. Serge Schneider and Alain Gras developed the ARV quantification method and carried out the concentration measurements. Anne-Marie Ternes and Nicolas Sauvageot performed the statistical analysis. Carole Seguin-Devaux and Serge Schneider analysed the data and were involved in the writing of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

- [1] Choo RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Med* 2004; 42(11): 1273-87.
- [2] Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *The Clin biochemist* 2006; 27(3): 147-59.
- [3] Rolinski B, Wintergerst U, Matuschke A, *et al.* Evaluation of saliva as a specimen for monitoring zidovudine therapy in HIV-infected patients. *AIDS* 1991; 5(7): 885-8.
- [4] van Heeswijk RP, Veldkamp AI, Mulder JW, *et al.* Saliva as an alternative body fluid for therapeutic drug monitoring of the nonnucleoside reverse transcription inhibitor nevirapine. *Ther Drug Monit* 2001; 23(3): 255-8.
- [5] Hugen PW, Burger DM, de Graaff M, *et al.* Saliva as a specimen for monitoring compliance but not for predicting plasma concentrations in patients with HIV treated with indinavir. *Ther Drug Monit* 2000; 22(4): 437-45.
- [6] Rakhmanina NY, Capparelli EV, van den Anker JN, *et al.* Nevirapine concentration in nonstimulated saliva: an alternative to plasma sampling in children with human immunodeficiency virus infection. *Ther Drug Monit* 2007; 29(1): 110-7.
- [7] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 8; 1(8476): 307-10.
- [8] Fischer A, Karasi JC, Kibibi D, *et al.* Antiviral efficacy and resistance in patients on antiretroviral therapy in Kigali, Rwanda: the real-life situation in 2002. *HIV Med* 2006; 7(1): 64-6.
- [9] Karasi JC, Servais JY, Musonera F, *et al.* Immunovirological outcomes and drug resistance profiles of the Rwandese HIV ART Cohort. 7th European HIV Drug Resistance Workshop 25-27 March, 2009 Stockholm, Sweden Reviews in Antiviral Therapy. p. Abstract #24.
- [10] Lowrance DW, Ndamage F, Kayirangwa E, *et al.* Adult clinical and immunologic outcomes of the national antiretroviral treatment program in Rwanda during 2004-2005. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 1; 52(1): 49-55.
- [11] Schneider S, Peltier A, Gras A, *et al.* Efavirenz in human breast milk, mothers', and newborns' plasma. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 48(4): 450-4.
- [12] Lemmer P, Schneider S, Schuman M, *et al.* Determination of nevirapine and efavirenz in plasma using GC/MS in selected ion monitoring mode. *Ther Drug Monit*. 2005; 27(4): 521-5.
- [13] Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 1995 21; 346(8982): 1085-7.
- [14] Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999; 8(2): 135-60.
- [15] Rakhmanina NY, van den Anker JN, Soldin SJ. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral therapy. *Aids Patient Care STDS* 2004; 18(1): 7-14.
- [16] Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, *et al.* Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clin Infect Dis* 2007; 45(9): 1230-7.
- [17] Rendon A, Nunez M, Jimenez-Nacher I, Gonzalez de Requena D, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Clinical benefit of interventions driven by therapeutic drug monitoring. *HIV Med* 2005; 6(5): 360-5.
- [18] Simoni JM, Frick PA, Lockhart D, Liebovitz D. Mediators of social support and antiretroviral adherence among an indigent population in New York City. *Aids Patient Care STDS* 2002; 16(9): 431-9.
- [19] Fraaij PL, Rakhmanina N, Burger DM, de Groot R. Therapeutic drug monitoring in children with HIV/AIDS. *Ther Drug Monit*. 2004; 26(2): 122-6.
- [20] Karasi JC, Musonera F, Servais JY, *et al.* HIV-1 molecular epidemiology and prevalence of drug resistance in treatment-naïve and HAART-treated patients between 2003 and 2009 in Rwanda. International HIV and Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop and Curative Strategies 8-12 June, 2010 Dubrovnik, Croatia Antiretroviral Therapy. p. A143.
- [21] van Griensven J, Zachariah R, Rasschaert F, Mugabo J, Atte EF, Reid T. Stavudine- and nevirapine-related drug toxicity while on generic fixed-dose antiretroviral treatment: incidence, timing and risk factors in a three-year cohort in Kigali, Rwanda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104(2): 148-53.
- [22] Fabbiani M, Di Giambenedetto S, Bracciale L, *et al.* Pharmacokinetic variability of antiretroviral drugs and correlation with virological outcome: 2 years of experience in routine clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(1): 109-17.
- [23] Clevenbergh P, Mouly S, Sellier P, *et al.* Improving HIV infection management using antiretroviral plasma drug levels monitoring: a clinician's point of view. *Curr HIV Res* 2004; 2(4): 309-21.
- [24] de Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp EC, Beijnen JH. Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54(4): 378-85.
- [25] Macnab KA, Gill MJ, Sutherland LR, De Boer Visser N, Church D. Erratic zidovudine bioavailability in HIV seropositive patients. *J Antimicrob Chemother*. 1993; 31(3): 421-8.
- [26] Ivanovic J, Nicastrì E, Ascenzi P, *et al.* Therapeutic drug monitoring in the management of HIV-infected patients. *Curr Med Chem* 2008; 15(19): 1925-39.
- [27] Shannon IL, Suddick RP, Dowd FJ, Jr. Saliva: composition and secretion. *Monogr Oral Sci* 1974; 2: 1-103.
- [28] Grossman L, Brickman B. Some Observations on the pH of Saliva. *J Dent Res* 1937; 16: 409-16.
- [29] Almond LM, Boffito M, Hoggard PG, *et al.* Nevirapine Protein Binding in HIV Infected Individuals. 6th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection 17-21 November 2002 Glasgow, UK Int Cong Drug Therapy HIV 2002 Nov 17-21. p. Abstract No. P164.
- [30] Rolinski B, Wintergerst U, Goebel FD, Roscher AA, Belohradsky BH. Determination of the protein-bound fraction of zidovudine in serum. 7th International AIDS Conference June 16-21, 1991 Florence, Italy. p. 208. Abstract #W.B.2107.
- [31] Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(1): 41-66.
- [32] Rasmussen F. Salivary Excretion of Sulphonamides and Barbiturates by Cows and Goats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1964; 21: 11-9.

