

N° d'ordre : 06/2010-E/S.N

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE « HOUARI
BOUMEDIENE »**

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du grade de DOCTORAT D'ETAT

EN : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Biochimie

Par : KHELIL Malika

THEME

**Contribution à l'étude des bases moléculaires de l'activité des
enzymes N-acétyltransférases**

Soutenu publiquement le 10/ 07/2010, devant le jury composé de :

Mme F. LARABA	Professeur	Président	à l'USTHB
Mr B. TAYEBI	Professeur	Directeur de thèse	à l'USTHB
Mme B. DJERDJOURI	Professeur	Examineur	à l'USTHB
Mme C. TOUIL	Professeur	Examineur	à l'USTHB
Mr M. BENBOUBETRA	Professeur	Examineur	à l'Université de Sétif
Mr C. CHELGHOUM	Professeur	Examineur	à l'USTHB
Mr M. MAKRELOUF	Maître de Conférences	Examineur	au CHU Bab El-Oued

Remerciements

Je remercie vivement Madame Le Professeur Fatima Laraba d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Madame Bahia Djerdjouri pour ses précieux conseils et pour avoir participé pleinement à l'élaboration de ce travail.

Je remercie Monsieur Le Professeur Bouchentouf Tayebi, mon directeur de thèse, de m'avoir intégrée au sein de l'équipe de Biochimie qu'il dirigeait, et de m'avoir soutenue et encouragée au cours de ce travail.

Je remercie Monsieur Le Professeur Rajagopal Krishnamoorthy de m'avoir accueillie dans l'ancien laboratoire de pharmacogénétique.

Je remercie également Monsieur Le Professeur Ryad. Tamouza de m'avoir accueillie dans son laboratoire d'immunogénétique et d'histocompatibilité (Hôpital Saint-Louis) dans lequel j'ai réalisé une grande partie de ce travail.

Je remercie Madame Le Professeur Chafia Touil d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand Merci à Monsieur Le Professeur Mustafa Benboubetra pour avoir accepté de se déplacer d'Angleterre rien que pour examiner cette thèse.

Je remercie Monsieur Le Docteur Mohamed Makrelouf d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie Monsieur Le Professeur Chaabane Chelghoum de m'avoir fait l'honneur d'examiner cette thèse.

Abréviations :

1U	acide 1-méthylurique
1X	1-méthylxanthine
137X	1,3,7-triméthylxanthine (caféine)
137U	acide 1,3,7-triméthylurique
2-AAF	2-acétylaminofluorène
2-AF	2-aminofluorène
AAMU	5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracile
AcCoA	acétyl coenzyme A
ADN	acide déoxyribonucléique
AFMU	5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile
ASPCR	PCR spécifique d'allèle
ARN	acide ribonucléique
BET	bromure d'éthidium
CoASH	CoA réduit
CYP P-450	monooxygénase à cytochrome P-450
DDS	dapsone
EC	Commission des enzymes
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
GST	glutathion S transférase
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HW	Hardy Weinberg
INH	1-isonicotinyl hydrazide
K_m	constante de Michaelis
MeIQX	2-amino-3,8-diméthylimidazol [4,5-f] quinoxaline
NAT	N-acétyltransférase
NAT	locus NAT
NAT*	allèle d'un gène codant pour une NAT
nt	nucléotide
OAT	O-acétyltransférase
PABA	acide <i>para</i> -aminobenzoïque
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pABG	p-aminobenzoylglutamate
PAS	acide para-aminosalicylique)
PhIP	2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazol [4,-5-b] pyridine
RFLP	polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SMX	sulfaméthoxazole
SMZ	sulfaméthazine
TEDK	tampon Tris-EDTA-DTT-KCl
V_{max}	vitesse maximale
wt	type sauvage (wild type)

Abréviations standardisées des acides aminés

Ala (A)	alanine
Arg (R)	arginine
Asn (N)	asparagine
Asp (D)	aspartate
Cys (C)	cystéine

Gln (Q)	glutamine
Glu (E)	glutamate
Gly (G)	glycine
His (H)	histidine
Ileu (I)	isoleucine
Leu (L)	leucine
Lys (K)	lysine
Met (M)	méthionine
Phe (F)	phénylalanine
Pro (P)	proline
Ser (S)	sérine
Thr (T)	thréonine
Tyr (Y)	tyrosine
Trp (W)	tryptophane
Val (V)	valine

Abréviations standardisées des bases nucléotidiques

A	adénine
G	guanine
C	cytosine
U	uracile
T	thymine

Résumé

Les arylamine *N*-acétyltransférases (NAT) sont des enzymes de la phase II de biotransformation des xénobiotiques de type arylamines et hydrazine. Ces enzymes catalysent aussi des réactions d'acétylation sur des molécules endogènes. Les NAT sont impliquées dans les processus d'élimination et de bioactivation de nombreux xénobiotiques incluant médicaments et molécules précarcinogènes.

Deux gènes fonctionnels *NAT1* et *NAT2* codant pour les *N*-acétyltransférases sont connus chez l'homme. Trois sont connus chez les rongeurs (*Nat1*, *Nat2* et *Nat3*). Ces gènes sont polymorphes aussi bien chez l'homme que chez les rongeurs. Le polymorphisme de *NAT2* a pu être corrélé à des toxicités médicamenteuses. Les polymorphismes de *NAT2* et de *NAT1* ont été liés à des pathologies multifactorielles graves en présence de polluants de l'environnement. Le polymorphisme de *NAT1* a aussi été lié à l'apparition de cancers épithéliaux probablement à travers le métabolisme des folates. Les enzymes *NAT1* et *NAT2* présentent des localisations tissulaires différentes et des spécificités de substrats malgré un degré d'homologie élevé. *Nat2* des rongeurs est l'homologue de *NAT1* humain et *Nat1* est l'homologue de *NAT2*.

Notre objectif a été l'investigation des quatre questions suivantes :

- Nous avons étudié la relation génotype *NAT2*-phénotype chez des individus atteints de tuberculose par l'isoniazide. En effet, des effets adverses ont été rapportés par la bibliographie chez les individus acétyleurs lents.
- Nous avons aussi examiné la relation entre les haplotypes et les génotypes de *NAT2* et le risque d'athérosclérose. En effet, des adduits d'ADN ont été constatés dans les artères d'individus atteints d'athérosclérose.
- Nous nous sommes intéressés également à l'étude de la relation génotype *NAT1*-phénotype par le substrat spécifique de *NAT1*, l'acide para-aminosalicylique (PAS). En effet, cette relation mérite d'être déterminée pour certains allèles.
- Notre travail a aussi porté sur l'étude du polymorphisme de *Nat2* chez le rat des sables *Psammomys obesus* en utilisant comme substrat l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Cet animal pourrait servir de modèle d'étude pour élucider la relation entre le rôle de *NAT1* dans le métabolisme des xénobiotiques et de substances endogènes, et la carcinogénèse.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE : NATURE ET ROLES DES ARYLAMINE N-ACETYL - TRANSFERASES (NAT)

I- NATURE.....	2
II- REACTIONS CATALYSEES PAR LES N-ACETYLTRANSFERASES	3
II-A- Cycle réactionnel.....	3
II-B- Substrats des arylamine N-acétyltransférases.....	3
II-B-1- Substrats exogènes.....	3
II-B-2- Substrats endogènes.....	7
III - Rôles des arylamine N-acétyltransférases.....	7
III-A- Rôle dans le métabolisme des substrats endogènes.....	7
III-A-1-Catabolisme des folates.....	7
III-B- Pharmacocinétique des xénobiotiques et rôle des NAT.....	8
III-B-1- Principales réactions dans la biotransformation des xénobiotiques.....	8
IV- Variabilité de l'activité des enzymes de détoxication.....	11

DEUXIEME PARTIE : PHARMACOGENETIQUE DES ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASES.....

I – BASES GENETIQUES DES ACTIVITES ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASES...	15
I-A- Caractéristiques structurales du locus <i>NAT</i> humain.....	15
I- B- Variabilité au locus <i>NAT</i> humain.....	16
I-B-1-Variabilité structurale et fonctionnelle au locus <i>NAT1</i> humain.....	17
I-B-2- Variabilité structurale et fonctionnelle au locus <i>NAT2</i> humain.....	18
I-C- Polymorphisme d'acétylation selon les groupes ethniques.....	19
I-C-1- Polymorphisme d'acétylation concernant <i>NAT2</i>	19
I-C-2- Polymorphisme d'acétylation concernant <i>NAT1</i>	19
I-D-- Les loci <i>NAT</i> chez d'autres espèces.....	20
I-D-1- Comparaison entre les gènes des arylamines N-acétyltransférases des humains et des Rongeurs.....	20
II – MANIFESTATIONS PHENOTYPIQUES DU POLYMORPHISME DE N-ACETYLATION CHEZ L'HOMME.....	21
II-A- Détermination et distribution des phénotypes d'acétylation.....	21
II-A-1- Méthodes de mesure du phénotype <i>NAT2</i>	21
II-A-2- Méthodes de mesure du phénotype <i>NAT1</i>	24

TROISIEME PARTIE : CONSEQUENCES DU POLYMORPHISME D'ACETYLATION

I-- Association entre le polymorphisme de <i>NAT2</i> et la prédisposition à certaines pathologies.....	26
I- A-Réactions adverses aux xénobiotiques et insuffisances thérapeutiques.....	26
I-B- Effet des xénobiotiques précarcinogènes.....	29
I-39- Effet endogène de <i>NAT1</i>	33

QUATRIEME PARTIE : RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DES ARYLAMINES N-ACETYLTRANSFERASES.....

I – CARACTERISTIQUE DU SITE ACTIF ET MECANISME CATALYTIQUE	35
II- STRUCTURE DES NAT ET SELECTIVITE DE SUBSTRATS	38
III – MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES INDUITES DES MUTATIONS GENIQUES.....	39
III-A-Modélisation moléculaire dans la protéine <i>NAT2</i>	39
III-B-Modélisation moléculaire dans la protéine <i>NAT1</i>	44

PARTIE EXPERIMENTALE.....

PREMIERE PARTIE : ETUDE DU GENOTYPE NAT2	50
A- CAS DE L'ATHEROSCLEROSE.....	50
I -MATERIELS ET METHODES.....	50
1- SUJETS ETUDIES.....	50
2 - DETERMINATION DU GENOTYPE.....	53
3 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES.....	53
II- RESULTATS.....	54
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	56
B- CAS DE LA TUBERCULOSE.....	58
I -MATERIELS ET METHODES.....	58
1- SUJETS ETUDIES.....	58
2 - DETERMINATION DU GENOTYPE.....	58
3 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES.....	58
II- RESULTATS.....	58
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	59
 DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU PHENOTYPE NAT2	 61
A- PHENOTYPE D'ACETYLATION DE LA CAFEINE.....	62
I-MATERIELS ET METHODES.....	62
1- PRODUITS CHIMIQUES.....	62
2- SUJETS ETUDIES.....	62
3- EXTRACTION DES METABOLITES DE LA CAFEINE.....	62
4- PURIFICATION ET DOSAGE.....	63
II- RESULTATS.....	63
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	65
B- PHENOTYPE D'ACETYLATION DE L'INH.....	67
I -MATERIELS ET METHODES.....	67
1- SUJETS ETUDIES.....	67
2- EXTRACTION DES METABOLITES DE L'INH.....	67
3- PURIFICATION ET DOSAGE.....	67
II- RESULTATS.....	67
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	68
 TROISIEME PARTIE : ETUDE DU GENOTYPE NAT1	 70
I -MATERIELS ET METHODES.....	71
1- SUJETS ETUDIES.....	71
2 - DETERMINATION DU GENOTYPE.....	71
II- RESULTATS.....	74
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	76
 QUATRIEME PARTIE : ETUDE DU PHENOTYPE NAT1	 78
A- PHENOTYPE D'ACETYLATION DU PAS CHEZ L'HOMME.....	79
I -MATERIELS ET METHODES.....	79
1- SUJETS ETUDIES.....	79
2- DETERMINATION DU PHENOTYPE D'ACETYLATION.....	79
II- RESULTATS.....	79
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	80
B- PHENOTYPE D'ACETYLATION DU PAS CHEZ LE RAT DES SABLES.....	82
I -MATERIELS ET METHODES.....	82
1- ANIMAUX.....	
2- DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	82

II- RESULTATS.....	82
III – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	85
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.....	87
REFERENCES.....	90
ANNEXES	

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE

NATURE ET ROLES DES ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASES

NATURE ET ROLES DES ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASES

I- NATURE

Les arylamine N-acetyltransferases (NAT : EC 2.3.1.5) sont des enzymes principalement de biotransformation des xénobiotiques de type arylamines et hydrazine.

Ces enzymes sont exprimées chez l'homme et chez d'autres mammifères (Grant et al. 1997; Hein et al. 1997 ; Hein et al. 2008). Chez l'homme, deux isoformes fonctionnelles NAT1 et NAT2 sont exprimées. Chez les rongeurs, trois isoformes Nat1, Nat2 et Nat3 sont fonctionnelles (Sugamori et al. 2003).

Les N-acétyltransférases sont des enzymes cytosoliques. NAT2 de l'homme et son homologue Nat1 des rongeurs sont exprimées principalement dans le foie, le tractus gastro intestinal. Leur expression a aussi été mise en évidence dans d'autres tissus et organes (windmill et al. 2000; Husain et al. 2007 ; Hein et al. 2008). L'expression de NAT1 et de son homologue Nat2 est ubiquitaire (Tableau 1) (Hein et al. 2008).

Ces enzymes présentent une différence dans l'affinité et la spécificité de substrats aussi bien chez l'homme que chez les rongeurs (Hein et al. 2002a ; Doll et al. 2010)

Tableau 1 : Sites d'expression des arylamines N-acétyltransférases chez l'homme et les rongeurs (Hein et al. 2008)

Tissu	NAT1	NAT2	Nat1	Nat2
Foie	+	+	+	+
Intestin grêle	+	+	+	+
Colon	+	+	+	+
Col de l'utérus	+	+	+	+
Cœur	+	+	+	+
Vessie	+	faible	+	+
Rein	+	+	+	+
Poumon	+	+	+	+
Muscle squelettique	+	+	+	+
Muscle lisse	+	+	+	+
Rate	+	+	+	+
Testicule	+	+	+	+
Thymus	+	+	+	+
Trachée	+	+	+	+
Estomac	+	+	+	+

Les deux isoenzymes NAT1 et NAT2 présentent 81% d'homologie en acides aminés. Elles ont des masses molaires de 33 et 31 kDa respectivement et sont formées chacune de 290 acides aminés (Blum et al. 1990 ; Ohsako et al. 1990).

responsable de différences interindividuelles dans le métabolisme de divers xénobiotiques (Hein, 2002a ; Boukouvala et Fakis, 2005).

II – REACTIONS CATALYSEES PAR LES N-ACETYLTRANSFERASES

II-A- Cycle réactionnel

Les NAT catalysent le transfert d'un groupement acétyl issu du cofacteur physiologique donneur, l'acétyl coenzyme A (AcCoA), sur l'azote du groupement amine (-NH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂) d'une molécule hydrazine, ou arylamine receveuse. Le produit formé est une arylamide (A et B figure 1).

En plus des réactions de N-acétylation, les NAT peuvent catalyser la O-acétylation de substrats aromatiques N-hydroxylés ainsi que la N, O-transacétylation intramoléculaire de composés N-hydroxylés et N-acétylés, ou acides arylhydroxamiques (C et D figure 1).

II-B- Substrats des arylamines N-acétyltransférases

II-B-1- Substrats exogènes

Les substrats arylamine sont principalement des xenobiotiques comprenant d'abord des médicaments largement employés mais aussi des polluants présents dans l'environnement et dans l'alimentation. Chez l'homme et les rongeurs, ces molécules peuvent être transformées plus ou moins sélectivement par l'une ou l'autre des deux isoformes d'arylamine N-acétyltransférases (Tableau 2).

Les structures chimiques de substrats hydrazines et arylamines sont représentées (Figure 2).

L'acide para-aminobenzoïque (PABA), le *p*-aminobenzoyl glutamate (pABG) et l'acide para-aminosalicylique (PAS) sont des substrats spécifiques de NAT1. L'isoniazide, la sulfaméthazine, la procainamide et le dapsonne sont acétylés spécifiquement par NAT2. Certains composés comme le 2-aminofluorene sont d'excellents substrats aussi bien de NAT1 que de NAT2 (Deguchi et *al.* 2005).

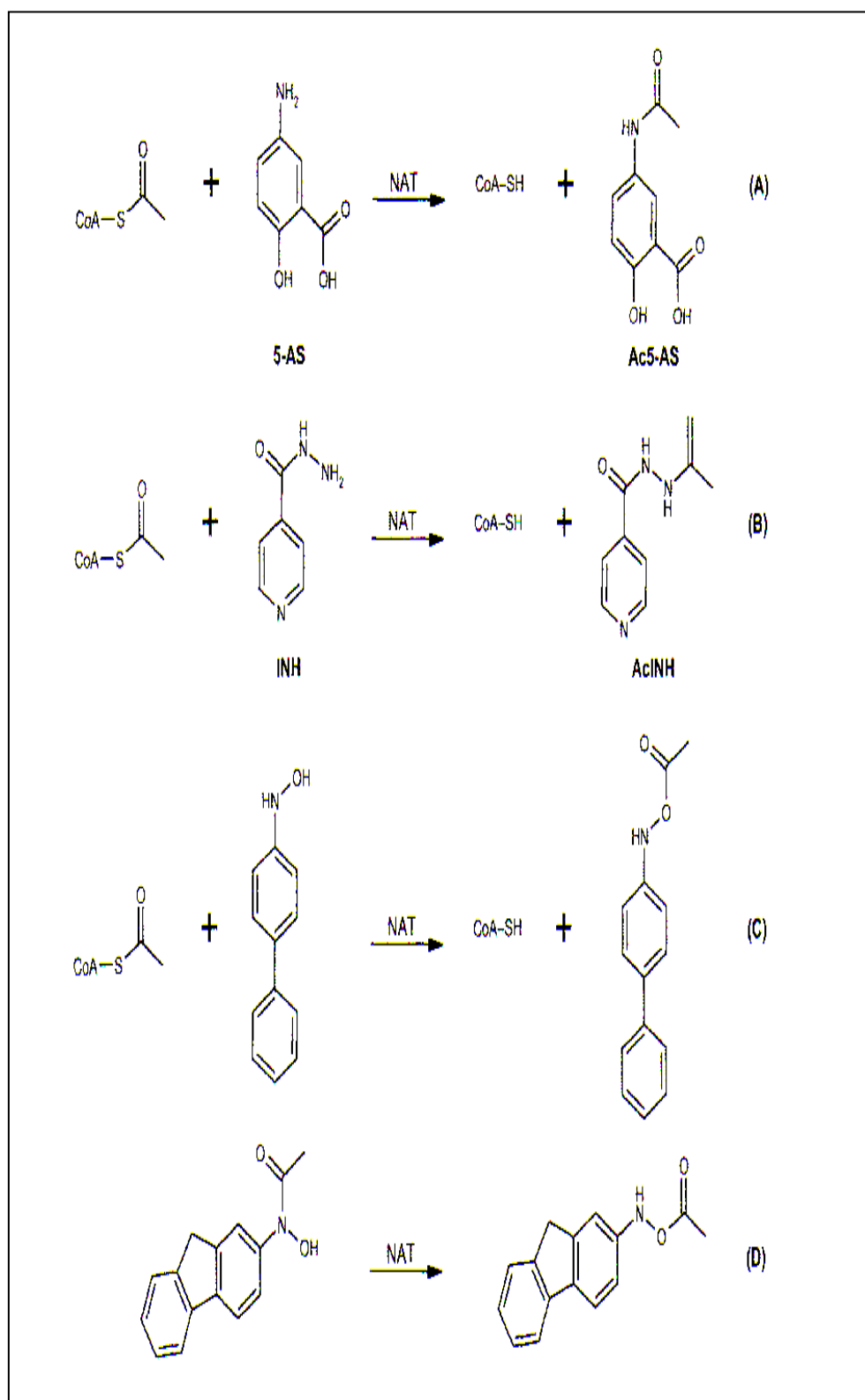


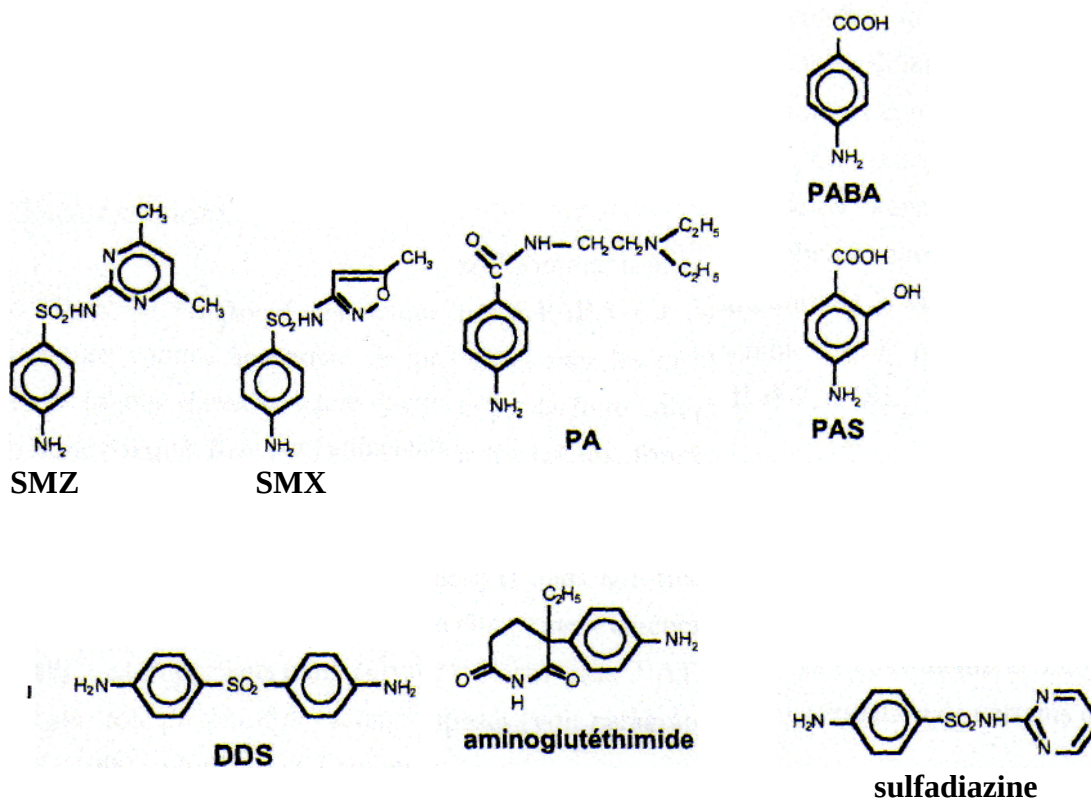
Figure 1. Exemples de réactions catalysées par les NAT. A. N-acétyl transfert d'un acétyl donneur vers un substrat arylamine (5-AS). B. N-acétyl transfert d'un acétyl donneur vers un substrat arylhydrazine (INH). C. O-acétyl transfert d'un N-hydroxyarylamine et D. N, O-acétyl transfert d'un acide N-arylhydroxamique (d'après Sim et al. 2007).

Tableau 2. Principaux substrats exogènes des arylamine N-acétyltransferases (d'après Deloménie, 1996) *Molécules représentées en formule développée dans la figure 2 et figure 8

SUBSTRAT	ACTIVITÉ, UTILISATION	SPÉCIFICITÉ CATALYTIQUE NAT ¹
MÉDICAMENTS		
<u>Hydrazines</u>		
isoniazide (INH)*	anti-tuberculeux (inhibition de la biosynthèse d'acides gras de la paroi bactérienne)	NAT2
hydralazine*	anti-hypertenseur (vasodilatateur)	NAT2
endralazine	antidépresseur dérivé de l'hydralazine	NAT2
phénelzine	antidépresseur (inhibiteur de la monoamine oxydase)	NAT2
<u>Arylamines</u>		
procaïnamide (PA)*	anti-arythmique cardiaque	NAT2
dapsone (DDS)*	anti-infectieux (lèpre, malaria, dermatite herpétiforme)	NAT2
aminoglutéthimide*	anticonvulsivant; traitement des carcinomes mammaires (inhibition de la synthèse des corticostéroïdes)	NAT2
<u>sulfamides</u>		
<u>antibactériens</u>		
sulfaméthoxazole (SMX)*	bloquage de la synthèse des nucléoprotéines bactériennes	NAT2
sulfadiazine*		NAT2
sulfaméthazine (SMZ)*		NAT2
sulfamérazine		
acide p-aminobenzoïque (PABA)*	antibactérien; antagoniste des sulfamides; photosensibilisateur	NAT1
acide p-aminosalicylique (PAS)*	anti-tuberculeux	NAT1
dipyrone	analgésique, anti-inflammatoire	NAT2
amrinone	vasodilatateur, inotrope positif	NAT2
prizidilol	vasodilatateur, anti-hypertenseur, β -bloquant	NAT2
amonafide	pro-médicament anticancéreux	NAT2
promizole		NAT2
<u>Molécules converties en métabolites amines primaires</u>		
sulfasalazine	anti-inflammatoire	NAT2
sulfapyridine	antibiotique, métabolite de la sulfasalazine	NAT2
nitrazépam	antidépresseur	NAT2
clonazépam	anti-convulsivant (épilepsie)	
acébutolol	anti-arythmique cardiaque (β -bloquant)	
caféine (137X)**	tonique cardiaque et respiratoire	NAT2 (NAT1)
<u>PRÉCARCINOGENES</u>		
benzidine*	industrie (mutagène)	NAT2
β -naphthylamine*	industrie, fumée du tabac (mutagène)	NAT2
4,4'-méthylène-bis-chloroaniline	industrie (mutagène)	
4-aminobiphényle	industrie, fumée du tabac	NAT1, NAT2
2-aminofluorène (2-AF)*	mutagène expérimental	NAT1, NAT2

¹ La spécificité est donnée à titre indicatif car chacune des deux isoformes NAT possède en général une activité catalytique détectable quel que soit le substrat considéré.

AMINES PRIMAIRES AROMATIQUES



HYDRAZINES AROMATIQUES

INH



ARYLAMINES PRECANCERIGENES

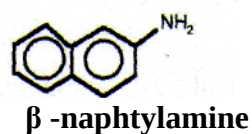
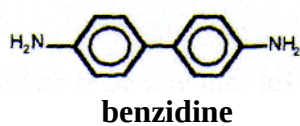
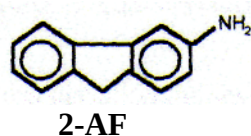


Figure 2. Formules développées de quelques substrats des arylamine N-acétyltransférases (d'après Weber et Hein, 1985 in Deloménie, 1996). 2-AF= 2-aminofluorène ; DDS= dapsone ; INH =1-isonicotinyl hydrazide (isoniazide); PA = procainamide ; PABA = acide para-amino benzoïque ; PAS= acide para-aminosalicylique, SMX= sulfaméthoxazole ; SMZ= sulfa -méthazine

II-B-2- Substrats endogènes

L'acide p-aminobenzoylglutamique est le seul substrat endogène connu des enzymes arylamine-NAT. NAT1 est le principal enzyme catalysant ce substrat. Le pABG est un métabolite des folates. Ces derniers sont importants dans l'érythropoïèse et dans la formation embryonnaire du tube neural. Les folates sont formés par la conjugaison de l'acide folique et de l'acide glutamique (Figure 3).

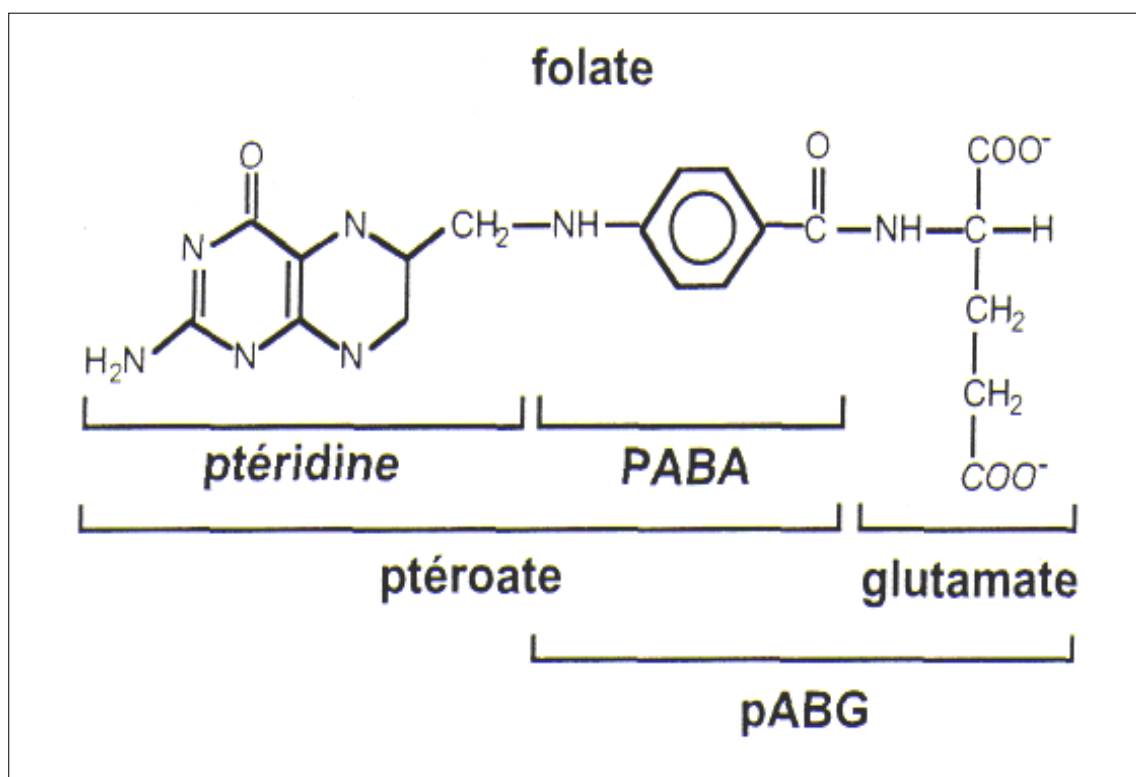


Figure 3. Structure des folates (d'après Ward et al. 1995 in Deloménie, 1996)

III –Rôles des NAT

III –A- Rôles dans le métabolisme des substrats endogènes

III-A-1- Catabolisme des folates

L'acide folique est un composé vitaminique chez l'homme. Il intervient dans la synthèse des acides nucléiques comme transporteur de groupement méthyle. L'acide folique est catabolisé en p-aminobenzoylglutamate (pABG), puis N-acétylé en N-acétyl-pABG qui est le métabolite urinaire majeur des folates.

Le rôle physiologique de NAT1 serait de favoriser le catabolisme des folates, et en particulier l'élimination du pABG, antagoniste possible des folates.

III –B - Pharmacocinétique des xénobiotiques et rôle des NAT

Le devenir des xénobiotiques dans l'organisme, ou pharmacocinétique, comprend les étapes suivantes, successives ou simultanées (Moulin et Coquerel, 2002) :

- la résorption, passage du composé dans le sang à partir de son site d'administration et impliquant Le passage des membranes cellulaires ;
- la distribution dans les tissus à partir de la circulation générale ;
- les biotransformations ou métabolisme proprement dit, catalysées par des enzymes essentiellement hépatiques ;
- l'élimination hors de l'organisme par les voies principalement rénale, intestinale et pulmonaire.

La détoxification fait partie des biotransformations que subissent certains composés hydrophobes aussi bien exogènes (xénobiotiques) qu'endogènes (hormones par exemple) et contribue globalement à leur élimination. Ces molécules, généralement non toxiques aux concentrations physiologiques, le deviendraient si elles s'accumulaient.

III-B-1- Principales réactions dans la biotransformation des xénobiotiques

La plupart des xénobiotiques sont hydrophobes et peu volatils. Ainsi, les biotransformations conduisant à la détoxification des xénobiotiques ont en général un double effet : celui de les rendre hydrosolubles en les transformant en métabolites plus polaires, donc moins facilement réabsorbés au niveau des tubules rénaux et pouvant être éliminés dans l'urine et accessoirement dans la bile, et celle de leur faire perdre leur activité biologique, thérapeutique ou toxique. Un xénobiotique subit en général plusieurs types de biotransformations, simultanées ou successives.

Les principaux sites de ce type de biotransformations sont le tube digestif, l'appareil respiratoire, le rein et le foie. Ce dernier étant fonctionnellement le plus important. La détoxification a généralement lieu selon deux phases réactionnelles (dites phase I et phase II), et met en jeu des enzymes dont un grand nombre est localisé dans les membranes du réticulum endoplasmique lisse.

Les réactions de la phase I sont des réactions de fonctionnalisation représentées essentiellement, par des oxydations microsomaux hépatiques (Moulin et Coquerel, 2002). Elles incluent également des réactions de réduction, d'hydrolyse et de décarboxylation (Tableau 3. A.).

Les oxydations sont assurées pour plus de 95% par un système membranaire de transporteurs d'électrons à activité mono oxygénase constitué d'un cytochrome P-450 (CYP P-450), hémoprotéine couplée avec des enzymes d'oxydoréduction (à NADP). Les enzymes de la superfamille des CYP P-450 catalysent des hydroxylations. Cinquante sept isoformes distinctes de CYP-450 hépatiques au moins ont été décrites (Preissner et *al.* 2010) et sont impliquées notamment dans la biotransformation de nombreux xénobiotiques.

D'une façon générale, les réactions de phase I ajoutent au substrat hydrophobe (XH) une fonction chimique d'ancrage ou centre réactif (-OH, -NH₂ ou -COOH) permettant la fixation d'un groupe le plus souvent polaire (R), au cours de la phase II.

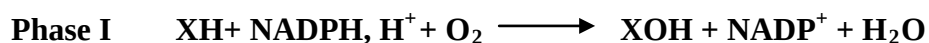
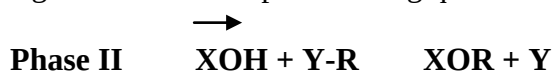


Tableau 3 A. Exemples de réactions principales de biotransformation des xénobiotiques lipophiles. Réactions de phase I ou fonctionnalisation.

<u>A- réactions de la phase I</u>		
Réaction	Enzyme	Nature des substrats
. Oxydation	<u>oxydases (fixation d'O Provenant de H2O)</u>	
	aldéhyde oxydase	aldéhydes
	monoamine oxydase	amines (neurotransmetteurs), hydrazines
	<u>mono-oxygénases (fixation d'O provenant de l'O2)</u>	
	cytochrome P450 :	
	Exemple : CYP1A1	hydrocarbures polycycliques aromatiques
	CYP1A2	arylamines, arylamides
. Réduction	réductases	quinones
. Hydrolyse	estérases, amidases, imidase	procaïne
. Décarboxylation		lévo-dopa
. Déméthylation	CYP 2 E	nitrosamines

Les réactions de la première phase sont le plus souvent inactivatrices, mais peuvent aussi aboutir à des métabolites plus actifs que la molécule initiale. Cette activité accrue peut être thérapeutique, dans le cas de promédicaments (par exemple, la conversion de la sulfamidochrysoidine en sulfamide, ou du cyclophosphamide en un agent antinéoplasique (Lechat et *al.* 1990) ou toxique, comme dans le cas des précarcinogènes.

Les réactions de la phase II sont des réactions de synthèse par conjugaison avec des constituants endogènes, succédant aux oxydations si celles-ci n'ont pas suffi à éliminer le xénobiotique. Elles sont catalysées dans le foie par des transférases (Tableau 3.B.) microsomaux ou cytosoliques. Elles augmentent le plus souvent l'hydro solubilité du substrat et aboutissent en général à des composés biologiquement inactifs.



L'acétylation est une réaction de phase II qui contribue à réduire l'activité pharmacologique de nombreux xénobiotiques. Les N-acetyltransférases NAT1 et NAT2 catalysent la N-acétylation des amine aromatiques et des hydrazines ainsi que la O-acétylation des composés hydroxy arylamine et des amines hétérocycliques. Elles jouent un rôle important dans l'inactivation et /ou l'activation d'un grand nombre de polluants de l'environnement comme la fumée de cigarettes, fumées d'échappement de véhicules (Hein et *al.* 2002a ; Deguchi et *al.* 2005).

Tableau 3. B. Réactions de phase II ou conjugaison

Réaction	groupe transféré	Enzyme	Nature des substrats
● Glucurono-Conjugaison	acide glucuronique	UDP- glucuronosyl transférases	(hydroxyl-amines, arylamines)
● Sulfoconjugaison	ion sulfate	sulfotransférases	alcools (stéroïdes), phénols, amines, hydroxylamines
● Acétylation	acétate	<u>N-acétyltransférases</u>	arylamines, hydrazines, aminométhyluraciles
● Conjugaison avec des acides aminés	glycine, taurine, glutamate, cystéine	N-acyltransférases	acides carboxyliques aromatiques ou aliphatiques
● Conjugaison Avec le glutathion	glutathion	glutathion S-transférase	carbones électrophiles (époxydes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, arylamines)
● Méthylation	méthyle de la S- adénosyl méthionine		amines, catécholamines, imidazoles (histamine), thiols

L'adaptation des systèmes de détoxification à un très grand nombre de substances chimiques en constant renouvellement est donc assurée par un ensemble de familles enzymatiques assurant un très large spectre de réactivités chevauchantes. La spécificité de ces enzymes semble orientée préférentiellement vers des composés lipophiles, dépourvus a priori d'activités physiologiques et notamment nutritionnelles.

IV - Variabilité de l'activité des enzymes de détoxification

La tolérance de l'organisme aux xénobiotiques présente une importante hétérogénéité interindividuelle. Celle ci résulte en grande partie d'une variabilité dans l'activité des enzymes de biotransformation en raison de deux types de facteurs :

- des facteurs d'ordre génétique (polymorphismes génétiques)
- des facteurs non génétiques : physiologiques (sexe, âge, gestation, nycthémère) ou pathologiques (atteintes hépatiques), induction ou inhibition des protéines impliquées dans la réponse aux xénobiotiques.

- Induction et inhibition :

Il a été suggéré que les promoteurs de *NAT1* et de *NAT2* contiendraient des séquences inductibles par des xenobiotiques et particulièrement par leurs propres substrats. Ces séquences seraient aussi inhibées par les métabolites de leurs substrats N-hydroxylés. *NAT1* est réversiblement inactivée par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette inactivation est due à une modification oxydative de la cystéine du site catalytique. Ce phénomène peut être supprimée par le glutathion (Rodrigues-Lima, Dupret, 2004).

