

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE

THESE DE SCIENCES

DISCIPLINE : Génétique et Biologie Moléculaire

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

par

Christian Lacks LINO CARDENAS

Identification et caractérisation du polymorphisme
génétique des cytochromes P450 4A11 et 4A22
(*CYP4A11* et *CYP4A22*)
et de la Glycine N-acyltransférase (*GLYAT*)

Soutenue le 20 décembre 2010 devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs :

Monsieur le Docteur Luc FERRARI.

Monsieur le Docteur Nicolas PICARD.

Examineurs :

Monsieur le Professeur Franck BROLY.

Monsieur le Docteur Dany CHEVALIER, Directeur de thèse.

REMERCIEMENTS

A mes juges

Monsieur le Docteur Luc Ferrari

Que je remercie très vivement d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Nicolas Picard

Que je remercie vivement d'avoir pris part à ce jury. Qui m'a fait un très grand honneur d'accepter de juger cette thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Michel Lhermitte

Ses conseils et les longues heures passées à discuter de nos résultats ont toujours été très instructifs. Ce travail n'aurait sans doute pu aboutir sans sa grande disponibilité et son implication sans faille. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Franck Broly

A qui j'adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie avec beaucoup de gentillesse dans l'EA 4483, et pour m'avoir ouvert les portes de la recherche. Sa disponibilité, ses conseils et son soutien auront été des éléments clés de ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude, et soit assuré de ma respectueuse considération.

Monsieur le Docteur Dany Chevalier

Qui m'a donné l'occasion de réaliser ce projet qui m'était si cher. Il m'a témoigné une grande confiance en me permettant d'entreprendre ce travail de recherche à ses côtés. Les quatre années passées à travailler sous sa direction auront été riches d'enseignements. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude pour m'avoir fait partager ses connaissances et son savoir, et m'avoir permis de mener à bien cette thèse. Qu'il soit également assuré de ma plus respectueuse admiration.

Que cette thèse soit aussi l'occasion de remercier très vivement tous ceux et celles avec qui j'ai partagé de beaux moments durant ces 4 années passées au sein de l'EA 4483.

Jean-Marc, Delphine, Christelle, Ingrid et Anne,

Vous m'avez accueillie au laboratoire avec beaucoup de gentillesse, et j'ai toujours pu compter sur votre disponibilité pour m'apporter votre aide quand j'en ai eu besoin. Je garderai des mes années passées à vos côtés de très bons souvenirs. Recevez tous mes remerciements, et trouvez ici l'expression de ma plus sincère sympathie.

Joanna, Anne, Marion, Nicolas, Julie, Florence, Julien, Elisabeth,

Qui ont su m'accueillir avec immense gentillesse, entouré de votre affection, soutenue dans les moments difficiles et encouragé quand il le fallait. Nous aurons partagé de mémorables moments. Trouvez ici le témoignage de ma sincère gratitude et de ma plus profonde sympathie.

Je tiens également à remercier tous ceux et toutes celles qui comptent tellement pour moi, et qui par leur amour et leur amitié m'ont permis, non seulement de mener cette thèse à son terme, mais surtout de ne jamais perdre de vue l'essentiel...

Ma mère,

Tu as toujours été là... pour partager tous mes doutes, les peines et les galères. Aujourd'hui, c'est un grand moment de bonheur qu'on va partager... La confiance que tu as mise en moi depuis mes premiers pas m'aura permis de croire en mes rêves, et finalement d'en réaliser un ! Merci... Infiniment... et plus que ça encore !!!

Madre,

Siempre estuviste hay para mi... para compartir todas mis dudas, las penas y los momentos difíciles. Hoy día es un gran momento de felicidad que a pesar de la distancia vamos a compartir... La confianza que tu has depositado en mi desde mis primeros pasos me ha ayudado a creer en mis sueños, y finalmente en realizar uno de ellos!! Muchas gracias infinitamente te quiero madre.