## Original article / Article original

# Simultaneous quantification of zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

## *Quantification simultanée de zidovudine, stavudine, lamivudine et névirapine par chromatographie électrocinétique micellaire*

Alain Gras<sup>1,\*</sup>, Michel Yegles<sup>2</sup>, Jean-Claude Karasi<sup>1</sup>, Jean-Claude Schmit<sup>1,3</sup>, Carole Seguin-Devaux<sup>1</sup>, Serge Schneider<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Retrovirology, CRP-Santé, Rue Val Fleuri 84, 1526 Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg

<sup>2</sup> Laboratoire National de la Santé, Toxicology, Avenue de la Faïencerie 162a, 1511 Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg

<sup>3</sup> Service National des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier de Luxembourg, Rue Ernest Barblé 4, 1210 Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg

**Abstract – Purpose:** Recent improvements to the availability of antiretroviral therapy in Sub-Saharan Africa can be attributed to the generic formulation of antiretroviral drugs. Quality drug surveillance, routine supervision and adherence data are however restricted owing to a fundamental lack of resources in the area. Accordingly we have developed an affordable micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method for the simultaneous detection and quantification of zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine in plasma. **Methods:** The antiretroviral drugs were extracted by solid phase extraction. Various factors influencing separation of the four drugs have been optimized. A buffer consisting of 5 mM sodium tetraborate at pH 9.8, containing 50 mM SDS, 30% methanol and 5% ethanol was found to be particularly suitable and the MEKC method was validated. **Results:** All validation parameters were within the 20% acceptance limit, except for the interday precision of stavudine which required a daily calibration curve. The limit of quantification (LOQ) for zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine were 0.037, 0.051, 0.029 and 0.028 mg/L respectively and were below the therapeutic concentration ranges of each drug. The optimized MEKC method was successfully applied to 16 human plasma samples. **Conclusion:** Our sensitive and validated method was demonstrated to be suitable for simultaneous detection and quantification of zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine. This cost-effective method could be of interest for resource limited countries not only for adherence or therapeutic monitoring but also for steady-state pharmacokinetic studies of generic ARV drugs.

**Key words:** Capillary electrophoresis, drug monitoring, highly active antiretroviral therapy, Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, plasma

**Résumé – Objectif :** L'accès aux thérapies antirétrovirales en Afrique sub-saharienne s'est récemment nettement amélioré grâce à l'apparition des antirétroviraux sous la forme de génériques. Cependant, la surveillance de la qualité des médicaments, le suivi thérapeutique de routine et les données concernant l'observance restent limités dans ces régions du fait du manque de ressources. Par conséquent, nous avons développé une méthode de chromatographie électrocinétique micellaire (CEM) à faible coût permettant la détection et la quantification simultanée de zidovudine, stavudine, lamivudine et névirapine dans le plasma. **Méthodes :** Une extraction en phase solide a été réalisée afin d'isoler les médicaments antirétroviraux. Différents facteurs influençant la séparation des quatre composants ont été optimisés. Un tampon constitué de tétraborate de sodium 5 mM à pH 9,8, contenant 50 mM de SDS, 30 % méthanol et 5 % éthanol s'avérait le plus adéquat et la méthode CEM a été validée. **Résultats :** Tous les paramètres de validation étaient dans la limite d'acceptabilité de 20 %. La répétabilité calculée pour la stavudine dépassait cependant légèrement cette limite nécessitant l'analyse journalière d'une courbe de calibration. La limite de quantification (LOQ) de la

\* Correspondence: Alain Gras, [alain.gras@crp-sante.lu](mailto:alain.gras@crp-sante.lu)

zidovudine, de la stavudine, de la lamivudine et de la névirapine étaient respectivement de 0,037, 0,051, 0,029 et 0,028 mg/L, par conséquent, inférieures aux concentrations thérapeutiques de chaque médicament. Seize plasmas humains ont été analysés avec succès par la méthode CEM optimisée. **Conclusion :** Notre méthode sensible et validée a permis la détection et la quantification simultanée de zidovudine, stavudine, lamivudine et névirapine. Cette méthode à faible coût pourrait convenir aux pays en voie de développement non seulement pour le suivi de l'observance du traitement ou le suivi thérapeutique pharmacologique mais aussi pour des études pharmacocinétiques des antirétroviraux génériques.