En ce qui concerne l'exemple des CYP et des UGT, il y a en général deux mécanismes par lesquels l'induction enzymatique se produit : la stabilisation de l'ARNm ou de l'enzyme, ou bien l'augmentation de la transcription du gène. Le mécanisme le plus commun de l'induction des CYP est l'activation de la transcription du gène CYP. L'activation est véhiculée par des récepteurs nucléaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription tels que le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), le récepteur des androstanes (CAR) et le récepteur de pregnane ou de stéroïdes (PXR ou SXR). En l'absence de ligand, le récepteur nucléaire est associé à un co-répresseur. La liaison du ligand au récepteur nucléaire induit des changements conformationnels qui permettent de libérer le co-répresseur. Le récepteur nucléaire se lie par son domaine de liaison à l'ADN aux éléments de réponse de l'ADN présents dans la région du promoteur des gènes cibles. La liste de récepteurs nucléaires et de leurs gènes cibles est représentée (Tableau 4)

Tableau 4: Récepteurs nucléaires et leurs gènes cibles (d'après Sinz et al.2008)

Récepteurs nucléaires	Gènes cibles
AhR	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B1, UGT1A1,UGT1A6, SULT2B
CAR	CYP2A6, CYP21B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, UGT1A1, UGT2B1, SULT2A1
PXR	CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, SULT2A1

Des inducteurs des CYP sont représentés dans le tableau 5

Tableau 5. Marqueurs couramment utilisés in vivo dans les études cliniques et inducteurs des CYP (d'après Sinz et al.2008)

Enzyme CYP	Substrat/Marqueur	Inducteurs
1A2	Théophylline, caféine, acetaminophene, amines aromatiques, phenacetine	Fumée de cigarettes, Omeprazole
2A6	Coumarine, butadiène, nicotine	Barbiturates
2B6	Efavirenz	Rifampine
2C8	Repaglinide, rosiglitazone	Rifampine
2C9	S-warfarine, tolbutamide, phenytoine	Rifampine
2C19	Omeprazole, esoprazole, lansoprazole, pantaprazole, diazepam, imipramine, propranolol	Rifampine, barbiturates
2D6	Antidépresseurs, neuroleptiques, β -bloqueurs Antiarythmiques, codéine	Non identifiés
2E1	Acetaminophene, caféine, dapsone, théophylline	Ethanol, isoniazide

- Les facteurs génétiques

Les facteurs génétiques influençant l'activité des enzymes de détoxification résident le plus souvent dans une modulation de l'expression génique due à l'existence de polymorphisme. Il peut résulter de ces variations génétiques une capacité accrue ou réduite de biotransformation, voire même une absence totale d'activité enzymatique, comme par exemple dans le cas d'un variant de délétion du gène glutathion-S- transférase μ 1 (GSTM1) (McGrath et al. 2006).

Le polymorphisme génétique des enzymes de biotransformation des xénobiotiques est fortement impliqué dans les réactions adverses aux médicaments (Butcher et al. 2000) et dans la susceptibilité à de nombreuses maladies (Boukouvala et Fakis, 2005).

Les enzymes polymorphes majeures en pharmacogénétique sont, de part la diversité de leurs substrats et l'ampleur des prescriptions thérapeutiques que ceux-ci représentent, les CYP P-450 pour la phase I et les NAT, GST et UDP-glucuronyltransférases (UGT) pour la phase II (Daly, 2010).

- Variabilité des capacités d'acétylation

Le polymorphisme de la N-acétylation fut découvert au début des années cinquante quand la variabilité individuelle à la neurotoxicité par l'isoniazide (INH) fut attribuée à une origine génétique (Evans et al. 1960). Enfin, des investigations biochimiques ont révélé que le défaut d'élimination provenait d'une réduction de la vitesse d'acétylation du médicament dans le foie, d'où la distinction qui s'est établie entre "acétyleurs lents" et "acétyleurs rapides" (Evans et White, 1964).

NAT1 présente aussi un polymorphisme génétique, indépendant de celui de *NAT2* (Weber et Vatsis. 1993). Plusieurs amine aromatiques et hydrazines sont des substrats aussi bien de *NAT1* que de *NAT2* (Hein et *al.* 1988). Le polymorphisme de *NAT1* se traduit par trois types de phénotypes : acétyleurs rapides, intermédiaires et lents (Doll et *al.* 2010).

Le polymorphisme de la N-acétylation revêt un intérêt médical car il engendre des effets de prédisposition aux réactions de toxicité induites à divers xénobiotiques. L'hépatotoxicité est le phénomène le plus sévère observé avec les médicaments de type hydrazine. Plusieurs études ont essayé d'expliquer le mécanisme de l'hépatotoxicité par l'INH. Le polymorphisme de *NAT2* affecterait la concentration du médicament ou de ses métabolites qui peuvent alors former un complexe covalent avec des protéines ou entraîner directement une destruction cellulaire (Daly, 2010). Il pourrait atténuer l'acétylation des histones des hépatocytes entraînant ainsi un échec de la régénération dans le foie (Murata et *al.* 2007).

La N-acétylation et la O-acétylation des précarcinogènes de type arylamines et N-hydroxy-arylamines sont catalysées aussi bien par *NAT1* que par *NAT2*. Le rôle du polymorphisme d'acétylation dans le risque individuelle à certaines pathologies où les arylamines jouent un rôle étiologique est donc biologiquement plausible. Il a fait l'objet de plusieurs études. La formation d'adduits d'ADN par l'acétylation des arylamines a été observée dans plusieurs pathologies comme l'athérosclérose et certains cancers (Izzoti et *al.* 2007 ; Sim et *al.* 2007). La formation de ces adduits se fait à l'origine sur dG (Turesky, 2002).

Les adduits dG-C8-ABP (4-aminobiphenyl), dG-C8-PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine), dG -C8-MeIQx (2-amino-3,8-diméthylimidazo-[4,5-f] quinoxaline ont été identifiés dans les tissus et cellules humaines (Gorlewska-Roberts et *al.* 2002). L' ABP est un carcinogène humain présent dans la fumée de cigarettes (Stabbert et *al.* 2003). Le MeIQx et le PhIP sont des mutagènes potentiels et abondants dans l'alimentation humaine, formés lors de la cuisson des viandes à haute température (Keating et Bogen, 2004). Ces composés ont aussi été retrouvés dans la bière, le vin, la fumée de cigarette et sont désignés comme des carcinogènes humains (Doll et *al.* 2010).

DEUXIEME PARTIE
PHARMACOGENETIQUE DES ARYLAMINE N- ACETYLTRANSFERASES ET
MANIFESTATIONS PHENOTYPIQUES

PHARMACOGENETIQUE DES ARYLAMINE N- ACETYLTRANSFERASES ET MANIFESTATIONS PHENOTYPIQUES

I – BASES GENETIQUES DES ACTIVITES ARYLAMINE N-ACETYL - TRANSFERASES

I-A- Caractéristiques structurales du locus NAT humain

Les deux gènes *NAT1* et *NAT2*, et le pseudogène *NATP* sont localisés sur le bras court du chromosome 8 dans l'orientation *NAT1* : *NATP* : *NAT2*. Les locus *NAT1* et *NAT2* sont localisés en position 8p22. Pour chaque loci, la région codante consiste en un exon unique. Les exons codants *NAT1* et *NAT2* sont constitués chacun de 870 pb (Sim et al. 2008).

Les transcrits *NAT2* ont été identifiés dans plusieurs tissus humains. Ils dérivent de l'exon codant (exon 2) et d'un deuxième exon non codant formé de 100 pb, localisé à environ 8kb en amont du site du début de transcription de l'exon 2 (figure 4) (Boukouvala et Sim, 2005).

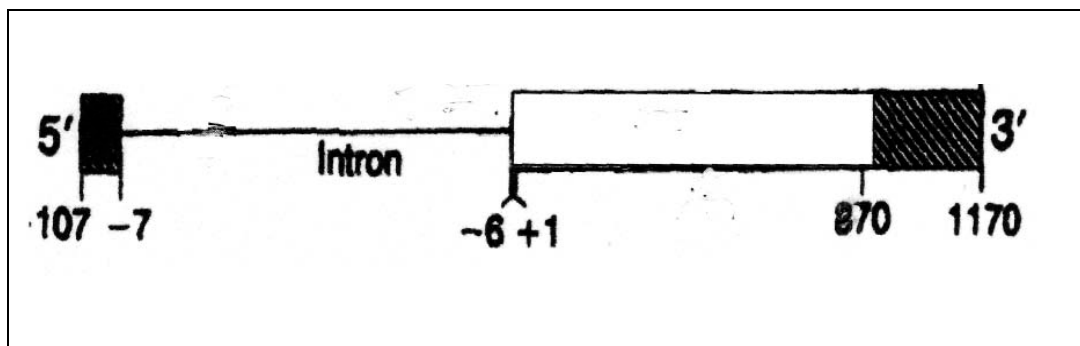


Figure 4. Représentation schématique du locus *NAT2* humain (Boukouvala et Sim, 2005). Les parties hachurées représentent les extrémités 5' et 3' UTR.

Le gène *NAT1* est constitué de 9 exons dont l'exon 9 est codant. Des transcrits multiples de *NAT1* à partir des exons dans la région 5'-UTR ont été mis en évidence. Ces transcrits proviennent à partir de deux promoteurs séparés. Le premier, NATa est localisé à 51.5kb en amont de la région codante et génère des transcrits commençant à partir de l'exon 1. Le second promoteur, NATb est en amont de l'exon 4 et entraîne la formation d'au moins 5 différents transcrits. Le transcrit le plus commun est le plus court et comprend les exons 4, 8 et 9 (figure 5). Cependant la signification biologique de la présence de deux promoteurs est inconnue (Butcher et al. 2004).

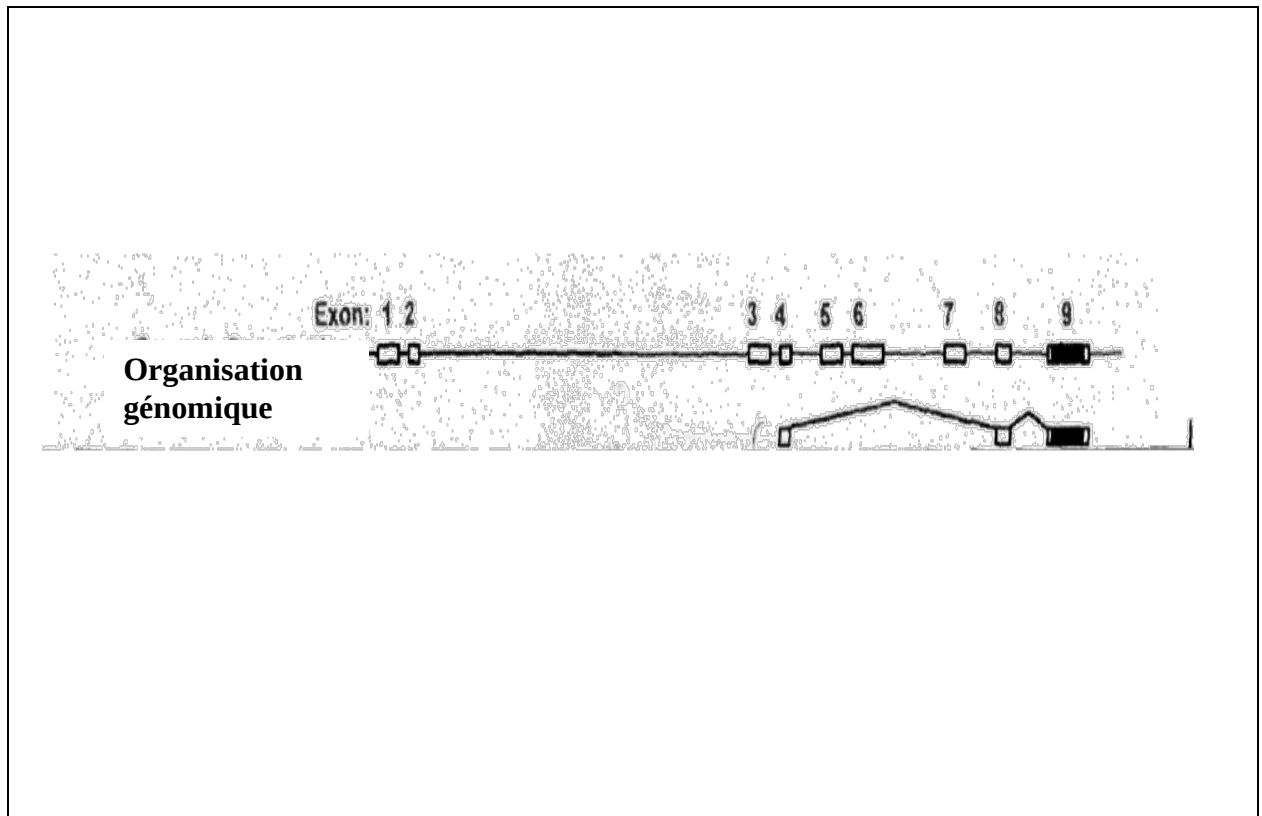


Figure 5 : Organisation génomique du gène humain NAT1 (d'après Butcher et al. 2004). Les rectangles clairs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8) représentent les exons non codants. Le rectangle sombre 9 représente l'exon codant. Dans la deuxième ligne, les rectangles clairs représentent les ARNm des exons 4 et 8 et le rectangle sombre représente l'ARNm de l'exon codant 9

I-B- Variabilité au locus NAT humain

Plusieurs allèles NAT* distincts à transmission autosomique mendélienne ont été identifiés par séquençage de la région contenant l'exon codant NAT1 et de la région contenant l'exon codant NAT2 (Hein et al. 2008).

Différents allèles NAT2* sont bien identifiés tant au niveau structural, qu'en ce qui concerne leur incidence fonctionnelle sur le polymorphisme classique d'acétylation. Le phénotype acétyleur lent suit une transmission autosomale récessive aussi bien pour NAT2 que pour NAT1. En revanche, l'impact fonctionnel de plusieurs allèles NAT1 est moins bien déterminé par rapport à NAT2 (Hein, 2008). La détermination du génotype NAT2 et NAT1, est utile par sa valeur prédictive du phénotype, atteignant 95 à 100% de fiabilité selon les auteurs (Hein, 2006c).

L'identification du génotype NAT est réalisée aussi afin d'estimer le risque d'apparition de certaines pathologies, notamment en association de facteurs environnementaux (Doll et al. 1010).

I-B-1- Variabilité structurale et fonctionnelle au locus *NAT1* humain

Les sites polymorphes *NAT1* identifiés sont situés dans la région codante ainsi que dans les régions 5' et 3'- flanquantes (Figure 6). 28 allèles *NAT1** ont été identifiés, cependant bien qu'il existe une bonne corrélation entre génotype et phénotype pour certains allèles, il est moins certain pour les allèles résultant de mutations hors de la région codante (Tableau A annexe 1) (Hein et al. 2008).

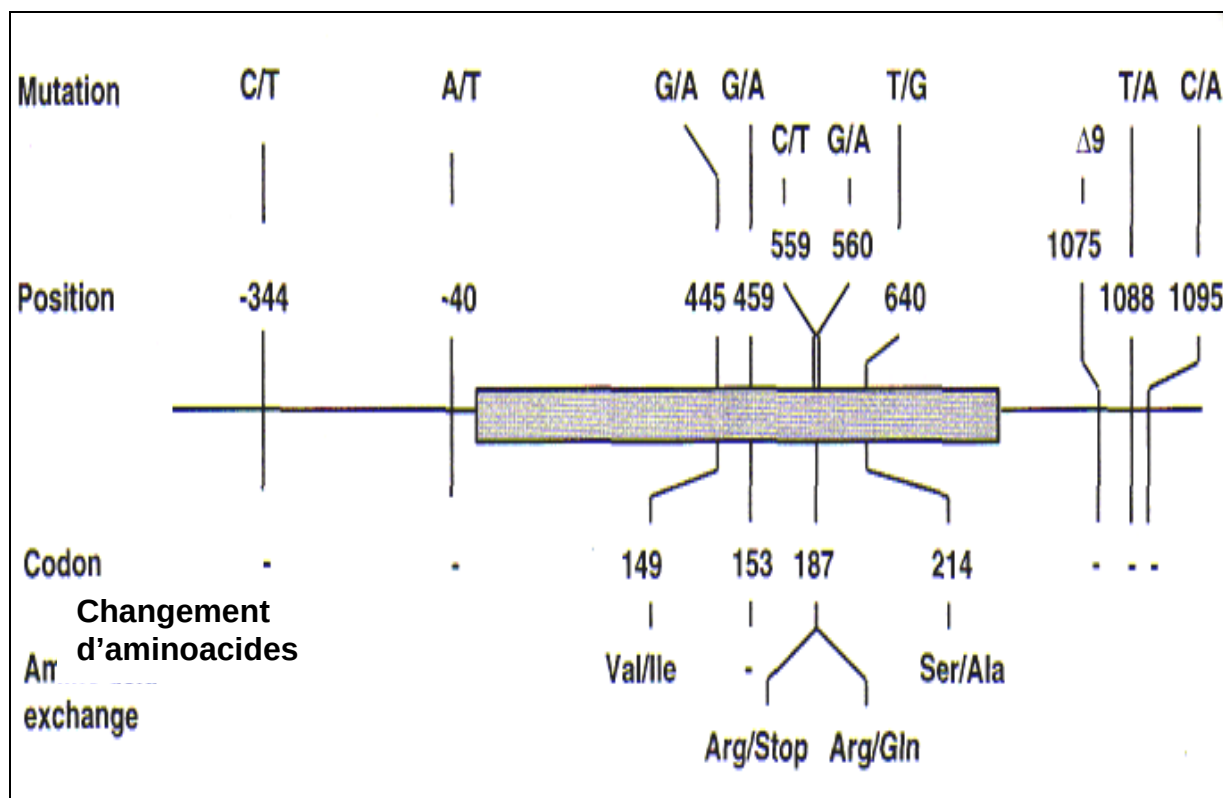


Figure 6 : Variations nucléotidiques du gène *NAT1*. Le changement d'acides aminés induit est aussi représenté (d'après Cascorbi et al. 2001).

L'impact toxicologique du polymorphisme *NAT1* est moins bien caractérisé par rapport à *NAT2*, mais des réductions importantes dans l'activité enzymatique sont observées pour les protéines codées par *NAT1**14B (R187Q), *NAT1**15 (R187stop), *NAT1**17 (R64W), *NAT1**19 (R33stop), et *NAT1**22 (D251V) (Hein, 2002).

Une partie de notre travail a concerné l'étude du génotype de *NAT1* chez une population algérienne.

I-B-2- Variabilité structurale et fonctionnelle au locus *NAT2* humain

Soixante et un allèles sont actuellement mis en évidence (Hein et *al.* 2010). *NAT2**4 est considéré comme l'allèle 'type sauvage' ou référence par l'absence de toute mutation ponctuelle polymorphe ou single nucleotide polymorphism (SNP). 28 SNP ont été identifiés dans la séquence codante *NAT2* et onze groupes d'allèles ont été déterminés.

- *NAT2**5 caractérisé par le SNP341T>C et la substitution d'acide aminé I114T ;
- *NAT2**6 caractérisé par la mutation polymorphe 590G>A et R197Q ;
- *NAT2**7 caractérisé par 857G>A et la substitution d'acide aminé G286E ;
- *NAT2**10 caractérisé par 499G>A et E167K ;
- *NAT2**11 caractérisé par 481C>T et L161L ;
- *NAT2**12 caractérisé par 803A>G et K268R ;
- *NAT2**13 caractérisé par le SNP282C>T et Y94Y ;
- *NAT2**14 caractérisé 191G>A et R64Q ;
- *NAT2**17 caractérisé par 434A>C et Q145P ;
- *NAT2**18 caractérisé par 845A>C et K282T ;
- *NAT2**19 caractérisé par 190C>T et R64W. (Tableau B annexe 2)

Les mutations nucléotidiques les plus fréquentes et les plus étudiées (Sabbagh et *al.* 2008) sont représentées dans la figure suivante (figure 7).

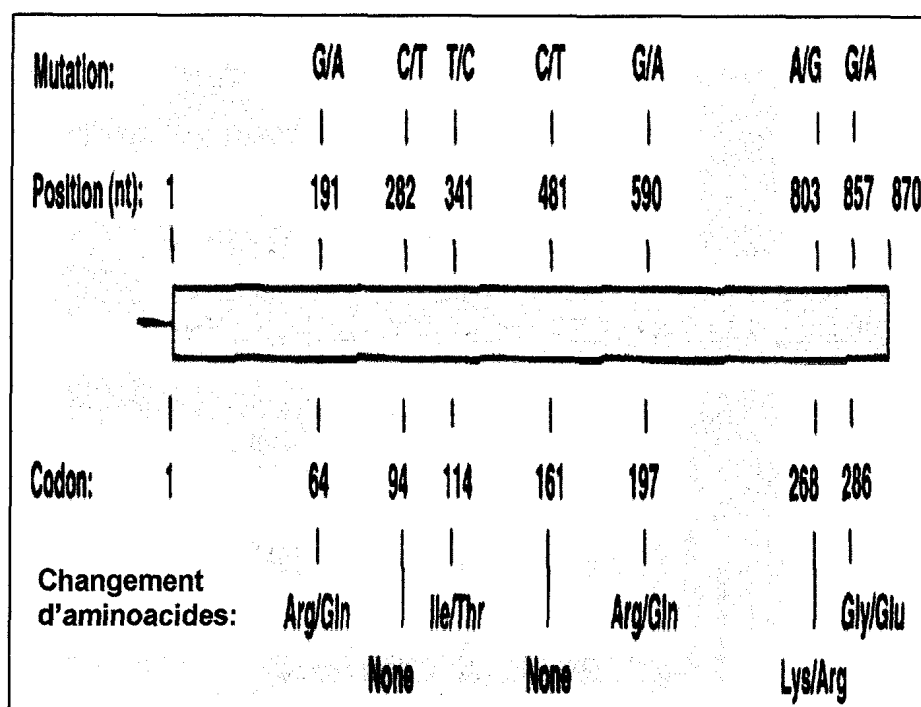


Figure 7: Schéma de l'exon codant *NAT2* avec les sites de mutation nucléotidique et d'acides aminés (d'après Deitz et *al.* 2000)

Les Effets des SNP et des allèles sur l'activité enzymatique *NAT2* seront détaillés dans le chapitre relation structure–fonction des arylamines N-acétyltransférases.

I-C- Polymorphisme d'acétylation selon les groupes ethniques

I-C-1- Polymorphisme d'acétylation concernant NAT2

La proportion des allèles associés avec le phénotype lent connaît d'importantes variations selon l'origine ethno géographique des populations considérées. Les données actuellement disponibles concernent presque uniquement NAT2.

Les populations Caucasiennes comptent des proportions en moyenne équivalentes d'acétyleurs rapides et d'acétyleurs lents (Evans et *al.* 1960, Sabbagh et *al.* 2008). La part de ces derniers varie entre 40 et 70% en Europe et en Amérique du Nord. Chinois et Japonais sont essentiellement acétyleurs rapides, avec seulement 10 à 20% d'acétyleurs lents (Deguchi, 1992, Kukongviriyapan et *al.* 2003). Ils se rapprochent en cela des peuples Eskimos canadiens (5%) mais aussi des Amérindiens.

Différents groupes ethniques pris sur tous les continents ont été comparés entre eux pour les fréquences des principaux allèles NAT2*. Les allèles NAT2*5B et NAT2*6A sont fréquents chez les Caucasiens et représentent à eux seuls 74% des variants lents (Tableau 6). La différence de distribution des phénotypes lents entre Asiatiques et Caucasiens proviendrait de la présence majoritaire des allèles NAT2*5 chez les Caucasiens (Blum et *al.* 1991). Les allèles NAT2*14 ont été rencontrés avec une fréquence significative de 9% chez les noirs Américains d'origine africaine alors qu'ils n'ont pas été détectés chez les Caucasiens (Kukongviriyapan et *al.* 2002).

Tableau 6: Comparaison interethnique des fréquences alléliques de NAT2 (d'après Kukongviriyapan et *al.* 2003)

Groupes ethniques	n	NAT2*4	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	Autres	L
Caucasiens	744	0.25	0.45	0.28	0.02	-	0.55
Africains	256	0.36	0.30	0.22	0.02	0.09	0.41
Emiratis	212	0.18	0.54	0.21	0.04	0.02	0.65
Indiens	278	0.44	0.20	0.32	0.04	-	0.31
Chinois	374	0.51	0.07	0.32	0.10	-	0.28
Australiens aborigènes	98	0.41	0.02	0.17	0.40	-	0.35

n, nombre total d'allèles. Seuls les allèles majeurs ont été considérés. *L*, phénotype acétyleur lent déduit des génotypes.

I-C-2- Polymorphisme d'acétylation concernant NAT1

L'allèle de type sauvage NAT1*4 est présent dans 70% des cas chez les Caucasiens. L'allèle NAT1*10 y est présent à une fréquence de 20%. L'ensemble des allèles NAT1*3, NAT1*11, et NAT1*14 forment une fréquence de 8% chez les Caucasiens (Rodriguez –Lima et *al.* 2004).

Les allèles *NAT1*14B*, *NAT1*15*, *NAT1*17*, *NAT1*19* et *NAT1*22* représentent une plus faible activité catalytique que l'allèle de référence *NAT1*4* et peuvent être considérés comme responsables du phénotype acétyleur lent (Rodriguez-Lima et al. 2004).

Ces derniers allèles représentent seulement 3% des allèles chez les Caucasiens. L'allèle *NAT1*10* présente une activité plus importante que l'activité normale. Cependant, les mutations se trouvant dans *NAT1*10* s'effectuent dans la région 3'-UTR et n'altère pas la structure de la protéine. Les effets exacts de cet allèle demeurent inconnus (Minchin et al. 2007).

I-D- Les loci NAT chez d'autres espèces

Le polymorphisme d'acétylation des arylamines a été décrit initialement chez le lapin. Il a été ensuite démontré que la souche de type acétyleur lent portait une délétion sur un des 2 loci *NAT*, codant un enzyme homologue à *NAT2* humain (Blum et al. 1990). D'autres études ont aussi rapporté une variabilité de l'activité Nat chez différentes souches de souris (Glowinski et Weber, 1982), de hamster (Hein et al. 1982) et de rat de laboratoire (Hein et al. 1991). Trois gènes *Nat* ont été identifiés chez les rongeurs (Doll et Hein ; Land et al. 1993 ; Walraven et al. 2006).

Concernant les procaryotes, deux isoenzymes fonctionnelles ont été identifiées. La première présente une activité NAT typique, alors que la seconde de taille plus petite paraît agir seulement comme une acétyl-coenzyme A hydrolase (Boukouvala et al. 2005).

I-D-1- Comparaison des gènes arylamines N-acétyltransférases entre humains et rongeurs :

Les rongeurs comprennent 3 gènes *Nat* : *Nat1* ; *Nat2* et *Nat3*. Ces gènes présentent une grande homologie avec les *NAT* humaines. L'isoniazide est acétylé par *Nat1* chez les rongeurs alors qu'il est acétylé par *NAT2* chez l'homme. *Nat2* des rongeurs, comme *NAT1* catalyse l'acétylation de l'acide *p*-aminobenzoïque (PABA), l'acide *p*-aminosalicylique (PAS), l'acide *p*-aminobenzoylglutamate (pABG), le 2-aminofluorène (AF), le 2 amino 1 methyl- imidazole [4, 5-b] pyridine (PhIP), le 4-aminobiphenyl (ABP) (Michin, 1995; Ward et al., 1995; Hein et al., 2006a; Walraven et al., 2006). Les protéines *Nat2* de souris, de rat et de hamster sont beaucoup plus similaires sur le plan structure et fonction à *NAT1* humaine qu'à *NAT2* (Butcher et al. 2002). La modélisation structurale par ordinateur a aussi confirmé l'homologie entre *NAT1* humaine et *Nat2* des rongeurs (Kawamura et al. 2005). *Nat2* des rongeurs présentent les même 13 acides aminés de la séquence C-terminale que *NAT1* humaine (Tableau 7) (Sim et al. 2007).

Tableau 7. Comparaison de la séquence C-terminale des NAT d'eucaryotes (Sim et al. 2007)

Séquence C-terminale	
Nat2 de rat	GVSLERKLVPHKGDRFFTI
Nat2 de souris	GVSLERKLVPHKGDRFFTI
Nat2 de hamster	GISLEKKLVPHKGDRFFTI
NAT1 humaine	NISLQRKLVPHKGDRFFTI

Les 290 acides aminés de la protéine Nat2 présentent une grande homologie à ceux de la protéine NAT1 humaine et à ceux d'autres mammifères (Hein, 2002; Boukouvala and Fakis, 2005). Comme NAT1 humaine, Nat2 des muridés est exprimée au cours de l'embryogenèse (Wakefield et al. 2008a). NAT1 humaine ainsi que son homologue Nat2 des rongeurs sont identifiées dans la plupart des tissus et sont polymorphes (Hein et al. 1997). Cette homologie et ce polymorphisme les présentent comme des modèles utiles pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques et des toxicités (Hein et al. 1997; Zhang et al. 2006). Par exemple, de grandes quantités d'adduits de PhIP-DNA ont été détectées dans le colon de rats acétyleurs rapides sous l'action du PhIP. L'administration des amines aromatiques induit aussi la formation de grandes quantités d'adduits d'ADN dans la vessie des rats acétyleurs lents. (Jiang et al. 1999).

II – MANIFESTATIONS PHENOTYPIQUES DU POLYMORPHISME DE N-ACETYLATION CHEZ L'HOMME

Les polymorphismes touchant les enzymes du métabolisme des médicaments ont souvent été révélés par des réactions inattendues à un traitement. Puis, ils ont été confirmés à l'aide d'un médicament sonde, dont les métabolites sont dosés dans l'urine ou dans un lysat cellulaire (Daly, 1995).

II-A- Détermination et distribution des phénotypes d'acétylation

La mesure du phénotype d'acétylation trouve son application principale dans le suivi des capacités d'acétylation au cours d'une exposition thérapeutique ou professionnelle à des xénobiotiques potentiellement toxiques.

II-A-1- Méthodes de mesure du phénotype NAT2

La détermination phénotypique *in vivo* consiste à quantifier les métabolites plasmatiques ou urinaires produits après l'administration d'une sonde métabolique. Ces composés tests ont initialement été des médicaments, avant que la caféine s'avère utilisable (Grant et al. 1983a ; Tang et al. 1983). Certains substrats sont également utilisés à des fins expérimentales *in vitro* dans des lysats sanguins ou dans des cytosols de foie.

-Utilisation de substrats médicamenteux

Plusieurs méthodes ont été décrites, elles se sont basées notamment sur l'emploi de l'isoniazide, de sulfamethazine, de sulfasalazine, de dapsone, ou de procainamide (Grant et al. 1991). Ainsi, l'acétyl-SMZ est dosée par spectrophotométrie dans un échantillon de plasma prélevé 6 heures après l'ingestion de 10 mg/kg de SMZ. Le dapsone sérique non métabolisée est quantifiée par HPLC.

Les méthodes utilisant *in vivo* des molécules médicamenteuses arylamines ou hydrazines ne sont pas dénuées d'inconvénients. En effet, leur usage impose des contraintes éthiques lorsque des réactions adverses sont à craindre (personnes hypersensibles, jeunes enfants). De plus, ces tests nécessitent souvent des administrations multiples (Grant et al. 1983a).

-Utilisation de la caféine

La caféine est très largement préconisée comme sonde métabolique pour l'étude

épidémiologique du statut d'acétylation (Grant et *al.* 1983a ; Tang et *al.* 1983 ; Rihs et *al.* 2007). Facilement disponible dans le monde entier en tant que constituant ou additif de nombreux aliments, c'est le xénobiotique le plus consommé dans le monde. Elle est exempte de toxicité sur une large gamme de doses et permet de déterminer facilement, avec précision et en toute sécurité le phénotype d'individus sains ou malades. De plus, cette méthode permet d'éviter la procédure invasive du prélèvement sanguin.

Le métabolisme de la caféine (1, 3,7-triméthylxanthine) met en jeu des réactions de déméthylation oxydative, d'hydroxylation et d'acétylation. Quatorze métabolites distincts ont été identifiés dans l'urine (Grant et *al.* 1983b) dont cinq sont majeurs (Figure 8). La para xanthine (17X), est convertie par l'isoforme CYP1A2 en un intermédiaire instable de nature inconnu, déméthylé en position 7 et possédant un cycle ouvert (Grant et *al.* 1984). Cette décyclisation partielle conduit de la xanthine initiale à l'uracile. Ce composé est stabilisé par conversion catalysée par NAT2 en un dérivé acétylé majeur, la 5-acétyl-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU) (Tang et *al.* 1983).

Chez les sujets acétyleurs rapides, le composé intermédiaire serait en grande partie converti en AFMU, alors que chez les acétyleurs lents, sa recyclisation conduisant à la formation de 1 X serait prépondérante. La synthèse de l'AFMU étant catalysée par NAT2, le ratio AFMU/1X est plus grand chez les acétyleurs rapides que chez les acétyleurs lents et constitue donc un indice d'acétylation (Grant et *al.* 1983a ; 1983b).

La caféine (1,3,7-triméthylxanthine) est un stimulant respiratoire et cardiaque. Entrant dans la composition de quelques spécialités pharmaceutiques comme antimigraineux et stimulant cardiaque, elle constitue surtout l'un des xénobiotiques les plus consommés (café).

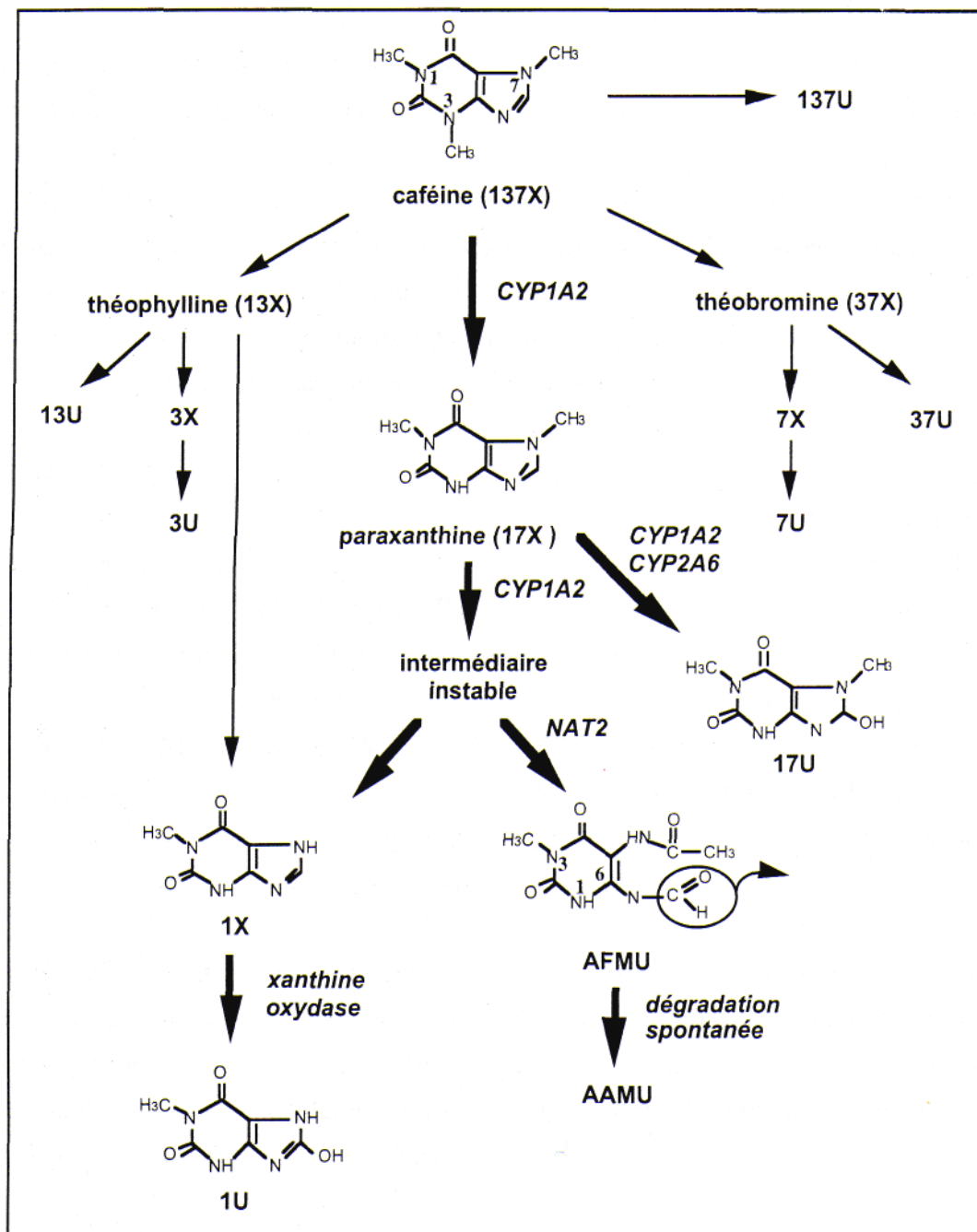


Figure 8. Métabolisme de la caféine (d'après Grant et al. 1984 ; Denaro et al. 1996 in Deloménie, 1996). Les voies majeures comme celles de la formation de l'AFMU et du 1X sont représentées par les flèches épaisses. Les métabolites 13X, 37X, 13U, 3X et 7X sont formés en quantité minoritaire alors que les molécules 3U, 7U, 37U et 137U ne sont présentes qu'à l'état de traces peu ou pas détectable à l'analyse. AFMU = acétylaminoformylmethyluracile, AAMU = acétylaminomethyluracile , 1X = 1-methylxanthine, 1U = 1-methyluracile , 3X = 3-methylxanthine , 3U = 3-methyluracile, 7X = 7-methylxanthine , 7U = 7-methyluracile , 13U = 1,3-methyluracile , 37U = 3,7-methyluracile.

II-A-2- Méthodes de mesure du phénotype NAT1

Les études du polymorphisme du phénotype d'acétylation de NAT1 ont été réalisées aussi bien *in vivo* (Grant et *al.* 1983a ; Rihs et *al.* 2007) qu'à partir de tissu hépatique (Sugamori et *al.* 2003), de sang total ou de leucocytes mononucléés (Hughes et *al.* 1998). Les molécules médicamenteuses spécifiques à NAT1 sont l'acide p-aminobenzoïque (PABA) ou vitamine H1, qui est principalement utilisée pour ses propriétés anti- rickettsies mais aussi comme antagoniste expérimental des sulfamides. Le PABA est également employé dans la fabrication industrielle d'esthers anesthésiques locaux, d'acide folique, de crèmes solaires et d'ozo-colorants. L'acide p-aminosalicylique (PAS), est un tuberculostatique découvert en 1946 (Bouchet, 1996). Son mécanisme d'action est semblable à celui des sulfamides. En raison de sa faible activité et de nombreux effets adverses, le PAS n'entre plus depuis 1992 dans aucune préparation pharmaceutique standard. Il peut cependant être prescrit de manière exceptionnelle chez des patients présentant une tuberculose résistante à l'isoniazide et à la rifampicine.

L'isoniazide, la caféine, le PAS et le PABA ont fait partie des principaux substrats utilisés <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> dans notre travail pour l'étude de l'activité des NAT de l'homme et de rongeurs.
--

TROISIEME PARTIE
CONSEQUENCES DU POLYMORPHISME D'ACETYLATION

CONSEQUENCES DU POLYMORPHISME D'ACETYLATION

Toute variation de l'activité des enzymes de biotransformation des xénobiotiques influence l'efficacité de la réponse thérapeutique et le risque de toxicité médicamenteuse. Cette variation est aussi liée au risque de développer certaines pathologies, lié aux polluants de l'environnement. Les NAT, enzymes polymorphes du métabolisme des xénobiotiques entrent donc dans cette catégorie de facteurs de risque.