Ma sœur,

... Je te remercie d'avoir toujours fait en sorte de t'intéresser à mon travail, et surtout d'être venue à l'aéroport à chaque fois comme la première fois, merci beaucoup pour le soutien sans toi ça n'aurait pas été pareil !!!

Hermana,

...Te agradezco mucho de haber siempre aparentado estar interesada en mi trabajo y sobre todo de venir al aeropuerto a cada llegada mía como las mismas ganas de la primera vez, muchas gracias por el apoyo sin ti no hubiese sido igual!!!

SOMMAIRE

I. AVANT-PROPOS	1
<hr/>	
II. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU POLYMORPHISME GENETIQUE DES CYTOCHROMES P450 4A11 ET 4A22, GENES CANDIDATS DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE ESSENTIELLE	17
<hr/>	
II.1 Généralités	18
II.1.1 Structure et métabolisme des eicosanoïdes	
II.1.2 Cascade d'activation de l'acide arachidonique par la voie des cytochromes P450	
II.1.3 Hypertension artérielle essentielle et polymorphisme génétique des cytochromes P450	
II.1.4 Les cytochromes P450 de la sous-famille 4A	
II.2 Etude du polymorphisme génétique des <i>CYP4A11</i> et <i>CYP4A22</i>	36
II.2.1 Echantillons d'ADN analysés	
II.2.2 Développement d'une stratégie d'analyse PCR-SSCP	
II.3 Analyse fonctionnelle des variants naturels des CYP4As	39
II.3.1 Analyse <i>in silico</i> des variants de la région promotrice	
II.3.2 Analyse <i>in silico</i> des variants des régions codantes par modélisation par homologie comparative	
II.3.3 Analyse <i>in vitro</i> des variants des régions codantes par expression hétérologue dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
II.3.4 Cinétiques enzymatiques des CYP4As recombinants, mesure de l'acide 12-hydroxylaurique par GC-MS/MS	

II.4 Articles	51
Article 1 : Inter-ethnic variations in the g.T8590C loss-of-function variant of the arachidonic acid ω -hydroxylase CYP4A11.	
Article 2 : Genetic polymorphisms of the human <i>CYP4A11</i> and <i>CYP4A22</i> genes in a French Caucasian population and in silico insights from comparative 3D modelling.	
II.5 Conclusion et perspectives	106
III. IDENTIFICATION DU POLYMORPHISME GENETIQUE DE LA GLYCINE N-ACYLTRANSFERASE (<i>GLYAT</i>)	108
<hr/>	
III.1 Généralités	109
III.2 Etude du polymorphisme génétique de la <i>GLYAT</i>	113
III.2.1 Echantillons d'ADN analysés	
III.2.2 Développement d'une stratégie d'analyse PCR-SSCP	
III.3 Article 3 :	114
Genetic polymorphisms of Glycine N-acyltransferase (GLYAT) in a French Caucasian population. <i>Xenobiotica</i> (2010) 40:853-861.	
III.4 Conclusion et perspectives	124
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	126
<hr/>	

Article 4 : Genetic polymorphism of CYP2U1, a cytochrome P450 involved in fatty acids hydroxylation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (2010) 83:105-10.

Article 5 : Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. PLoS One (2009) 4:6718.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Activités des enzymes de biotransformation au sein de la cellule.

Figure 2. Les différents types de transporteurs exprimés dans la cellule.

Figure 3. Bases moléculaires de la variation d'expression en fonction du génotype.

Figure 4. Structure de l'acide arachidonique ou acide eicosatétraénoïque.

Figure 5. Cascade d'activation de l'acide arachidonique par la voie des cyclooxygénases, des lipoxygénases et des cytochromes P450.

Figure 6. Métabolisme de l'acide arachidonique par la voie des cytochromes P450.

Figure 7. Organisation structurale du cluster de gènes de la famille CYP4 sur le chromosome 1 humain, région p33 et structure des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*.

Figure 8. Vecteur d'expression dans la levure pYeDP60 (pV60).

Figure 9. Droite de calibration de l'acide laurique et de son métabolite l'acide 12-hydroxylaurate.