**Mots clés :** Électrophorèse capillaire, pharmacovigilance, traitement antirétroviral hautement actif, chromatographie électrocinétique micellaire, plasma sanguin

Received 30 July 2012, accepted after revision 13 December 2012

Published online 12 March 2013

## 1 Introduction

The Human Immunodeficiency Virus (HIV), responsible for the acquired immunodeficiency syndrome pandemic, is estimated to affect 34 million people worldwide, the majority living in Sub-Saharan Africa. Large-scale programs have expanded access to antiretroviral therapy in this region thanks to affordable generic antiretroviral (ARV) drugs. First-line treatment regimens are mainly based on combinations of two nucleoside inhibitors, either stavudine (D4T), lamivudine (3TC) or zidovudine (ZDV), and one non-nucleoside inhibitor like nevirapine (NVP) or efavirenz (EFV). Sub-Saharan African HIV-infected patients are mainly treated with the generic formulation Triumune<sup>®</sup>, a tablet containing fixed dose combinations of D4T, 3TC and NVP.

Due to a lack of resources and material, ongoing surveillance of generic drug quality is never performed by the authorities before approval in resource-limited countries and routine supervision or adherence data are limited [1, 2]. Non-adherence to antiretroviral drugs or sub-optimal ARV drug plasma concentrations resulting from drug interactions are leading to an accumulation of resistance mutations and subsequent treatment failures [3, 4]. Compliance testing and therapeutic drug monitoring would therefore be beneficial to preserve the limited availability of second line treatment options in these countries [5]. It is notable that some variants of the cytochrome P450 CYP2B6 gene, known to predict decreased plasma NVP or EFV clearance, are more frequent in black African individuals [6–9]. It is therefore crucial to develop affordable ARV quantification methods to allow intensive pharmacokinetic studies in these populations.

Alternate separation techniques such as HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF/TOF and MALDI triple quadrupole MS/MS have been described [10–15]. However, these costly methods require highly qualified human resources and an extremely well-equipped infrastructure limiting their use in Sub-Saharan Africa.

Capillary electrophoresis (CE) has become an invaluable analytical tool for the determination of drugs in biological matrices and only requires nL volumes of sample amounts [16–19]. CE could indeed serve as the method of choice for separating, analysing and monitoring of drugs in resource-limited countries [20]. Few CE methods have been reported to measure ARV concentrations and were mainly based on micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) allowing separation of charged and uncharged

compounds [21–26]. Sekar and Azhaguel described two different MEKC methods to separate 3TC and ZDV as well as 3TC, D4T and NVP in pharmaceutical formulations but they encountered difficulties to separate 3TC from the electroosmotic flow (EOF) peak [21, 22]. Separation and quantitation of ZDV, NVP and EFV using MEKC was then validated in human serum by two other groups [23, 25]. Tuan *et al.* separated fifteen protease and reverse transcriptase inhibitors in human serum samples with a fast MEKC method [26]. However, the method was not fully validated and showed low recovery for 3TC and only a satisfactory limit of detection (LOD) value for ZDV probably due to a large volume of redissolution (500  $\mu$ L) of the dried residue to avoid electrophoretic matrix interferences. The aim of our study was to develop a validated MEKC method enabling simultaneous quantification of ZDV, D4T, 3TC and NVP. The method was further applied to plasma samples of 16 HIV-infected patients under antiretroviral therapy.

## 2 Material and methods

### 2.1 Reagents and preparation of electrolytes

Zidovudine, lamivudine, stavudine and nevirapine were provided by the National Health Laboratory – Toxicology (Luxembourg). Methaqualone was purchased from Cerilliant Corporation (Texas, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S), phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85%) and sodium hydroxide (NaOH) were provided by Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Sodium tetraborate (anhydrous, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>), boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), ethanol, methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and ammonia (NH<sub>3</sub>, 25%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) was purchased from VWR BDH Prolabo (Leuven, Belgium). High quality ultrapure water was gained from Millipore's AFS 8 Q-Guard A System (Brussels, Belgium).

Ammonia (NH<sub>3</sub>, 25%) was added to a saturated solution of ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) to obtain an ammonium buffer with a pH equal to 9.5. Phosphate buffers at 50 and 100 mM were prepared from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and adjusted to pH 4.5 and 2.5, respectively. Different MEKC buffers were evaluated: a first buffer containing 12.5 mM sodium tetraborate, 15 mM boric acid, 90 mM SDS and 5% (v/v) ACN with a pH of 10.8 and a second buffer at pH 9.8 containing 10 mM sodium tetraborate, 20 mM SDS, 30% ACN and 5% ethanol. Finally, the most suitable buffer for the separation of the four ARVs consisted of 5 mM sodium tetraborate (anhydrous) adjusted at pH 9.8

containing 50 mM SDS, 30% (v/v) methanol and 5% (v/v) ethanol. Optimal separation was achieved using a daily fresh prepared buffer solution filtered with a sterile 0.22  $\mu\text{m}$  pore size Millex filter to avoid SDS clusters. During each day, buffer solutions were replaced after 12 sample runs.

## 2.2 Preparation of spiked samples and collection of specimens

Methanolic standard solutions of ARV compounds (1 000 mg/L) and of methaqualone (100 mg/L) were prepared in screw top clear glass vials and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Lymphochek Drug Free Serum (Biorad) was spiked with the ARV standard solutions at a concentration of 10 mg/L for NVP (1% v/v) and 4 mg/L for ZDV, 3TC and D4T (0.4% v/v) respectively and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis.