I--Association entre le polymorphisme des allèles NAT2 et la prédisposition à certaines pathologies

I-A- Réactions adverses aux médicaments et insuffisances thérapeutiques

Les réactions adverses aux médicaments regroupent des symptômes idiosyncrasiques diversifiés, aigus ou chroniques. De tels effets secondaires corrélés aux capacités d'acétylation par NAT2 sont établis pour certains médicaments parmi lesquels l'isoniazide (Tableau 8). L'interprétation de ce type de toxicité est classiquement celle d'un défaut d'élimination du médicament. Un défaut d'acétylation peut conduire en effet à l'accumulation de métabolites qui seraient capables dans certaines conditions d'induire un processus toxique. Il est cependant important de souligner que d'autres facteurs de risque interviennent également. Les corrélations rapportées sont toujours relativement faibles en raison de la nature intrinsèque multifactorielle de tous ces processus. Les NAT contribuent à l'accroissement relatif de certains risques mais n'ont pas les seules responsabilités.

Tableau 8. Relations entre phénotype d'acétylation NAT2 et réactions adverses aux médicaments ou insuffisances thérapeutiques (d'après Evans, 1992 in Deloménie, 1996).

Médicament	Phénotype d'acétylation	Réactions observées
isoniazide "	[lent rapide	neuropathies périphériques, hépatites posologie sub-optimale
sulfamides	lent	réactions d'hypersensibilité
hydralazine "	[lent rapide	lupus érythémateux systémique posologie sub-optimale
procaïnamide	lent	lupus érythémateux systémique
sulfasalazine et sulfapyridine	lent	nausées, vomissements, vertiges, troubles hématologiques, rash cutané
nitrazepam	lent	somnolence, confusion, délire
amonafide	rapide	leucopénie

- Modèle de l'hydralazine et de l'isoniazide (INH)

L'isoniazide est un dérivé de l'acide isonicotinique utilisé comme agent thérapeutique de la tuberculose aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. Commercialisé dès 1952 sous le nom de Rimifon ®. Cette molécule exerce une activité bactériostatique et bactéricide spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'INH est un substrat préférentiel de l'isozyme NAT2. Il a permis de découvrir le polymorphisme NAT2, qui fut d'ailleurs initialement appelé « polymorphisme d'acétylation de l'isoniazide ».

Des effets adverses fréquents tels que désordres hépatiques et neuropathies périphériques ont été observés chez les acétyleurs lents traités à l'INH ou à l'hydralazine (antihypertenseur) aux posologies usuelles (Fukino et *al.* 2008). L'hépatotoxicité constitue l'effet majeur et le plus sévère. La voie métabolique principale de l'INH est son métabolisme en acetyl isoniazide (AcINH) par NAT2 (Figure 9). Ce métabolite représente 50-90% des métabolites totaux de l'INH. L'AcetylINH produit est alors hydrolysé par une amidase en Acétylhydrazine. Il existe aussi une autre voie où l'INH est hydrolysé par une amidase en hydrazine (Fukino et *al.* 2008).

Une diminution de l'activité de NAT2 peut entraîner l'accumulation de précurseurs, hydrazine et acetylhydrazine dans le foie, entraînant une hépatotoxicité par la production de radicaux libres à partir de l'hydrazine (Higuchi et *al.* 2007).

De plus, l'INH et l'hydralazine empêcheraient l'acétylation des histones et entraîneraient ainsi une hépatotoxicité chez les acétyleurs lents (Murata et *al.* 2008).

Il existe une association entre le phénotype NAT2 (acétyleur lent) et l'induction de l'hépatotoxicité isoniazide dépendante (Higuchi et *al.* 2007).

Chez les acétyleurs rapides de l'INH, un défaut de réponse au traitement est observé, en particulier en cas d'administrations intermittentes (hebdomadaires), du fait d'une inactivation trop rapide du principe actif (Evans et *al.* 1960). Un traitement effectué de façon régulière (au moins bihebdomadaire) aboutit cependant à une guérison similaire quel que soit le phénotype d'acétylation (Evans et *al.* 1964). Face à ce type de problèmes, les cliniciens peuvent choisir d'adapter ou non leur posologie. Ainsi, dans le cas de la tuberculose de l'adulte, a-t-il été recommandé de déterminer le phénotype d'acétylation puis de prescrire 3 mg d'INH/kg/jour chez un acétyleur lent ou 5 à 6 mg/kg/jour chez un rapide. Il a été suggéré que chez le jeune enfant dont l'âge est inférieure à 5 ans, la dose d'INH doit être au moins de 10mg/kg assurant d'emblée un effet optimal chez les acétyleurs de type phénotype rapide (Schaaf et *al.* 2005).

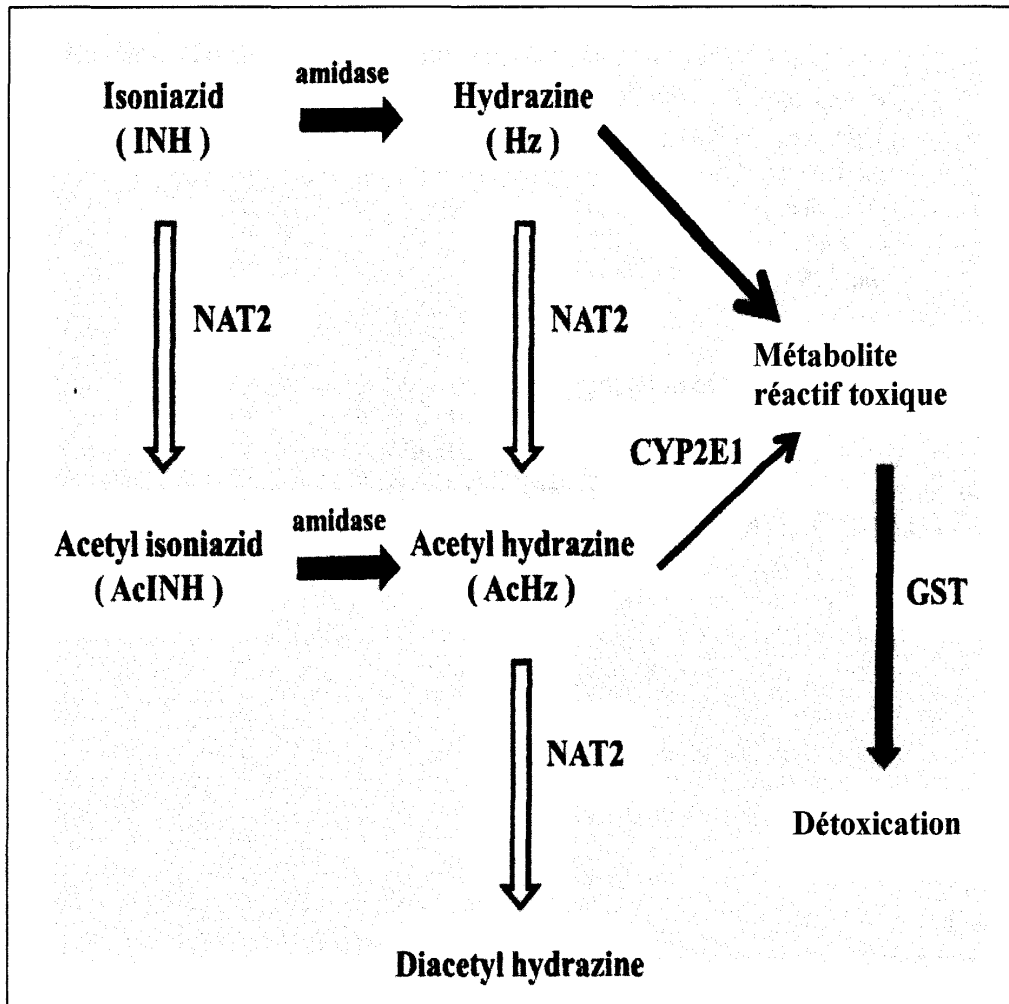


Figure 9. Voie métabolique de l'isoniazide dans le foie (d'après Fukino et al. 2008)

Il a été généralement proposé que le métabolite responsable de l'induction de l'hépatotoxicité par l'INH soit l'acétylhydrazine. Celle-ci peut être métabolisée par le CYP450 en métabolite toxique ou par NAT2 en un métabolite, le diacétylhydrazine moins toxique (Daly et al. 2010).

- Cas du procainamide

Le procainamide est un anti-arythmisant. Il est métabolisé principalement par NAT2 en son métabolite le N-acétylprocainamide (NAPA), possédant aussi des effets anti-arythmisants. Chez les acétyleurs rapides, l'augmentation de la conversion de la procainamide en NAPA peut entraîner des concentrations élevées en NAPA avec le risque de développer une arythmie ventriculaire potentiellement mortelle. Le phénotype acétyleur lent est un facteur de risque de développer des anticorps anti-nucléaires et un lupus érythémateux systémique (Johnson et Humma, 2002).

- Cas du levosimendan

Le levosimendan est indiqué dans le traitement de la décompensation sévère d'une insuffisance cardiaque chronique. C'est aussi un vasodilatateur. Il est métabolisé par NAT2 en son métabolite le OR-1896. Chez les acétylateurs lents, une infusion prolongée de levosimendan a été associée à une augmentation marquée du rythme cardiaque qui peut s'avérer dangereuse (Antila et *al.* 2004).

I- B- Effets des xénobiotiques précarcinogènes

La N-acétylation par NAT2 permet la détoxification de l'organisme. Cependant, NAT2 peut aussi par une O-acétylation activer les N-hydroxylamines, les acides N-hydroxylamiques et les diarylamine trouvés dans l'environnement comme la fumée de cigarettes, les vapeurs de gaz d'échappement de véhicules, certains produits industriels et produits alimentaires en les transformant en métabolites adduits de macromolécules cellulaires. Ainsi, la benzidine, l' α - et la β - naphthylamine, l'aniline et ses dérivés comme la 4'4'-méthylène-bis-2-chloroaniline sont reconnus responsables de cancers "professionnels" (Carréon et *al.* 2006). Des arylamines hétérocycliques hautement mutagènes comme le PhIP également générées lors de la cuisson des aliments et en particulier au cours de la pyrolyse de certains acides aminés (Doll et *al.* 2010).

Le 2-aminofluorène, à usage uniquement expérimental, a fait l'objet de nombreuses investigations pour son haut pouvoir cancérogène (Hein et *al.* 2008).

Ces composés de type arylamines sont activés en composés mutagènes adduits de l'ADN via une O-acétylation (Hein et *al.* 2006b). Pour cette raison, l'association possible entre le polymorphisme génétique de NAT2 et la prédisposition aux maladies en présence de composés suspects de l'environnement a été largement étudiée. Ainsi, le polymorphisme génétique de NAT2 a été associé à la susceptibilité à certaines pathologies dans les tissus exposés aux xénobiotiques (Hein et *al.* 2000).

De façon générale, plusieurs voies enzymatiques complémentaires, parfois spécifiques d'un tissu donné, se conjugueraient pour faire apparaître des métabolites réactifs à partir de certaines arylamines. Parmi les voies se combinant probablement aux réactions d'acétylation, celles des CYP P-450 et de la prostaglandine H synthase ou cyclooxygénase semblent en faire parti (Smith et *al.* 1997).

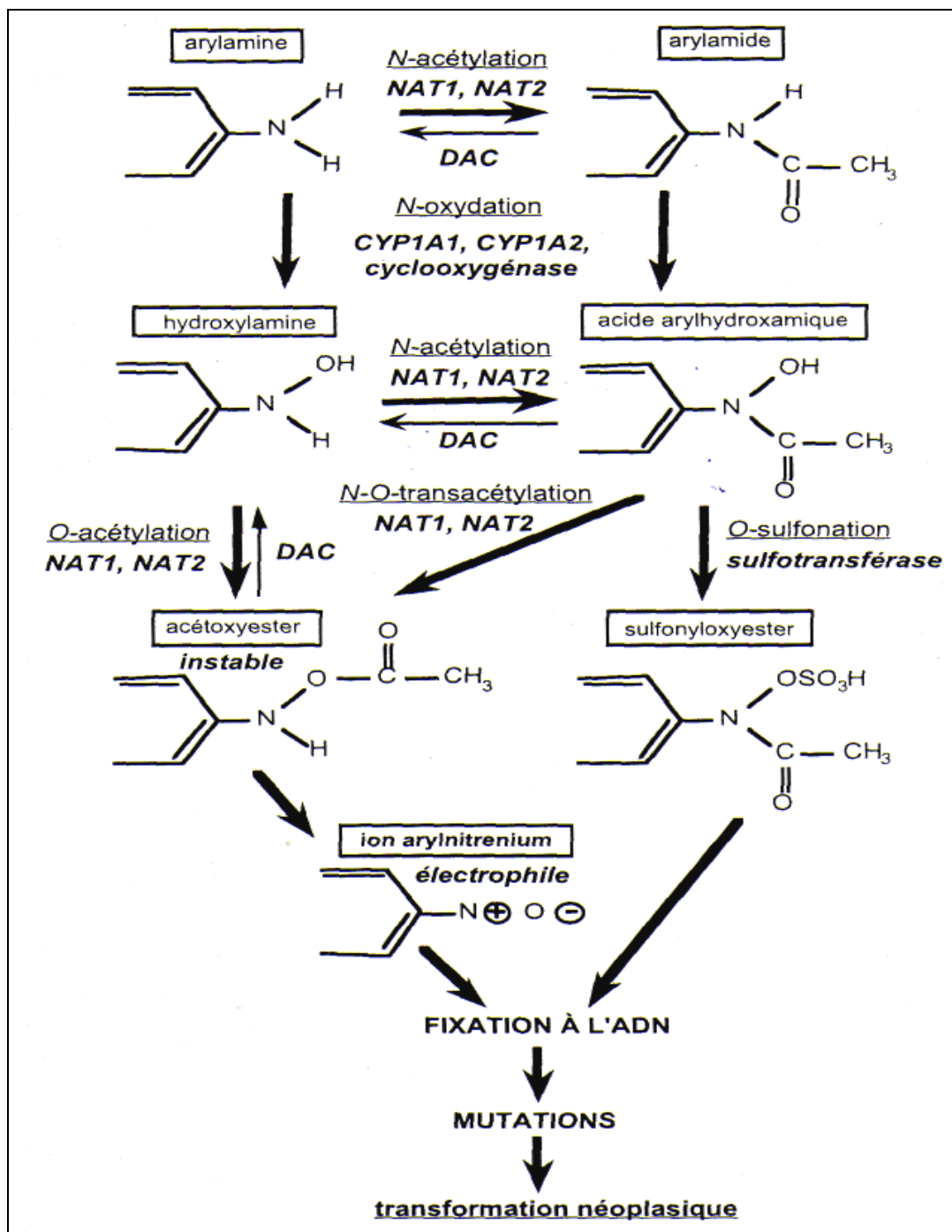


Figure 10. Principales voies de la bioactivation des précarcinogènes chimiques (d'après Grant et al. 1993 in Deloménie, 1996).

Les maladies concernées regroupent entre autres, les maladies cardiovasculaires (Binkova et al. 2002 ; Izzoti et al. 2007), le cancer du colon (Brockton et al. 2000 ; Huang et al. 2009), le cancer de la vessie (Garcia-Closas et al. 2005 ; Hein, 2006a ; McGrath et al. 2006), ainsi que d'autres pathologies. Il ne s'agit en aucun cas de relations de causalité directe mais, étant donné la multiplicité des mécanismes de beaucoup de maladies, de corrélation d'ordre statistique (Evans, 1992). Historiquement, la notion d'activation métabolique des précarcinogènes en carcinogènes réactifs est apparue à la suite des travaux de Miller et al (1960). Ces auteurs démontrèrent en effet les premiers que le 2-acétylamino-fluorène devait

subir une hydroxylation métabolique avant de pouvoir devenir un agent réactif vis à vis de l'ADN. Une estérification terminale permettait l'activation finale du métabolite en un composé électrophile avide de motifs nucléophiles. A la suite Miller, (1978) a mis en évidence la conversion de précarcinogènes inactifs en métabolites procarcinogènes puis en une forme 'ultime' carcinogène commune à plusieurs voies métaboliques à partir de composés initiaux différents. Ce dernier produit, rendu électrophile par un déficit local en électrons, établit spontanément des liaisons covalentes avec l'ADN.

- Cas du cancer de la vessie

Plusieurs travaux ont montré une forte association entre le phénotype acétyleur lent de type NAT2 et le risque de ce cancer lors de l'exposition à diverses arylamines précancérigènes (Garcia-Closas et *al.* 2005, Hein, 2006). Le mécanisme hypothétique de cette association serait que l'acétylation lente par NAT2 des amines aromatiques carcinogènes rentre faiblement en compétition avec l'activation métabolique via les cytochrome P450 et/ou les prostaglandine H-synthases, pour augmenter le risque de la carcinogenèse chez le phénotype acétyleur lent. Ainsi, à la suite d'une inhalation et d'une exposition aux monoarylamines aromatiques, la N-acétylation rentre en compétition faiblement avec la N-hydroxylation entraînant un risque élevé au phénotype NAT2 acétyleur lent (Hein et *al.* 2000).

Plus le phénotype acétyleur lent est important, plus le risque du cancer de la vessie augmente (Hein, 2000).

Le risque du cancer de la vessie est plus important chez les individus possédant les haplotypes NAT2*5 (Patin et *al.* 2006). En effet, le SNP 341T>C (I114T) associé à l'allèle NAT2*5 entraîne de très larges réductions de la quantité et de l'activité de la protéine NAT2 (Fretland et *al.* 2001) résultant de sa dégradation (Zang et *al.* 2004). Cependant, d'autres études montrèrent que les acétyleurs rapides présentaient plus de risque de cancer de la vessie que les acétyleurs lents chez des travailleurs Chinois exposés aux benzidines (Carreon et *al.* 2006). Ces observations sont expliquées par le fait que les benzidines sont des aryldiamines. La N-acétylation d'une seule des deux amines aromatiques n'est pas une voie d'inactivation, mais au contraire peut augmenter l'activation métabolique et /ou le transport vers la vessie (figure 11). Cette forme de cancer fait partie des cancers 'professionnels' car son apparition est favorisée par une exposition prolongée (de 15 à 20 ans en moyenne) à certaines amines aromatiques, en relation avec leur fabrication ou leur utilisation industrielle.

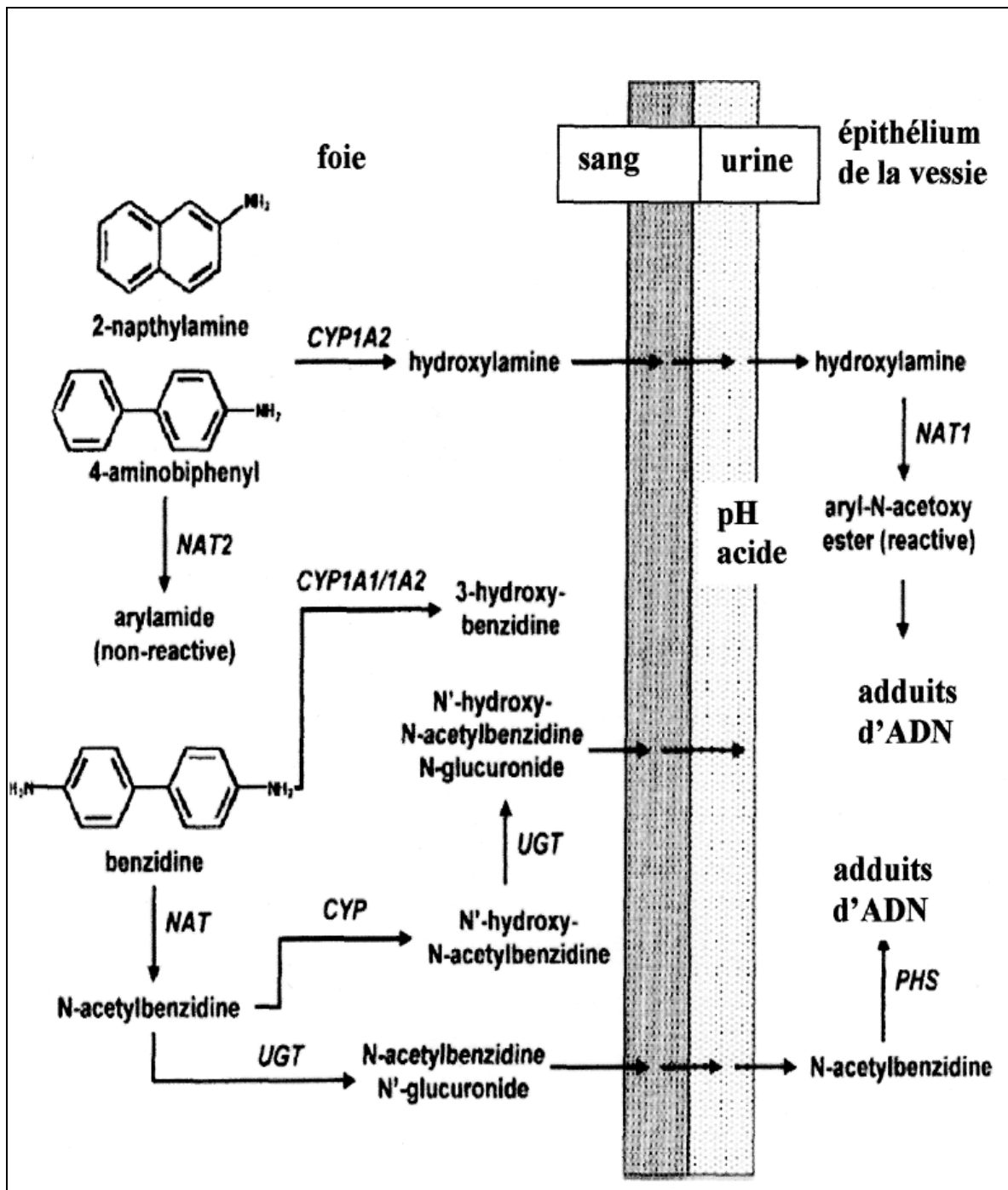


Figure 11. Comparaison des voies clés dans le métabolisme de la monoamine aromatiques et des diamines aromatiques. CYP1A1/CYP1A2, cytochrome P-450 1A1/1A2 ; UGT, UDP-glucuronyl transférase, prostaglandine H-synthase (D'après Caréon et al. 2006).

-Cas du cancer côlo-rectal

Plusieurs études ont montré l'accroissement du risque d'apparition de ce cancer avec le phénotype acétyleur rapide (Brockton et al. 2000 ; Huang et al. 2009). La muqueuse du colon possède des activités NAT et OAT élevées. Il a été suggéré que la O-acétylation serait plus importante que la N-acétylation et par conséquent, le génotype acétyleur rapide est le statut du risque du cancer colorectal (Hein et al. 2006).

- Cas des maladies cardiovasculaires

Les enzymes du polymorphisme des xénobiotiques peuvent contribuer dans la variabilité interindividuelle et à la susceptibilité non seulement aux carcinogénèses mais aussi aux adduits d'ADN athérogènes (Izzoti et *al.* 2001). Les niveaux d'adduits de l'ADN pronostiquent la progression de l'athérosclérose en initiant la formation des plaques athérosclérotiques, à la suite d'exposition à des facteurs environnementaux (Binkova et *al.* 2002 ; Izzoti et *al.* 2007). En effet, l'exposition aux polluants de l'air provenant de gaz d'échappement de véhicules est associée à la progression de l'athérosclérose (Lund et *al.* 2009). Les particules polluant l'air ont été associés à des décès cardiovasculaires (Park et *al.* 2008). Le 2-nitrobenzathrone (2-NBA) est un des constituants des particules de pollution de l'air ambiant, qui est métabolisé par NAT2 (Arlt et *al.* 2007).

Une partie de notre travail a concerné l'étude de l'association du polymorphisme NAT2 et la prédisposition aux maladies cardiovasculaires.

I-C- Effet endogène du polymorphisme de NAT1

Plusieurs travaux ont suggéré que NAT1 pourrait avoir dans les cellules un autre rôle que celui du métabolisme des xénobiotiques. Ceci à cause de sa localisation tissulaire ubiquitaire et son expression dès les premières étapes de l'embryogenèse. Cependant, mis à part son rôle dans le métabolisme des folates, aucun autre rôle endogène n'a été identifié jusqu'à nos jours. NAT1 catalyse spécifiquement un métabolite des folates, le pABG, en N-acétyl-pABG (Minchin, 1995; Ward et *al.* 1995). Des études épidémiologiques indiquèrent que les polymorphismes de NAT1 pourraient être associés aux problèmes de la fermeture du tube neural aboutissant au spina bifida, au bec de lièvre et à l'ouverture du palais (Jensen et *al.* 2006). Ces défauts sont probablement multifactoriels, incluant les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Les allèles mutants entraînant la diminution de l'activité NAT1 sembleraient être protecteurs contre le spina bifida (jensen et *al.* 2006). En effet, Le SNP C1095A situé en dehors de la partie codante et responsable d'une activité enzymatique rapide a été associé à une augmentation de l'homocystéine, un composant toxique du cycle de la méthionine dans le métabolisme des folates (Stanislawska et *al.* 2006). Le SNP C1095A se trouve dans l'allèle NAT1*10 (Hein et *al.* 2008). Ce SNP paraît à une fréquence élevée dans des études pathologiques, comme la maladie d'Alzheimer (Johnson et *al.* 2004).

D'autre part, NAT1 humaine pourrait être considérée comme un bio marqueur potentiel des tumeurs (Wakefield et *al.* 2008a). En effet, NAT1 est exprimée de façon abondante dans les récepteurs oestrogéniques des cancers du sein et le niveau de son expression affecte la croissance des cellules en culture de ce cancer (Adams et *al.* 2003; Wakefield et *al.* 2008 b). La relation complexe entre le polymorphisme de NAT1 et les cancers épithéliaux pourrait résulter d'une liaison fonctionnelle *in vivo* entre l'activité d'acétylation et le métabolisme des folates (Wakefield et *al.* 2007).

QUATRIEME PARTIE
RELATIONS STRUCTURE-FONCTION
DES ARYLAMINES N-ACETYLTRANSFERASES

RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DES ARYLAMINES N-ACÉTYLTRANSFERASES

I - MECANISME CATALYTIQUE ET CARACTERISATION DU SITE ACTIF

I- A-- modèle de mécanisme catalytique ping-pong bi-bi

La nature du mécanisme réactionnel a pu être précisée grâce à l'analyse de la réaction d'acétylation de l'INH par la Nat hépatique de lapin (Weber et Cohen, 1967). La représentation en double inverse de la vitesse de formation d'acétyl-INH en fonction de la concentration du substrat accepteur ou celle du substrat donneur engendre des droites parallèles entre elles, indiquant que les valeurs apparentes des K_m et des V_{max} pour un substrat dépendent de la concentration de l'autre substrat et tendent vers un maximum. Selon la deuxième règle de Cleland, ces deux ligands se fixent donc sur deux formes enzymatiques distinctes séparées par une étape irréversible, condition pouvant être réalisée par la quasi absence de produits aux instants initiaux de la réaction. C'est ce type d'observations qui a conduit à envisager un mécanisme catalytique de type bi-bi ping-pong pour les NAT (Figure12).

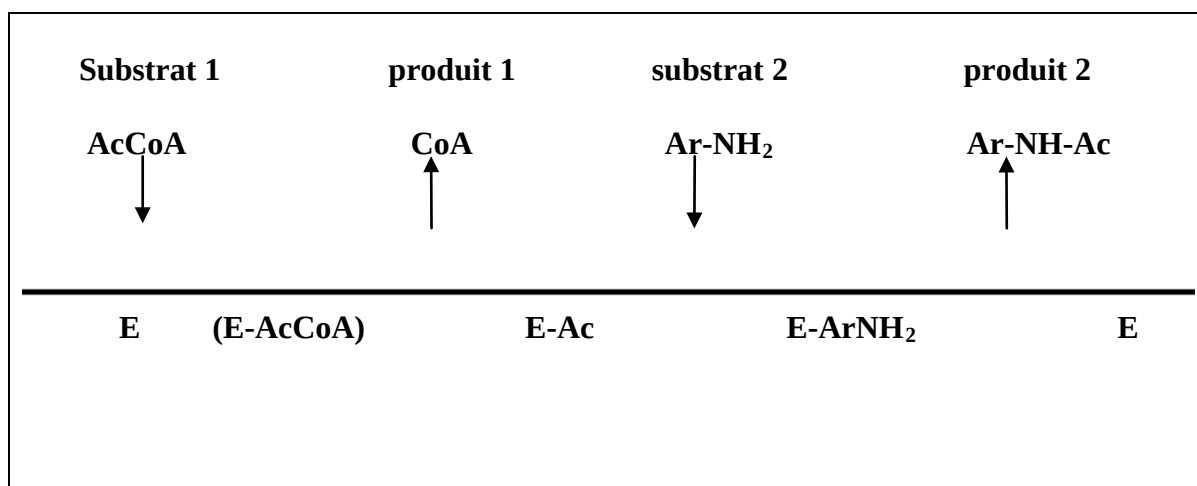


Figure 12. Schéma du chemin réactionnel bi-bi ping-pong de NAT (d'après Weber 1981). Il s'agit d'un processus ordonné à deux substrats et deux produits. Une première réaction entre l'enzyme (E) et son premier substrat (AcCoA) libère un premier produit (CoA) avant que le second substrat (Ar-NH₂) ne réagisse à son tour pour aboutir au produit acétylé final (Ar-NH-Ac).

Les résultats d'expériences d'inhibition de l'activité NAT ont suggéré que la première étape du ping-pong génère une forme intermédiaire de l'enzyme. Ainsi, l'inhibition compétitive de l'INH par le CoA suppose (troisième règle de Cleland) que ces deux composés interagissent avec la même forme enzymatique. Cet intermédiaire a été identifié comme étant l'enzyme ayant fixé l'acétyl à transférer (Weber et Cohen, 1981).

La cys68 est en premier acétylée grâce à sa liaison à l'acétyl-coenzyme A. Elle est suivie par la libération du CoA, la liaison du substrat, et le transfert du groupe acétyl au substrat amine exo cyclique ou à l'oxygène du substrat amine hydroxylé (Walraven et *al.* 2006). Une série d'interactions de type van der Waals et de type hydrogène entre plusieurs acides aminés chargés et acides aminés hydrophobes et les groupes pyrophosphate et adénine du CoA servent à orienter la molécule.

I– B— Caractérisation du site actif

Ce sont les travaux de Sinclair et *al* (2000), qui fournirent la première structure cristalline de la protéine NAT, à partir du procaryote *S.typhimurim*. Les Nat des eucaryotes étant sensibles aux protéolyses, elles présentaient plus de difficultés à être manipulées que les NAT des procaryotes. La structure des NAT de *-S.typhimurim* révéla qu'en plus du site actif portant une Cys en position 69 (correspondant à la Cys68 des NAT), deux autres résidus – His107 et Asp122 – contribuent à la formation d'une triade catalytique caractéristique agissant avec des sulfures nucléophiles, pouvant former des liaisons amides.

Finalement, grâce à des études cinétiques et à l'utilisation de la radioactivité, le mécanisme catalytique des Nat a été établi chez le hamster (Wang et *al.* 2005). La formation d'une paire d'ions de thiolate- imidazolium par Cys68 et His107 est nécessaire pour l'activité catalytique, et que l'Asp122 est indispensable pour une activité optimale et une stabilité structurale (Figure 13).

Les enzymes NAT1 et NAT2 ont des structures similaires à celles des autres espèces étudiées, notamment au niveau des résidus de la triade catalytique Cys68-His107-Asp122 (Sinclair et *al.* 2000).

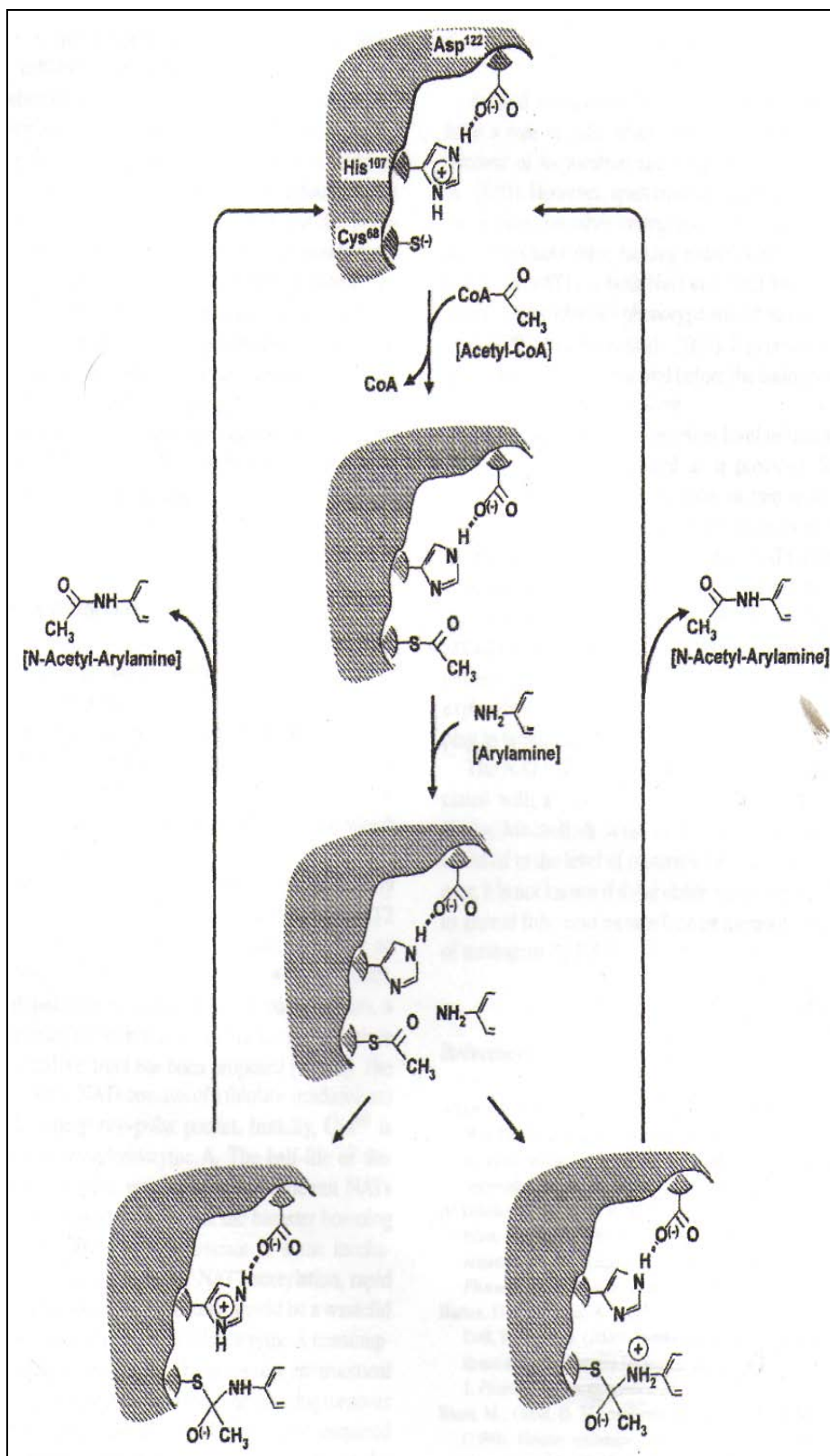


Figure 13. Mécanisme moléculaire de l'acétylation des arylamines par la triade catalytique (d'après Wang et al. 2005).

II- STRUCTURE ET SELECTIVITE DE SUBSTRATS

La structure des NAT est constituée de trois domaines approximativement égaux : Un domaine N-terminal très conservé formant l'hélice α , un second formant le feuillet β et un troisième constituant le couvercle α/β (Sinclair et *al.* 2000).

II-A - STRUCTURES CRISTALLINES DES NAT HUMAINES

Wu et *al* (2007) ont récemment réussi la cristallisation et la détermination directe de la structure des enzymes arylamine-NAT de l'homme et d'autres mammifères. Cette détermination a permis de confirmer plusieurs hypothèses émises par analogie avec la structure des procaryotes. Comme attendu, les protéines humaines NAT1 et NAT2 sont très similaires dans leur structure et superposables (Figure 14). Les positions des résidus de la triade catalytique Cys68-His107-Asp122, sont localisées à l'intérieur du noyau des enzymes et sont identiques. Cette localisation permet de préserver la Cys68 de l'eau de l'environnement, réduisant ainsi l'hydrolyse de l'intermédiaire sulfhydryle acétylé (Wang et *al.* 2005).



Figure 14. *Superposition des structures cristallines des NAT1 (vert) et NAT2 (jaune) humains (d'après Grant et al.2008).*

II-B – SELECTIVITE DE SUBSTRAT

Les gènes clonés des arylamine N-acétyltransférases présentent une homologie importante de 81%. Malgré cette similitude, ces enzymes présentent des différences significatives dans la sélectivité des substrats. NAT1 montre une plus grande affinité pour le PAS (avec un K_m apparent d'environ 10 μ M) que pour la SMZ (K_m apparent de 1.2 mM). NAT2 montre une sélectivité opposée, avec une plus grande affinité pour la SMZ (120 μ M) comparée au PAS (2.9mM) (Grant et *al.* 1991). La différence dans la sélectivité de substrats laisse donc suggérer une différence d'acides aminés spécifiques entre ces deux enzymes.

En effet, la sélectivité de NAT2 est fortement influencée par trois résidus serine aux positions 125 ; 127 ; et 129. Par contre, NAT1 possède les résidus Phe125 ; Arg127 ; Tyr129. (Walraven et *al.* 2008a). Les acides aminés 125 ; 127 et 129 jouent donc un rôle important dans la sélectivité de substrats, et sont localisés à proximité du site actif de ces enzymes (Rodroquez-Lima et *al.* 2004).

Le volume du site de liaison du substrat de NAT2 est environ 60% plus important que celui de NAT1. Ceci permettrait l'accès à un substrat plus volumineux comme la SMZ substrat de NAT2. La réduction du volume du site de liaison du substrat de NAT1 pourrait permettre l'accès à de plus petits substrats comme le PAS et restreindre l'accès à des substrats plus volumineux (Rodriguez-Lima et *al.* 2004).

III- MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES INDUITES DES MUTATIONS GENIQUES

III-A- Modélisation moléculaire dans la protéine NAT2

Parmi les cinquante trois allèles identifiés jusqu'à nos jours, trente cinq ont été corrélés à une activité de N-acétylation. Les allèles non encore corrélés à une activité NAT2 sont ceux contenant des SNP nouvellement mis en évidence (Hein et *al.* 2008). Parmi les 28 SNP identifiés, cinq transitions (481C>T ; 759C>T ; 282C>T ; 111T>C ; 345C>T) sont responsables de mutations neutres, où le codon normal est remplacé par son synonyme. Les autres substitutions nucléotidiques se traduisent chacune au niveau protéique par un changement conservatif, ou non conservatif d'acide aminé (Tableau B, annexe 2).