Figure 10. Chromatogrammes de détection de l'acide laurique et du métabolite le 12-hydroxylaurate après incubation avec des microsomes commerciaux.

Figure 11. Métabolisme de l'acide benzoïque en acide hippurique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Réactions de biotransformation de phase I.

Tableau 2. Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l'homme.

Tableau 3. Réactions de biotransformation de phase II.

Tableau 4. Protéines de phase III dites protéines de transport.

Tableau 5. Nomenclature des familles SLC « solute carrier » proposée par l'HUGO « Human Genome Organization ».

Tableau 6. Exemples d'inducteurs et d'inhibiteurs de certains cytochromes P450.

Tableau 7. Valeurs limites des différents niveaux d'hypertension artérielle.

Tableau 8. Gènes candidats impliqués dans la régulation de la pression artérielle.

Tableau 9. Production des eicosanoïdes (EETs et HETEs) par les cytochromes P450 ω -hydroxylases à partir de l'acide arachidonique.

Tableau 10. Association entre polymorphismes du *CYP4A11* et du *CYP4F2* et pathologies cardiovasculaires.

Tableau 11. Séquence des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le clonage des ADNc des *CYP4A11* et *CYP4A22*.

Tableau 12. Récapitulatif des temps de rétention et des transitions MRM en mode EI+ retenues pour la quantification et la qualification des différents analytes.

Tableau 13. Résultats des tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

Tableau 14. Mesures de l'activité enzymatique des Supersomes CYP4A11 recombinants.

Tableau 15. Modifications post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles des différents hôtes utilisés dans l'expression *in vitro* de protéines ciblées.

Tableau 16. Xénobiotiques métabolisés *via* la conjugaison aux acides aminés.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	:	Acide arachidonique
AASK	:	African american study of kidney disease
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
BSTFA	:	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide
COX	:	Cyclooxygénase
CV	:	Coefficient de variation
CYP450	:	Cytochrome P450
CYP4A11	:	Cytochrome P450 4A11
CYP4A22	:	Cytochrome P450 4A22
dNTP	:	Désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EET	:	Acide epoxyeicosatriénoïque
GC-MS/MS	:	Chromatographie phase gazeuse couplée à un détecteur spectromètres de masse en tandem
HETE	:	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HTA	:	Hypertension artérielle
LOD	:	Limite de détection
LOQ	:	Limite de quantification
LOX	:	Lipoxygénase
MONICA	:	Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease
MRM	:	Multiple reaction monitoring
NADPH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCBI	:	National center for biotechnology information
OR	:	Odds ratio
PA	:	Pression artérielle
PAD	:	Pression artérielle diastolique
PAS	:	Pression artérielle systolique

pb	:	Paire de base
PCR	:	Polymerase chain reaction
PL	:	Phospholipide
PPAR	:	Peroxisome proliferator-activated receptor
RT	:	Reverse transcription
SHR	:	Spontaneously hypertensive rats
SNP	:	Single nucleotide polymorphism
SSCP	:	Single strand conformation polymorphism
TMCS	:	Trimethylchlorosilane
UTR	:	Untranslated region/région non traduite
Wt	:	Wild-type/séquence sauvage

COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES

- **Docteur Jaime CARDENAS GARCIA**, Faculté de Pharmacie et Biochimie, Université Catolica de Santa Maria d'Arequipa, Pérou.

- **Professeur Philippe CHAVATTE**, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, France.

ENCADREMENT D'ETUDIANTS

- **Aminata TOURE**, « Etude de la variabilité interethnique du polymorphisme génétique de la Glycine N-acyltransférase (GLYAT) ». Master 2 de Biotoxicologie appliquée à l'industrie, l'environnement et la santé, 2008-2009, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie de Dakar, Sénégal.

- **Jérémy THOMAS**, « Analyse fonctionnelle du CYP4A11 humain : mise au point d'une méthode analytique de dosage de son substrat endogène l'acide laurique ». Master 1, Mention Santé publique, 2009-2010, Faculté des Sciences Pharmaceutique et Biologiques de Lille, Université Lille 2, Nord de France.