Anonymized plasma samples from 16 HIV-infected patients under antiretroviral therapy were provided from routine left-over of the "Centre Hospitalier de Luxembourg" (CHL). Nine patients received the ARV drugs Combivir<sup>®</sup> (300 mg ZDV and 150 mg 3TC, twice daily) and Viramune<sup>®</sup> (200 mg NVP, twice daily). Three patients were treated with Zerit<sup>®</sup> (30 mg or 40 mg D4T depending on patient's weight, twice daily), Epivir<sup>®</sup> (150 mg 3TC, twice daily) and Viramune<sup>®</sup> (200 mg NVP, twice daily). Two patients had an EFV regimen (600 mg tablet, once a day) in combination with either ZDV, 3TC (300 mg/150 mg, twice a day) or D4T (40 mg, twice daily), 3TC (150 mg, once a day). The protease inhibitor nelfinavir was given to two patients ( $5 \times 250$  mg tablets, twice daily) in combination with D4T (40 mg, twice a day) and 3TC (150 mg, twice daily or 300 mg, once a day).

## 2.3 Extraction procedure

Waters' Oasis<sup>®</sup> HLB solid phase extraction (SPE) cartridges were used to extract the ARV from specimens and spiked samples. The cartridges were conditioned with 2 mL of methanol, 2 mL of deionised water and 2 mL of ammonium buffer at pH 9.5. 1 mL plasma was mixed to 1 mL ammonium buffer (pH 9.5). A fixed concentration of 2 mg/L of methaqualone was used as internal standard (IS). The sample mixtures were added to the cartridges and drained slowly under slight vacuum. The sorbents were washed with 2 mL of deionised water and dried under vacuum for 15 min. A second wash with 2 mL of hexane/dichloromethane (95:5; v/v) was performed under vacuum. ARV drugs were eluted with 2 mL of methanol. The extracts were evaporated to dryness at  $40^\circ\text{C}$  under nitrogen flux and the residues were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of methanol. To further eliminate interfering matrix compounds, the suspension was centrifuged at 18 000 g for 6 min. 95  $\mu\text{L}$  of the upper layer was evaporated a second time and reconstituted in 10  $\mu\text{L}$  methanol/water (1:1; v/v) for capillary electrophoresis analysis.

## 2.4 Instrumental parameters and CE conditioning

The drugs' electrophoretic separation was conducted on a Beckman P/ACE<sup>™</sup>MDQ Capillary Electrophoresis System equipped with a diode array detector (Beckman Coulter,

Fullerton, CA, USA). The 32 Karat software (version 7.0) was used for data acquisition and parameters modification. A 64.6 cm long polyimide coated fused silica capillary with an effective length of 54.3 cm, an outer diameter of  $363 \pm 10 \mu\text{m}$  and an inner diameter of  $75 \pm 3 \mu\text{m}$  (Composite Metal Services Ltd., Shipley, UK) was chosen for optimal separation. Prior to each sample analysis, the capillary was rinsed at 25 psi with 0.2 M NaOH for 18 s and conditioned with the MEKC buffer for 42 s. A hydrodynamic absorption was done at 0.5 psi for 10 s. Sample stacking was achieved with a short injection of deionised water at 0.1 psi for 1 s. Analytes were separated by applying a 30 kV voltage for 20 min between the positive pole of the anode (left) and the negative pole of the cathode (right). The resulting current varied between 50 and 55  $\mu\text{A}$ . The capillary was heated at  $27^\circ\text{C}$ . Finally, the capillary was rinsed with 0.2 M NaOH at 25 psi for 90 s. All analytes were scanned by a DAD at a wavelength of 230 nm (scan range: 190 nm–320 nm). The scan data rate was 16 Hz. A high sensitivity filter with a peak width of more than 25 points was chosen for optimal data acquisition. Each spiked sample or specimen was analysed in triplicate.

## 2.5 Method validation procedure

Validation of the method was performed in terms of linearity, intra- and interday precision and accuracy, recovery, LOD and limit of quantification (LOQ).

Ten drug free serum samples spiked with 1.6 mg/L of ZDV, D4T and 3TC and 4 mg/L of NVP were used to determine intraday precision and accuracy. The interday repeatability and accuracy were determined by measuring six equally spiked samples during five days. The baseline noise from a drug free serum sample spiked with 0.4 mg/L ZDV, D4T and 3TC and 1 mg/L NVP was compared with the peak areas of each analytical compound to define the LOD (signal-to-noise ratio (S/N) > 3) and the LOQ (S/N > 10). Recovery of the analytes after SPE was calculated by comparing the peak areas of the ARVs of a blank serum sample spiked with 0.8 mg/L of ZDV, D4T and 3TC and 2 mg/L of NVP before the SPE with those of a plasma sample spiked after the SPE. The acceptance limit for the different validation criteria was fixed at 20%.