Hein et *al.* (2008) ont élucidé l'implication fonctionnelle de plusieurs SNP et allèles de NAT2. 364G>A, mutation de l'allèle NAT2*12D, entraînant le changement d'acide aminé Asp122Asn (D122N), implique essentiellement une inactivation de la protéine, l'asp 122 étant un composant de la triade catalytique du site actif. Ces auteurs montrèrent aussi que différents SNP peuvent causer des phénotypes acétyleurs lents par diminution de la thermo stabilité de l'enzyme (191G>A, 590G>A et 857G>A), par altération de la cinétique enzymatique (857G>A) ou par augmentation de la dégradation protéique (590G>A et 341T>C). Les protéines NAT2 recombinées associées à certains allèles de type acétyleur lent, montrent une stabilité réduite (Grant et *al.* 1997 ; Fretland et *al.* 2001 ; Zang et *al.* 2007), tandis que d'autres apparaissent comme cibles à une dégradation protéique par le protéasome (Zang et *al.* 2007).

Walraven et *al.* (2008a) ont expliqué le mécanisme moléculaire de l'effet des mutations sur la structure et la fonction enzymatique à partir de la structure cristalline (Figure 15).

III-A-1- Relation mutations et activités enzymatique

- R64Q (G191A) et R64W (C190T)

La liaison hydrogène entre la charge positive Arg64 (R64) et la charge négative Glu 38 (E38) contribue à la conformation et au dynamisme du premier domaine de la structure tertiaire. La substitution de l'Arg par la Gln (Q) ou le Trp (W) sur le résidu 64 entraînera la perte de cette interaction. Le fait que les résidus R64 et E38 sont complètement conservés dans toutes les N-acétyltransferases connues des mammifères, suggère que ces interactions sont importantes pour la fonction et/ ou la stabilité de l'enzyme. Le résidu N41 est aussi hautement conservé dans les N-acétyltransférases. Un changement structural significatif dans cette région pourrait influencer la position du résidu Cys68 (C68) de la triade catalytique, par altération de son interaction avec l'Hys107 (H107) et/ou en affectant son acétylation.

La mutation R64Q entraîne une activité réduite de la protéine due à une stabilité réduite.
La substitution R64W entraîne une réduction de l'activité et de la thermo stabilité.

- I114T (T341C)

La mutation Ile114 Thr (I114T) entraîne un changement structural de la protéine, qui pourrait augmenter son agrégation ou sa dégradation. En effet le résidu I114 est un résidu hydrophobe exposé à la périphérie du domaine II de NAT2. Le résidu I114 effectue des interactions avec les résidus Leu21 et Leu 24 (L21 et L24) du domaine I et Phe 84 (F84) et Val112 (V112) du domaine II. La substitution de ce résidu hydrophobe par un résidu polaire hydrophile comme la Thr peut réduire les interactions entre le domaine II et le domaine I de la protéine, altérant ainsi son mouvement dans cette région.

- D122N (G364A)

Le résidu Asp122 (D122) de la triade catalytique est complètement enfoui dans la protéine par des liaisons hydrogène avec les résidus Asn (N72), His107 (H107), Ser125 (S125), Tyr190 (Y190) et Gly124 (G124). Ces multiples liaisons hydrogène contribuent probablement à la stabilité de la conformation du site actif et à l'interaction entre les domaines I et II. Les résidus D122, N72, H107 et Y190 sont tous fortement conservés dans les N-acétyltransférases des mammifères et des bactéries. Par contre, le résidu Ser125, est très variable et joue un rôle important dans la sélectivité de substrats (Goodfellow et al. 2000 in Walraven et al. 2008). Tout changement du résidu D122 de la triade catalytique affectera négativement la fonction catalytique de la protéine. Un désordre dans la triade catalytique affecte probablement aussi l'acétylation de l'enzyme, par augmentation de la dégradation protéasomale de NAT2.

- L137F (A411T)

Le résidu Leu137 (L137) est orienté vers la partie interne du domaine II du cylindre bêta (Figure15). Il présente des interactions hydrophobes avec les résidus I120, L152, W159, F192 et L194. La substitution L137F affecte probablement la structure du cylindre bêta par des perturbations stériques qui résultent du remplacement de la Leu par un résidu plus volumineux comme le résidu phe. Il est aussi possible que les interactions aromatiques entre les résidus F137 et W159 puissent altérer le domaine II. Les études fonctionnelles du variant L137F dans des cellules de mammifères démontrèrent une réduction de la quantité protéique, résultant probablement d'une dégradation protéasomale. Ces données sont en accord avec un changement dans la structure secondaire, qui pourrait activer le mécanisme de dégradation de NAT2 chez les mammifères.

- Q145P (A434C)

Le résidu Q145 est localisé dans le domaine II et lié par une liaison hydrogène aux résidus W132 et Q133. Un changement de ce résidu par la proline dans le variant Q145P entraîne un désordre dans la structure secondaire par perte des liaisons hydrogènes stabilisantes.

Les études fonctionnelles du variant Q145P chez la levure démontra une activité catalytique réduite ou indétectable, cependant la stabilité de la protéine n'a pas été affectée. Cette réduction serait probablement due à une augmentation de sa dégradation, générée par des changements structuraux.

- E167K (G499A)

Le résidu E167 est localisé dans La boucle du domaine II où il est faiblement lié au résidu Lys185 (K185) adjacent de la boucle du domaine II. Cette boucle joue un rôle dans la stabilisation des N-acétyltransférases des mammifères. L'élimination de cette interaction peut affecter la conformation de la boucle, qui entraînerait largement la perte de la structure secondaire de la protéine qui serait plus susceptible aux changements de conformation. Les études fonctionnelles du variant E167K dans des cellules de mammifères montrèrent une réduction de l'activité liée à la quantité protéique, sans réduction de la quantité de l'ARNm ou de la thermo stabilité protéique. Il est possible que le variant E167K entraîne un faible changement structural qui causerait une agrégation et/ou une augmentation de la dégradation de la protéine.

- R197Q (G590A)

Le résidu R197 se trouve à la surface de la protéine dans le domaine II près de l'inter domaine de l'hélice. Ce résidu ne présente pas d'interactions hydrogène avec d'autres résidus, cependant il présente des liaisons électrostatiques avec le résidu E195 par sa charge négative. La substitution de l'Arg positivement chargée par un résidu gln neutre entraînerait une perte de cette interaction électrostatique.

Les études fonctionnelles du variant R197Q dans les cellules de bactéries, de levures et de mammifères, montrèrent une réduction de l'activité et de la quantité protéique résultant d'une réduction de la thermo stabilité protéique. Ces résultats sont compatibles avec une perte des interactions électrostatiques du résidu R197 avec E195.

- K268R (A803G)

Le résidu K268 est exposé à la surface de la protéine dans le domaine III de l'hélice α et ne présente pas d'interaction avec les résidus qui l'entourent. La substitution de la K268 par l'arginine n'est pas indispensable pour affecter la structure de l'hélice α .

Des études fonctionnelles du variant K268R dans des cellules de bactéries, de levures et de mammifères ne montrèrent pas de changement dans l'expression, la stabilité et l'activité de la protéine. L'évaluation de la structure de NAT2 suggéra que la conservation de l'activité dans le variant K268R serait due à la localisation superficielle et à l'absence de contacts avec les résidus de son entourage.

- K282T (A845C)

Le résidu K282 est localisé près du domaine C-terminal dans le domaine III. Ce résidu présente des interactions hydrogène avec le résidu H43 du domaine I et avec le résidu V280 du domaine III. L'interaction avec le résidu H43 du domaine I, semble contribuer à la stabilité de la conformation de la queue C-terminale. La substitution de K282 par le résidu Thr pourrait entraîner une perte de ces interactions et une déstabilisation structurale.

Les études fonctionnelles du variant K282T chez la levure montra une thermo stabilité réduite à 50°C, sans changement de l'activité catalytique ou de l'expression de l'enzyme. La perte des interactions hydrogènes quand la Thr remplace la Lys du résidu 282, pourrait contribuer à la légère réduction de la stabilité.

- G286E (G857A)

Le résidu G286 se trouve dans la partie C-terminale du domaine III, directement adjacent au site actif. G286 n'interagit pas directement avec d'autres résidus. La substitution de la Gly par un résidu de taille plus large, le Glu pourrait altérer significativement la conformation de la partie C-terminale, affectant ainsi l'ouverture du site actif. Ceci résulterait de chocs stériques et de perte du résidu Gly hautement flexible. Des études fonctionnelles du variant G286E dans des cellules de mammifères, montrèrent une activité réduite pour certains substrats et non pour d'autres (28 in Walraven 2008). Le changement du résidu G286E pourrait altérer la taille et la forme de la pochette du site actif. Ceci est compatible avec un changement de l'activité substrat dépendante. En outre, il a été constaté qu'un changement du résidu G286E altère le K_m pour l'AcCoA.

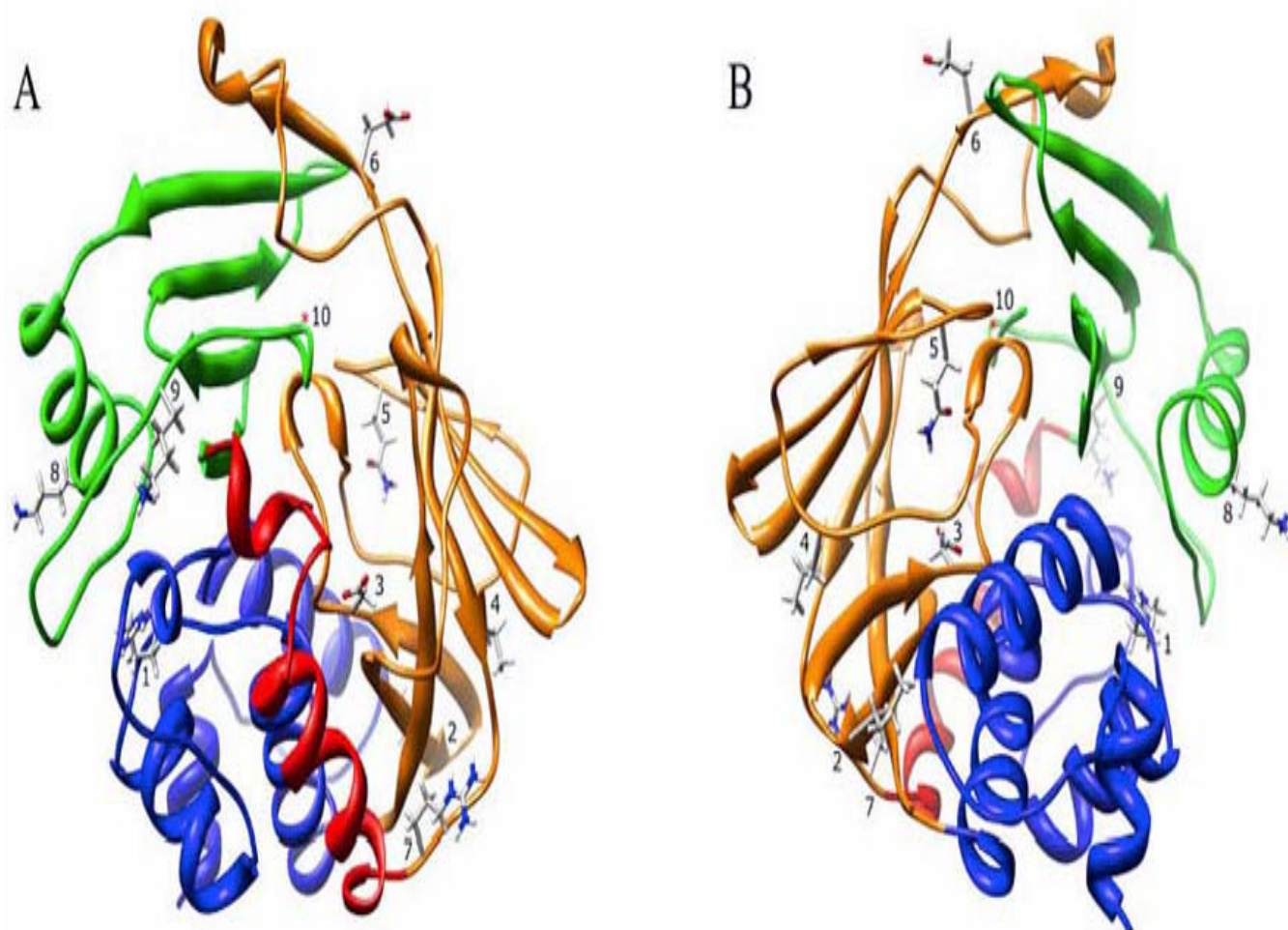


Figure 15 : Structure de NAT2. . Le domaine I est représenté en bleu, l'inter domaine en rouge, le domaine II en orange et le domaine III en vert. La localisation des résidus R64 (1), 114 (2), D122 (3), L137 (4), Q145 (5), E167 (6), R197 (7), K268 (8), K282 (9) et G286 est représentée (Walraven et al. 2008a).

Deux orientations sont présentées, une au site d'entrée du substrat dans le site actif (A) et l'autre dans le site reverse (B) de la structure.

Le tableau suivant (Tableau 9) résume les changements de la fonction et structure de NAT2 sous l'effet de mutations de différents SNP.

Tableau 9. Résumé des modifications structurelles et fonctionnelles de NAT2 induites des mutations des SNP (d'après Walraven et al. 2008a)

Substitution identifiées de SNP/ aminoacides	D	Structure secondaire	Localisation	Type de change -ments	Effets fonctionnels	Effets structuraux
G191A R64Q (rs1801279)	I	spirale	noyau	↑hydrophobicité ↓capacité de la liaison-H	↓de la stabi -lité	Perte des inter -actions électrostatiques
C190T R64W (rs1805158)	I	spirale	noyau	↓de la flexibilité ↑hydrophobicité ↓la capacité de la liaison-H	↓de la stabi -lité	Perte des inter -actions électrostatiques
T341C I114T (rs1801280)	II	cylindre-β	noyau hydrophobe	↑ la capacité de la liaison-H ↓ hydrophobicité ↑ la polarité	↑dégradation protéique	changement conformationnel
G364A D122N (rs4986996)	II	boucle du site actif	noyau	conservatif	↓protéine	Interruption de la triade catalytique
A411T L137F (rs4986997)	II	Cylindre-β	Exposé dans 6.1% de la surface	↑aromaticité ↑taille	↓protéine	changement conformationnel
A434C Q145P	II	Cylindre-β	Exposé dans 11.1% de la surface	↓de la flexibilité perte la capacité de la liaison-H perte de la polarité	protéine	changement conformationnel
G499A E197K	II	spirale	Boucle du domaine II	↓la capacité de la liaison-H ↓ hydrophobicité	protéine	changement conformationnel
G590A R197Q (rs1799930)	II	spirale	Exposé dans 16.6% de la surface	↑hydrophobicité ↓la capacité de la liaison-H	↓de la stabi -lité	Perte des inter -actions électrostatiques
A803G K268R (rs1208)	III	Hélice-α	surface	conservatif	non détecté	non examiné
A845C K282T	III	spirale	partie C-term -inale	↓de la flexibilité ↑hydrophobicité	↓de la stabi -lité	perte des inter -actions électrostatiques
G857A G286E (rs1799931)	III	spirale	partie C-term -inale	↑ la capacité de la liaison-H ↓ hydrophobicité	↓protéine	Altération de la forme du site actif

III-B- Modélisation moléculaire dans la protéine NAT1

La résolution récente de la structure de NAT1 augmenta les connaissances de la relation structure-fonction. La connaissance de cette relation étant importante pour la compréhension de l'association des SNP de NAT1 avec la prédisposition génétique au cancer, et autres maladies. Les évaluations des SNP entraînant les substitutions R64W, V149I, R187Q, Met 250Val (M205V), Ser214 Ala (S214A), D251V, E261K, et I263V dans la protéine ont été évaluées (Walraven et *al.* 2008b). La position de ces acides aminés dans la protéine est représentée dans la figure 16.

- R64W (190C>T)

Le résidu R64 est partiellement exposé à la surface dans le domaine I. L'arginine réalise plusieurs liaisons hydrogène avec E38 et N41 localisés dans le domaine I. Ces interactions disparaissent quand R64 est substituée par le Trp. La protéine NAT1 qui en résulte présente une thermo stabilité réduite. La perte de l'intégrité structurale pourrait se manifester comme une agrégation ou une dégradation protéique.

- V149I (445G>A) and S214A (640G>T)

Le résidu V149 est partiellement exposé à la surface dans le domaine II. La valine ne présente pas d'interactions apparentes avec d'autres résidus. La mutation de cet acide aminé par l'isoleucine ne semble pas influencer la stabilité enzymatique.

S214 est localisée dans la région de l'inter domaine. La Ser ne présente pas d'interactions apparentes avec d'autres résidus. Sa substitution par l'Ala n'influencerait pas la stabilité enzymatique, vu sa position à la surface protéique et l'absence d'interactions avec les autres résidus.

- R187Q (560G>A)

R187 est localisé dans le domaine II et est partiellement exposé à la surface protéique et au site actif. Un hydrogène de l'Arg se lie aux E182 et K188, tous deux dans le domaine II. La substitution de ce résidu par la Gln résulterait d'une perte de ces interactions. Cette perte d'interactions permettrait un changement dans la conformation du domaine II entraînant la destabilisation de la structure de NAT1.

- M205V (613A>G)

Le résidu M205 est partiellement exposé à la surface dans l'hélice de la région de l'interdomaine. La Met ne présente pas d'interactions avec d'autres résidus. La substitution de M205 par une Val n'influence pas la thermo stabilité ou l'activité catalytique de la protéine.

- D251V (752A>T)

L'Asp251 est localisée dans le domaine III. L'hydrogène du D251 se lie au résidu R166 du domaine II, au résidu R242 et au résidu N245 du domaine III. La liaison hydrogène entre D251 et R166 influence directement la conformation du domaine II. Ces interactions et d'autres entre le domaine II et le domaine III contribuent à la stabilité de la protéine. La substitution de l'Asp par une Val hydrophobe pourrait entraîner une perte de toutes les interactions de la D251, qui pourrait affecter la conformation du domaine II altérant ainsi la stabilité protéique.

- E261K (781G>A)

Le résidu E261 est exposé à la surface du domaine III. Un hydrogène du Glu se lie au S259. La substitution de E261 par un résidu Lys n'influence pas la stabilité ou la fonction protéique. En effet, le résidu 261 est localisé à la surface de la protéine, avec une interaction unique qui ne présente pas une contribution apparente à la dynamique ou aux conformations structurales dans cette région.

- I263V (787A>G)

Le résidu I263 est localisé dans le domaine III. La substitution de I263 par un résidu Val n'altère pas la structure du domaine III.

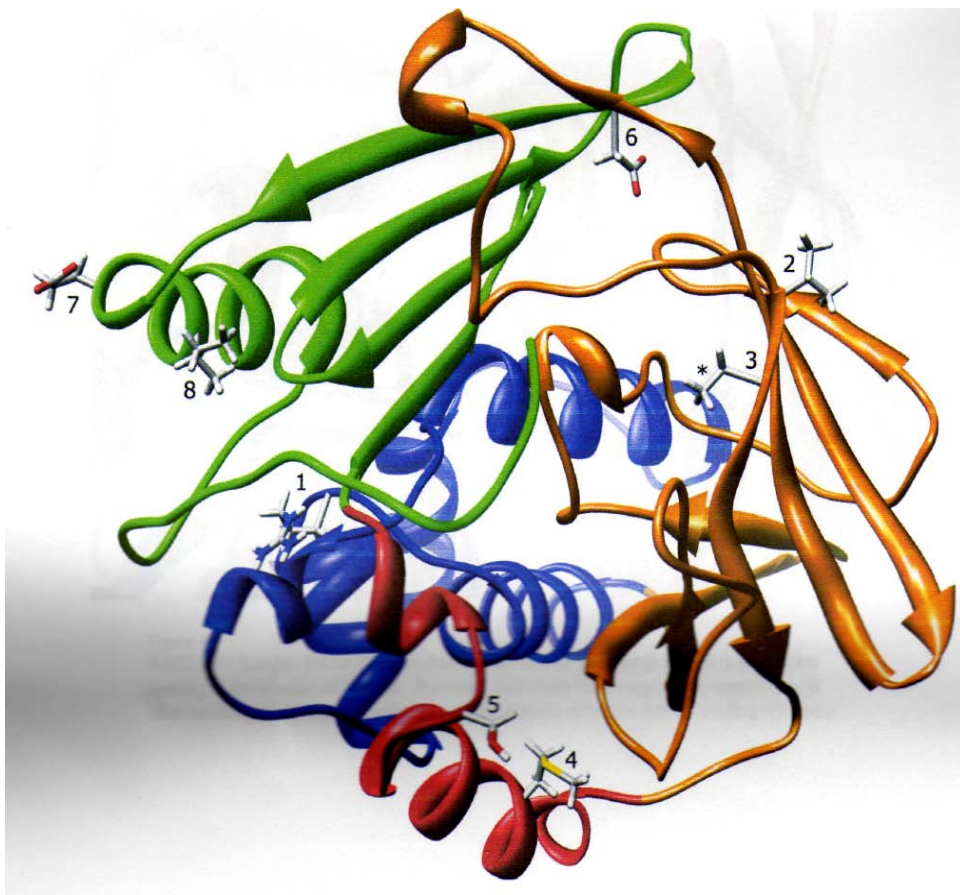


Figure 16. Structure de NAT1. Le domaine I est représenté en bleu, l'inter domaine en rouge, le domaine II en orange et le domaine III en vert. La localisation des résidus R64 (1), V149 (2), R187 (3), M205 (4), S214 (5), D251 (6), E261 (7), et I263 (8) est représentée (Walraven et al. 2008b).

Le tableau suivant (Tableau 10) résume les changements de la fonction et structure de NAT2 sous l'effet de mutations de différents SNP.

Tableau 10. Résumé des modifications structurelles et fonctionnelles de NAT1 induites des mutations des SNP (d'après Walraven et al. 2008b)

Substitution identifiées de SNP/ aminoacides	D	Structure secondaire	Localisation	Type de change -ments	Effets fonctionnels	Effets structuraux
R64W (190C>T)	I	spirale	Exposé dans 13.4% de la surface	↓de la flexibilité ↑hydrophobicité ↓la capacité de la liaison-H	↓de la stabilité	perte des interactions électrostatiques
V149I (445G>A)	II	cylindre-β	Exposé dans 39% de la surface	conservatif	↑ activité	non déterminé
S214A (640G>T)	Inter-domaine	spirale	Ouverture du site actif	Perte de la capacité de la liaison-H Perte de la polarité ↑hydrophobicité	↓protéine	altère la stabilité substrat/AcCoA
R187Q (560G>A)	II	cylindre-β	Pochette du site actif	↑hydrophobicité ↓la capacité de la liaison-H	↓de la stabilité	altère le site actif
M205V (613A>G)	Inter-domaine	Hélice-α	Exposé dans 19% de la surface	↓de la flexibilité	non détecté	non examiné
D251V (752A>T)	III	Cylindre-β	spirale	↓de la flexibilité perte la capacité de la liaison-H ↑hydrophobicité	↓de la stabilité	perte des interactions électrostatiques
E261K (781G>A)	III	Hélice-α	surface	↓la capacité de la liaison-H ↓hydrophobicité	non détecté	non examiné
I263V (787A>G)	III	Hélice-α	Spirale hydrophobe	conservatif	Non détecté	non examiné

III-C- Origine de l'activité cellulaire réduite de certains variants NAT

Le phénotype acétyleur lent a été associé plus à une diminution de la quantité protéique qu'à une altération dans la sélectivité du substrat (Grant et *al.* 1997). En effet, certains SNP des NAT humaines entraînent des réductions dans la quantité de la protéine recombinée dans des systèmes d'expression eucaryotes (Fretland et *al.* 2001 ; Zang et *al.* 2007). Des variants NAT avec des taux enzymatiques réduits ont été observés en absence de déficit de transcription (Hein et *al.* 2002), suggérant que la réduction du taux de la protéine serait causée par des mécanismes qui agissent sur les protéines plutôt que sur les gènes. L'activité compromise pourrait résulter de la présence d'une moindre quantité de protéine. D'autre part, l'absence de réduction protéique observée pour plusieurs variants NAT dans des systèmes d'expression bactérienne, comparée à la réduction observée dans le foie humain et dans les systèmes d'expression de levures laisse suggérer que l'altération structurale induite par la plupart des substitutions d'acides aminés entraînerait l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de la protéine (Grant et *al.* 2008). Des études chez le hamster ont suggéré qu'au moins un variant allélique l'Arg64Trp, est associé à une augmentation de l'agrégation protéique et à l'ubiquitination (Grant, 2008). De plus, certaines protéines NAT1 humaines avec des activités cellulaires réduites subissent une ubiquitination et une dégradation par le protéasome 26S (Butcher et *al.* 2004).

La voie ubiquitine-protéasome joue le rôle dans la dégradation protéique des NAT (Schubert et *al.* 2000). Le chemin consiste en deux étapes, appelées ubiquitination du substrat et dégradation protéasomale (Figure 17) (Sim et *al.* 2008).

L'ubiquitination du substrat se produit à travers une cascade enzymatique dans laquelle l'ubiquitine est activée par une enzyme E1 et permet alors la liaison covalente du substrat à travers l'action et la conjugaison des enzymes ligases E2 et E3. La liaison est réalisée entre la partie C-terminale de l'ubiquitine et une lysine de la protéine substrat (Figure 17). La liaison des ubiquitines activées entraîne la formation d'une chaîne de polyubiquitines attachées à la protéine substrat.

L'ubiquitination des substrats protéines nécessite leur reconnaissance par une protéine ubiquitine ligase E3. Des centaines d'enzymes E3 ont été identifiées dans les cellules et une spécificité existe entre ces enzymes et leurs substrats (Sim et *al.* 2008). L'ubiquitination des NAT est régulée par leur acétylation, les NAT acétylés sont stables dans les cellules, mais leur forme non acétylée est ubiquitinée et dégradée (Butcher et *al.* 2004). Les protéines résultant des variants alléliques NAT1*14, *15, *17 et *22 lient faiblement l'acétyl CoA et sont ubiquitinées (Butcher et *al.* 2004).

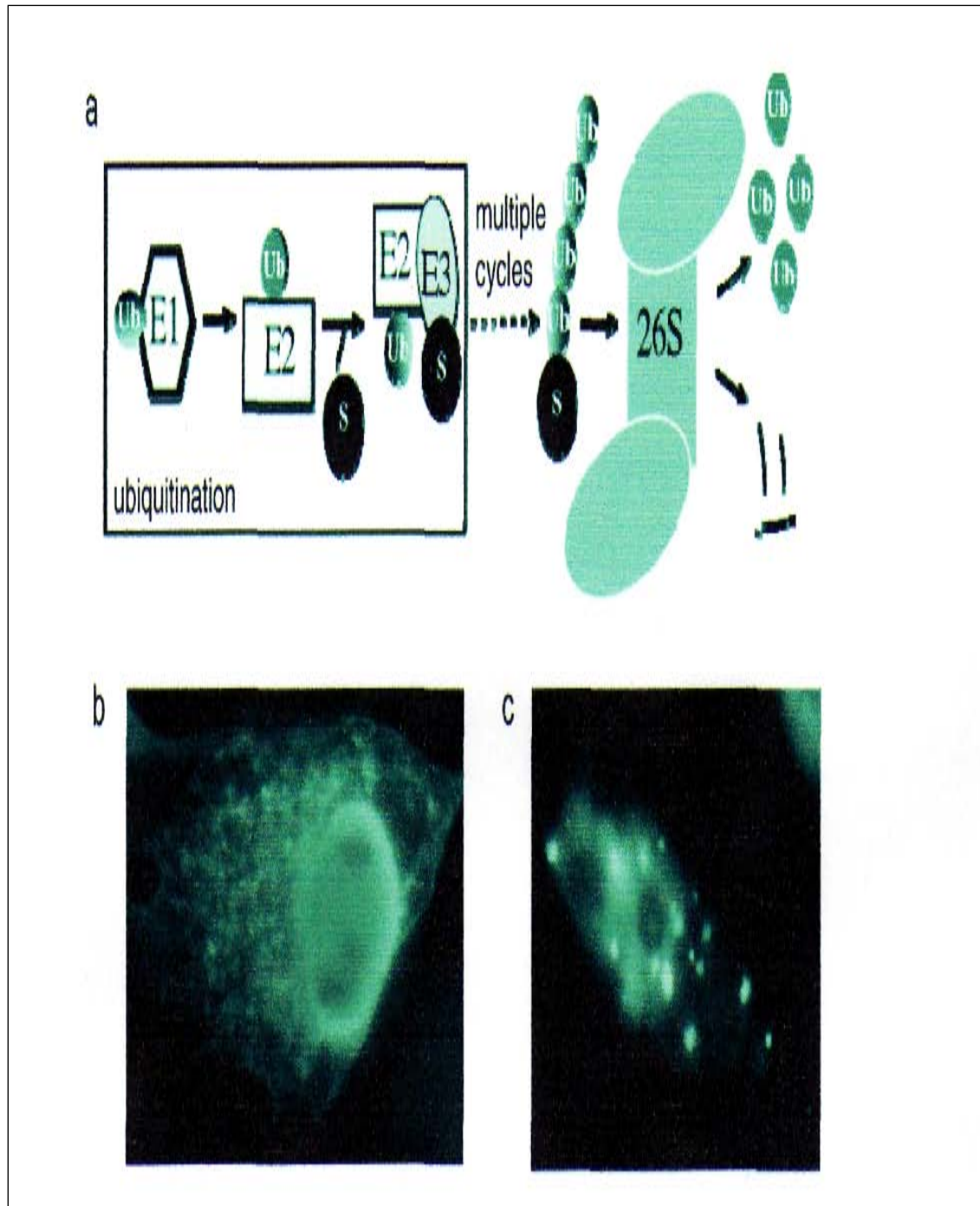


Figure 17: Dégradation intracellulaire des NAT via la voie ubiquitine-protéasome. La cascade enzymatique qui permet l'attachement covalent de l'ubiquitine (liaison 'Ub') à une lysine de la protéine substrat (S) est encadrée. Des cycles multiples à travers la cascade entraînent la polyubiquitination du substrat. Au niveau du protéasome (26S), le substrat polyubiquitiné est hydrolysé en peptides et les ubiquitines sont recyclées. La mutation R64W de l'allèle NAT1*17 entraîne des micro agrégats cytoplasmiques. Microscopie par immunofluorescence réalisée sur des cellules Héla transfectées par NAT1 humain de type sauvage (b) ou avec le variant NAT1*17 (c) (d'après Sim et al. 2008).

PARTIE EXPERIMENTALE

PREMIERE PARTIE

**ETUDE DU GENOTYPE *NAT2* DANS L'ATHEROSCLEROSE ET LA
TUBERCULOSE**

ETUDE DU GENOTYPE NAT2

A- DANS L'ATHEROSCLEROSE

I – MATERIEL ET METHODES

1- Sujets étudiés

L'étude du génotype de *NAT2* a été réalisée sur 285 échantillons d'ADN de patients atteints d'athérosclérose et 286 échantillons d'ADN d'individus sains utilisés comme témoins. Tous les ADN étudiés ont été prélevés de sujets originaires de la région Nord et Est d'Algérie.

2- Détermination du génotype

2- 1- Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir de sang par la méthode standard de précipitation aux sels à partir d'un volume de 5 ml de sang prélevé dans un tube EDTA. La méduse d'ADN est alors visualisée par précipitation dans de l'éthanol absolu. Elle est lavée par de l'éthanol à 70% et séchée après évaporation de l'éthanol. Elle est alors dissoute dans du tampon TE (Tris-EDTA, Tris 10mM, EDTA 1mM). La pureté et la concentration de l'ADN extrait sont évaluées par la mesure de sa densité optique à 260 et 280 nm.

2 – 2 - Amplification de l'ADN

2 – 2 - 1- Amplification de l'ADN génomique

Le génotype *NAT2* a été déterminé par la méthode de Deitz et al (2000) modifiée. Dans un premier temps, le fragment codant de 866 pb (Figure 18) contenant tous les sites polymorphes étudiés a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques sens *NAT2-F1* et anti-sens *NAT2-R1* (Tableau 11). Cette PCR a été réalisée dans 50µl de volume réactionnel contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1X-PCR, 0.2mM de dNTP, 2.5mM de MgCl₂, 0.7µM de chaque amorce *N2-F1* et *N2-R1*, et 0.5 U de Taq DNA polymérase.

Le programme thermique a été le suivant : un pré traitement à 94°C pendant 5 min, suivi de 35 cycles (94°C pendant 1 min, 61°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min), suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

La qualité des produits d'amplification a été vérifiée par l'obtention d'une bande unique après migration de 10µl de produit de PCR dans un gel à 1% d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

2 - 2- 2 -Nested PCR

1µl du produit de PCR *NAT2* a été utilisé comme matrice dans 20µl de milieu réactionnel contenant 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP, 220ng de l'amorce *N2-F2* et de l'amorce *N2-R2* (pour la position T341C), 240 ng de l'amorce *N2-F3* et de l'amorce *N2-R1* (pour la position A803G) et 0.5 unités de Taq DNA polymérase (Tableau 11).

Le programme thermique a été le suivant : un pré traitement à 94°C pendant 5 min, suivi de 30 cycles (94°C, 30 sec, 58°C, 30 sec et 30 sec à 72°C) suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène NAT2 entier et de fragments plus courts permettant la détection des points de mutation

Nom des amorces	Position des hybridations	Longueur des Fragments (pb)	Séquence
N2-F1	30-50	866	5'-GGCTATAAGAACTCTAGGAAC
N2-R1	895-867		5'-AAGGGTTTATTTTGTTCCTTATTCTAAAT
N2-F2	318-337	141	5'-CACCTTCTCCTGCAGGTGACCG
N2-R2	458-437		5'-TGTCAAGCAGAAAATGCAAGGC
N2-F3	776-799	120	5'-TGAGGAGAGGTTGAAGAAGTGCT
N2-R3	867-896		5'-AAGGGTTTATTTTGTTCCTTATTCTAAAT

GGCTATAAGAACTCTAGGAACAAATTGGACTTGGAACATTAAGTACAT
TCTTGAGCACCAGATCCGGGCTGTTCCCTTTGAGAACCTTAACATGCATT
GTGGGCAAGCCATGGAGTTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGTA
AGAAGAAACCGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTG
GGCTCTGACCACAATCGGTTTTTCAGACCACAATGTTAGGAGGGTATTTTT
ACATCCCTCCAGTTAACAAATACAGCACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTG
CAGGTGACCAATTGACGGCAGGAATTACATTGTTCGATGCTGGGTCTGGAAG
CTCCTCCCAGATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGC
CTCAGGTGCCTTGCAATTTCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTAC
CTGGACCAAATCAGGAGAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAA
TTCTCATCTCCTGCCAAAGAAGAAACACCAAAAAATATACTTATTTACGC
TTGAACCTCGAACAATTGAAGATTTTGAGTCTATGAATACATACCTGCAG
ACGTCTCCAACATCTTCATTTATAACCACATCATTTTGTTCCTTGCAGAC
CCCAGAAGGGGTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCACCTATAGAAAAT
TCAATTATAAAGACAATACAGATCTGGTCGAGTTTAAACTCTCAC TGAG
GAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAAGATTTCTTGGGGAG
AAATCTCGTGCCCAACCTGGTGATGGATCCCTTACTATTAGAATAAGG
AACAAAATAAACCTT

Figure 18. Fragment de NAT2 (GenBank CR407631) amplifié

F = forward, R = reverse ; — Amorces N2-F1/N2-R1, — Amorces N2-F2/N2-R2, — Amorces N2-F3/N2-R1

2 -3 – RFLP

Les produits de ces PCR ont alors été analysés par la méthode RFLP grâce à des enzymes de restriction (Tableau 12).

Tableau 12. *Enzymes de restriction utilisées pour la détermination des mutations de NAT2*

SNP	Enz	Effet de la mutation	Longueur des fragments Type sauvage/type muté
191G>A	MspI	Mutation abolit le site de MspI	707+93+66 / 800+66
434A>C	MspI	Mutation ajoute un site de MspI	707+93+66 / 416+291+93+66
481C>T	KpnI	Mutation abolit le site de KpnI	450+416 / 866
111T>C	TaqI	Mutation ajoute un site de TaqI	332+226+170+138 / 252+226+170+138+80
590G>A	TaqI	Mutation abolit un site de TaqI	332+226+170+138/ 396+332+138
759C>T	TaqI	Mutation abolit un site de TaqI	332+226+170+138 / 332+308+226
857G>A	BamHI	Mutation abolit un site de BamHI	826+40 / 866
282C>T	FokI	Mutation abolit un site de FokI	429+238+199 / 667+199
845A>C	DraIII	Mutation ajoute un site de DraIII	866/ 820+46
341C>T	AciI	Mutation ajoute un site	141 / 121+ 20
803A>G	DdeI	Mutation ajoute un site	120 / 97+23

L'annexe 3 représente des exemple d'enzymes de restriction coupant sur des sites polymorphes de NAT2.

L'annexe 4 représente un exemple le profil électrophorétique après action d'une enzyme de restriction

3- Analyse statistique des données

La méthode de l'analyse statistique utilisée dans cette première partie est utilisée dans tous nos résultats expérimentaux concernant les génotypes.

- Loi de Hardy Weinberg

Soit un locus autosomal dont les allèles A1 et A2 ont pour fréquences observées respectives p et q. La loi de Hardy Weinberg (HW) permet, d'établir une relation simple entre ces fréquences alléliques et la fréquence des génotypes théoriquement rencontrés au sein d'une population. Cette loi prévoit en effet que les fréquences théoriques des génotypes A1/A1, A2/A2 et A1/A2 sont respectivement p^2 , q^2 et $2pq$ et obéissent à la relation :

$$p^2 + q^2 + 2pq = 1$$

L'existence ou non d'une déviation par rapport à cette loi pour le groupe étudié est testée par la mesure de l'indice de confiance statistique χ^2 .

La déviation entre les distributions observées et calculées selon la relation de HW est considérée comme significative lorsque le χ^2 , dépasse une valeur seuil fixée pour (n-1) degrés de liberté, n étant le nombre de classes génotypiques considérées. En l'absence de déviation significative, la population est dite respecter les proportions de l'équilibre de HW.

- Comparaisons statistiques au sein des populations étudiées

L'effet du polymorphisme génétique sur le risque de l'athérosclérose a été évalué par la régression logistique multiple à l'aide du logiciel SPSS 10. Le odds ratio (OR), son intervalle de confiance (CI, 95%) et le χ^2 ont été calculés. Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

II- RESULTATS

1- Haplotypes NAT2

Onze différents variants alléliques du gène NAT2 ont été identifiés (Tableau 13). Les plus répandus ont été l'allèle NAT2*5B, avec 28.60% chez les patients atteints d'athérosclérose et 27.27% chez les témoins, NAT2*4 avec 24.74% chez les patients et 21.85% chez les témoins, NAT2*6A avec 22.11% chez les patients et 19.23% chez les témoins. NAT2*5F a été significativement moins fréquent chez les patients par rapport aux témoins (15% contre 9.65%) ($P = 0.005$, OR = 0.55, 95%CI = 0.37-0.84, $q = 0.049$). L'allèle NAT2*5G est présent à une fréquence supérieure à 6%. Les autres haplotypes ont été définis très rares par l'analyse statistique. De ce fait, les analyses génétiques ont été basées sur les allèles les plus fréquentes NAT2*4, *5B, *6A, *5F et *5G.