PUBLICATIONS

- 1- **Lino Cardenas CL**, Devos A, Lo-Guidice JM, Cardenas Garcia J, Broly F, Chevalier D. Inter-ethnic variations in the g.T8590C loss-of-function variant of the arachidonic acid ω -hydroxylase CYP4A11. Genetics and Molecular Biology, soumis.
- 2- **Lino Cardenas CL**, Renault N, Farce A, Cauffiez C, Allorge D, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Chavatte P, Broly F, Chevalier D. Genetic polymorphisms of the human *CYP4A11* and *CYP4A22* genes in a French Caucasian population and *in silico* insights from comparative 3D modelling. Prostaglandins and other lipid mediators, à soumettre.
- 3- **Lino Cardenas CL**, Bourguine J, Cauffiez C, Allorge D, Lo-Guidice JM, Broly F, Chevalier D. Genetic polymorphisms of Glycine N-acyltransferase (GLYAT) in a French Caucasian population. Xenobiotica (2010) 40:853-861.
- 4- Devos A, **Lino Cardenas CL**, Glowacki F, Engels A, Lo-Guidice JM, Chevalier D, Allorge D, Broly F, Cauffiez C. Genetic polymorphism of CYP2U1, a cytochrome P450 involved in fatty acids hydroxylation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (2010) 83:105-110.
- 5- Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puisségur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, **Lino Cardenas CL**, Courcot E, Rios G, Fourre S, Lo-Guidice JM, Marcet B, Cardinaud B, Barbry P, Mari B. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. PLoS One (2009) 4:6718.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

1- **Lino Cardenas CL**, Chevalier D, Lhermitte M, Broly F. Identification du polymorphisme génétique de la Glycine N-acyltransférase (GLYAT, EC 2.3.1.13) dans une population française d'origine caucasienne. Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie (SFT), Toxicité Juvénile des Xénobiotiques et Toxicologie de la Reproduction, 19-20 octobre 2009, Nancy, France.

2- **Lino Cardenas CL**, Chevalier D, Lhermitte M, Broly F. Identification of genetic polymorphism and 3D modelling of the CYP4A11: Candidate gene of HTA .I Congreso Internacional de Ciencias de la Salud y Tecnología Farmacéutica, 06-09 août 2009, Arequipa, Peru.

3- **Lino Cardenas CL**, Chevalier D, Farce A, Lhermitte M, Chavatte Ph, Broly F. Identification du polymorphisme génétique de gènes candidats de l'hypertension artérielle, les CYP4A11 et CYP4A22, et construction des structures 3D par homologie comparative. Journée André VERBERT, 16 septembre 2009 (EDBSL), Lille, France.

4- Chevalier D, **Lino Cardenas CL**, Farce A, Imbenotte M, Lhermitte M, Broly F, Chavatte P. Molecular modeling of human cytochrome P450 4A11: study of the effects of CYP4A11 gene mutations. ISSFAL 2008: From Lipidomics to Human Health: 8th meeting of the international society for the study of fatty acids & lipids, May 10-22, 2008, Kansas City, USA.

*Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés
grâce aux financements du Conseil Régional Nord-Pas de
Calais
et de l'Université Lille 2 Droit et Santé*

I. AVANT-PROPOS

Comme tous les êtres vivants l'Homme est exposé en permanence directement ou indirectement à un grand nombre de composés exogènes d'origines diverses, rassemblé sous le terme de xénobiotiques. Parmi ces molécules, il existe des xénobiotiques naturels, d'origine alimentaire (flavonoïdes, caroténoïdes, toxines végétales et animales, additifs alimentaires) et des xénobiotiques de synthèse qui peuvent être chimiques (médicaments, pesticides, solvants, pesticides, herbicides, dérivés de combustibles domestiques et industriels, hydrocarbures...), géologiques (volcans, radioactivité naturelle, eaux riches en minéraux, charbon...) ou néoformés (produits de grillades, huiles chauffées, nitrosamines des charcuteries) (Bories et Pascal, 1996).