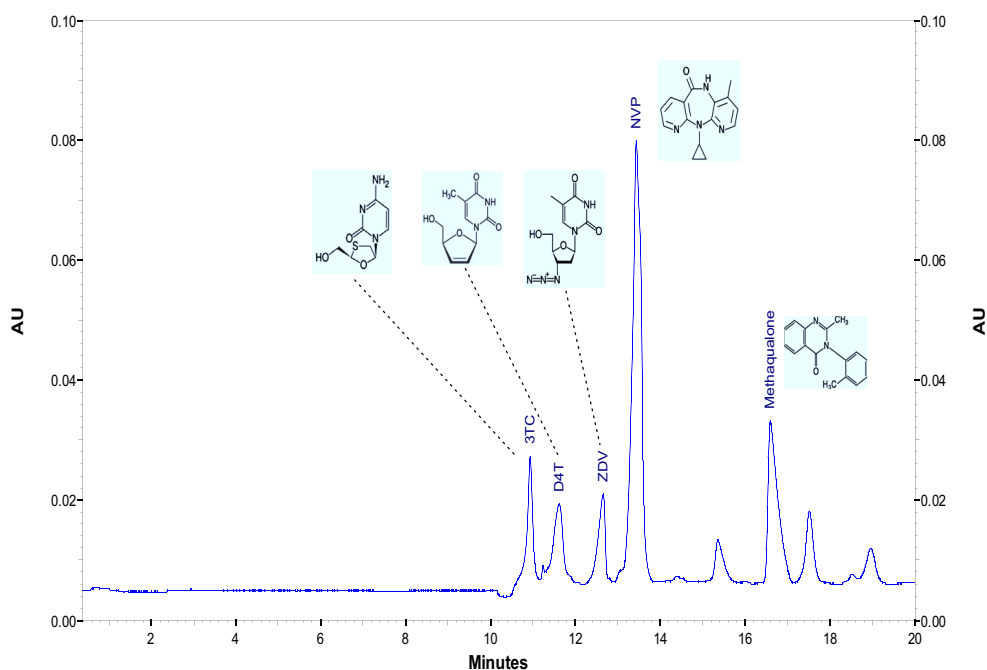
## 3 Results and discussion

### 3.1 Development of a new MEKC method for ARV separation

A capillary zone electrophoretic method with a 50 mM phosphate buffer at pH 4.5 was firstly evaluated to separate ZDV, D4T, 3TC and NVP of a spiked serum sample. However, only 3TC and NVP could be separated. An increase of the phosphate concentration (from 50 to 100 mM) and changes of the buffer pH could not improve the separation efficiency.

Different MEKC methods were tested to get an optimal separation of the four ARVs. Based on the work of Sekar and Azhaguvel, a buffer containing 12.5 mM sodium tetraborate and 15 mM boric acid adjusted at pH 10.8, 90 mM SDS and 5% ACN was evaluated [21]. With the same electrophoretic





**Fig. 1.** (Color online) Electropherogram of a spiked serum sample with 1.6 mg/L ZDV, D4T and 3TC and 4 mg/L NVP. The ARVs were scanned at a wavelength of 230 nm.

conditions, the 3TC peak was separated from the EOF peak. Two additional peaks for ZDV and D4T appeared but NVP was undetectable. To modify the EOF and the electrophoretic mobility of the different drugs, additions of 10%, 20% and 30% of ACN were tested to change their solvation [27]. The best result was achieved with 10% ACN but the peaks of ZDV and D4T were no longer separated. Addition of 2% or 5% ethanol and a raise of 5 °C of the capillary temperature (from 25 °C to 30 °C) did not influence the ZDV or D4T electrophoretic migration. Since ZDV and D4T could be separated with a slightly modified version of the buffer used by the group of Pereira, a buffer solution with 10 mM sodium tetraborate (pH 9.8), 50 mM SDS, 30% MeOH and 5% ethanol allowed a good separation between the EOF and the 3TC peak but the capillary temperature had to be raised at 40 °C to get an optimal separation of each ARV drug [25]. To avoid high temperature and the subsequent Joule effect, a decrease of the tetraborate concentration to a final 5 mM was tested and gave similar separation results with a capillary temperature of 27 °C and a voltage of 30 kV. The new MEKC buffer in combination with the method characteristics and the optimal data acquisition parameters were further shown to be effective for the determination of ZDV, D4T, 3TC and NVP in plasma samples.

### 3.2 Validation of the separation method

An electropherogram of a spiked sample with 1.6 mg/L ZDV, D4T and 3TC and 4 mg/L NVP is shown in figure 1. Preliminary tests showed that better validation results were obtained for ZDV, D4T and 3TC without the IS. For this reason, methaqualone was only used for NVP.

With the peak areas of seven point standards plotted against the concentration, a good linearity of the method was