Tableau 13. Fréquence des allèles NAT2 chez les cas et les témoins

	position (nt) des nucléotides	Cas n (%)	Contrôles n (%)	OR*(95%CI)	P
Allèle	111 191 282 341 434 481 590 759 803 845 857				
4	T G C T A C G C A A G 141(24.74.)	125(21.85)	1		
5B	. . . C . T . . G . . 163(28.60)	156(27.27)	0.93 (0.67-1.28)	0.65	
5C	. . . C G . . 17(2.98)	20(3.50)	0.75 (0.4-1.5)	0.42	
5D	. . . C 9(1.58)	9(1.57)	0.89 (0.34-2.3)	0.80	
5F	. . . C . T . T G . . 55(9.65)	88(15)	0.55 (0.37-0.84)	0.005	
5G	. . T C . T . . G . . 30(5.26)	43(7.52)	0.62 (0.37-1.05)	0.07	
6A	. . T . . . G 126(22.11)	110(19.23)	1.02 (0.71-1.44)	0.93	
7B	. . T A 7(1.23)	3(0.52)	2.07 (0.52-8.17)	0.29	
11	 T 2(0.35)	6(1.05)	0.3 (0.06-1.50)	0.12	
13	. . T 11(1.93)	8(1.40)	1.22 (0.48-3.13)	0.68	
14D	. A T . . . A 9(1.58)	4(0.70)	1.99 (0.60-6.64)	0.25	

*OR, odds ratio ORs est référé à l'allèle de type sauvage NAT2*4

Pourcentage des allèles (i.e., 570 chez les patients et 572 chez les témoins).

Les sites polymorphes ont été numérotés considérant +1 comme le A de la transcription du premier codon dans la séquence ADNc (GenBank [CR407631](#))

Les haplotypes NAT2 ont été nommés en accordance avec la nomenclature consensus des allèles NAT2 humains.

<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT>

2- Génotypes NAT2 et phénotypes

La distribution du génotype ne diverge pas significativement de l'équilibre de Hardy Weinberg ($P = 0.128$).

Les génotypes NAT2 ont été distribués de façon similaire parmi les patients et les témoins (Tableau 14).

Deux génotypes d'acétylation ont été associés aux phénotypes NAT2, le phénotype lent et le phénotype rapide. Les fréquences et la distribution des génotypes ont été comparées entre malades versus témoins. La fréquence du phénotype acétyleur rapide était plus élevée chez les malades (51%) par rapport aux témoins (46.15%), mais sans différence significative ($P = 0.51$). De façon similaire, l'allèle de type sauvage NAT2*4 s'est produit à une fréquence plus élevée chez les malades (24.74%) que chez les témoins (21.85%, $P = 0.40$).

Tableau 14. Distribution de génotypes NAT2 analysée par régression logistique multiple

Genotypes	Cas n (%)	Controles n(%)	OR*(95%CI)	P
4/4	8(3.51)	6(2.62)	1	
4/5B	52(22.81)	36(15.72)	1.08(0.35-3.39)	0.89
4/5F	15(6.58)	21(9.17)	0.54(0.15-1.87)	0.32
4/5G	13(5.70)	14(6.11)	0.70(0.19-2.56)	0.58
4/6A	31(13.60)	30(13.10)	0.78(0.24-2.50)	0.67
5B/5B	12(5.26)	13(5.68)	0.69(0.19-2.59)	0.58
5B/5F	16(7.82)	22(9.61)	0.55(0.16-1.88)	0.33
5B/5G	5(2.19)	10(4.37)	0.38(0.08-1.69)	0.20
5B/6A	46(20.18)	41(17.90)	0.84(0.27-2.63)	0.77
5F/6A	20(8.77)	24(10.48)	0.63(0.19-2.10)	0.44
5G/6A	10(4.39)	12(5.24)	0.63(0.16-2.41)	0.49

OR, odds ratio ORs est référé au génotype de type sauvage NAT2*4/NAT2*4

III- DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons observé l'absence de différence significative dans la fréquence du polymorphisme de l'allèle NAT2 chez les patients atteints d'athérosclérose par rapport aux témoins. Ce résultat suggère que ce polymorphisme n'est pas en relation avec une augmentation du risque d'athérosclérose. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par des études antérieures (Ilett et *al.* 1993 ; Binkoba et *al.* 2002 ; Izzotti et *al.* 2007). Cependant, les polymorphismes dans les enzymes de détoxification et d'activation des xénobiotiques pourraient agir sur l'ADN et influencer le risque de maladie.

En effet, des risques d'altération avec le métaboliseur lent ou le métaboliseur rapide ont été rapportés pour le cancer de la vessie (32) et le cancer colorectal (Brokton et *al.* 2000 ; Hein et *al.* 2006a ; Huang et *al.* 2009).

Nos résultats ont montré que l'haplotype lent *NAT2*5F* pourrait jouer un rôle protecteur contre l'athérosclérose. Ceci suggère que la mutation C759T (qui permet de coder pour un acide aminé synonyme), permettrait l'expression d'un ARNm entraînant la formation d'une protéine moins active dans la catalyse de la O-acétylation. En effet, il a été rapporté que le phénotype acétyleur rapide commence à souffrir d'une sélection désavantageuse (Luca et *al.* 2008). Au contraire, les haplotypes portant les mutations qui réduisent l'activité enzymatique sont avantageux et augmentent de fréquence dans différentes populations humaines. Les populations moins exposées aux xénobiotiques de l'environnement comme les Esquimaux présentent un pourcentage élevé d'acétyleurs rapides (Cascorbi et *al.* 2001). Dans notre étude, la fréquence du phénotype acétyleur lent a été d'environ 50% aussi bien chez les patients que chez les témoins.

En fait, les acétyleurs lents sont susceptibles à des toxicités médicamenteuses parce que ces derniers sont des xénobiotiques plus récents (Luca et *al.* 2008).

*NAT2*5F* est formé par la combinaison de l'haplotype *NAT2*5*B* et le nucléotide polymorphe C759T. Cependant, ce nucléotide existe à des fréquences faibles dans les populations largement étudiées pour l'effet de *NAT2* comme les populations Européennes et Asiatiques (Sabbagh et *al.* 2008). Seulement 7 SNP, principaux polymorphismes se produisant chez ces populations ont été étudiés. Néanmoins, chez la population Algérienne étudiée, en plus à ces sept principaux polymorphismes, le SNP C759T est présent à une fréquence non négligeable (15%) chez les témoins et (9.65%) chez les malades

Des travaux portant sur le cancer de la vessie ont montré que la combinaison du génotype *NAT1** rapide/*NAT2** augmentait le risque du cancer de la vessie (Badawi et *al.* 1995). *NAT1* est l'enzyme prédominante dans la vessie. Son activité catalytique d'acétylation de l'hydroxylamine formée dans le foie pourrait être plus importante comparée à *NAT2* (Grant et *al.* 1997). Il a été suggéré une association de risque de cancers en présence d'arylamines et le type phénotype *NAT2* rapide hétérozygote (Doll et *al.* 2010).

En conclusion, nos résultats ont montré que les fréquences des polymorphismes *NAT2* chez les patients atteints d'athérosclérose étudiés n'augmentent pas par rapport à celles des témoins. Cependant, l'haplotype *NAT2*5F* semble jouer un rôle protecteur contre l'athérosclérose. L'absence de l'association entre *NAT2* et l'athérosclérose suggère que d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques devraient être impliqués. Les travaux de (Izzotti et *al.* 2007) sur le rôle des CYP450 et des GST dans le développement de l'athérosclérose nous suggèrent d'orienter nos futurs travaux vers ces enzymes.

B- DANS LA TUBERCULOSE

I – MATERIEL ET METHODES

1- Sujets étudiés

L'étude du génotype de *NAT2* a été réalisée sur 30 échantillons d'ADN de patients atteints de tuberculose pulmonaire et 70 échantillons d'ADN d'individus sains utilisés comme témoins. Tous les ADNs étudiés ont été prélevés de sujets originaires de la région Nord et Est d'Algérie.

2- Détermination du génotype

La méthode utilisée pour l'étude du génotype est la même que celle utilisée dans le chapitre de l'athérosclérose

II- RESULTATS

1- Haplotypes *NAT2*

Les haplotypes utilisés sont les plus répandus dans la population étudiée (Tableau 15). L'allèle *NAT2*5B* est l'allèle majeure, avec 40% chez les patients atteints de tuberculose et 29.28% chez les témoins (OR = 2.70, $P = 0.03$), *NAT2*4* avec 26.42% chez les témoins et 13.33% chez les patients, *NAT2*6A* avec 28.33% chez les patients et 20.71% chez les témoins (OR = 2.71, $P = 0.04$). *NAT2*5F* a été moins fréquent chez les patients par rapport aux témoins (15% contre 10%). L'allèle *NAT2*5G* est présent à une fréquence de l'ordre de 8% aussi bien chez les patients que chez les témoins.

Tableau 15. Fréquence des allèles *NAT2* chez les patients et les témoins

	position (nt) des nucléotides	Cas	Contrôles	OR*(95%CI)	P
		n (%)	n (%)		
Allèle	111 191 282 341 434 481 590 759 803 845 857				
4	T G C T A C G C A A G	8(13.33)	37(26.42)	1	
5B	. . . C . T . . G . .	24(40)	41(29.28)	2.70(1.08-6.76)	0.03
5F	. . . C . T . T G . .	6(10)	21(15)	1.32(0.4-4.32)	0.64
5G	. . T C . T . . G . .	5(8.33)	12(8.57)	1.93(0.53-7.02)	0.32
6A	. . T . . . G	17(28.33)	29(20.71)	2.71(1.03-7.16)	0.04

*OR, odds ratio ORs est référé à l'allèle de type sauvage *NAT2*4*

Pourcentage des allèles (i.e., 60 chez les patients et 140 chez les témoins).

2- Génotypes NAT2 et phénotypes

Deux génotypes d'acétylation ont été associés aux phénotypes NAT2, le phénotype lent et le phénotype rapide. Les fréquences et la distribution des génotypes ont été comparées entre malades versus témoins (Tableau 16). La fréquence du phénotype acétyleur lent était plus élevée chez les malades (76.67%) par rapport aux témoins (50%), mais sans différence significative ($P = 0.22$). L'allèle de type sauvage NAT2*4 s'est produit à une fréquence plus élevée chez les témoins (26.12%) que chez les malades (13.33% $P = 0.10$).

Tableau 16. Distribution des génotypes NAT2 analysée par régression logistique multiple

Génotypes	Cas n (%)	Contrôles n(%)	OR*(95%CI)	P
4/4	1(3.33)	2(2.86)	1	
4/5B	2(6.66)	12(17.14)	0.39(0.08-1.84)	0.22
4/5F	1(3.33)	7(10)	0.33(0.04-2.83)	0.29
4/5G	1(3.33)	5(7.14)	0.47(0.05-4.17)	0.49
4/6A	2(6.66)	9(12.86)	0.52(0.10-2.54)	0.41
5B/5B	3(10)	4(5.71)	1.75(0.37-8.30)	0.48
5B/5F	3(10)	7(10)	1.25(0.44-6.12)	0.35
5B/5G	2(6.66)	4(5.71)	1.67(0.2-6.72)	0.86
5B/6A	11(36.67)	10(14.28)	2.56(0.99-6.68)	0.048
5F/6A	2(6.66)	7(10)	0.67(0.13-3.40)	0.62
5G/6A	2(6.66)	3(4.29)	1.55 (0.25-9.79)	0.63

Acétyleurs lents = 76.66% chez les malades et 50% chez les témoins

III- DISCUSSION

Nos résultats montrent que les haplotypes NAT2*5B et NAT2*6A présentent une différence significative entre malades et témoins (OR = 2.70 ; $P = 0.03$ et $P = 0.04$ respectivement). Ce qui est en accord avec les résultats de (Higuchi et *al.* 2007) qui ont montré que l'haplotype NAT2*6A est un facteur de risque pour la tuberculose. Ces auteurs ont suggéré que l'haplotype 6A pourrait être un bio marqueur de l'hépatotoxicité induite par les hydrazines. Les patients tuberculeux possédant l'haplotype *6A pourraient ne pas métaboliser l'hydrazine ou l'acétylhydrazine générés par le métabolisme de l'isoniazide dans le foie, qui pourrait s'accumuler et induire une hépatotoxicité (Higuchi et *al.* 2007).

De même, une différence significative (OR = 2.56 (0.99-6.68) ; $P = 0.04$) est observée entre malades et témoins pour le génotype NAT2*5B/6A.

La fréquence du phénotype acétyleur lent est 76.67% chez les malades et de 50% chez les témoins. Cependant cette différence n'est pas significative ($P = 0.21$).

En conclusion, nos résultats ont montré que il y aurait plus d'acétyleurs lents que d'acétyleurs rapides chez la population des patients tuberculeux. Le phénotype acétyleur lent a été corrélé à une neuropathie périphérique et à une hépatotoxicité. Il serait important de personnaliser la dose de l'INH afin d'éviter ces toxicités.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DU PHENOTYPE NAT2

ETUDE DU PHENOTYPE NAT2

A - PHENOTYPE D'ACETYLATION DE LA CAFEINE

I- MATERIEL ET METHODES

1- Produits chimiques

Le 5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU), a été préparé par notre équipe (méthode de (Tang *et al.* 1983), du AFMU a aussi été fourni par Nestlé, le 1-méthylxanthine (1X) et le N-acétyl p-amino-phénol de Sigma Chemical Co.

2- Sujets

Les urines de 18 sujets volontaires sains, non fumeurs, composés de 11 femmes et de 7 hommes, âgés de 20 à 50 ans, ont été collectées. La collecte des urines utilisées a eu lieu durant les 8 heures après l'ingestion de deux tasses de café (une tasse de café fort correspond à 114 mg de caféine (Vincent-Viry *et al.* 1994).

Pour extraire l'AFMU, le prélèvement d'urine a été réalisé durant les 24 heures après ingestion de trois tasses de café chez un sujet sain.

Les urines ont été acidifiées à pH 3,5 avec du HCl 6N juste après les prélèvements, afin de contrôler la stabilité de l'AFMU. Ces urines ont été utilisées immédiatement après prélèvement ou congelées à - 20°C pour une durée maximale de 15 jours.

3- Extraction

3 – 1- Extraction et purification de l'AFMU (Méthode de Tang *et al.* 1983)

Un litre d'urine a été saturé avec du sulfate d'ammonium et additionné de 5 volumes de chloroforme à 100%. Après une centrifugation pendant 10 min à 2500 g, la phase organique a été prélevée et concentrée par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L'extrait concentré a été purifié par chromatographie d'adsorption, sur gel de silice (70-230 mesh, colonne en verre de 25 x2, 2 cm). Il a été ensuite élué avec une phase mobile constituée d'un mélange chloroforme/méthanol (9/1). Les fractions ont été collectées et analysées à 284nm et les fractions appropriées ont été regroupées et évaporées. Les cristaux de la solution ont alors été filtrés et lavés avec du chloroforme froid.

3 – 2- Extraction de l'AFMU et du 1X (Méthode de Grant *et al.* 1983)

Des aliquotes (200µl) d'urine chargée ont été mis dans des tubes en verre, saturés par du sulfate d'ammonium (120mg), agités au vortex et additionnés de 6 ml d'un mélange chloroforme/isopropanol (85 :15, v/v). Du N-acétyl-p-aminophénol (120mg/l de chloroforme) a été ajouté au mélange comme standard interne. Les tubes ont alors été centrifugés pendant 5 min à 2500 g. La phase organique a alors été évaporée à sec dans un bain marie entre 45 et 50°C. 200µl d'acide acétique à 0,05% ont été ajoutés aux tubes évaporés qui ont alors été agités au vortex.

4 - Purification et dosage des métabolites de la caféine par HPLC

100µl de chaque échantillon ont été analysés par une HPLC sur une colonne_{C18} (15 cmx4,6mm ID), élués selon un mode isocratique, avec un mélange d'acide acétique 0,05%/méthanol (88 :12, v/v), à un débit de 1,2ml/min. Les profils d'élution ont été détectés à 280nm et enregistrés.

Nous avons procédé de la même manière pour les tubes standard qui ont été réalisés avec de l'urine non chargée additionnée de concentrations connues des métabolites (5 ; 10 ; 20 ; 40 ; et 80 mg/l) de l'AFMU et du 1X.

II- RESULTATS

1 - Critères de validation de la méthode de dosage

Les critères de spécificité, linéarité, fidélité, exactitude et limite de détection et de quantification ont été mesurés afin de valider la méthode de dosage des métabolites de la caféine par HPLC (Annexe 5, 6 et 7).

1- 1- Spécificité

La spécificité de dosage pour chaque substance analysée a été caractérisée par la présence d'un pic caractéristique.

Des solutions témoins contenant chacune un seul métabolite standard (AFMU ou 1X) ou le standard (SI) ont été injectés. Les chromatogrammes obtenus présentent un seul pic au temps de rétention de la substance injectée (figure 1a, 1b et 1c Annexe 5). Ces résultats confirment la spécificité de cette méthode.

1 – 2- Linéarité des courbes étalons

Cinq points de gamme ont été préparés. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer les courbes étalons (Figure 2a et 2b Annexe 6).

Ces résultats ont montré une proportionnalité entre les concentrations introduites de l'AFMU (5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 mg/l) et la moyenne du rapport des aires des pics AFMU/SI correspondants (respectivement de 0.013 ; 0.023 ; 0.046 ; 0.112 ; et 0.248) (figure 2a).

L'équation de la droite est $Y = 0.0032X - 0.009$. Le coefficient de corrélation $R = 0.998$.

Les résultats ont montré une proportionnalité entre les concentrations et la moyenne du rapport des aires des pics 1X/SI correspondants (respectivement 0.036 ; 0.08 ; 0.146 ; 0.30 et 0.65) (figure 2b). L'équation de la droite est $Y = 0.0082 X - 0.010$. Le coefficient de corrélation $R = 0.999$.

1 – 3 - Précision ou fidélité

La précision est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en effectuant une analyse à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Elle comporte 2 paramètres, qui sont la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Elle est estimée par le coefficient de variation CV.

- Répétabilité

Elle a été estimée par l'injection du 1X et de l'AFMU contenus séparément dans un échantillon standard à la concentration de 20 mg/l 5 fois, le même jour.

La valeur du CV pour l'AFMU est = 2% (1-4%) et pour le 1X, CV = 2%(1-4%).

- Fidélité intermédiaire

Elle a été déterminée par l'analyse de cinq séries de concentrations (10 ; 15; 30 ; 50 et 75 mg/l) de l'AFMU et du 1X et ceci pendant 5 jours. (Tableau 1 annexe 7)

1 – 4 - Exactitude (ou justesse)

Elle représente l'étroitesse de l'accord entre la valeur vraie et le résultat obtenu (ou plutôt la moyenne des résultats obtenus). (Tableau 2 annexe 7)

I- 5- Limites de détection et de quantification

Les limites de détection ont varié entre 0.3 et 0.5mg/l pour tous les métabolites.

2 - Phénotype d'acétylation de NAT2

Le phénotype d'acétylation de NAT2 a été déterminé par l'indice d'acétylation $\log ([AFMU]/ [1X])$. Le tableau 3 de l'annexe 8 représente les aires, le rapport des aires AFMU/SI, les temps de rétention (t_r) de l'AFMU (3.99-4.59 min) et du 1X (6.07-6.79) et les concentrations (mg/l).

Les valeurs de l'indice d'acétylation sont représentées dans le tableau 4 de l'annexe 8
La figure 19 représente le diagramme de l'indice d'acétylation

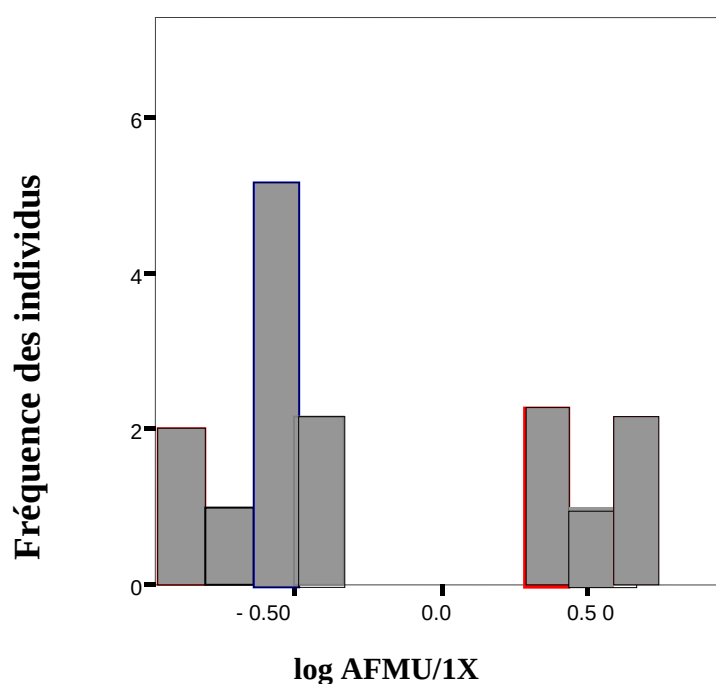


Figure 19: Diagramme de l'indice d'acétylation

Les valeurs des indices sont comprises entre -1.13 et 0.82. Ces valeurs suggèrent une répartition bimodale des sujets testés. L'analyse de nos résultats montre une répartition bimodale. Les acétyleurs lents sont représentés par les individus (1 ; 2 ; 4 ; 5 ; 7 ; 10 ; 11 ; 15 ; 16 et 17), les acétyleurs rapides sont représentés par les individus (3 ; 6 ; 8 ; 9 ; 12 ; 13 ; 14 et 18). Ces résultats ont été confirmés par le test de student ($P < 0.05$).

III- DISCUSSION

Nos résultats ont montré une répartition bimodale des individus dans leur capacité d'acétylation. Le pourcentage d'acétyleurs lents trouvés est de 55%, celui des rapides de 45%. Nos résultats sur le phénotype d'acétylation de la caféine concordent avec ceux trouvés avec le génotype d'individus sains. 50% des génotypes de notre population étudiée sont acétyleurs lents. La proportion des phénotypes rapides et lents varie dans les différents groupes ethniques. Chez les caucasiens, 40 à 70% des individus ont un phénotype acétyleur lent, alors que les populations asiatiques présentent seulement 10-30% d'acétyleurs lents (Bakayev et al. 2004).

Grant et al (1984), en utilisant le rapport AFMU/1X ont également trouvé une répartition bimodale chez une population Caucasienne saine. Cascorbi et al (2001) ont aussi trouvé une répartition bimodale chez une population Allemande saine en utilisant le rapport log AFMU/1X. Ils ont montré que 45,3% étaient acétyleurs rapides et 54,7% acétyleurs lents. O'Neil et al (2000) ont également trouvé une répartition bimodale chez des individus sains et chez des individus atteints du SIDA, avec le test de la caféine et le test du dapson, dans une population Américaine. Ces auteurs ont classé les individus acétyleurs rapides par un rapport molaire AFMU/1X > 0.55 ou un rapport monoacétyl-dapson $> 0,35$. Ils ont aussi montré la prédominance d'acétyleurs lents par le test de la caféine avec 67% des individus sains acétyleurs lents et 33% acétyleurs rapides.

Bakayev et al (2004) ont de même montré, pour NAT2, un pourcentage d'acétyleurs lents plus important que celui des acétyleurs rapides chez une population Iranienne.

En conclusion, il est important d'étudier l'activité NAT2 chez les malades traités avec des médicaments substrats de NAT2 (Brans et al. 2004). Chez les acétyleurs lents, le médicament restant trop longtemps dans l'organisme entraîne des effets adverses, sa dose doit être réduite. Ainsi, une association a été démontrée entre le phénotype acétyleur lent et une hépatotoxicité chez les malades tuberculeux, traités à l'isoniazide ou à l'hydralazine (Murata et al. 2007 ; Daly, 2010). De même, les acétyleurs rapides des arylamines présenteraient un risque de développer un cancer (Luca et al. 2007 ; Doll et al. 2010). Nos résultats laissent suggérer qu'il existerait un polymorphisme d'acétylation chez la population étudiée qui permet de subdiviser les individus en acétyleurs lents et rapides. Le pourcentage des acétyleurs lents serait plus important (55%) par rapport à celui des acétyleurs rapides (45%). Nos résultats confirment aussi la bonne corrélation entre génotype et phénotype.

B - PHENOTYPE D'ACETYLATION DE L'ISONIAZIDE

I – MATERIEL ET METHODES

1 - Sujets

Les échantillons urinaires ont été collectés de patients tuberculeux volontaires du Service des Maladies Respiratoires des Centres Hospitalo Universitaire de Bab elOued et de Mustapha Bacha d'Alger. La collecte a eu lieu pendant les 24 heures après l'administration du médicament de première ligne de la tuberculose (isoniazide (5 mg/kg) et rifampicine (450 mg/j)). Un aliquote de chaque échantillon a été conservé à – 20°C jusqu'à analyse.

2-Protocole de synthèse de l'Ac-INH (d'après Weber et King, 1981)

L'INH (1g) est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée additionnée de 200 ml d'acétate d'éthyle. 2,5 ml d'acide acétique anhydre ont été ajoutés.

Après agitation vigoureuse et évaporation à sec dans une étuve à température 45-50°C et refroidissement, 50 ml de butanol sont ajoutés. Après avoir laissé agir pendant 15 min, les cristaux d'AcINH sont recueillis par filtration et conservés dans un flacon hermétique à l'abri de la lumière.

3 -Quantification de l'INH et AcINH (Fukino et al. 2005)

Des tubes contenant chacun 500 µl d'urine non chargée, ont été additionnés avec de l'INH et de l'Ac-INH à des concentrations respectives 10 ; 20 ; 25 ; 80 et 100 mg/l. Ces tubes ont servi pour tracer la courbe étalon. Un blanc a été constitué uniquement de 500µl d'urine non chargée.

Des tubes contenant chacun uniquement 500µl d'urine chargée provenant des individus malades ont servi pour l'essai.

Une concentration fixe de l'étalon interne (acide nicotinique) de 150 mg/l et du HCl 0.05M a été ajoutée à chaque tube. Après addition de 350 µl d'acide perchlorique 1 M, le mélange a été agité puis centrifugé à 13000g. 20µl du surnageant ainsi obtenu a été analysé par une HPLC sur une colonne_{C18} (15 cmx4, 6mm ID). L'élution s'est faite selon un mode isocratique avec un mélange de 50 mM de KH₂PO₄, acétonitrile et isopropanol (65 :28 :7, v/v), à un débit de 1,2ml/min. Les profils d'élution ont été détectés à 340 nm et enregistrés.

II- RESULTATS

1- Phénotype d'acétylation

Après validation de la méthode (spécificité, fiabilité, linéarité, exactitude), (Annexe 9) les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5 de l'annexe 10.

A partir de ces résultats les valeurs du logAcINH/INH ont été calculées (Tableau 6, Annexe 10).

A partir des calculs, l'histogramme de la répartition du phénotype a été réalisé (Figure 20).

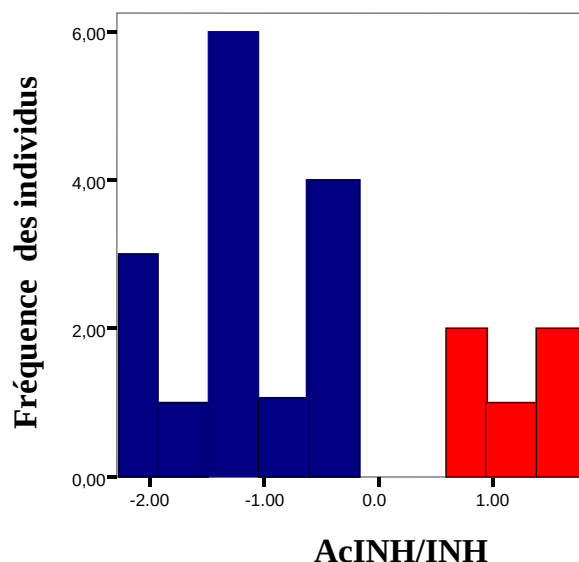


Figure 20. Histogramme du rapport molaire log Ac-INH/INH

Les résultats du tableau 17 et de l'histogramme de la figure 20, suggèrent l'existence de 2 types d'acétyleurs : les acétyleurs lents (individus 1 ; 2 ; 3 ; 6 ; 8 ; 9 ; 10 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 18 ; 19 et 20) avec $\log (\text{Ac-INH}/\text{INH}) < 0$ et les acétyleurs rapides (individus 4 ; 5 ; et 7 ; 11 et 17) avec $\log (\text{Ac-INH}/\text{INH}) > 0$. Le test de student a confirmé une différence hautement significative ($P < 0,001$). Le pourcentage d'acétyleurs lents étant de 75%.

III- DISCUSSION

L'analyse du phénotype de NAT2 a révélé que 75% des patients tuberculeux Algériens étaient acétyleurs lents et 25% étaient métaboliseurs rapides. Ceci montre la corrélation entre le génotype et le phénotype NAT2. En effet, nos résultats de l'étude du génotype de ces patients tuberculeux montrent que 76% des patients sont acétyleurs lents et 25% acétyleurs rapides.

Le traitement de la tuberculose par l'INH est associé à de sérieux problèmes, tels que le développement d'effets aduerses. Ainsi, l'hépatotoxicité, la neuropathie périphérique peuvent entraîner une diminution de la qualité de vie des patients traités. Quoique il existe des facteurs non génétiques pour l'hépatotoxicité, les facteurs génétiques ont aussi un impact dans le développement de l'hépatotoxicité iatrogène. Parmi les gènes candidats, NAT2 est l'enzyme principale impliquée dans le métabolisme de l'INH. Une diminution de l'activité de NAT2 peut entraîner l'accumulation de toxiques comme l'hydrazine et l'acétylhydrazine dans le foie, entraînant une hépatotoxicité (Hugichi et *al.* 2007). Il a été suggéré que les acétyleurs rapides avec des niveaux normaux de NAT2 formeraient efficacement le diacétylhydrazine et ainsi, les niveaux des métabolites toxiques, hydrazine et acétylhydrazine, seraient faibles chez ces individus (Daly, 2010).

De plus, Comme le montre d'autres enzymes interviennent dans le métabolisme de l'INH comme le CYP2E1 et la GST. Cependant, Fukino et *al* (2008) ont rapporté que l'enzyme CYP2E1 jouerait un rôle négligeable, alors que GSTM1 nulle pourrait entraîner l'accumulation de l'hydrazine. De même, une forte concentration de rifampicine a un effet inducteur sur les amidases.

En conclusion, La proportion d'acétyleurs lents mesurée dans l'étude du phénotype concorde avec celle obtenue avec l'étude du génotype. Ceci confirme également la bonne corrélation entre génotype et phénotype.

Des précautions doivent être prises afin d'empêcher le développement de désordres hépatiques induits par l'INH chez les patients porteurs du phénotype NAT2 lent.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DU GENOTYPE *NAT1*

ETUDE DU GENOTYPE *NAT1*

I- MATERIEL ET METHODES

1- Sujets étudiés

Le sang total a été prélevé de 50 individus sains âgés de 22-24 ans de sexe femelle, originaires des régions Nord et Est de l'Algérie. 1 ml de sang a été congelé pour l'étude du phénotype. L'ADN génomique a été extrait par la méthode standard de précipitation aux sels.

2 – Détermination du génotype *NAT1*

2 – 1 - Amplification de l'ADN

Le génotype *NAT1* a été déterminé par la méthode de Cascorbi et *al.* 2001. huit sites polymorphes majeurs ont été étudiés.

2 – 1 - 1- Amplification d'une partie de la région 5'flankante

Un fragment de 409 pb de la partie 5'flankante (Figure 21) a été amplifié grâce au couple d'amorces N1-F1, N1-R1 (Tableau 17) afin d'étudier la position A40T. Cette PCR a été réalisée dans 50µl de volume réactionnel contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1X-PCR, 0.2mM de dNTP, 2.5mM de MgCl₂, 0.2µM de chaque amorce et 0.5 U de Taq DNA polymérase.

Le programme de la PCR a été le suivant : un pré traitement à 95°C pendant 5 min, suivi de 30 cycles (95°C pendant 30 sec, 62°C pendant 20 sec et 72°C pendant 1 min), suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

2 – 1 - 2 - Amplification de l'exon codant

Un fragment de 1007 pb contenant l'exon codant (Figure 21) avec les sites polymorphes G445A, G459A, C559T, G560A, et A752T a été amplifié grâce aux amorces NAT1-F2 et NAT1-R2 (Tableau 17). Cette PCR a été réalisée dans 50µl de volume réactionnel contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1X-PCR, 0.2mM de dNTP, 2.5mM de MgCl₂, 0.2µM de chaque amorce et 0.5 U de Taq DNA polymérase.

Le programme thermique a été le suivant : un pré traitement à 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles (95°C pendant 30 sec, 52°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min), suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

2 – 1 – 3 - Amplification d'une partie de la région 3'flankante

Un fragment de 435 pb contenant le site 1095 (Figure 21) a été amplifié grâce au couple d'amorces N1-F3 et N1-R3 (voir tableau 17).

Le programme de la PCR a été le suivant : un pré traitement à 95°C pendant 8 min, suivi de 35 cycles (95°C pendant 30 sec, 57°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min) suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

2 – 1 – 4 - ASPCR

Cette méthode de ré amplification spécifique d'allèle permet d'analyser directement et d'isoler chaque allèle *NAT1** pour un site polymorphe sur le fragment amplifié par la PCR. L'ASPCR permet, d'amplifier séparément les deux allèles correspondants. Un fragment de 398 pb a été amplifié grâce aux trois amorces *NAT1-F3* et *NAT1 Rwt* ou *NAT1 Rmut* (Tableau 17, Figure 21).

Le programme de la PCR a été le suivant : un pré traitement à 95°C pendant 8 min, suivi de 30 cycles (95°C pendant 30 sec, 50°C pendant 30 sec et 72°C pendant 1 min), suivi d'une étape d'extension à 72°C pendant 5 min.

Les enzymes de restriction utilisées pour chaque site ainsi que les fragments obtenus sont représentés dans le tableau 18.

La qualité des produits d'amplification a été vérifiée par l'obtention d'une bande unique après migration de 10µl de produit de PCR dans un gel à 1% d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

Tableau 17. *Amorces utilisées pour l'amplification des fragments NAT1*

Nom des amorces	Séquence
N1-F1	5'-GAAATTGAGTGGGTCAGGTACC
N1-R1	5'CTAAGCAAGGAAAACAAAACGAAAGCAAAT
N1-F2	5'-GATCAAGTTGTGAGAAGAAATCG
N1-R2	5'-GAATTCAACAATAAACCAACATTAAAA
N1-F3	5'-GTTCACTGTTTGGTGGGCTT
N1-R3	5'-TTCCAAGATAACCAAGGCCATCTTTA
N1-Rwt	5'- GCCATCTTTAAAATACATTTT
N1-Rmut	5'- GCCATATTTAAAATACATTTA


```

gcactagaac agtaggaaac acattatagc tattcagtga actatttctt 18123344
gagttaatca atcaatggat gagtgaatca atacagttct ttgagcggga 18123394
aactttgtat aaggctcagc taaaagggaa attgagtgagg tcagggtacca 18123444
cggatactat acactctatt gcatgattct cctgcctaca tcagaagacg 18123494
tttataagcc tatttttaaag gataccagtt ggaatctctc ttttattaat 18123544
caccaagaga accatgaaca agctgtttat catttgactc atcattttaat 18123594
cttgatttcc agcttctcac acttgaaaga agacataata catttctcac 18123644
aggattctgg gactattaac tgaacttatg tgtgtaaaag gaattcatac 18123694
aatgaaagca ctagaaataa ttattatact tataaccatt gtatttttac 18123744
atgtttaaaa tatagccata attagcctac tcaaatccaa gtgtaaaagt 18123794
aaaatgattt gctttcgttt tgttttcctt gcttagGGGA TCATGGACAT 18123844
TGAAGCATAT CTTGAAAGAA TTGGCTATAA GAAGTCTAGG AACAAATTGG 18123894
ACTTGAAAC ATTAAGTAC ATTCTTCAAC ACCAGATCCG AGCTGTTCCC 18123944
TTTGAGAACC TTAACATCCA TTGTGGGGAT GCCATGGACT TAGGCTTAGA 18123994
GGCCATTTTT GATCAAGTTG TGAGAAGAAA TCGGGGTGGA TGGTGTCTCC 18124044
AGGTCAATCA TCTTCTGTAC TGGGCTCTGA CCACTATTGG TTTTGAGACC 18124094
ACGATGTTGG GAGGGTATGT TTACAGCACT CCAGCCAAAA AATACAGCAC 18124144
TGGCATGATT CACCTTCTCC TGCAGGTGAC CATTGATGGC AGGAACATA 18124194
TTGTCGATGC TGGGTTTGGA CGCTCATACC AGATGTGGCA GCCTCTGGAG 18124244
TTAATTTCTG GGAAGGATCA GCCTCAGGTG CTTGTGTCT TCCGTTTGAC 18124294
GGAAGAGAAT GGATTCTGGT ATCTAGACCA AATCAGAAGG GAACAGTACA 18124344
TTCCAAATGA AGAATTTCTT CATTCTGATC TCCTAGAAGA CAGCAAATAC 18124394
CGAAAAATCT ACTCCTTTAC TCTTAAGCCT CGAACAATTG AAGATTTTGA 18124444
GTCTATGAAT ACATACCTGC AGACATCTCC ATCATCTGTG TTTACTAGTA 18124494
AATCATTTTG TTCCTTGCAG ACCCCAGATG GGTTCACTG TTTGGTGGGC 18124544
TTCAACCTCA CCCATAGGAG ATTCAATTAT AAGGACAATA CAGATCTAAT 18124594
AGAGTTCAAG ACTCTGAGTG AGGAAGAAAT AGAAAAAGTG CTGAAAAATA 18124644
TATTTAATAT TTCCTTGCAG AGAAAGCTTG TGCCCAAACA TGGTGATAGA 18124694
TTTTTTACTA TTTAGAATAA GGAGTAAAAC AATCTTGTCT ATTTGTCATC 18124744
CAGCTCACCA GTTATCAACT GACGACCTAT CATGTATCTT CTGTACCTT 18124794
ACCTTATTTT GAAGAAAATC CTAGACATCA AATCATTTCA CCTATAAAAA 18124844
TGTCATCATA TATAATTAA CAGCTTTTTA AAGAAACATA ACCACAAACC 18124894
TTTTCAAATA ATAATAATAA TAATAATAAA AAATGTATTT TAAAGATGGC 18124944
CTGTGGTTAT CTTGGAAATT GGTGATTTAT GCTAGAAAGC TTTTAATGTT 18124994
GGTTTATTGT TGAATTCCTA GAAAAGTTTT ATTGGTAGAT GAGTAAATAA 18125044
AATATTGTAA AAAAAGTTAT TGTCTATAAA GTATATTAATA ACATTGTTGG 18125094
CTAAataat ttgaaaaaaa gtgggtttttt ggaagactta ggatattatg 18125144
gtgctacata atttttcctc gatgctctct tcctctcatc tttcttgtct 18125194
cttaa

```

Figure 21. Fragment de NAT1 (GenBank) amplifié

F = forward, R = reverse ; — Amorce N1-F1/N1-R1 — Amorce N1-F2/N1-R2, — Amorce N1-F3/N1-R3 — Amorce N1-F3/ N1-Rwt = une partie de N1-R3+partie grise de la séquence.