Ces composés sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal, des voies respiratoire et cutané puis ils sont métabolisés par des systèmes enzymatiques spécifiques qui permettront leur élimination par voie urinaire ou biliaire. Ces réactions enzymatiques peuvent générer des composés plus réactifs et plus toxiques que les produits de départ, provoquant des perturbations cellulaires, capables d'induire des mutations à l'origine de la formation de tumeurs. Toutefois, certains xénobiotiques présentent des propriétés anti-cancérogènes ; c'est le cas de certains microconstituants alimentaires (flavonoïdes, caroténoïdes) capables de moduler l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (ou EMX) impliquées dans la bioactivation des cancérogènes de type Aflatoxine B1, mycotoxine responsable de cancers du foie (Canivenc-Lavier *et al.*, 1996 ; Manson *et al.*, 1997 ; Gradelet *et al.*, 1997).

Les xénobiotiques ont pour tendance naturelle à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Ces molécules pourraient donc entraîner une mort inéluctable des organismes si ceux-ci ne s'étaient dotés, au cours de l'évolution, de systèmes enzymatiques puissants permettant la détoxification d'une partie de ces composés (Parkinson, 1996).

La biotransformation des xénobiotiques ou processus de détoxification, d'élimination des composés exogènes est assurée par des systèmes enzymatiques dits de « biotransformation » présents dans la plupart des organismes vivants. Ce processus se déroule selon trois phases, réaction de phase I dite de fonctionnalisation, réaction de phase II dite de conjugaison et réaction de phase III dite de transport ou d'élimination (Figure 1).

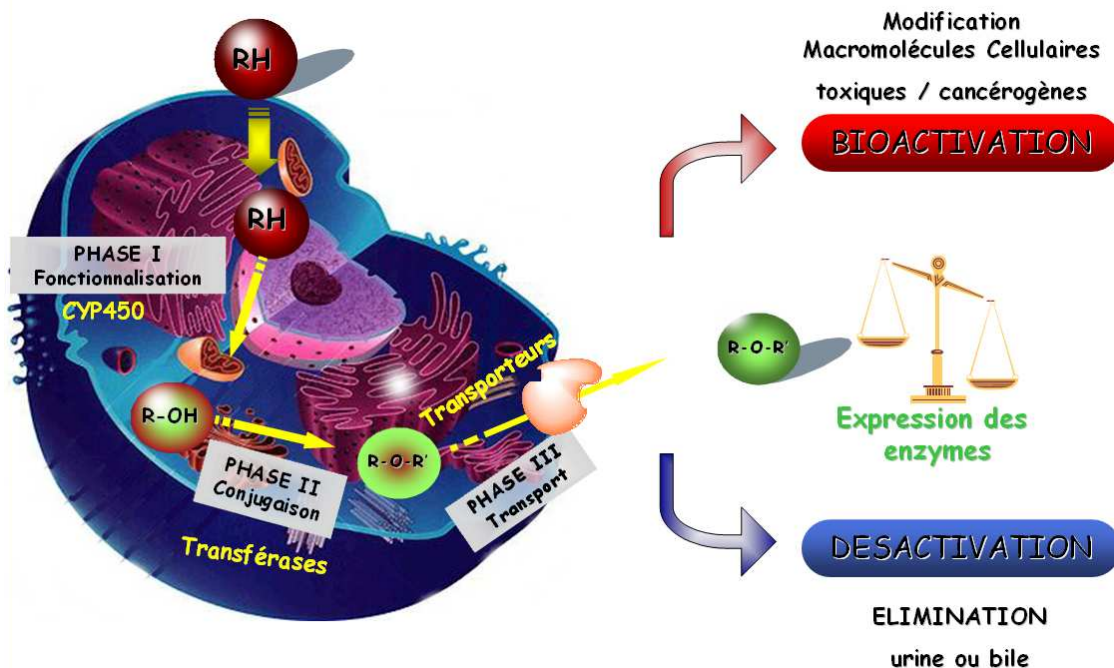


Figure 1 : Activités des enzymes de biotransformation au sein de la cellule.