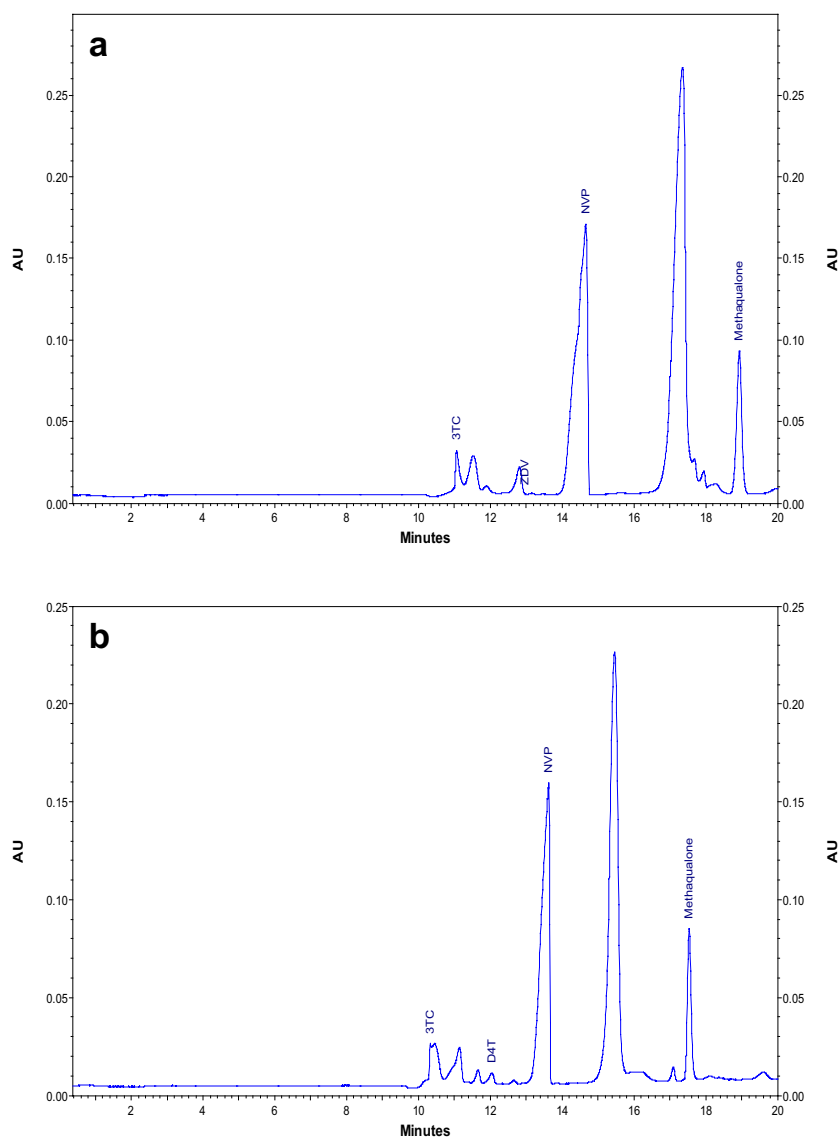
**Table I.** Coefficient of determination, LOD, LOQ and recovery.

ARV drug	R <sup>2</sup> a)	LOD <sup>b)</sup> (mg/L)	LOQ <sup>c)</sup> (mg/L)	Recovery <sup>d)</sup> (%)
Zidovudine	0.997	0.011	0.037	109.1
Stavudine	0.992	0.015	0.051	105.7
Lamivudine	0.989	0.009	0.029	107.7
Nevirapine	0.996	0.008	0.028	87.9

a) coefficient of determination, b) S/N > 3, c) S/N > 10, d) number of samples  $n = 2$ .

observed. The coefficient of determination was equal to 0.99 for each drug (table I). The calibration curves were linear over the concentration ranges of 0.037–3.2 mg/L, 0.051–3.2 mg/L, 0.029–3.2 mg/L and 0.028–8.0 mg/L for ZDV, D4T, 3TC and NVP, respectively and covered the therapeutic concentration spectrum of the ARVs. Limits of detection and quantification (table I) were found to be lower than in previous studies reported by others, the LODs were 10 to 100 times lower than in the study of Sekar and Azhaguvel [21], Fan and Stewart [23], Pereira *et al.* [25], and Tuan *et al.* [26].

ARVs extracted from serum with SPE cartridges were successfully recovered (near 100% for ZDV, D4T and 3TC and 88% for NVP, table I). Therefore, to further evaluate the robustness of the MEKC method for NVP, an external quality control (QC) plasma sample containing 3.53 mg/L NVP was added in the validation procedure. The QC was part of the Anti-HIV program launched by the Association for Quality Assessment in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (KKGTT, den Haag, The Netherlands). NVP was successfully quantified: the measured concentration was 3.42 mg/L with an accuracy of 96.9%.



**Fig. 2.** (Color online) (a) Electropherogram of a plasma sample from an HIV-infected patient treated with zidovudine, lamivudine and nevirapine. The measured drug concentration of ZDV, 3TC and NVP were 0.95 mg/L, 0.97 mg/L and 4.86 mg/L, respectively. (b) Electropherogram of a plasma sample from an HIV-infected patient treated with stavudine, lamivudine and nevirapine. The measured drug concentration of D4T, 3TC and NVP were 0.53 mg/L, 3.03 mg/L and 6.70 mg/L, respectively.

**Table II.** Intra- and Interday measurements.

ARV drug	Concentration (mg/L)	Intraday (n = 10)		Interday (n = 6)	
		Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)
Zidovudine	1.6	17.23	99.19	14.07	88.44
Stavudine	1.6	12.63	96.69	22.78	88.11
Lamivudine	1.6	14.88	114.88	10.60	97.03
Nevirapine	4.0	12.15	88.71	15.89	103.39

Intra- and interday repeatability and accuracy were within the acceptance limit, except for the interday precision of D4T (22.78%, table II). Consequently, a calibration curve has to be performed daily before each run.