3 – RFLP

Les produits de ces PCR ont alors été analysés par RFLP grâce aux enzymes de restriction (tableau 18).

Tableau 18. Enzymes de restriction utilisées pour la détermination des mutations *NAT1*

SNP	Enzyme de restriction	amorces	Longueur des fragments de restriction
			Type sauvage Type muté
A-40T	SspI	N1-F1/N1-R1	409
			40 + 369
G445A	BbsI	N1-F2/N1-R2	270+113+624
			383+624
G459A	BslI	N1-F2/N1-R2	234+279+159+335
			513+159+335
G559T	DdeI	N1-F2/N1-R2	212+393+402
			212+147+246+402
G560A	Alw26I	N1-F2/N1-R2	40+39+928
			40+39+288+640
T640G	AlwNI	N1-F2/N1-R2	1007
			182+825
C1095A	BbsI	N1-F3/N1-R3	435
			30+405

II- RESULTATS

1 - Etude des SNP

Les SNP *NAT1** obtenus après PCR et restriction par les endonucléases spécifiques sont représentés dans le tableau 19

Tableau 19. Distribution des 9 SNP étudiés dans le gène *NAT1* chez les individus sains

SNP	A-40T	G445A	G459A	C559T	G560A	T640G	A752T	T1088A	C1095A
(%) M	9	49	2	0	0	55	0	57	45
W/W	43	1	48	50	50	20	50	14	6
W/M	5	49	2	0	0	5	0	15	43
M/M	2	0	0	0	0	25	0	21	1

W = type sauvage ; M = type muté

Les fréquences du type sauvage au niveau des SNP G559A, G560 et A752T sont de 100%. Celles des SNP G459A, et A-40T sont respectivement 98% et 91%. Cependant, les SNP G1095A ; G445A, T640G, T1088A ont présenté des mutations plus importantes avec des fréquences respectivement 45% ; 49% ; 55%.

2 - Etude des haplotypes

Dans la population étudiée, les haplotypes les plus répandus dans la population étudiée ont été NAT1*10 et NAT1*11 avec des fréquences respectivement de 42 % et de 40 %. La fréquence de l'haplotype de type sauvage NAT1*4 est de 18 % (Tableau 20). Par contre, les autres haplotypes pouvant être déterminés par les SNP étudiés seraient inexistantes (Tableau A, Annexe1).

Tableau 20. Fréquence des allèles NAT1 déterminés chez 50 individus sains

	position des nucléotides (nt)									haplotypes (%)
Allèle	-40	445	459	559	560	640	752	1088	1095	
NAT1*4	A	G	G	C	G	T	A	T	C	18
NAT1*10	.	.	.	.	.	.	.	A	A.	42
NAT1*11	.	A	.	.	.	G	.	.	.	40

3 - Etude des génotypes

Les génotypes obtenus dans notre étude après analyse des 9 SNP ont été le génotype NAT1*4/ *10, NAT1*4/ *11, NAT1*10/ *10 et NAT1*10/ *11. Les autres génotypes ont été absents (Tableau 21).

NAT1*4/ *10 s'est produit à une fréquence de 4% par contre, NAT1*4/ *11 est présent avec une fréquence de 32%. Les fréquences des génotypes NAT1*10/ *10 et NAT1*10/ *11 sont respectivement de 16% et 48 %.

Tableau 21. Fréquence des génotypes NAT1 déterminés chez 50 individus sains.

Génotype	Individus n(%)
4/ 10	2(4)
4/11	16(32)
10/10	8(16)
10/11	24(48)

III- DISCUSSION

L'étude des SNP G559A, G560 et A752T n'a pas montré de mutation. Pour les SNP G459A et A- 40T, la fréquence des mutations est respectivement de 2% et 9%. La fréquence de C1095A est de 45%. Tous ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez des populations Caucasiennes sur le site SNP500Cancer (ressource publique pour la validation et l'essai sur les variations génétiques des gènes candidats) (web site 1). Le SNP T1088A a présenté une fréquence de mutation de 57%, ce qui concorde avec les résultats rapportés par (Patin et al. 2006). Cependant, les SNP G445A et T640G avec les fréquences respectivement de 49% et 55% diffèrent des individus Caucasiens qui en présentent seulement 2%.

En ce qui concerne les haplotypes, nos résultats pour NAT1*10 concordent avec ceux rapportés par la littérature (Cascorbi et al. 2001). Cependant la fréquence de l'haplotype NAT1*11 en est différente, les résultats rapportés par la littérature sont de l'ordre de 3% seulement (Cascorbi et al. 2001). Il y aurait 13 fois plus d'haplotype NAT1*11 dans notre population étudiée que dans les autres populations Caucasiennes. De même, nos résultats pour l'haplotype NAT1*4 ne concordent pas avec ceux rapportés par la littérature, en effet, la fréquence de cet allèle est de l'ordre de 75% chez des populations Caucasiennes (Cascorbi et al. 2001). Il y aurait environ 4 fois moins de l'haplotype de type sauvage dans notre population.

Des études épidémiologiques moléculaires ont rapporté des associations entre le polymorphisme génétique NAT1 et le risque individuel aux cancers de la vessie (Grant et al. 1997 ; Carréon et al. 2006) et à d'autres cancers (Hein et al. 2000). NAT1 entraîne une augmentation de la résistance à l'apoptose (Adams et al. 2003).

La fréquence du génotype NAT1*4/ *10 a représenté environ le 1/6 de celle rapportée dans la littérature, en effet, une fréquence d'environ de 24% a été rapportée chez une population Caucasienne (Zheng et al. 1999).

NAT1*4/ *11 a présenté une fréquence d'environ 16 fois plus importante que celle rapportée dans la littérature d'une population Caucasienne (2%) (Cascorbi et al. 2001).

Concernant le génotype NAT1*10/ *10, nos résultats rapportent une fréquence environ 5 fois plus importante que celle rapportée par la littérature. En effet, le pourcentage de ce génotype a été de 3% chez des populations Caucasiennes (Cascorbi et al. 2001)

En ce qui concerne le génotype NAT1*10/ *11, sa fréquence a été de 14 fois plus importante que celle rapportée par la littérature (Cascorbi et al. 2001). En effet, ces auteurs ont rapporté une fréquence de 4%.

Nos résultats n'ont pas mis en évidence le génotype NAT1*4/ *4. Une fréquence de 58% de ce génotype a été rapportée chez des populations Caucasiennes (Bell et al. 1995).

Il a été rapporté que le stress oxydatif et la fumée de cigarette peuvent jouer un rôle important dans la carcinogenèse de la prostate des individus portant les génotypes NAT1 rapides (Higuchi et al. 2007).

Le phénotype acétyleur rapide a présenté une fréquence de 100% dans notre population. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par la littérature. En effet, il a été rapporté une fréquence de 100% ou d'environ 90% d'acétyleurs rapides chez des populations Caucasiennes (Bell et al. 1995).

En conclusion, dans la population Algérienne étudiée, il existerait des différences dans les fréquences des haplotypes et des génotypes par rapport aux autres populations Caucasiennes. Notamment l'haplotype *NAT1*11*. La fréquence du génotype *NAT1*10/NAT1*10* s'est révélée plus importante par rapport à des populations Caucasiennes. Ce génotype a été corrélé à une susceptibilité à certaines maladies. Ceci laisse suggérer que les individus étudiés présenteraient une sensibilité accrue aux arylamines et devraient être moins exposés à ces substances. Cependant ces résultats n'ont été réalisés que sur un nombre réduit d'individus. Il faudrait un échantillonnage beaucoup plus important pour vérifier nos résultats. En ce qui concerne le phénotype, comme chez les autres populations Caucasiennes, tous les individus étudiés ont présenté un phénotype acétyleur rapide.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DU PHENOTYPE NAT1

ETUDE DU PHENOTYPE NAT1

A – PHENOTYPE NAT1 CHEZ L’HOMME

I- MATERIEL ET METHODES

1 – Sujets

Le sang (5 ml) a été prélevé de 60 individus sains âgés de 22-24ans de sexe féminin, originaires des régions Nord et Est de l’Algérie. 4 ml ont été utilisés pour l’extraction de l’ADN et 1 ml a été utilisé pour l’étude du phénotype.

2 - Détermination du phénotype d’acétylation (méthode de Hughes et al. 1998, Sinclair et al. 1998)

Le sang stocké à – 20°C a été décongelé et dilué 50 fois avec du tampon TEDK (10 mM triethanolamine-HCl, 1mM EDTA, 1 mM dithiothréol, 50mM KCl, pH 7,0). La réaction est suivie dans un volume final de 200µl constitué de 100µl du lysat des cellules sanguines, 40µl d’AcCoA 500µM, 40µl de tampon (20mM Tris-HCl, pH 8.0), 1 mM DTT et 20 µl de la solution du substrat PABA (0.05-1 mM dans 25 % de DMSO). Les tubes ont alors été incubés pendant 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 100 µl d’acide acétique à 20%. Les tubes ont alors été centrifugés à 1200g pendant 10 min. Le surnageant est prélevé pour le dosage. 200 µl de surnageant ont été additionnés de 200µl de TCA à 20% (w/v) et de 800µl de diméthylaminobenzaldehyde (DMBA). L’absorbance à 450 nm a été alors mesurée avec un spectrophotomètre.

Les concentrations protéiques ont été déterminées par la méthode de Bradford (1976).

Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Student.

II- RESULTATS

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau de l’annexe (Tableau 7 ; Annexe 11). A partir des résultats les valeurs du $\log \text{AcPAS/PAS}$ (indice d’acétylation) ont été calculées (Tableau 7. Annexe 11) pour tracer l’histogramme révélant le phénotype d’acétylation du PAS (Figure 22).

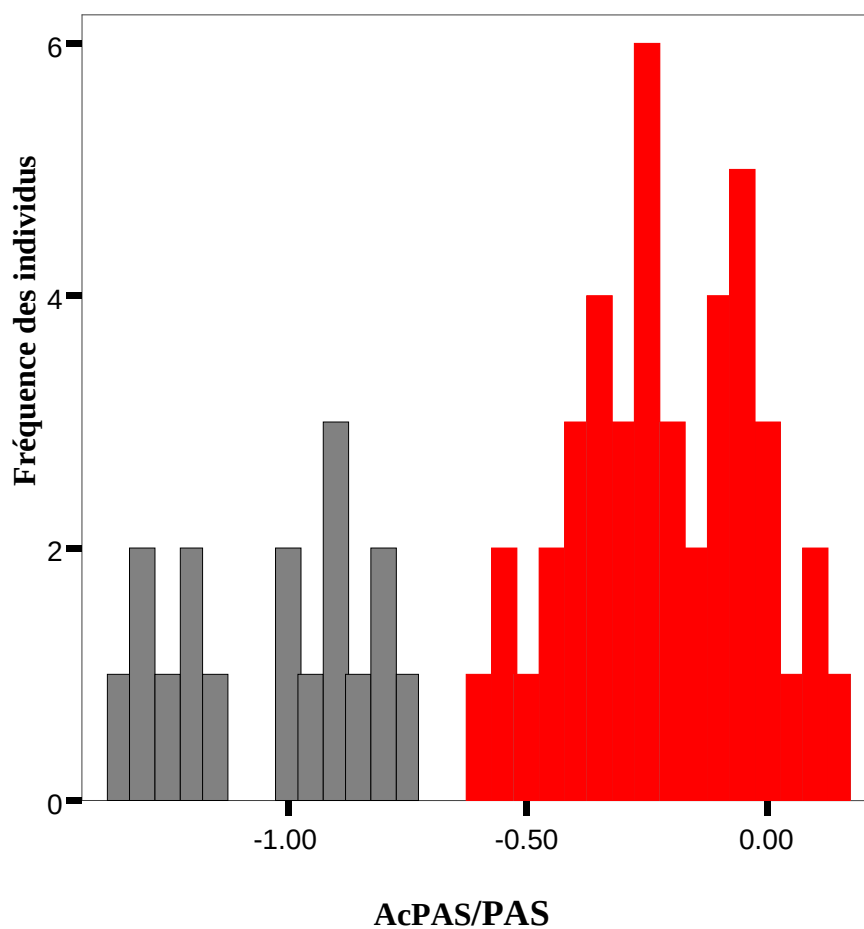


Figure 22. Histogramme du phénotype d'acétylation du PAS

III- DISCUSSION

La NAT1 présente un polymorphisme d'acétylation du PAS. Une activité spécifique variant de 0,005 nmol/min/mg (individu 26) à la valeur 1.05nmol/min/mg (individu 9). Cette valeur est 210 fois plus élevée chez l'individu 9 par rapport à l'individu 26. De même Fretland et *al* (2001), ont rapporté pour NAT1 humain recombiné dans la levure, une activité de N-acétylation du PABA de plusieurs centaines de fois plus réduite chez les recombinants du phénotype lent *NAT1 14B*, *NAT1 15*, *NAT1 17*, *NAT1 19* et *NAT1 22* par rapport à la référence *NAT1 *4*.

Selon la figure 22, il existerait trois types d'acétyleurs : Les individus acétyleurs lents (individus 26 ; 10 ; 18 ; 22 ; 12 ; 19 et 16) avec une valeur de l'activité spécifique $\leq 0,055$ (valeur moyenne = 0.03 ± 0.018 nmol/min/mg de protéine), les acétyleurs intermédiaires (individus 4 ; 6 ; 25 ; 5 ; 21 ; 17 ; 13 ; 11 ; 3 et 24) avec une activité spécifique $> 0,055$ (valeur moyenne = 0.098 ± 0.0078 nmol/min/mg) et les acétyleurs rapides (individus 8 ; 23 ; 27 ; 1 ; 15 ; 2 ; 7 ; 14 ; 28 ; 20 et 9) avec une activité spécifique ≥ 0.15 (valeur moyenne = 0.415 ± 0.29 nmol/min/mg). La différence est hautement significative entre les acétyleurs lents et les acétyleurs intermédiaires ($P < 0,001$), la différence est aussi hautement significative ($p < 0,001$) entre les acétyleurs intermédiaires et les acétyleurs rapides.

L'activité de NAT1 varie en fonction des tissus. Nos résultats sont en accord, en ce qui concerne les acétyleurs intermédiaires, avec ceux de Vaziri et *al* (2001) qui ont rapporté une valeur moyenne de l'activité spécifique de N-acétylation du PAS dans des lysats sanguins humains de 97,3 pmol/min/mg protéine chez les acétyleurs rapides dans une population Canadienne. Nos résultats se rapprochent aussi de ceux de Payton et Sim (1998) qui ont rapporté une valeur moyenne de l'activité spécifique dans le sang de sujets humains caucasiens de 1,13nmol/min/mg chez les acétyleurs rapides.

Nos résultats donnent un pourcentage des acétyleurs lents de 25%, des acétyleurs intermédiaires de 35,71%, des acétyleurs rapides de 39,28%. Une distribution trimodale de l'activité de N-acétylation a été rapportée (Doll et *al*. 2010).

L'acétylation du PAS in vitro dans le plasma total n'est pas susceptible aux variations interindividuelles dans les voies de biotransformation du PAS, de son débit d'élimination et de la fonction rénale (Vaziri et *al*. 2001). Atman et *al* (2003), ont rapporté que en plus de la variation de l'activité de NAT1 dépendante du polymorphisme, H₂O₂, pourrait aussi réguler l'activité de cette enzyme et peut avoir des conséquences importantes sur la toxicité des médicaments et sur le risque de cancer.

Ainsi nos résultats nous permettent de suggérer que l'activité de NAT1 est polymorphe dans la population étudiée et divise les individus en acétyleurs lents, intermédiaires et acétyleurs rapides. Ces derniers étant plus nombreux que les acétyleurs lents au sein de cette population.

Nous avons utilisé le PAS comme modèle pour l'étude de l'acétylation de NAT1 afin de déterminer les personnes à risque. En effet, l'importance de NAT1 dans le métabolisme du PAS et des cancérigènes de l'environnement a conduit à des études épidémiologiques moléculaires pour déterminer les génotypes et les phénotypes à risque potentiel dans le développement de cancer (Hein et *al*. 2002).

En conclusion, des investigations épidémiologiques à grande échelle sur le rôle du phénotype et du génotype NAT1 en association avec d'autres susceptibilités génétiques et l'exposition aux cancérogènes sont nécessaires pour améliorer la compréhension du rôle du polymorphisme NAT1 dans le risque de cancer. La perspective de notre étude, c'est aussi de pouvoir établir une relation génotype/phénotype en déterminant les variants alléliques impliqués dans les différences phénotypiques. En effet, la relation génotype/phénotype n'est pas encore déterminée pour différents allèles (Hein et *al*. 2008).

ETUDE DU PHENOTYPE NAT1

B- PHENOTYPE Nat2 CHEZ LE RAT DES SABLES *Psammomys obesus*

I- MATERIEL ET METHODES

1- Animaux

Des rats de sable mâles de souche *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828, proviennent de la zone de Beni-Abbès : 30°7N-2°10 Ouest du Nord du Sahara occidental Algérien.

2 - Détermination de l'activité enzymatique

Les foies ont été prélevés de 9 rats adultes et leur homogénat a été préparé selon la méthode de Boukouvala et *al.* (2002). Des aliquotes du surnageant (100µl) ont été réalisés en double avec 0.1 mM PABA. Après 3 min de pré incubation à 37°C. Les réactions sont stoppées par adition de 100 µl de 20%(w/v) d'acide trichloracétique (TCA). Après centrifugation, le surnageant est utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique du PABA et pour la détermination des constantes de Michaelis et Vmax par la méthode de Sinclair et al (1998). Des témoins sont réalisés par substitution de l'Acetyl-CoA par l'eau. L'activité spécifique Nat2 a été exprimée en nmoles de (AcPABA)//min//mg de protéines. Les concentrations protéiques ont été déterminées par la méthode de Bradford (1976). Les valeurs du Km apparent et de la Vmax ont été déterminées à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk.

Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Student.

II- RESULTATS

1- Activité enzymatique

L'activité enzymatique de Nat2 a été déterminée à l'aide du PABA (substrat spécifique). Les variations de cette activité spécifique sont représentées dans le tableau 22. Les valeurs de l'activité spécifique varient de 0.42 à 6.33 nmoles/min/mg, avec une valeur moyenne de 2.96 ± 2.16 nmoles/min/mg. L'augmentation de 15.07 fois observée permet de suggérer qu'il y aurait plus d'un seul type de phénotype d'acétylation parmi les rats testés.

Tableau 22. Valeurs de l'activité spécifique de Nat2

Les homogénats de foie de *Psammomys obesus* (n = 9) ont été utilisés pour l'étude de l'activité de Nat2 avec 0.1mM PABA en présence de 0.1mM d'acetyl-CoA. La valeur du produit (AcPABA) de chaque rat représente la moyenne de trois essais.

Rats	Activité spécifique (nmol/min/mg) ± SD
1	0.42 ± 0.066
2	0.72 ± 0.081
3	0.96 ± 0.11
4	1.80 ± 0.15
5	2.97 ± 0.14
6	3.51 ± 0.45
7	4.47 ± 0.44
8	5.49± 0.23
9	6.33 ± 0.67

2 - Phénotype d'acétylation

L'index d'acétylation formé par le rapport molaire AcPABA/PABA a été utilisé pour décrire le phénotype d'acétylation chez le rat des sables. Les valeurs des fractions molaires AcPABA/PABA obtenues sont représentées dans le tableau 23. Ces valeurs varient de 0.03 à 0.29 avec une augmentation de 10 fois.

Tableau 23. Rapport molaire AcPABA/PABA

Rats	AcPABA/PABA ± SD
1	0.03 ± 0.025
2	0.03 ± 0.022
3	0.06 ± 0.031
4	0.22 ± 0.065
5	0.24 ± 0.087
6	0.25 ± 0.075
7	0.27 ± 0.081
8	0.28 ± 0.092
9	0.29 ± 0.095

L'histogramme de l'index d'acétylation (Figure 23) a permis de mettre en évidence la répartition du phénotype. Cette répartition est clairement bimodale, avec un phénotype acétyleur rapide ($n=6$) et un phénotype lent ($n=3$). Les rats ont été ainsi classés en deux groupes, le groupe acétyleur rapide avec une moyenne du rapport molaire AcPABA / PABA de 0.26 ± 0.026 et le groupe métaboliseur lent avec une moyenne de 0.04 ± 0.017 . Le test de student montre une différence significative entre les métaboliseurs rapides et lents ($p < 0.001$). Ceci a confirmé notre observation d'une distribution bimodale. La fréquence du phénotype lent est de 33.33% avec une moyenne de l'activité spécifique de 0.7 ± 0.27 nmoles/min/mg. La valeur moyenne de l'activité spécifique des métaboliseurs rapides est de 4.10 ± 1.67 nmoles/min/mg.

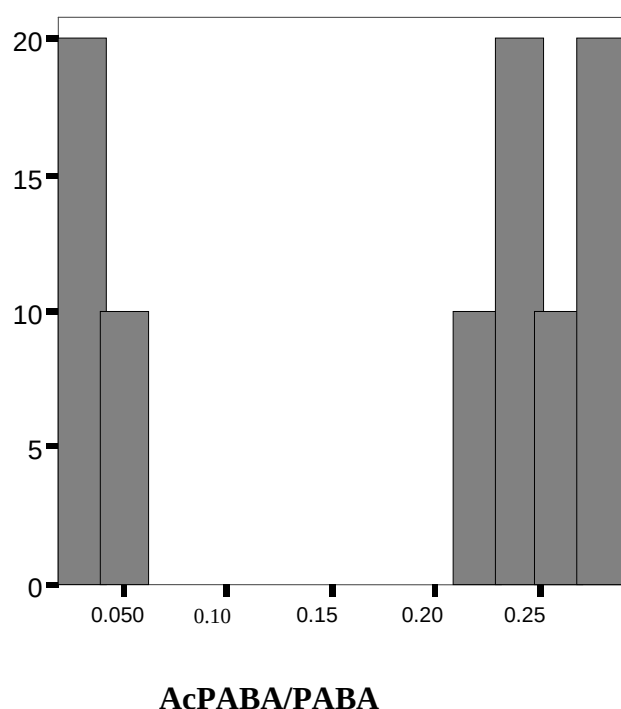


Figure 23. Distribution des phénotypes acétyleurs dans les homogénats de foies de rats des sables ($n = 9$). L'axe des abscisses représente les rapports Ac-PABA/PABA (indices d'acétylation).

3- Paramètres cinétiques

La valeur moyenne du K_m mesurée est de 74 ± 8.35 μ M, celle du V_{max} est de 5.20 ± 3.27 nmoles/min/mg pour l'acétylation du PABA dans les homogénats de foie de rat des sables (Figure 24).

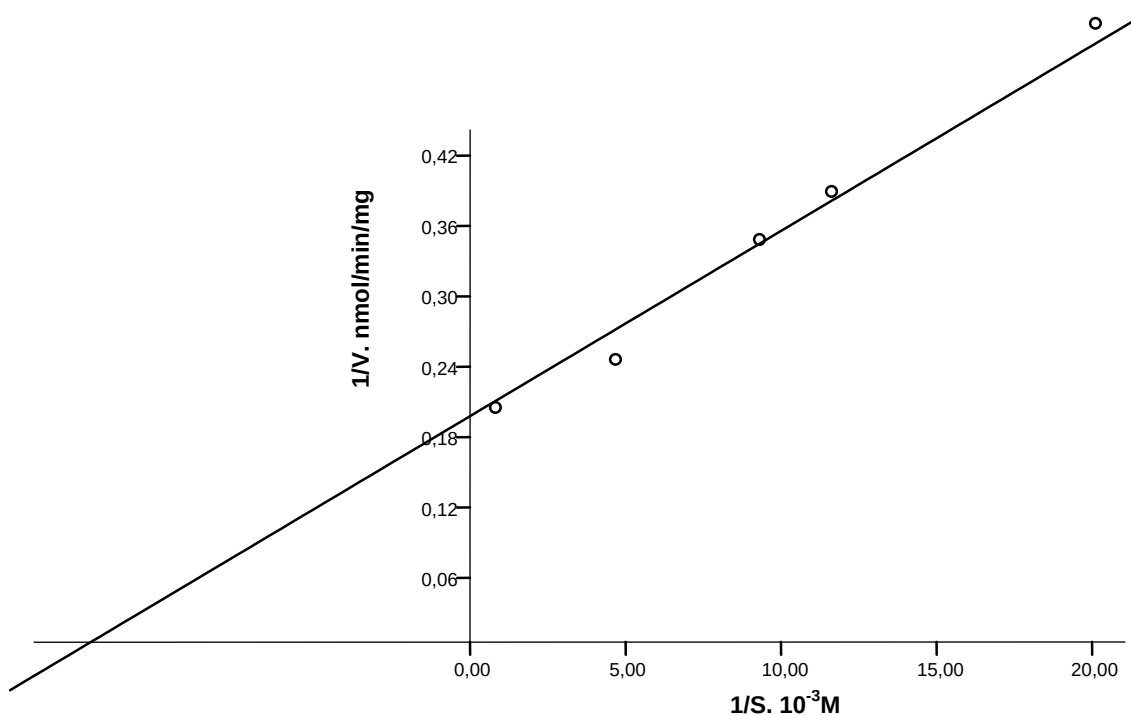


Figure 24. Constantes cinétiques de l'activité PABA-Nat2 de rats des sables *Psammomys obesus*. Les homogénats de foie ont été incubés à 37°C avec un système régénérant d'acetyl--CoA contenant 0.1mM d'acetyl-CoA et des concentrations de PABA variant de 1mM à 50 μ M. Les valeurs du K_m et de la V_{max} ont été déterminées grâce à la représentation de Lineweaver-Burk.

III- DISCUSSION

Le polymorphisme de NAT1 a été associé aux cancers épithéliaux exposés aux xénobiotiques procarcinogènes (Hein et *al.* 2000). Le rôle endogène de NAT1 dans le métabolisme des folates a été aussi lié à la carcinogenèse dans certains tissus (Wakefield et *al.* 2007; Wakefield et *al.* 2008b). Ainsi, le développement d'un modèle animal convenable pour examiner la relation entre NAT1 humain et la carcinogenèse est important.

Dans cette étude l'activité Nat2 du PABA et de son polymorphisme a été mesurée chez le rat des sables *Psammomys obesus*. Le PABA est un substrat utile et spécifique pour la détermination de ce polymorphisme chez les rongeurs. (Hein et *al.* 1988).

Le PABA a été efficacement acétylé par les homogénats de foie du rat des sables avec une V_{max} de 5.20 ± 3.27 nmol/min/mg.

Les indices d'acétylation AcPABA/PABA ont montré une distribution bimodale de la N-acétylation du PABA. Le groupe acétyleur rapide montra une augmentation de 6 fois ($P < 0.01$) l'activité de la N-acétylation du PABA par rapport au groupe acétyleur lent avec une fréquence des acétyleurs lents de 33.33%. L'expression polymorphe de la N-acétylation du PABA dans le cytosol de foie ainsi que dans le cytosol d'autres tissus de rat albinos est largement détectée dans tous les tissus examinés aussi bien chez les mâles que les femelles (Hein et *al.* 1991).

Dans chaque tissu examiné, l'activité mesurée est génotype dépendante avec des proportions élevées chez les acétyleurs homozygotes rapides, intermédiaires chez les acétyleurs hétérozygotes et faibles chez les homozygotes lents (Hein et al. 2008).

La base moléculaire, chez le rat et chez l'homme du phénotype acétyleur lent, se manifeste par des mutations non conservatives dans la région codante de *Nat2* et *NAT1* (Hein, 2002). L'activité de la N-acétylation du PABA est plus importante chez le rat par rapport à d'autres rongeurs (Hein et al. 1982; Hein et al. 1991; Boukouvala et al. 2002; McQueen et al. 2003). En outre, comparant nos résultats à ceux de Hein et al (1991), le rat des sables et le rat blanc semblent avoir une activité NAT importante et similaire. L'activité *Nat2* du PABA ne présente pas de différence significative entre les rats mâles dans tous les tissus examinés (Hein et al. 2008).

Une haute fréquence exceptionnelle d'hépatome spontané, de prolifération de l'épithélium de la muqueuse de la vésicule biliaire, et d'adénofibromes utérins a été observée chez le *Psammomys obesus* (Ungar et Adler, 1978; Ungar et Adler, 1982; Czernobilsky et al. 1982).

En conclusion, ce travail constitue probablement la première étude de l'activité de la N-acétylation du PABA dans le foie de rats des sables *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. Cet animal a présenté une activité *Nat2*. Une variabilité dans l'activité de N-acétylation a été observée chez ce rat qui montre une répartition bimodale. De plus, *Psammomys obesus* présente des cancers spontanés. Ce rat pourrait être utilisé comme un modèle utile pour clarifier la relation entre le rôle de *NAT1* dans le métabolisme des xénobiotiques et de substances endogènes et la carcinogenèse. D'autres études sont nécessaires à l'aide de ce modèle animal pour démontrer l'association entre le polymorphisme *Nat2* et la carcinogenèse pour progresser dans la compréhension des bases moléculaires de ce phénomène.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

- Nos résultats nous ont permis grâce à l'étude du phénotype, par le dosage des métabolites urinaires de l'INH et de son métabolite acétylé (AcINH) de patients tuberculeux, de mettre en évidence que la répartition des individus était bimodale, les acétyleurs lents et les acétyleurs rapides. Le pourcentage de patients acétyleurs lents a été de 75%.

Les études des génotypes de *NAT2* de ces mêmes patients ont confirmé ces résultats. En effet, la relation génotype et phénotype bien déterminée (Higuchi et *al.* 2007) nous permet de déduire la proportion d'acétyleurs lents et rapides. Les acétyleurs porteurs des génotypes de l'acétylation lente représentent 76.67% des patients. Environ 70% des patients atteints de tuberculose sont acétyleurs lents chez des populations Caucasiennes (Grant et *al.* 2008).

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en évidence une répartition bimodale du phénotype d'acétylation de *NAT2*. Le pourcentage d'acétyleurs lents de patients tuberculeux est d'environ 70%. Cependant, notre échantillon est faible et des études ultérieures sur un nombre de patients plus important permettraient de vérifier nos résultats.

- L'étude du phénotype par le dosage des métabolites de la caféine, substance ubiquitaire et relativement non toxique, nous a permis de mettre en évidence une répartition bimodale avec environ 50% d'individus acétyleurs lents 50% acétyleurs rapides. Ceci est en accord avec les résultats d'études rapportées sur des populations Caucasiennes (Cascorbi et *al.* 2001).

L'étude du génotype a montré aussi le même pourcentage d'acétyleurs lents. L'haplotype le plus répandue dans cette population Algérienne est *NAT2*5B*. Il est suivi de l'haplotype *NAT2*4* puis de *NAT2*6A*. Ceci est en accord avec les résultats rapportés dans des études sur des populations Caucasiennes (Cascorbi et *al.* 2001).

- La troisième problématique a été l'examen de la relation du polymorphisme de *NAT2* et le risque de l'athérosclérose. En effet, l'athérosclérose est une maladie multifactorielle où les xénobiotiques comme les polluants de l'environnement jouent un rôle important (Izzoti et *al.* 2007).

Nos résultats nous ont permis de suggérer l'absence de relation entre le génotype de *NAT2* et le risque de développer l'athérosclérose. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Izzoti et *al.* 2007). Nous avons remarqué que l'haplotype *NAT2*5F*, allèle de l'acétylation lente, jouait un rôle protecteur contre cette maladie. Plusieurs études ont rapporté que les haplotypes lents seraient le résultat de mutations sélectives (Luca et *al.* 2006).

En conclusion, d'après nos résultats, il n'y aurait pas de relation entre le polymorphisme génétique de *NAT2* et l'athérosclérose. D'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques interviendraient.

- La quatrième investigation a été la détermination de la relation génotype phénotype de *NAT1*. En effet, cette relation n'est pas encore déterminée pour certains génotypes, l'activité de certains haplotypes reste encore à déterminer (Hein et *al.* 2008). D'autre part, il est important de déterminer la fréquence de l'haplotype *NAT1*10* chez la population Algérienne. Cet haplotype a été associé à plusieurs cancers (Sim et *al.* 2007).

Nos résultats de l'étude du phénotype de NAT1 réalisée chez des individus sains par le dosage du PAS et de son métabolite AcPAS, ont montré une répartition trimodale. Ce qui est en accord avec ceux de (Doll et *al.* 2010). Le pourcentage d'acétyleurs rapides était de 90%. Ceci concorde avec les résultats rapportés d'études sur des populations Caucasiennes (Patin et *al.* 2006).

L'étude du génotype de patients atteints du cancer de la vessie a montré une fréquence importante de *NAT1*10/NAT1*10* (Patin et *al.* 2006). Plusieurs études ont rapporté un taux de 10% pour cet allèle chez des populations Caucasiennes (Patin et *al.* 2006). Nos résultats ont montré une fréquence importante de cet allèle.

En conclusion, nos résultats montrent une répartition trimodale de l'activité de l'enzyme NAT1. Le pourcentage d'acétyleurs rapides est de 90%. *Nat1*10* est un haplotype de fréquence importante dans notre population. Cependant un effectif plus important est indispensable pour la vérification de nos résultats.

- La cinquième investigation a été la mise en évidence d'un modèle d'étude efficace pour l'étude de la relation du phénotype de NAT1 et le risque de cancers. Le polymorphisme de NAT1 a été corrélé à certains cancers (Hein et *al.* 2002). Nous avons utilisé comme modèle animal le *Psammomys obesus*. En effet, ce rat des sables est potentiellement susceptible à certains cancers (Ungar et *al.* 1982). NAT1 humaine est l'homologue de *Nat2* des rongeurs.

Nos résultats montrent une répartition bimodale de l'activité de *Nat2* mesurée par le rapport des concentrations molaires du substrat PABA et de son métabolite AcPABA. Les acétyleurs lents et les acétyleurs rapides. Ce qui met en évidence la présence d'un polymorphisme de NAT1 chez ce rat des sables. Cependant, les résultats d'autres auteurs chez des rats blancs ont montré une répartition trimodale (Doll et *al.* 2010). Nos résultats seraient différents soit par rapport à la lignée, soit par rapport à l'effectif. Notre effectif est faible par rapport à celui utilisés par ces auteurs.

En conclusion, nos résultats montrent la présence d'un polymorphisme de *Nat2* de *Psammomys obesus*. La perspective est de mieux élucider l'expression de NAT1 dans le phénomène de la cancérisation.

REFERENCES

- Adams PJ, Berry J, Loader JA, Tyson KL, Craggs G and Smith P. (2003). Arylamine N-acetyltransferase 1 is highly expressed in breast cancer and conveys enhanced growth and resistance to etoposide in vitro. *Mol. Cancer Res* 2003; **1**: 826-835.
- Antila S , Pesonen U , Lehtonen L, et al. Pharmacokinetics of levosimendan and its active metabolite OR-1896 in rapid and slow acetylators. *Eur J Pharm Sci* 2004; **23**: 213-222.
- Arlt VM , Glatt H , Gamboa da Costa G , et al. Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2- nitrobenzanthrone. *Toxicol Sci* 2007; **98**: 445-457.
- Atman N, Dairou J, Paul A, Dupret JM, Rodrigues-Lima F. Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase1 (NAT1). *J. Biol. Chem* 2003; **278**: 35086-35092.
- Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, et al. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder. *Cancer Res* 1995; **55**: 5230-5237.
- Bakayev VV, Mohammadi F, Bahadori M, Sheikholeslami M, Javeri A, Masjedi MR, Velayati AA . Arylamine N-acetyltransferase 2 slow acetylator polymorphisms in unrelated Iranian individuals. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **20**:120.
- Batra J, Ghosh B. N-acetyltransferases as markers for asthma and allergic/atopic disorders, *Curr Drug Metab* 2008; **9**: 546-553.
- Bell DA,Badawi AF, Lang NP, Ilett KF, Kadlubar FF, Hirvonen A. Polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) polyadenylation signal : association of NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res* 1995; **55**: 5226-5229.
- Bendaly J , Metry KJ , Doll MA , et al. Role of human CYP1A1 and NAT2 in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole [4, 5-b] pyridine-induced mutagenicity and DNA adducts, *Xenobiotica* 2009; **19**: 1-8.
- Binková B, Šmerhovský Z, Strejc P, et al. DNA- adducts and atherosclerosis: a study of accidental and sudden death males in the Czech Republic, *Mutat Res* 2002; **501**: 115-128.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Hein M, Meyer UA. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell Biol* 1990, **9**: 193.
- Bonisolli L, Pontirulli AE, De Pasqua A, et al. Association between Chlorpropamide - alcohol flushing and fast acetylator phenotype in type I and TYPE II diabetes. *Acta Diabetol Lat.* 1985; **22**: 305-315.
- Bouchet, H. Histoire et évolution de la tuberculose. *Rev Prat* 1996; **46** :1701-1703.

- Boukouvala S, Price N, Sim E. Identification and functional characterization of novel polymorphisms associated with the genes for arylamine N-acetyltransferases in mice. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 385-394.
- Boukouvala S, Price N and Sim E. Identification and functional characterization of novel polymorphisms associated with the genes for arylamine N-acetyltransferases in mice. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 385-394.
- Boukouvala S and Fakis G. (2005). Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev* 2005; **37**: 511-564.
- Bozaoglu K, Curran JE, Elliot KS, Walder KR, Dyer TD, Rainwater DL, Vandeberg JL, Comuzzie AG, Collier GR, Zimmet P, MacCluer JW, Jowett JB and Blangero J. Association of genetic variation within UBL5 with phenotypes of metabolic syndrome. *Human Biol* 2006; **78**: 147-159.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- Brans R, Laizane D, Khan A, Blömeke BN. *Clinical Chemistry* 2004; **50**: 1264.
- Bratton A, Marshall EK. A new coupling component for sulfanil-amide determination. *J. Biol. Chem* 1939; **218**: 537-550.
- Brockton N, Little J, Sharp L, et al. N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am. J.Epidemiol* 2000; **15**: 846-861.
- Butcher NJ, Ilett KF, Minchin RF. Functional polymorphism of the human N-acetyltransferase type 1 gene caused by C190T and G560A mutations. *Pharmacogenetics* 1998; **8**: 67-72.
- Butcher NJ, Kenneth FI, Minchin RF. Substrate-dependent regulation of human N-acetyltransferase-1 in cultured cells. *Molecular pharmacology* 2000; **57**: 468-473.
- Butcher NJ, Arulpragasam A, Minchin RF. Proteasomal degradation of N-acetyltransferase 1 is prevented by acetylation of the active site cysteine: a mechanism for the slow acetylator phenotype and substrate-dependent down-regulation. *J. Biol Chem* 2004; **279**: 22131-7.
- Cantinella LR, Katki AG, Klecker RW, Collis JM. Metabolism by N-acetyltransferase 1 in vitro and in healthy volunteers: a prototype for target inhibition. *J. Clin Pharm* 2004; **44**: 1405-1411.
- Carreón T, Ruder AM, Schult PA, et al. NAT2 slow acetylation and bladder cancer in workers exposed to benzidine *Int. J. Cancer* 2006; **118**: 161-168.
- Cascorbi I, Roots I. Pitfalls in N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics* 2001; **9**: 123-127.
- Coroneos E, Gordon JW, Kelly SL, Wang PD, Sim E. Drug metabolising N-acetyltransferase activity in human cell lines. *Biochim et Biophys Acta* 1991; **1073**: 593-599.