Les enzymes de phase I

Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, permettent l'introduction d'un groupement fonctionnel qui a pour rôle de rendre la molécule plus polaire, plus hydrophile. Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 réalisent à eux seuls environ 90% de ces réactions (Oestreicher *et al.*, 1999). Les réactions de phase I comportent non seulement des réactions d'hydroxylation, de N-oxydation et de S-oxydation où l'oxydation est évidente car il y a eu addition d'un atome d'oxygène, mais également des réactions de N-, S- et O-déalkylation, où la fixation d'un atome d'oxygène n'a été qu'une étape intermédiaire et n'apparaît pas dans le produit final et des réactions d'hydrolyse (Rendic, 2002) (Tableau 1). L'introduction d'une fonction chimique supplémentaire produit généralement des métabolites de polarité supérieure pouvant être directement éliminés dans la bile ou l'urine, ou être transformés par des enzymes de phase II.

Tableau 1. Réactions de biotransformation de phase I.

TYPE DE REACTION	ENZYME	SUBSTRATS
Oxydation	Monoxygénase Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénase	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénase	Aldéhydes
	Flavine Monoxygénase	Amines tertiaires
	Monoamine oxydase	Amines
Réduction	Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénase	Aldéhydes, cétones
	Carbonyl réductase	Aldéhydes, cétones
Hydrolyse	Estérase	Esters
	Peptidase	Peptides
	Epoxyde hydrolase	Benzo(<i>a</i>)pyrène

Les monoxygénases à cytochrome P450 sont essentielles pour effectuer des biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes...), aussi bien que celles de très nombreux médicaments et toxiques naturels (végétaux par exemple) ou de synthèse (Tableau 2). Dans le système monoxygénase, la variété des propriétés catalytiques provient de la variété de la partie protéique du cytochrome P450. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les cytochromes P450 ont été répartis en familles et sous-familles.

Tableau 2. Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l'homme.

CYPs	SUBSTRATS
CYP1A1	Benzo(a)pyrène, autres hydrocarbures polycycliques aromatiques
CYP1A2	Phénacétine, aflatoxine B1, caféine, arylamines hétérocycliques, théophylline, acétaminophène, imidazole, imidazoquinoline, aminofluorène, chlorzoxazone
CYP2A6	Coumarine
CYP2B6	Coumarine
CYP2C9	Méphénytoïne
CYP2D6	Débrisoquine
CYP2E1	Alcool, acétones, nitrosodiméthylamines, chloroforme, styrène, acétonitrile, chlorzoxazone, acétaminophène, tétrachlorure de carbone, vinyles
CYP3A4/5	Nifédipine, aflatoxine B1, cyclosporine, testotérone, éthinylestradiol, rifampicine, érythromycine, lovastatine, midazolam
CYP4A11/22	Acides gras (oxydation et hydroxylation)
CYP4B1	Testostérone, coumarine

Les CYPs appartenant à une même famille possèdent plus de 40% d'homologie de séquence. A l'intérieur d'une même sous-famille, l'homologie de séquence en acides aminés est supérieure à 55%. Généralement, tous les gènes répertoriés comme appartenant à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome (ou cluster de gènes).

Chez les mammifères et particulièrement chez l'homme, 4 familles sont importantes pour le métabolisme, surtout hépatique, des médicaments.

Il s'agit des familles et sous-familles suivantes :

- Sous-famille 1A ;
- Sous-famille 2A, 2B, 2C, 2D, 2E ;
- Sous-famille 3A ;
- Sous-famille 4A.

Les enzymes de phase II

Les réactions de phase II ou de conjugaison sont des réactions qui conduisent à un produit plus hydrosoluble, peu ou pas actif, éliminé dans l'urine ou dans la bile. Elles sont classées en fonction du cofacteur nécessaire et de son état d'activation. En effet, de l'énergie est nécessaire pour les réactions de phase II. Tous les cofacteurs ou accepteurs ont un poids moléculaire relativement élevé, ils sont généralement hydrophiles. Ils sont en nombre limité.