### 3.3 Analysis of plasma samples from 16 HIV infected patients under HAART

The validated method was applied to 16 plasma samples from HIV-infected patients under antiretroviral therapy. Figure 2 shows representative electropherograms of a

ZDV-3TC-NVP and a D4T-3TC-NVP plasma sample, respectively. The ARV concentrations are presented in table III. ZDV, D4T, 3TC and NVP drug concentrations ranged from 0.02 mg/L to 1.14 mg/L, 0.13 mg/L to 0.86 mg/L, 0.13 mg/L to 3.03 mg/L and 2.34 mg/L to 8.55 mg/L, respectively. One ZDV plasma sample out of 10 had an undetectable drug level. We assumed that the drug concentration was below the detection limit of our method. The sample extract was further analysed with a routine LC/MS-MS technique with a detection limit of 125 ng/L but no ZDV could be detected. These results strongly suggested the absence of the ZDV compound in the patient's

**Table III.** Quantification of ARVs in plasma samples of treated HIV – infected patients.

Number of patients	HAART <sup>a)</sup>	Daily Dose (mg)	Mean ZDV (SD <sup>b)</sup> (mg/L)	Mean D4T (SD) (mg/L)	Mean 3TC (SD) (mg/L)	Mean NVP (SD) (mg/L)
1	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.05 (0.004)	/	0.30 (0.04)	6.50
2	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.06 (0.01)	/	0.21 (0.02)	8.55 (0.77)
3	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.06 (0.01)	/	0.13 (0.01)	8.33 (0.67)
4	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	1.14 (0.14)	/	0.51 (0.04)	4.70 (0.99)
5	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.95 (0.48)	/	0.97 (0.27)	4.86 (0.77)
6	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.40 (0.01)	/	0.16 (0.06)	2.53 (0.06)
7	ZDV-3TC-EFV <sup>c)</sup>	600-300-600	0.08 (0.01)	/	0.45 (0.07)	/
8	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.03 (0.02; < LOQ)	/	0.25 (0.04)	5.87 (1.73)
9	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	0.02 (0.002; < LOQ)	/	0.17 (0.01)	2.34 (1.18)
10	ZDV-3TC-NVP	600-300-400	nd <sup>d)</sup>	/	0.27 (0.01)	3.76 (0.15)
11	D4T-3TC-NVP	80-300-400	/	0.53 (0.02)	3.03 (0.05)	6.70 (0.18)
12	D4T-3TC-NVP	60-300-400	/	0.13 (0.04)	0.15 (0.04)	3.50
13	D4T-3TC-NVP	60-300-400	/	0.86 (0.07)	0.33 (0.03)	3.67 (0.94)
14	D4T-3TC-NFV <sup>e)</sup>	80-300-2,500	/	0.39 (0.01)	0.22 (0.02)	/
15	D4T-3TC-EFV	80-150-600	/	0.35 (0.07)	2.71 (0.16)	/
16	D4T-3TC-NFV	80-300-2,500	/	0.50 (0.08)	1.36 (0.08)	/

<sup>a)</sup> Highly Active Antiretroviral Therapy, <sup>b)</sup> Standard deviation, <sup>c)</sup> Efavirenz, <sup>d)</sup> Not detected, <sup>e)</sup> Nelfinavir.

plasma. The period of time between the last drug intake and the sample collection, pharmacogenetic factors or some drug-drug interactions could explain the absence of ZDV in this sample.

#### 4 Conclusion

The reported MEKC method has been developed to simultaneously quantify ZDV, D4T, 3TC and NVP in plasma samples. The various buffer components and the data acquisition parameters were optimized. The method was validated in terms of linearity, intra- and interday repeatability and accuracy, LOD, LOQ and recovery of each ARV drug after SPE but not fully validated in accordance with the quality assurance schemes ISO 17025 or 15189 or with the 2011 EMEA guidelines [28]. It was further successfully applied to 16 plasma samples from HIV infected patients under ARV treatment. Due to the LOQ values below the therapeutic drug ranges, our method can be proposed for therapeutic drug monitoring of ARVs. Therefore, this cost-effective method could be of interest for resource-limited countries not only for adherence or therapeutic monitoring but also for steady-state pharmacokinetic studies of generic ARV drugs.

**Conflicts of interests.** The authors have declared no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This study was granted by the *Aides à la Formation Recherche* (AFR) of the *Fonds National de la Recherche* (FNR) from Luxembourg [TR-PHD BFR08/072].