- Czernobilsky B, Ungar H and Adler JH. (1982). Spontaneous uterine neoplasm in the fat sand rat (*Psammomys obesus*). *Laboratory Animals* 1982; **16**: 285-289.
- Daly A. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med* 1995; **73**: 539-553.
- Daly M and Daly S. (1993). On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, Gerbillidae) in the Wadi Saoura, Algeria. *Mammalia* 1982; **37**: 546-561
- .Daly A. Drug- induced liver injury: past, present and future. *Pharmacogenomics* 2010; **11**: 607-611.
- Deguchi T. Sequences and expression of alleles of polymorphique arylamine N-acetyltransferase of human liver. *J.Bilo.Chem* 1992; 267: 18140-18147.
- Deguchi M, Yoshida S, Kennedy S, et al. Lack of association between endometriosis and N-acetyl transferases 1 (*NAT1*) and 2 (*NAT2*) polymorphisms in a Japanese population, *J Soc Gynecol Investig* 2005; **12**: 208-213.
- Deitz AC, Zheng W, Leff MA, et al. N-acetyltransferase-2 genetic polymorphism, well-done meat intake, and breast cancer risk among postmenopausal women. *Cancer Epidemiol, Biomark. Prev* 2000; **9**: 905-910.
- Deloménie C, Sica I, Grant DM, Krishnamorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (*NAT2* *) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics* 1996; **6**:177-185.
- Doll MA, Hein DW. Cloning, sequencing and expression of *NAT1* and *NAT2* encoding genes from rapid and slow acetylators inbred rats. *Pharmacogenetics* 1995; **5**: 247-251.
- Doll MA, Zang Y, Moeller T, Hein DW. Co-dominant expression of N-acetylation and O-acetylation activities catalyzed by N-acetyltransferase 2 in human hepatocytes. *JPET*.2010. DOI: 10.1124/jpet.110.168567.
- Estrada L, Kanelakis KC, Levy GN, Weber W. Tissue-and gender-specific expression of N-acetyltransferase2 (*Nat2*) during developpement of the outbred mouse strain CD-1. *Drug Metabol. Dispos* 2000; **28**: 139-146.
- Evans DAP, Manley KA, McKusick. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *BR Med J* 1960; **2**: 485-491.
- Evans DAP, White TA. Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med* 1964; **63**: 394-403.
- Evans DAP. N-acetyltransferase. *Pharmacogenetics of Drugs Metabolism* 1992; 95-178.
- Ferguson RJ, Doll MA, Gray K, Hein DW. Cloning expression and functional characterization of two mutant (*NAT2* 191 and *NAT2* 341/803) and wild-type human polymorphic N-acetyltransferase (*NAT2*) alleles. *Drug Metabol Dispos* 1994; **22**: 371-376.

- Fiala ES, Weisburger JH, Katayama S, Chandrasekaran V and Williams GM. The effect of disulfiram on the carcinogenicity of 3,2' dimethyl-4-aminobiphenyl in Syrian golden hamsters and rats. *Carcinogenesis* 1981; **2**: 965-969.
- Fretland AJ, Doll MA, Leff MA, Hen DW. Functional characterization of nucleotide polymorphisms in the coding region of N-acetyltransferase1. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 511-520.
- Fukino K, Sasaki Y, Ueno K. Effects of N-acetyltransferase 2 on the serum concentration of isoniazid. *J Toxicol Sci* 2005; **33**: 187-195.
- Galvani S , Coatrieux C , Elbaz M , et al. Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives, Free Radicals. *Biol Med* 2008; **45**: 1457-1467.
- Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish bladder cancer study and meta-analyses. *Lancet* 2005; **366**: 649-659.
- Glowinski IB, Weber WW. Biochemical characterization of genetically variant aromatic amine N-acetyltransferases in A/J and C57BL/6J Mice. *J Biochem Chem* 1982. **70**: 1431-1437.
- Gorlewska-Roberts K, Green B, Fares M, Kaldubar FF. Carcinogen-DNA adducts in humans breast epithelial cells. *Env Mol Mutagen* 2002; **39**: 184-192.
- Grant DM, Tang BK, Kalow W. Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite. *Clin Pharmacol Ther* 1983a; **33**:355-359.
- Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1983b; **33**: 591-602.
- Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J clin Pharmacol* 1984; **17**:49-464.
- Grant DM, Morike K, Echelbaum M. Acetylation pharmacogenetics: the slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Clin Invest* 1990; **85**: 968-972.
- Grant DM, Blum M, Meyer B, Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferase a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol Pharmacol* 1991; **39**: 184-191.
- Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, Yu VL, Greawal R. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation research* 1997; **376**. 61-70.
- Grant DM. Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Current Drug Metabol* 2008; **9**: 465-476.
- Hazen SL. Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity, *J.Biol. Chem*2008; **283**: 15527-15531.

- Hansen AM, Wallin H, Binderup ML, et al. Urinary 1-hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark, *Mutat Res* 2004; **557**: 7-17.
- Hein DW, Masaharu H, Weber WW. An enzyme marker to ensure reliable determinations of human isoniazid acetylase phenotype in vitro. *Pharmacology* 1981; **23**:203-210.
- Hein DW, Smolen TN, Fox RR and Weber WW. Identification of genetically homozygous rapid and slow acetylators of drugs and environmental carcinogens among established inbred rabbit strains. *J Pharmacol. Exp Ther* 1982; **223**: 40-44.
- Hein DW, Trinidad A, Yerokun T, et al. Genetic control of acetyl coenzyme A-dependent arylamine N-acetyltransferase, hydrazine N-acetyltransferase, and N-hydroxy-arylamine O-acetyltransferase enzymes in C57BL/6J, AC57F1, and the rapid and slow acetylase A.B6 and B6.A congenic inbred mouse. *Drug Metab Dispos* 1988; **16**: 341-347.
- Hein DW, Rustan TD, Bucher KD, Martin WJ, Furman EJ. Acetylase phenotype-dependent expression of arylamine N-acetyltransferase isozymes in rapid and slow acetylase inbred rat liver. *Drug Metab Dispos* 1991; **19**: 933-937.
- Hein DW, Doll MA, Gay K, Rustan TD, Ferguson RJ. Metabolic activation of N-hydroxy-2-aminofluorene and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by NAT1 and NAT2 in colon cytosols of Syrian hamsters congenic at the NAT2 locus. *Cancer Res* 1993; **53**: 509-514
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Ferguson RJ. Metabolic activation of N-hydroxyarylamines by 16 recombinant human NAT2 allozymes. Effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res* 1995; **55**: 3331-3336.
- Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Detz AC, Feng Y, Jiang W, Rustan TD, Satran SL, Wilkie TR. Rodents models of the human acetylation polymorphism. Comparisons of recombinant acetyltransferases. *Mutation Res* 1997; **376**:101-106.
- Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb J, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y.(2000a). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biom Prev* 2000a; **9**: 29-42.
- Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2 : role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002a; **506**: 65-77.
- Hein DW. N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene* 2006a; **25**: 1649-1658.
- Hein DW, Fretland A, Doll MA. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. *Int J Cancer* 2006 b; **119**:1208-1211.
- Hein DW, Doll MA, Nerland DE and Fretland AJ. Tissue distribution of N-acetyltransferases 1 and 2 catalysing the N-acetylation of N-hydroxy-4-aminobiphenyl in the congenic rapid and slow acetylase Syrian hamster. *Mol Carcinog* 2006c; **45**: 230-238.

- Hein DW, Bendaly J, Neale JR and Doll MA. Systemic functional expression of N-acetyltransferase polymorphism in the F344 *Nat2* congenic rat. *Drug Metabol Dispos* 2008; **36**: 2452-59.
- Higuchi N, Tahara N, Tsukamoto K. NAT2*6A of the N-acetyltransferase 2 gene in Japanese patients with tuberculosis. *World J Gastro* 2007; **13**: 6003-6008.
- Huang CC, Chien WP, Wong RH, et al. NAT2 fast acetylator genotype and MGMT promoter methylation may contribute to gender difference in K-RAS mutation occurrence in Taiwanese colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen* 2009; **50**: 127-133.
- Hughes NC, Janezic SA, McQueen KL, Jewwett MAS, Castranio T, Bell DA, Grant DM. Identification and characterization of variant alleles of human acetyltransferase NAT1 with defective function using p-aminosalicylate as an in-vivo and in-vitro probe. *Pharmacogenetics* 1998; **8**:55-56.
- Husain A, Zhang X, Doll MA, et al. Identification of N-acetyltransferase 2 (NAT2) transcription start sites and quantitation of NAT2-specific mRNA in human tissues. *Drug Metab Dispos* 2007; **35**: 721-727.
- Ilett KF, Gastleden WM, Vandongen YK, et al. Acetylation phenotype and cytochrome P450IA2 phenotype are unlikely to be associated with peripheral arterial disease. *Clin. Pharmacol. Ther* 1993; **54**: 317-322.
- Izzotti A, Cartiglia C, Lewtas J, et al. Increased DNA alterations in atherosclerotic lesions of individuals lacking the GSTM1 genotype. *FASEB J* 2001; **15**:752-757.
- Izzotti A, Piana A, Minniti G, et al. Survival of atherosclerotic patients as related to oxidative stress and gene polymorphisms. *Mutat Res* 2007; **621**: 119-128.
- Jensen LE, Mitchell LE, Whitehead AS. Loss of function polymorphisms in NAT1 protect against spina bifida. *Hum Gen* 2006; **120**: 52-57.
- Ji Y and Gao S. Arylamine N-acetyltransferases: a new inhibitor of apoptosis in HepG2 cells. *J Zhejiang Univ Sci* 2008; **9**: 701-706.
- Jiang W, Feng Y and Hein DW. Higher DNA adduct levels in urinary bladder and prostate of slow acetylator inbred rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1999; **156**: 187-194.
- Johnson JA, Humma LM. Pharmacogenetics of cardiovascular drugs. *Briefing Func Genom Proteom* 2002; **1**: 66-79.
- Johnson N, Bell P, Sim E. Gene polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease. *BMC Med Genet* 2004; **5**: 6.
- Kaiser N, Neshet R, Donath MY, Fraenkel M, Behar V, Magnan C, Ktorza A, Cerasie E and Leibowitz G. *Psammomys obesus*, a model for environment-gene interactions in type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 137-144.

- Kaufmann GR, Wenk M, Taeschner W, Peterly B, Gyr K, Meyer UA, Heafeli WE. N-acetyltransferase 2 polymorphism in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **60**: 62-67.
- Kawamura A , Graham J , Mushtaq A , Tsiftoglou SA , Vath GM , P.E. Hanna , Wagner CR, Sim E. *Biochemical pharmacology* 2005. **69**: 347.
- Keating GA and Bogen KT. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; **802**: 127-133.
- Kennedy MJ, Abdel-Rahman SM, Kashuba AD, Leeder JS. Comparison of various urine collection intervals for caffeine and dextromethorphan phenotyping in children. *J Clin Pharm Org* 2004; **44**: 708-714.
- Kinscherf R and Deigner HP. Apoptogenic signal transduction in arteriosclerosis-associated cells – opportunities for future therapy? *Vascular Disease Prevention* 2008; **5**: 116-128.
- Kinzig-Schippers M, Tomatik-Scharte D, Scheidel AJ, Jacob V, Rodamer M, Cascorbi I, Sorgel OF, and Fuhr U. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**: 1733.
- Klebovich I, Arvela P, Pelkonen O. *J. Pharm . Biochem Anal* 1993. **11**: 1017.
- Kukongviriyapan V, Prawan A, Warashiha B. Arylamine N-acetyltransferase-2 genotypes in the Thai population. *J Clin Pharmacol* 2003; **55**: 278-281.
- Land SJ, Zukowsk K, Lee MS, Wang CY, King CW. Purification and characterization of a rat acetyltransferase that can metabolize aromatic amine derivatives. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1441-1449.
- Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson YM, Felton JS. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implication for research. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 39-52.
- Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson YM, Felton JS. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 39.
- Lechat P, Calvo F, Weber S. Pharmacologie médicale. Masson, Paris, 1990.
- Luca F, Bubba G, Basile M, et al. Multiple advantageous amine acid variants in the NAT2 gene in human populations. *Plos One* 2008; **3**.
- Lund AK , Lucero J, Lucas S, et al. Vehicular emissions induce vascular MMP-9 expression and activity associated with endothelin-1-mediated pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 511-517.
- Makarova SI, Vavilin VA , Lyakhovich VV, et al. Allele NAT2*5 determines resistance to bronchial asthma in children, *Bull Exp Biol Med* 2000; **129**: 575-577.
- Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants, *Toxicol Lett* 2001; **120**: 269-280.

- Martell KJ, Levy GN and Weber WW. Cloned mouse N-acetyltransferases: enzymatic properties of expressed Nat1 and Nat2 gene products. *Mol Pharmacol* 1992; **42**: 265-272.
- McGRATH M, Michaud D, De Vivo I. Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer* 2006; **6**:
- McQueen CA, Chau B, Erickson RP, Tjalkens RB and Philbert MA. The effects of genetic variation in N-acetyltransferases on 4-aminobiphenyl genotoxicity in mouse liver. *Chem Biol Interact* 2003; **146**: 51-60.
- Miller JA, Cramer JW, Miler EC. The N- and ring-hydroxylation of 2- acetylaminofluorene during carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1960; **20**: :950-962.
- Miller EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis. *Cancer Res* 1978; **38**: 1479-1496.
- .Minchin RF, Mojarrabi ME, Bett B. N and O-acetylationof aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human N-acetyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Common* 1992; **185**: 839-844.
- Minchin RF. Acetylation of p-aminobenzoylglutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine N-acetyltransferase and U937 cells. *Biochem J* 1995; **307**: 1-3.
- Minchin RF, Dupret JM, Butcher NJ. Arylamine N-acetyltransferase 1. *I JBCB* 2007.
- Moulin M, Coquerel. Pharmacologie. Masson, Paris, 2002.
- MurataK, Minoro H, Sugimoto K, Nakato T. A novel mechanism for drug-induced liver failure: inhibition of histone acetylation by hydralazine derivatives. *J Hepato* 2007; **46**: 322-329.
- Nakago S, Hadfield RM, Zondervan KT, et al. Association between endometriosis and N-acetyltransferase 2, polymorphisms in UK population. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 1079-1083.
- Niwa T, Shiraga T, Ohno Y, et al. Interindividual variability in 5-fluorouracil metabolism and procainamide N-acetyl ation in human liver cytosol, *Biol. Pharm. Bull* 2005; **28**: 1071-1074.
- Nyeki A. Caffeine metabolites :a new analytical method for the reappraisal of N-acetyltransferase 2, cytochrome P450 1A2 and xanthine oxidase phenotypc studies. Thèse de doctorat 2001.
- Ohsako S and Deguchi T. Cloning and expression of DNA for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferasesfrom human liver. *J Biol. Chem* 1990. **265**: 4630.
- Olivera M, Martinez C, Molina JA, et al. Increased frequency of rapid acetylator genotypes in patients with brain astrocytoma and meningioma. *Acta Neurol Scand* 2006; **113**:322-326.

- O'Neil WM, Drobitch RK, MacArthur RD, Farrough MJ, Doll MA, Fretland AJ, Hein DW, Crane LR, Svensson CK. Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: discordance between methods for phenotype determination and genotype. *Pharmacogenetics* 2000; **10**: 171-182.
- Ozawa S, Abu-Zeid M, Kawakubo Y, Toyama S, Yamazoe Y, Kato R. Monomorphic and polymorphic isozymes of arylamine N-acetyltransferase in hamster liver: purification of the isozymes and genetic basis of N-acetylation polymorphism. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 2137-2144.
- Palmer LI, Martin RC, Hein DW. Chemo preventive drug treatments in subjects with genetic predisposition to cancer. Prescriber liability and healthcare disparities. *Pharmacogenomics* 2004; **5**: 319-329.
- Parissis JT, Andreadou I, Bistola V, et al. Novel biologic mechanisms of levosimendan and its effect on the failing heart. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; **17**: 1143-1150.
- Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, et al. Traffic-related particles are associated with elevated homocysteine: the VA normative aging study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **178**: 283-289.
- Patin E, Hermant C, Kidd KK, et al. Sub-Saharan African coding sequence variation and haplotype diversity at the *NAT2* gene. *Hum Mutat* 2006; **27**: 720-730.
- Payton MA, Sim E. Genotyping human arylamine N-acetyltransferase type 1 (NAT1). *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 361-366.
- Preissner D, Krolli K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G. SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**: Database issue D237-D243
doi:10.1093/nar/gkp970
- Pompeo F, Brooke E, Kawumura A, Mushtaq A, Sim E. The pharmacogenetics of NAT: structural aspects. *Pharmacogenetics* 2002; **3**: 19-30.
- Rasmussen BB and Brossen K. *Therapeutic Drug Monitoring* 1996. **18**: 254.
- Rihs HP, John A, Bruning T. Concordance between the deduced acetylation status. *Clin Chim Acta* 2006; 240-243.
- Rodrigues-Lima F and Dupret JM. Regulation of the activity of the human drug metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1: role of genetic and non genetic factors. *Current Pharmacology Design* 2004; **10**: 1-3
- Rodriguez-Menocal L, Pham SM, Mateu D, et al. Aging increases p16 Ink4a expression in vascular smooth muscle cells. *Biosci Rep* 2009.
- Ross RE. Atherosclerosis: A defence mechanism gone awry. *Am. J. Pathol* 1993a; **143**: 987-1002.

- Ross RE. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993b; **562**: 801-809.
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, et al. Worldwide distribution of NAT2 diversity: Implication for NAT2 evolutionary history, *BMC Genetic* 2008; **27**: 9-21.
- Sasaki Y, Ohsako S, Deguchi T. Molecular and genetic analyses of arylamine N-acetyltransferase polymorphism of rabbit liver. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13243-13250.
- Schaaf HS, Parkin DP, Donald PR. Isoniazid pharmacokinetics in children. *Arch Dis Child* 2005; **90**: 614-618.
- Shafir E, Ziv E and Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (Spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil). *ILAR J* 2006; **47**: 212-224.
- Sharpless NE and Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov* 2006; **5**: 741-754.
- Shirai T, Nakamura A, Fukushima S, Yamamoto A, Tada M and Ito N. Different carcinogenic responses in a variety of organs, including the prostate, of five different rat strains given 3,2 - dimethyl-4-aminobiphenyl. *Carcinogenesis* 1999; **11**: 793-797.
- Sim E, Westwood I and Fullam E. Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin. Drug Metab.Toxicol* 2007; **3**: 169-184.
- Sim E, Walters K, Boukouvala S. Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Met Rev* 2008; **40**: 479-510.
- Sinclair JC, Delgoda R, Noble M.E.M, Jarmin S, Goh N.K, Sim E. Purification, characterization, and crystallization of an N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *Prot Exp Purif* 1998; **12**: 371-380.
- Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction : preclinical and clinical. 2008; 10: DOI: 101208/s12248-008-9037-4.
- Smith CAD, Wadelius M, Gough A, Harrison DJ, Wolf CR, Rane A. A simple assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J Med Genet* 1997; **34**: 78-760.
- Stabbert R, Schafer KH, Biefel C, Rustemeier K. Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; **17**: 2125-2132.
- Stanislawska SA, Jensen LE, Kealay C. Association between the NAT1 1095 C>A polymorphism and homocysteine concentration. *Am J Med Genet A* 2006; **140**: 2374-2377.
- Stanley LA, Copp AJ, Pope J, Rolls S, Smelt V, Perry VH and Sim E. Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase during mouse embryonic development and in adult mouse brain. *Teratology* 1998; **58**: 174-182.

- Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**: 9440–9445.
- Sugamori KS, Wong S, Gaedigk A, Yu V, Abramovici H, Rosemahel R and Grant DM. Generation and functional characterization of arylamine N-acetyltransferase *Nat1/Nat2* double-knockout mice. *Mol Pharmacol* 2003; **64**: 170-179.
- Tang BK, Grant DM, Kalow AW.(1983). Isolation and identification of 5-acetylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metab Disp* 1983; **11**: 218-219.
- Tureskey RJ. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 2002; **34**:625-650.
- Unal M , Tamer L, Doğruer ZN , et al. N- acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *Laryngoscope* 2005; **115**: 2238-2241.
- Ungar H and Adler JH. The histogenesis of hepatoma occurring spontaneously in a strain of sand rats (*Psammomys obesus*). *Am J Pathol* 1978; **90**: 399-410.
- Ungar H and Adler JH. Naturally occurring polypoid hyperplasia and papilloma in gallbladders of the fat sand rat (*Psammomys obesus*). *Vet Pathol* 1982; **19**: 230-238.
- Van Eyken E, Van Camp G, Fransen E, et al. Contribution of the N- acetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing impairment. *J Med Genet* 2007; **44**: 570-578.
- Vaziri SA, Hughes NC, Sampson H, Darlington G, Jewett MAS, Grant DM. Variation in enzymes of arylamine procarcinogen biotransformation among bladder cancer patients and control subjects. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 7-20.
- Vincent-Viry M, Silva Pontes ZBV, Gueguen R, Galteau MM, Siest G. Segregation analyses of four urinary caffeine metabolite ratios implicated in the determination of human acetylation phenotypes. *Genetics Epidemiol* 1994; **11**: 115-129.
- von Schmiedeberg S , Fritsche E , Rönna AC et al. Polymorphisms of the xenobiotic metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 1999; **455**: 147-152.
- Wakefield L, Cornish V, Long H, Griffiths WJ and Sim E. Deletion of a xenobiotic metabolizing gene in mice affects folate metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **21**: 556-560.
- Wakefield L, Cornish V, Long H, Kawamura A, Zhang X, Hein DW and Sim E. Mouse arylamine N-acetyltransferase 2 (*Nat2*) expression during embryogenesis: a potential marker for the developing neuroendocrine system. *Biomarkers* 2008a; **13**: 106-118.
- Wakefield L, Robinson J, Long H, Ibbitt JC, Cooke S, Hurst HC and Sim E. Arylamine N-acetyltransferase 1 expression in breast cancer cell- lines: a potential marker in oestrogen positive tumours. *Genes Chromosomes Cancer* 2008b; **47**: 118-126.

- Walraven AJ, Doll MA and Hein DW. Identification and characterization of functional rat arylamine N-acetyltransferase 3: comparisons with rats arylamine N-acetyltransferases 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **319**: 369-375.
- Walraven JM, Trent JO, Hein DW. Structure/Function evaluation of NAT1. *Curr Drug Metab* 2008a; **40**:169-184.
- Walraven JM, Trent JO, Hein DW. Structure/Function evaluation of NAT2. *Curr Drug Metab* 2008b **9**: 471-486.
- Ward A, Summer MJ and Sim E. Purification of recombinant human N-acetyltransferase type 1 (NAT1) expressed in E.coli and characterization of the potential role in folate metabolism. *Biochem Pharmacol* 1995; **49**: 1759-1767.
- Ware JA, Svensson CK. Longitudinal distribution of arylamine N-acetyltransferase in the intestine of the hamster, mouse, an rat. Evidence for multiplicity of N-acetyltransferase in the intestine. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 1613-1620.
- Weber WW and King CM. (1981). N-acetyltransferase and arylhydroxamic acid acetyltransferase. *Methods in enzymology* 1981; **77**: 272-281.
- Weber WW and Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 1985; **37**: 25-79.
- Weber WW, Vatsis KP. Individual variability in p-aminobenzoic acid N-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. *Pharmacogenetics* 1993; **3**: 209-212.
- Westwood IM, Kawamura A, Fullam E, Russell AJ Davies SG and Sim E. Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Curr. Top. Med. Chem* 2006; **6**: 1641-1654.
- Whitley E and Ball J. Statistics review 4: Sample size calculations. *Critical Care* 2002; **6**: 335-341.
- Wilson C, Brown D, Najarian K, Hanley EN and Gruber HE. Computer aided vertebral visualization and analysis: a methodology using the sand rat, a small animal model of disc degeneration. *BMC Musculoskeletal Disord* 2003; **4**: 1-10.
- Windmill KF, Gaedigk A, Hall PM, et al. Localization of N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues, *Toxicol Sci* 2000; **54**: 19-29.
- Witztum JL, and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J Clin Invest* 1991; **88**:1785-1792.
- Wu H, Tempel W, Grant DM. *J Biol Chem* 2007; **282**: 30189-30193.
- Zaher H, Svensson CK. Glucocorticoid induction of hepatic arylamine N- acetyl transferase activity in the rat. *Chem Pathol Pharmacol* 1994; **83**: 195-208.

Zang Y, Doll MA, Hein DW. Functional characterization of genetic polymorphisms in NAT2. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 37-45.

Zhang X, Lambert JC, Doll MA, Walraven JM, Arteel GE and Hein DW. 4,4-methylenedianiline-induced hepatotoxicity is modified by N-acetyltransferase 2 (NAT2) acetylator polymorphism in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**: 289-294.

Website

<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>

ANNEXES

Annexe 1

Tableau A. Mutations nucléotidiques de *NAT1*, allèles correspondants et phénotype (d'après Hein et al. 2007)

Allèle <i>NAT1</i>	Changement de nucléotides et le rs identifiant	Changement d'acides aminés	Phénotype
<i>NAT1</i> *4	référence	référence	rapide
<i>NAT1</i> *3	1095A>A (rs15561)		Equivalent à <i>NAT1</i> *4
<i>NAT1</i> *5	350,351 G>C 497-499 G>C 884A>G Δ^{976} Δ^{1105}	R117T R166T ; E167Q	ND
<i>NAT1</i> *10	1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561)		Plus élevé que <i>NAT1</i> *4
<i>NAT1</i> *11A	-344C>T 40A>T 445G>A (rs4987076) 459G>A (rs4986990) 640T>A (rs4986783) Δ^9 entre 1065-1090 1095C>T (rs15561)	V1491 T153T(synonyme) S214A	Plus élevé que <i>NAT1</i> *4
<i>NAT1</i> *11B	-344C>T 40A>T 445G>A (rs4987076) 459G>A (rs4986990) 640T>A (rs4986783) Δ^9 entre 1065-1090	V1491 T153T(synonyme) S214A	Plus élevé que <i>NAT1</i> *4
<i>NAT1</i> *11C	-344C>T 40A>T 459G>A (rs4986990) 640T>A (rs4986783) Δ^9 entre 1065-1090 1095C>T (rs15561)	T153T(synonyme) S214A	ND
<i>NAT1</i> *14A	560G>A (rs4986782) 1088T>A (rs1057126) 1095C>T (rs15561)	R187Q	lent
<i>NAT1</i> *14B	560G>A (rs4986782)	R187Q	lent
<i>NAT1</i> *15	559C>T (rs5030839)	R187Stop	lent
<i>NAT1</i> *16	[AAA] immédiatement après 1091 1095C>T (rs15561)		ND
<i>NAT1</i> *17	190C>T	R64W	lent
<i>NAT1</i> *18A	Δ^3 entre 1065-1087 1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561)		ND
<i>NAT1</i> *18B	Δ^3 entre 1065-1087		ND
<i>NAT1</i> *19	97C>T	R33Stop	Lent
<i>NAT1</i> *20	402T>C	P134P (synonyme)	Equivalent à <i>NAT1</i> *4

<i>NAT1*21</i>	613A>G	M205V	Equivalent à <i>NAT1*4</i>
<i>NAT1*22</i>	752A>T	D251V	lent
<i>NAT1*23</i>	777T>C	S259S(synonyme)	Equivalent à <i>NAT1*4</i>
<i>NAT1*24</i>	781G>A	E261K	Equivalent à <i>NAT1*4</i>
<i>NAT1*25</i>	787A>G	I263V	Equivalent à <i>NAT1*4</i>
<i>NAT1*26A</i>	[TAA] insertion entre 1065 et 1090 1095C>A (rs15561)		ND
<i>NAT1*26B</i>	[TAA] insertion entre 1065 et 1090		ND
<i>NAT1*27</i>	21T>G(rs4986992) 777T>C (rs4986991)	L7L (synonyme) S259S (synonyme)	Equivalent à <i>NAT1*4</i>
<i>NAT1*28</i>	[TAATAA]deletion entre 1065-1090		ND
<i>NAT1*29</i>	1088T>A (rs1057126) 1095C>A(rs15561) Δ^{1025}		ND

ND = non déterminé

Annexe 2

Tableau B. Mutations de NAT2, allèles correspondants et phénotype (d'après Hein et al. 2008)

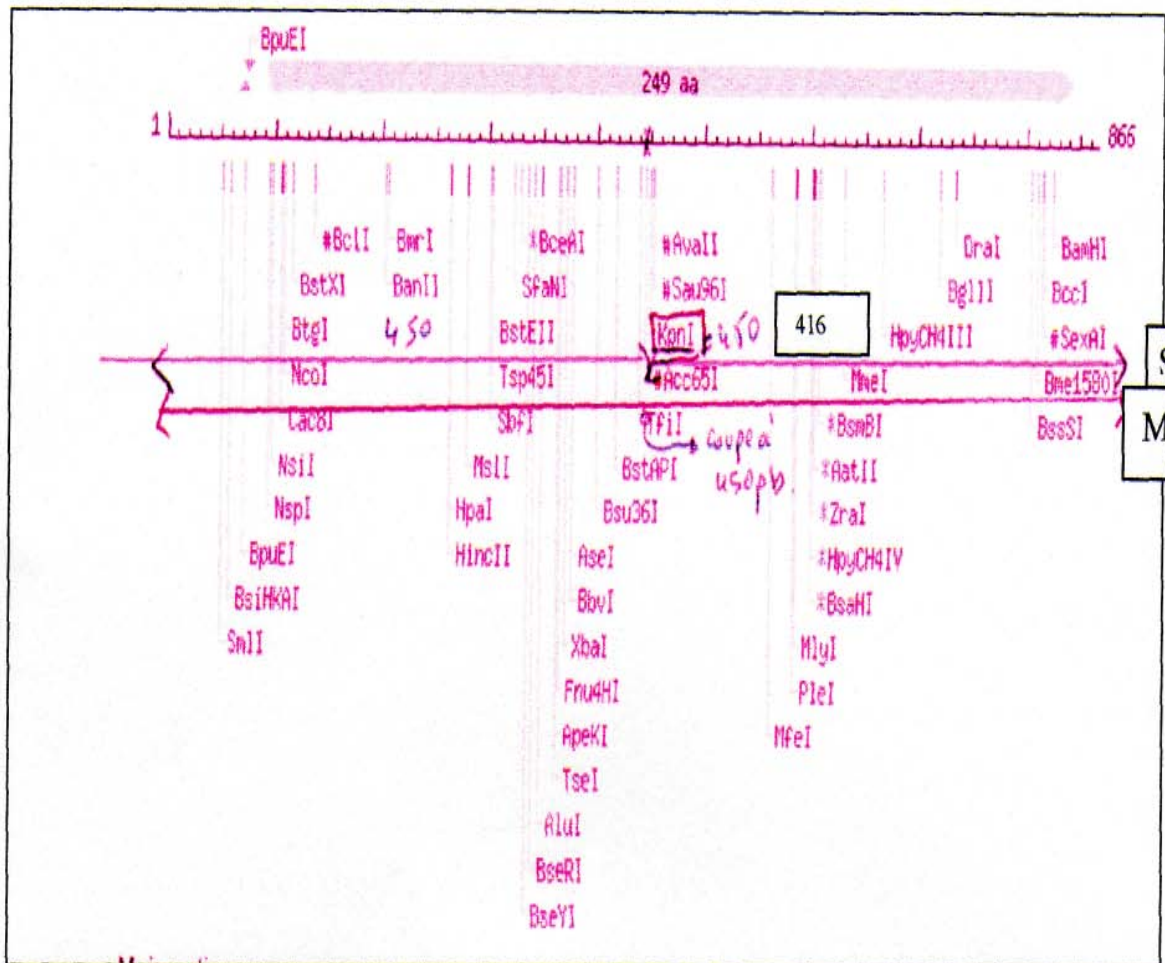
Allèle NAT2	Changement nucléotidique et rs identifiant	Changement d'acides aminés	phénotype
NAT2*4	référence	référence	Rapide
NAT2*5A	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929)	I114T L161L (synonyme)	Lent
NAT2*5B	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	I114T L161L (synonyme) K268R	Lent
NAT2*5C	341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208)	I114T K268R	Lent
NAT2*5D	341T>C (rs1801280)	I114T	Lent
NAT2*5E	341T>C (rs1801280) 590G>A	I114T R197Q	Lent
NAT2*5F	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 759C>T 803A>G (rs1208)	I114T L161L (synonyme) V253V (synonyme) K268R	Lent
NAT2*5G	282C>T 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	Y94Y (synonyme) I114T L161L (synonyme) K268R	Lent
NAT2*5H	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 859Del	I114T L161L (synonyme) K268R S287Frameshift	Lent
NAT2*5I	341T>C (rs1801280) 411A>T (rs4986997) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	I114T L137F L161L (synonyme) K268R	Lent
NAT2*5J	282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930)	Y94Y (synonyme) I114T R197Q	Lent
NAT2*5K	282C>T (rs 1041983) 341T>C (rs1801280)	Y94Y (synonyme) I114T	Lent
NAT2*5L	70T>A 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	L24I I114T L161L (synonyme) K268R	Lent
NAT2*5M	341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 838G>A	I114T L161L (synonyme) K268R V289M	Lent

<i>NAT2*6A</i>	282C>T (rs 1041983) 590G>A (rs1799930)	Y94Y (synonyme) R197Q	Lent
<i>NAT2*6B</i>	590G>A (rs1799930)	R197Q	Lent
<i>NAT2*6C</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	Y94Y (synonyme) R197Q K268R	Lent
<i>NAT2*6D</i>	111T>C 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	F37F (synonyme) R197Q K268R	Lent
<i>NAT2*6E</i>	481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930)	L161L (synonyme) R197Q	Lent
<i>NAT2*6F</i>	590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208)	R197Q K268R	Lent
<i>NAT2*6G</i>	282C>T (rs1041983) 518A>G 590G>A (rs1799930)	Y94Y (synonyme) K173R R197Q	Lent
<i>NAT2*6H</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 766A>G	Y94Y (synonyme) R197Q K256E	Lent
<i>NAT2*6I</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 838G>A 857G>A (rs1799931)	Y94Y (synonyme) R197Q V280M G286E	Lent
<i>NAT2*6J</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931)	Y94Y (synonyme) R197Q G286E	Lent
<i>NAT2*6K</i>	282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 638C>T	Y94Y (synonyme) R197Q P213L	Lent
<i>NAT2*6L</i>	282C>T (rs1041983) 345C>T 590G>A (rs1799930)	Y94Y (synonyme) D115D (synonyme) R197Q	Lent
<i>NAT2*7A</i>	857G>A (rs1799931)	G286E	Lent
<i>NAT2*7B</i>	282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931)	Y94Y (synonyme) G286E	Lent
<i>NAT2*10</i>	499G>A	E167K	Lent
<i>NAT2*11A</i>	481C>T (rs1799929)	L161L (synonyme)	rapide
<i>NAT2*11B</i>	481C>T (rs1799929) 859 Del	L161L (synonyme) S287Frameshift	ND
<i>NAT2*12A</i>	803A>G (rs1208)	K268R	rapide
<i>NAT2*12B</i>	282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208)	Y94Y (synonyme) K268R	rapide
<i>NAT2*12C</i>	481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	L161L (synonyme) K268R	rapide
<i>NAT2*12D</i>	364G>A (rs4986996) 803A>G (rs1208)	D122N K268R	Lent
<i>NAT2*12E</i>	282C>T (rs1041983) 578C>T 803A>G (rs1208)	Y94Y (synonyme) T193M K268R	Rapide
<i>NAT2*12F</i>	622T>C 803A>G (rs1208)	Y208H K268R	Rapide

<i>NAT2*12G</i>	609G>T 803A>G (rs1208)	E203D K268R	Rapide
<i>NAT2*12H</i>	403C>G 803A>G (rs1208)	L135V K268R	Rapide
<i>NAT2*13A</i>	282C>T (rs1041983)	Y94Y (synonyme)	rapide
<i>NAT2*13B</i>	282C>T (rs1041983) 578C>T	Y94Y (synonyme) T193M	Rapide
<i>NAT2*14A</i>	191G>A (rs1801279)	R64Q	Lent
<i>NAT2*14B</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983)	R64Q Y94Y (synonyme)	Lent
<i>NAT2*14C</i>	191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	R64Q I114T L161L (synonyme) K268R	Lent
<i>NAT2*14D</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	R64Q Y94Y (synonyme) R197Q	Lent
<i>NAT2*14E</i>	191G>A (rs1801279) 803A>G (rs1208)	R64Q K268R	Lent
<i>NAT2*14F</i>	191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208)	R64Q I114T K268R	Lent
<i>NAT2*14G</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930)	R64Q Y94Y (synonyme) R197Q	Lent
<i>NAT2*14H</i>	191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 683C>T	R64Q Y94Y (synonyme) P228L	Lent
<i>NAT2*14I</i>	191G>A (rs1801279) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208)	R64Q L161L (synonyme) K268R	Lent
<i>NAT2*17</i>	434A>C	Q145P	Lent
<i>NAT2*18</i>	845A>C	K282T	Rapide
<i>NAT2*19</i>	190C>T (rs1805158)	R64W	Lent

Annexe 3. Exemple d'enzymes de restriction coupant sur des sites polymorphes de NAT2

- Enzyme KpnI (coupe au niveau du point polymorphe 481C>T)



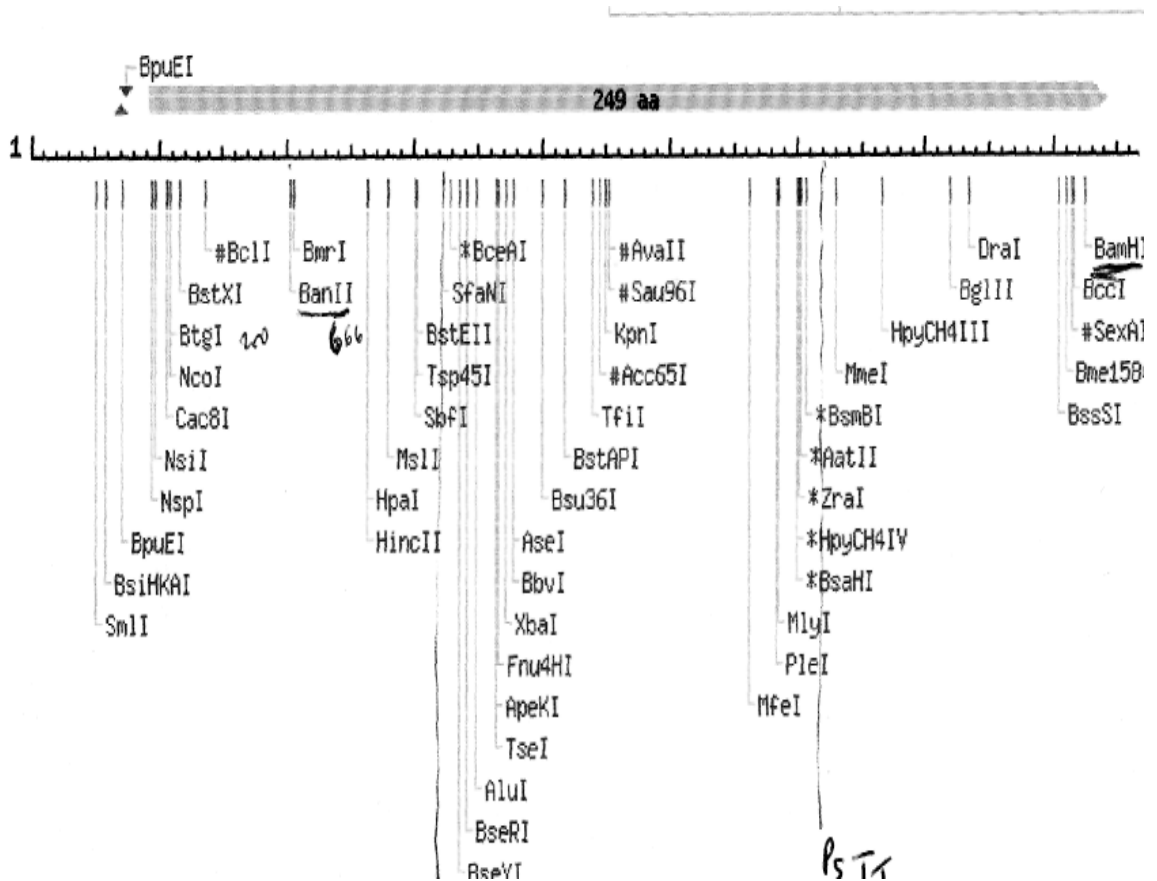
KpnI coupe sur le site polymorphe 481C>T qui correspond sur le schéma à la position 450 (1 sur le schéma correspond à la position -31 du A de la transcription du premier codon dans la séquence).

Les fragments obtenus : le type sauvage (S) : 450+416

Le type muté (M) : 866

Annexe 3 : suite

- Enzyme BamHI (coupe au niveau du point polymorphe 857G>A)



Taille du fragment : 866pb

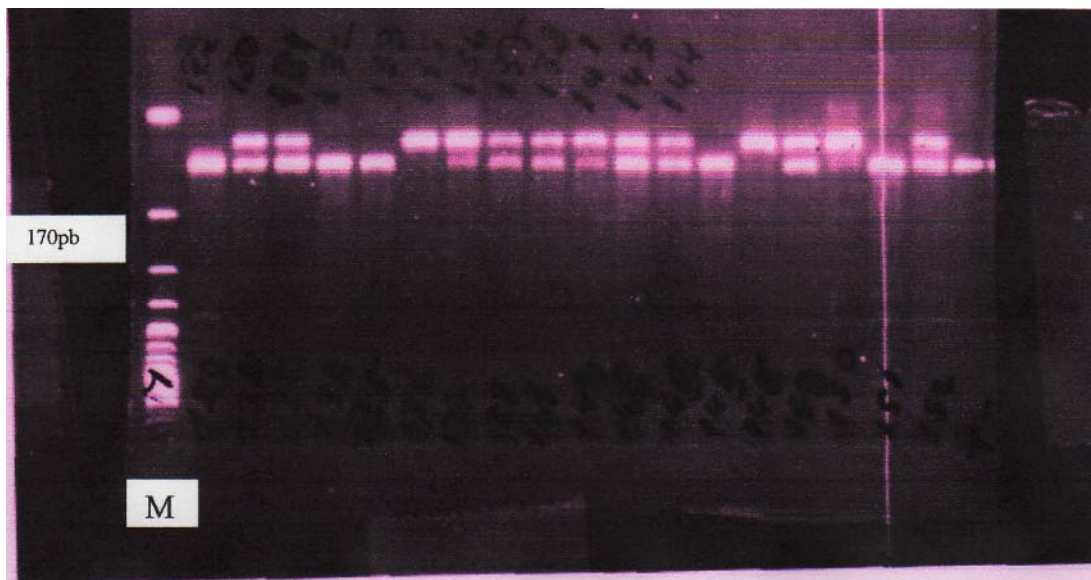
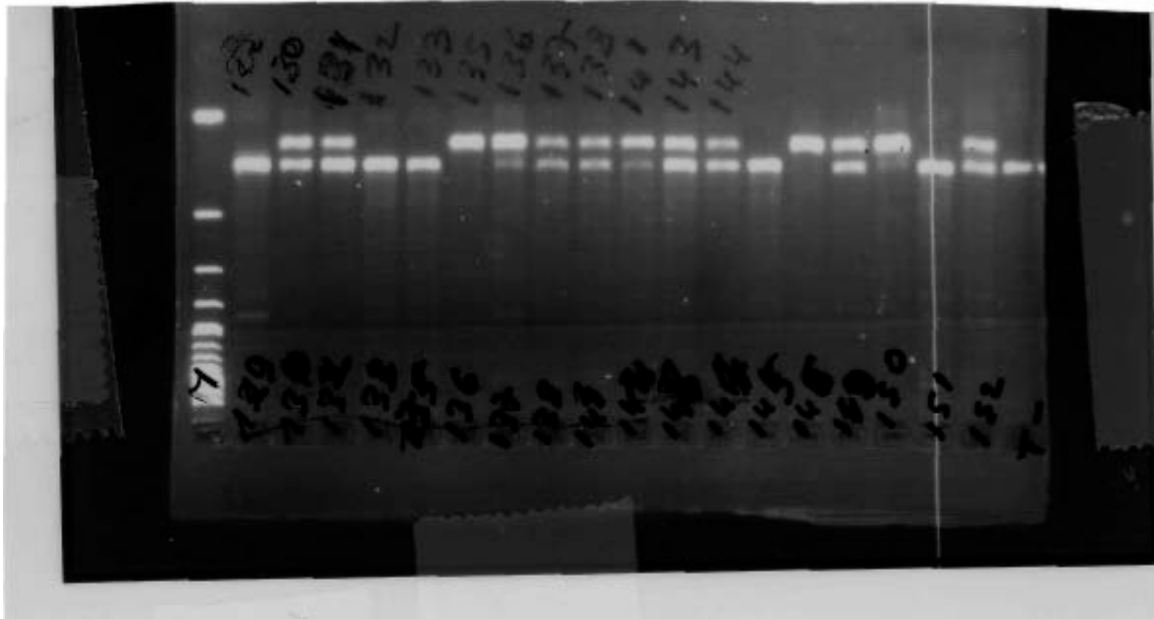
BamHI sur le site polymorphe 857G>A qui correspond sur le schéma à la position 826 (1 sur le schéma correspond à la position -31 du premier codon codant (ATG))

Les fragments obtenus : le type sauvage : $826+40=866$

Le type muté : 866

Annexe 4

Exemple d'un profil electrophorétique après action de l'enzyme de restriction AccI



M = Marqueur de poids moléculaire

Annexe 5 : Résultats de la caféine

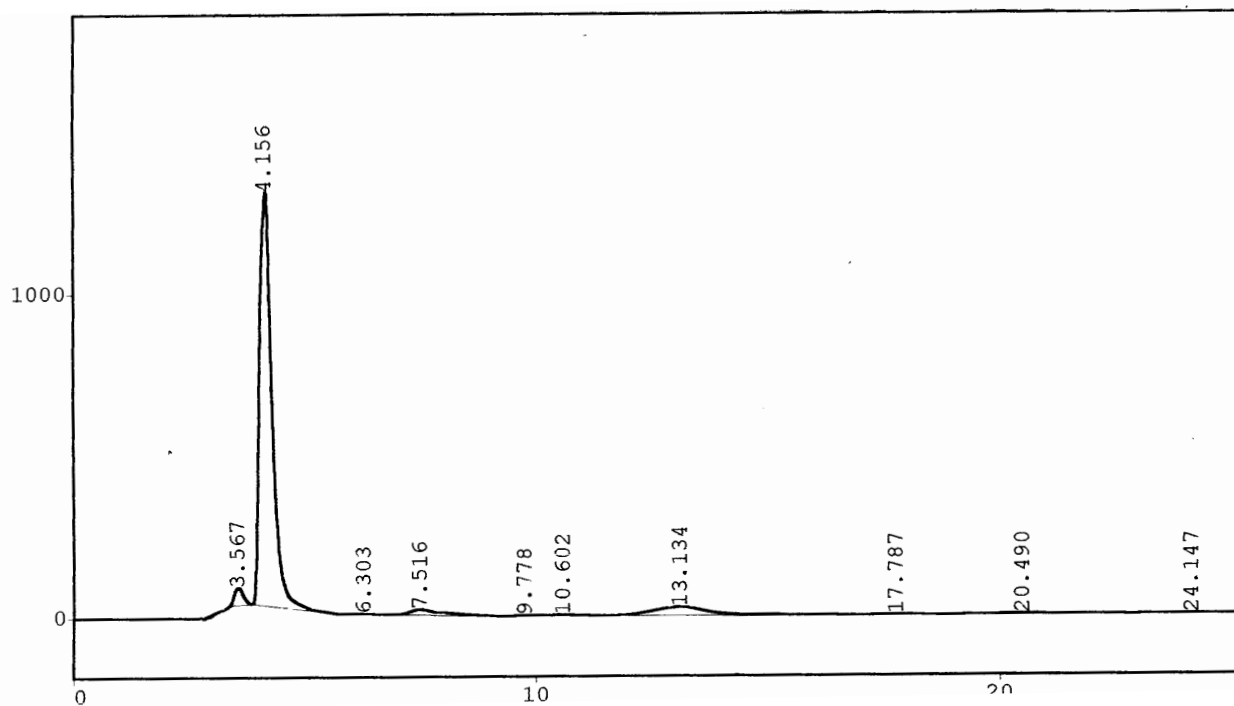


Figure 1a

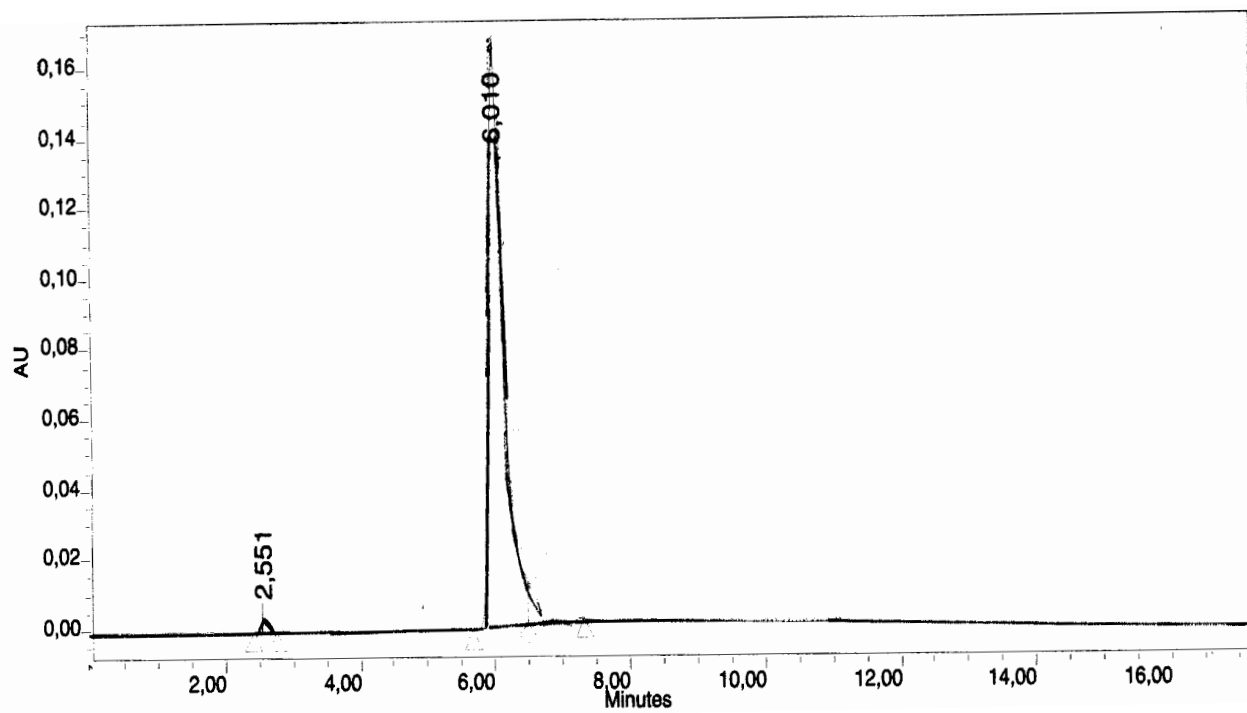


Figure 1b :

Annexe 5 : Résultats de la caféine (suite)

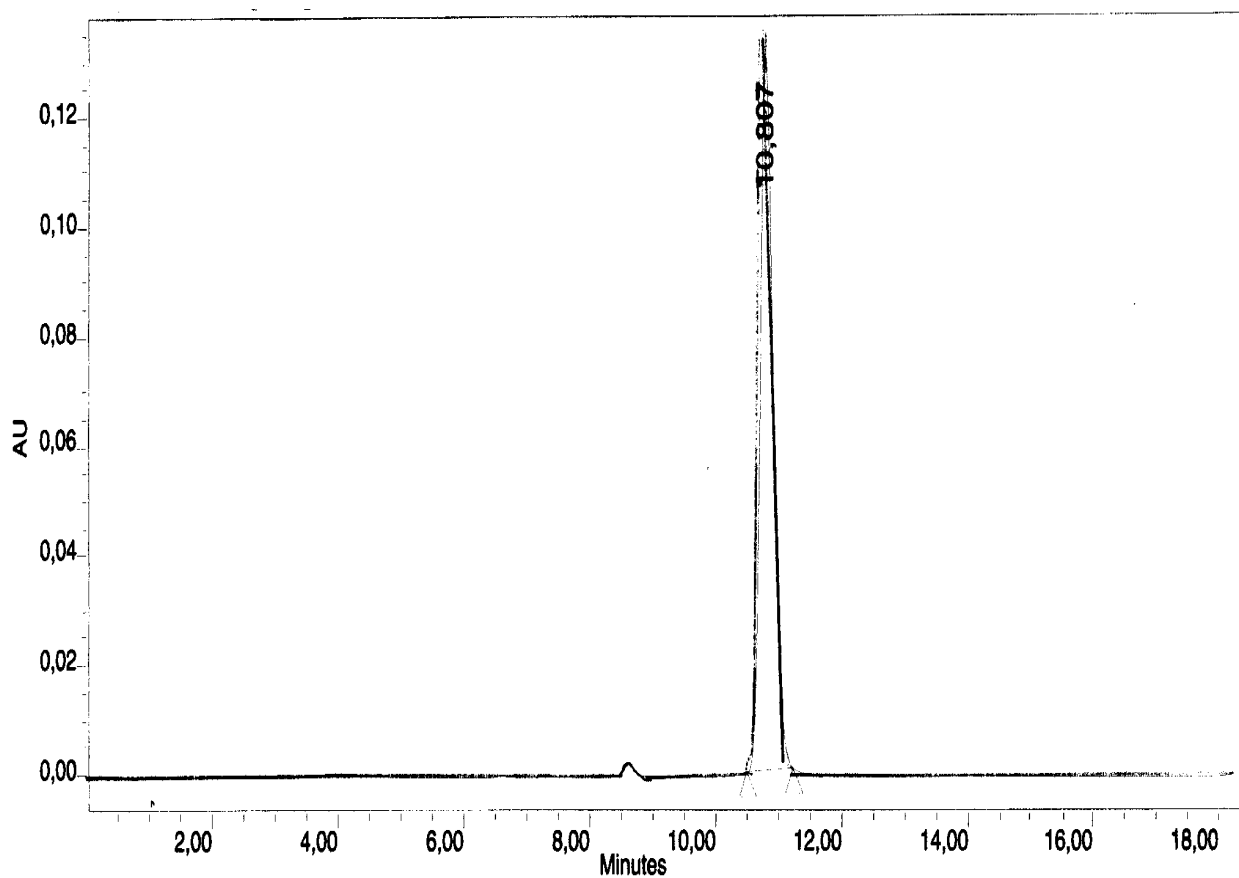


Figure 1c

Figure 1. Chromatogramme montrant la spécificité de la méthode (1a : AFMU ; 1b : 1X; 1d : Standard interne)

Annexe 6

Courbes étalons des métabolites de la caféine

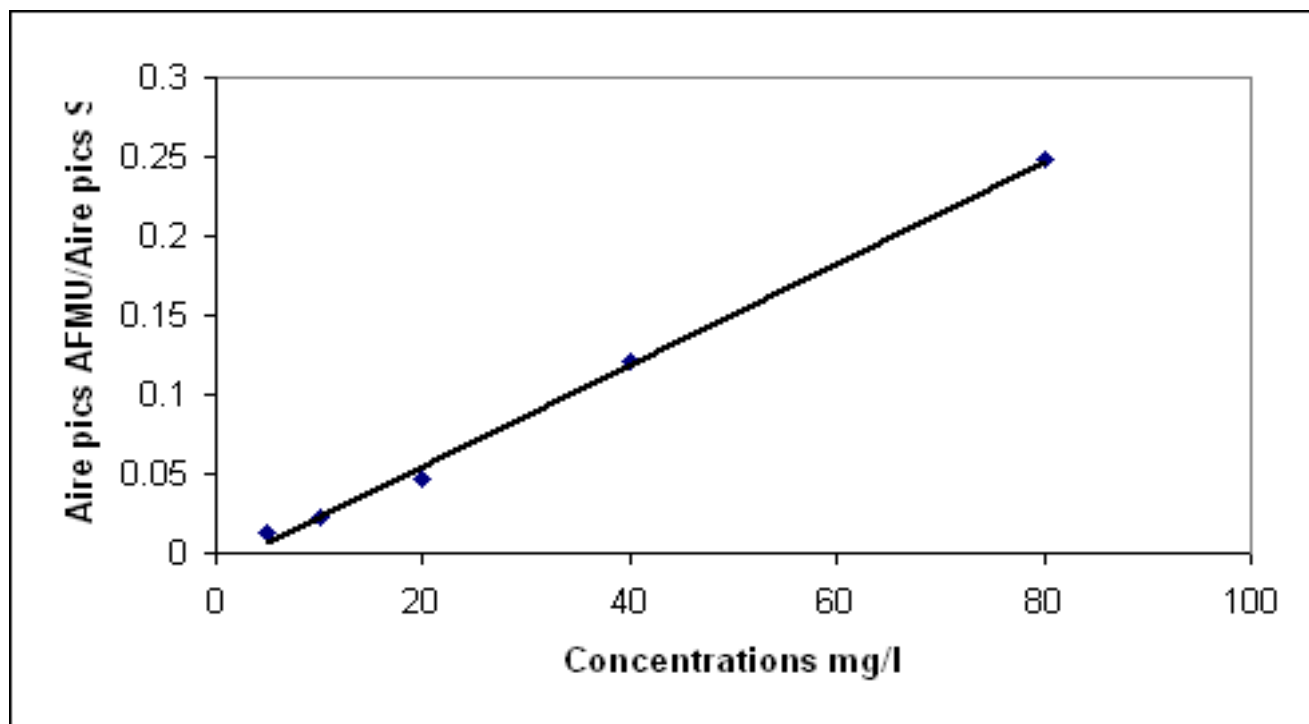


Figure 2a. Courbe étalon de l'AFMU

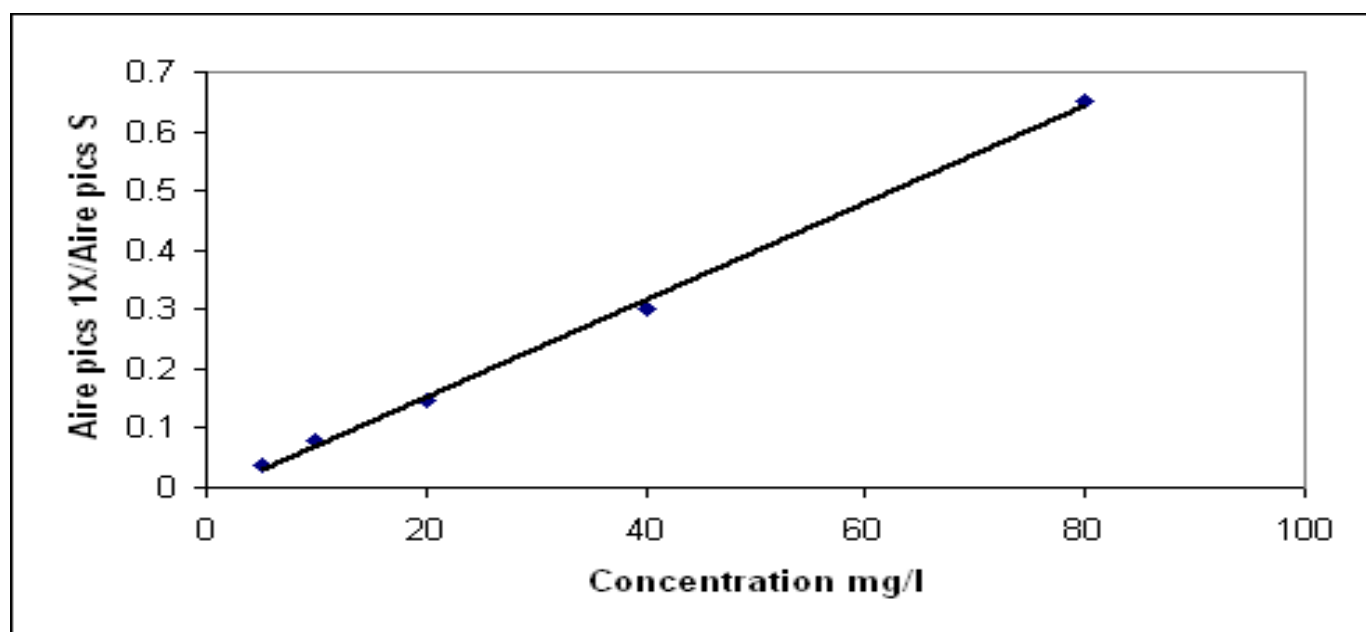


Figure 2b : Courbe étalon du 1X

Annexe 7

Tableau 1. Fidélité intermédiaire

	Concentrations introduites mg/l									
	10		15		30		50		75	
Substances	Moy (mg/l) ± SD	CV(%)	Moy (mg/l) ± SD	CV(%)	Moy± (mg/l) SD	CV(%)	Moy± (mg/l) SD	CV(%)	Moy± (mg/l) SD	CV(%)
AFMU	10,56 ± 0,26	2.46	15,58 ± 0,38	2,43	30,56 ± 0,7	2,29	50,82 ± 2,02	3,97	75,78 ± 3,02	3,98
1X	10,66 ± 0,33	3	15,63 ± 0,55	3,2	30,58 ± 0,91	2,97	50,67 ± 2,92	5,77	75,81 ± 4,01	5,29

Tableau 2 : Concentrations mesurées et concentrations introduites de l'AFMU et du 1X

Concentrations[C] de l'AFMU introduites (mg/l)	Moy ± SD des [C] calculées de l'AFMU	CV (%)	Concentrations[C] du 1X introduites (mg/l)	Moy ± SD des [C] calculées du 1X	CV (%)
5	5.62 ± 0.13	2.20	5	4.64± 0.28	6
10	10.10 ± 0.29	2.90	10	10.92±0.26	2.37
20	20.17 ± 0.31	1.53	20	19.62±0.57	2.9
40	40.28 ± 0.94	2.33	40	40.38±1.05	2.6
50	86.55 ± 2.04	2.36	80	80.84± 1.1	1.36

Annexe 8

Tableau 3 : Aires des pics de l'AFMU et du 1X ; rapports ; et concentrations (mg/l)

Essais	Aire de l'AFMU	Rapport Aire AFMU /Aire SI	Tr AFMU (min)	[AFMU] (mg/l)	Aire du 1X	Rapport Aire1X/ Aire SI	Tr 1X (min)	[1X] (mg/l)
1	2736610	0.022	4.32	9.69	86796022	0.71	6.76	88.34
2	893456	0.007	4.15	5	1276881	0.104	6.53	13.99
3	4155267	0.034	1.27	13.43	31783325	0.261	6.79	33.12
4	6634	0.000054	4.00	2.82	278855	0.002	6.48	1.47
5	8188552	0.067	4.59	23.75	83669442	0.69	6.72	85.89
6	22817798	0.18	4.04	59.06	28547724	0.23	6.58	29.45
7	3125	0.000026	3.99	2.82	36685109	0.33	6.47	38.23
8	14245567	0.12	4.12	40.31	8115589	0.067	6.69	9.45
9	4112243	0.034	4.19	13.43	1559985	0.013	6.71	2.82
10	13066232	0.107	4.21	36.25	149985779	1.23	6.77	152.15
11	9816778	0.081	4.15	2.89	8327798	0.068	6.78	9.57
12	1160736	0.009	4.11	5.63	7788928	0.064	6.76	9.10
13	15987754	0.131	4.13	43.75	28898966	0.24	6.51	30.67
14	9299882	0.076	4.42	26.56	2788979	0.023	6.07	4.05
15	31885576	0.26	3.99	84.04	319889778	2.63	6.54	323.93
16	7432151	0.061	4.16	21.88	8524987	0.7	6.51	87.12
17	4321566	0.036	4.24	14.06	71554819	0.59	6.49	73.62
18	15233458	0.125	4.34	41.88	18995327	0.156	6.62	20.37

Tableau 4. Indices d'acétylation de la caféine obtenus à partir des résultats

Essais	[AFMU] (mg/l)	[1X] (mg/l)	[AFMU]/ [1X]	log [AFMU]/ [1X]
1	9.69	88.34	0.109	-0.96
2	5	13.99	0.36	-0.44
3	13.43	10.12	1.32	0.12
4	2.82	1.47	.41	-0.39
5	23.75	85.89	0.28	-0.55
6	59.06	29.45	2	0.3
7	2.82	38.23	0.074	-1.13
8	40.31	9.45	4.27	0.63
9	13.43	2.82	4.76	0.68
10	36.25	152.15	0.24	-0.62
11	2.89	9.57	0.29	-0.54
12	9.10	5.63	1.62	0.21
13	43.75	30.67	1.43	0.16
14	26.56	4.05	6.55	0.82
15	84.04	323.93	0.26	-0.58
16	21.88	87.12	0.25	-0.6
17	14.06	73.62	0.19	-0.72
18	41.88	20.37	2.06	0.31

Annexe 9 : Résultats de l'INH

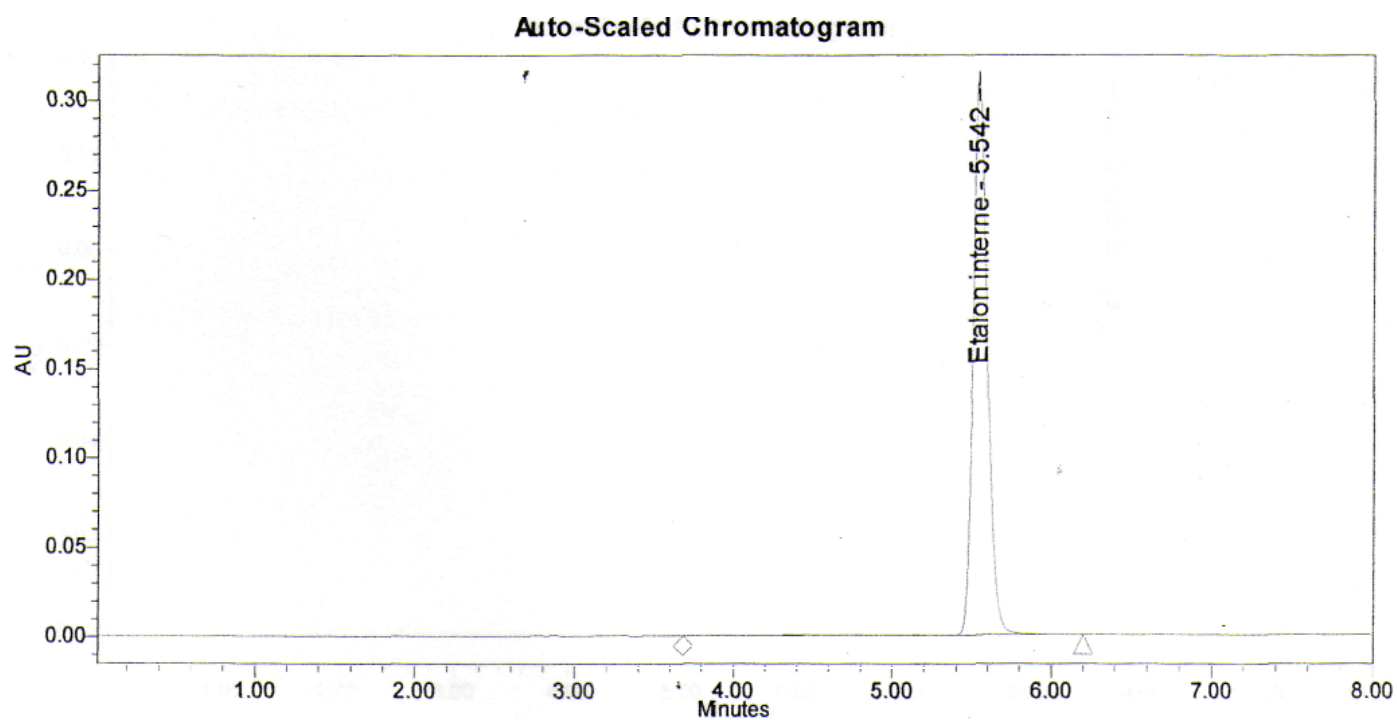


Figure 3a

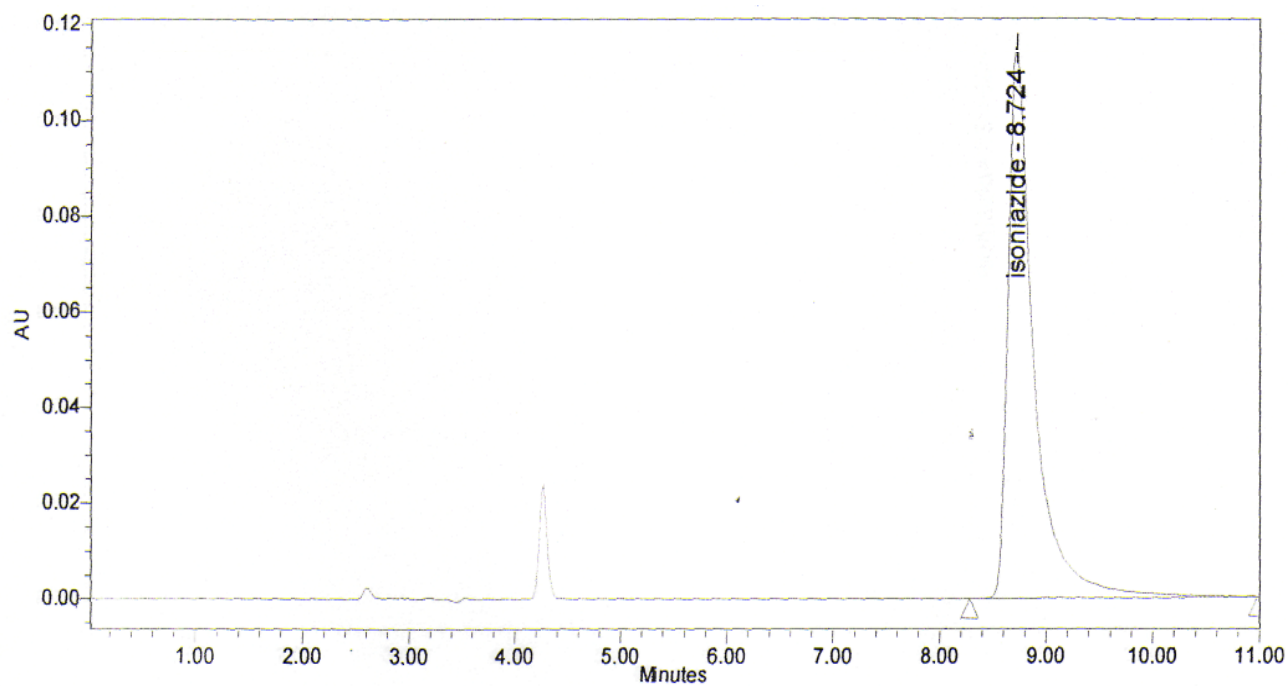


Figure 3b

Figure 3. Spécificité

Annexe 10 : Résultats de l'INH (Suite)

Tableau 5. Concentrations de l'INH et AcINH

Essais	Rapport Aire INH/ Aire SI	[INH] (mg/l)	Rapport Aire AcINH/ Aire SI	[AcINH] (mg/l)
1	7,218	426,60	0,047	0,068
2	1,709	101,25	0,221	0,444
3	5,171	305,75	0,010	0,084
4	3,07	71	1,62	1,52
5	6,759	1,25	0,188	33,64
6	1,138	399,45	0,166	0,100
7	6,707	67,65	2,349	3,53
8	2,99	396,45	0,089	0,083
9	1,32	36,30	0,96	0,34
10	1,06	14,70	0,068	0,05
11	7,13	11,10	2,37	3,51
12	0,87	87,00	0,49	0,07
13	3,66	90,00	0,066	0,008
14	1,05	42,00	1,87	0,75
15	3,98	10,50	0,058	0,057
16	0,45	46,70	0,060	0,013
17	7,4	3,60	1,37	6,11
18	1,50	90,00	0,108	0,018
19	1,69	16,80	0,196	0,18
20		19,50	0,41	0,26

Annexe 10. Résultats de l'INH (Suite)

Tableau 6. Valeurs des concentrations et log ([Ac-INH]/ [INH])

Malades	[INH] mg/l	[Ac-INH] mg/l	[Ac-INH]/ [INH]	log ([Ac-INH]/ [INH])
1	426,60	29,20	0,068	-1,17
2	101,25	45,05	0,444	-0, 35
3	305,75	25,8	0 ,084	-1,08
4	2,40	85	35	1.55
5	1,25	42 ,05	33,64	1,53
6	399,45	39,90	0,100	-1
7	67,65	238,65	3,53	0,55
8	396,45	33	0,083	-1,08
9	36 ,30	12,40	0,34	-0,47
10	14,70	0,80	0,05	-1,30
11	11,10	39,00	3,51	0,55
12	87,00	6,10	0,07	-1,15
13	90,00	0,70	0,008	-2,10
14	42,00	31,80	0,75	-0,12
15	10,50	0,60	0,057	-1,24
16	46,70	0,60	0,013	-1,89
17	3,60	22	6,11	0,79
18	90,00	1,70	0,018	-1,74
19	16,80	3,00	0,18	-0,74
20	19,50	5,00	0,26	-0,59

Annexe 11 : Résultats du PAS

Tableau 7. Valeurs de l'indice d'acétylation logAcPAS/PAS

N°Individus	DO1	DO2	DO2-DO1	DO2-DO1/DO1	log AcPAS/PAS
1	0.58	0.34	0.24	0.71	-0.15
2	0.43	0.25	0.18	0.71	-0.15
3	0.11	0.05	0.06	1.2	0.08
4	0.87	0.49	0.38	0.78	-0.11
5	0.76	0.48	0.28	0.58	-0.24
6	0.87	0.75	0.12	0.16	-0.80
7	0.61	0.34	0.27	0.79	-0.10
8	0.79	0.55	0.24	0.44	-0.36
9	0.81	0.51	0.30	0.59	-0.23
10	0.48	0.28	0.20	0.71	-0.15
11	0.52	0.35	0.17	0.49	-0.31
12	0.86	0.65	0.21	0.32	-0.49
13	0.86	0.52	0.34	0.65	-0.19
14	0.77	0.43	0.34	0.79	-0.10
15	0.77	0.51	0.26	0.51	-0.29
16	0.91	0.66	0.25	0.38	-0.42
17	0.82	0.46	0.36	0.79	-0.10
18	0.78	0.52	0.26	0.46	-0.34
19	0.49	0.32	0.17	0.53	-0.28
20	0.87	0.47	0.40	0.85	-0.07
21	0.70	0.63	0.07	0.11	-0.96
22	0.80	0.55	0.25	0.45	-0.35
23	0.52	0.50	0.02	0.04	-1.40
24	0.88	0.61	0.27	0.44	-0.36
25	0.54	0.36	0.18	0.50	-0.30
26	0.61	0.57	0.04	0.07	-1.16
27	0.81	0.73	0.08	0.11	-0.95
28	0.67	0.35	0.32	0.90	-0.05
29	0.68	0.42	0.26	0.62	-0.21
30	0.71	0.51	0.20	0.39	-0.41
31	0.90	0.72	0.18	0.25	-0.60
32	0.78	0.52	0.26	0.50	-0.30
33	0.18	0.14	0.035	0.25	-0.60
34	0.55	0.28	0.27	0.98	-0.01
35	0.59	0.45	0.14	0.32	-0.49
36	0.38	0.21	0.17	0.80	-0.10
37	0.82	0.67	0.15	0.22	-0.66
38	0.58	0.35	0.23	0.66	-0.18
39	0.55	0.49	0.06	0.12	-0.92
40	0.21	0.15	0.06	0.42	-0.38
41	0.45	0.19	0.26	1.37	0.14
42	0.92	0.61	0.31	0.5	-0.30
43	0.56	0.25	0.31	1.25	0.097
44	0.98	0.51	0.47	0.93	-0.03

45	0.60	0.55	0.05	0.09	-1.05
46	0.43	0.31	0.12	0.39	-0.41
47	0.30	0.16	0.14	0.88	-0.06
48	0.40	0.19	0.21	1.10	0.04
49	0.81	0.74	0.07	0.09	-1.05
50	0.37	0.33	0.04	0.12	-0.92
51	0.86	0.75	0.11	0.15	-0.82
52	0.52	0.46	0.06	0.13	-0.88
53	0.47	0.36	0.11	0.31	-0.51
54	0.16	0.14	0.02	0.14	-0.85
55	0.42	0.40	0.02	0.05	-1.30
56	0.53	0.50	0.03	0.06	-1.22
57	0.89	0.59	0.30	0.51	-0.29
58	0.90	0.85	0.05	0.06	-1.22
59	0.29	0.20	0.09	0.45	-1.35
60	0.58	0.40	0.18	0.45	-1.35