#### References

- Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Kalemeera F, D'Avolio A, Mauro S, Di Perri G, Ryan M, Mayanja-Kizza H, Khoo S, Back D, Boffito M, Merry C. Steady-state pharmacokinetic comparison of generic and branded formulations of stavudine, lamivudine and nevirapine in HIV-infected Ugandan adults. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(5): 1113–1117.
- Lowrance DW, Ndamage F, Kayirangwa E, Ndagije F, Lo W, Hoover DR, Hanson J, Elul B, Ayaba A, Ellerbrock T, Rukundo A, Shumbusho F, Nash D, Mugabo J, Assimwe A. Adult clinical and immunologic outcomes of the national antiretroviral treatment program in Rwanda during 2004-2005. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 52(1): 49–55.
- Quiros-Roldan E, Torti C, Lapadula G, Ladisa N, Micheli V, Patroni A, Cusato M, Pierotti P, Tirelli V, Uccelli MC, Di Giambenedetto S, Castelnuevo F, Gargiulo F, Manca N, Carosi G. Adherence and plasma drug concentrations are predictors of confirmed virologic response after 24-week salvage highly active antiretroviral therapy. *Aids Patient Care STDS.* 2007; 21(2): 92–99.
- Re MC, Bon I, Monari P, Gorini R, Schiavone P, Gibellini D, La Placa M. Drug failure during HIV-1 treatment. New perspectives in monitoring drug resistance. *New Microbiol.* 2003; 26(4): 405–413.
- Peters BS, Conway K. Therapy for HIV: past, present, and future. *Adv Dent Res.* 2011; 23(1): 23–27.
- Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB, Tierney C, Wilkinson GR, Gulick RM, Clifford DB, Hulgan T, Marzolini C, Acosta EP. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an adult AIDS clinical trials group study. *AIDS.* 2004; 18(18): 2391–2400.
- Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Decosterd L, Telenti A. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15(1): 1–5.
- Penzak SR, Kabuye G, Mugenyi P, Mbamanya F, Natarajan V, Alfaro RM, Kityo C, Formentini E, Masur H. Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) G516T influences nevirapine plasma concentrations in HIV-infected patients in Uganda. *HIV Med.* 2007; 8(2): 86–91.
- Haas DW, Gebretsadik T, Mayo G, Menon UN, Acosta EP, Shintani A, Floyd M, Stein CM, Wilkinson GR. Associations between CYP2B6 polymorphisms and pharmacokinetics after a single dose of nevirapine or efavirenz in African americans. *J Infect Dis.* 2009; 199(6): 872–880.



10. Donnerer J, Kronawetter M, Kapper A, Haas I, Kessler HH. Therapeutic drug monitoring of the HIV/AIDS drugs abacavir, zidovudine, efavirenz, nevirapine, indinavir, lopinavir, and nelfinavir. *Pharmacology*. 2003; 69(4): 197–204.
11. Schuman M, Schneider S, Omes C, Wennig R, Fundira L, Tayari JC, Arendt V. HPLC analysis of generic antiretroviral drugs purchased in Rwanda. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb*. 2005; (3): 317–325.
12. Rebiere H, Mazel B, Civade C, Bonnet PA. Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 850(1-2): 376–383.
13. Taylor PJ, Tai CH, Franklin ME, Pillans PI. The current role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressant and antiretroviral drugs. *Clin Biochem*. 2011; 44(1): 14–20.
14. Notari S, Mancone C, Alonzi T, Tripodi M, Narciso P, Ascenzi P. Determination of abacavir, amprenavir, didanosine, efavirenz, nevirapine, and stavudine concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008; 863(2): 249–257.
15. Meesters RJ, van Kampen JJ, Reedijk ML, Scheuer RD, Dekker LJ, Burger DM, Hartwig NG, Osterhaus AD, Luijckx TM, Gruters RA. Ultrafast and high-throughput mass spectrometric assay for therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in pediatric HIV-1 infection applying dried blood spots. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 398(1): 319–328.
16. Chiang JF, Hsiao YT, Ko WK, Wu SM. Analysis of multiple abused drugs and hypnotics in urine by sweeping CE. *Electrophoresis*. 2009; 30(14): 2583–2589.
17. Steppe M, Prado MS, Tavares MF, Kedor-Hackmann ER, Santoro MI. Determination of cephalexin in oral suspensions by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of capillary electrophoresis and microchip technology*. 2002; 7(3-4): 81–86.
18. Yang YH, Wu WY, Yeh HH, Chen SH. Simultaneous determination of cefepime and vancomycin in plasma and cerebrospinal fluid by MEKC with direct sample injection and application for bacterial meningitis. *Electrophoresis*. 2007; 28(11): 1788–1797.
19. Znaleziona J, Petr J, Maier V, Knob R, Horakova J, Smetanova D, Sevcik J. Capillary electrophoresis as a verification tool for immunochemical drug screening. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007; 151(1): 31–36.
20. Marini RD, Rozet E, Montes ML, Rohrbasser C, Roht S, Rheme D, Bonnabry P, Schappler J, Veuthey JL, Hubert P, Rudaz S. Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. *J Pharm Biomed Anal*. 2010; 53(5): 1278–1287.
21. Sekar R, Azhaguvel S. Simultaneous determination of HIV-protease inhibitors lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2005; 39(3-4): 653–660.
22. Sekar R, Azhaguvel S. MEKC determination of antiretroviral reverse transcriptase inhibitors lamivudine, stavudine, and nevirapine in pharmaceutical formulations. *Chromatographia*. 2008; 67(5): 389–398.
23. Fan B, Stewart JT. Determinations of zidovudine/didanosine/nevirapine and zidovudine/didanosine/ritonavir in human serum by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2002; 30(4): 955–960.
24. Fan B, Stewart JT. Determination of lamivudine/didanosine/nevirapine in human serum using capillary zone electrophoresis. *J Capill Electrophor Microchip Technol*. 2002; 7(5-6): 103–106.
25. Pereira EA, Mücke GA, Tavares MF. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2005; 1091(1-2): 169–176.
26. Tuan ND, Gutleben W, Scherer K, Stoiber H, Falkensammer B, Dierich MP, Zemann A. Simultaneous separation of fifteen approved protease and reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus therapy by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003; 24(4): 662–670.
27. Fritz JS. The role of organic solvents in the separation of nonionic compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003; 24(10): 1530–1536.
28. Nicolas O, Farenc C, Bressolle F. Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Ann Toxicol Anal*. 2004; 16(2): 118–127.