Les enzymes de phase II, surtout représentées par des transférases, catalysent la conjugaison à une molécule endogène (acide glucuronique, glutathion, ions sulfate et acétate, groupement méthyl et glycine) des xénobiotiques ou de leur(s) métabolite(s) préalablement produit(s) par un processus de phase I. Les produits gagnent ainsi en hydrosolubilité, facilitant leur élimination (Tableau 3).

Tableau 3. Réactions de biotransformation de phase II.

REACTIONS	ENZYME	TYPE DE SUBSTRATS
Glucuroconjugaison	UDP glucuronyl transférase	Phénols, thiols, amines, acides
Sulfoconjugaison	Sulfotransférase	Phénols, thiols, amines
Mercaptoconjugaison	Glutathion <i>S</i> transférase	Tout substrat électrophile
Méthylation	Méthyltransférase (O, N, S)	Phénols, amines, thiols
Acétylation	<i>N</i> -acétyltransférase	Amines
Conjugaison	Aminoacyltransférase	Acides carboxyliques

Les phases I et II du métabolisme ne peuvent être considérées isolément, elles fonctionnent de façon séquentielle. De plus, un même toxique peut être métabolisé par plusieurs voies.

Les protéines de phase III dites « protéines de transport »

Les transporteurs de phase III permettent l'élimination hors de la cellule des conjugués hydrophiles. Ils sont composés de transporteurs membranaires dont le rôle est de réaliser le transport actif hors de la cellule, des xénobiotiques ou de leurs métabolites conjugués rendus hydrophiles (Gerloff, 2004). Ces transporteurs membranaires peuvent se situer sur la face apicale ou basolatérale de la cellule et ainsi éliminer les composés conjugués dans le sang, dans la lumière intestinale, dans la bile ou dans l'urine.

Les principales protéines de transport sont les protéines ABC (ATP-Binding Cassette). La glycoprotéine-P (Pg-P) ou ABCC1, codée par le gène ABCC1 est le transporteur membranaire le mieux connu jusqu'ici et semblerait important pour la disponibilité des xénobiotiques chez l'Homme (Tableau 4).

Tableau 4. Protéines de phase III dites protéines de transport.

FAMILLE	MEMBRES	FONCTION
ABCA	ABCA1 (ABC1)	Transport du cholestérol
	ABCA2 (ABC2)	Résistance aux médicaments
	ABCA3	Secrétion du surfactant
ABCB	ABCB1 (MDR1, P-gp)	Résistance aux médicaments, Excrétion de médicaments et xénobiotiques
ABCC	ABCC1, 3 (MRP1, 3)	Résistance aux médicaments
	ABCC2 (MRP2)	Efflux hépatique d'anions organiques conjugués
	ABCC4, 5 (MRP4, 5)	Transport de nucléosides
	ABCC6 (MRP6)	Inconnu
	ABCC7 (CFTR)	Transport des chlorures
ABCG	ABCG2 (ABCP, MXR, BCRP)	Résistance aux médicaments, Efflux de toxines et xénobiotiques
	ABCG8	Transport des stérols

D'autre part, les transporteurs de solutés ou « solute carrier » (SLC) fonctionnent de façon passive. Ils doivent en effet subir un changement de conformation global pour permettre la translocation des substrats mais cependant, ils n'utilisent pas d'énergie puisque le changement de conformation obéit aussi à la loi de l'énergie minimale.

Sur le plan fonctionnel, on connaît jusqu'à maintenant quatre sous-groupes de protéines SLC (voir figure 2) : (1) les uniporteurs qui favorisent le mouvement d'un seul substrat à la fois, (2) les symporteurs ou cotransporteurs qui favorisent le mouvement d'au moins deux substrats dans la même direction, (3) les antiporteurs ou échangeurs qui favorisent le mouvement de deux substrats mais dans des directions opposées et (4) les transporteurs mixtes qui sont à la fois des symports et des antiports.

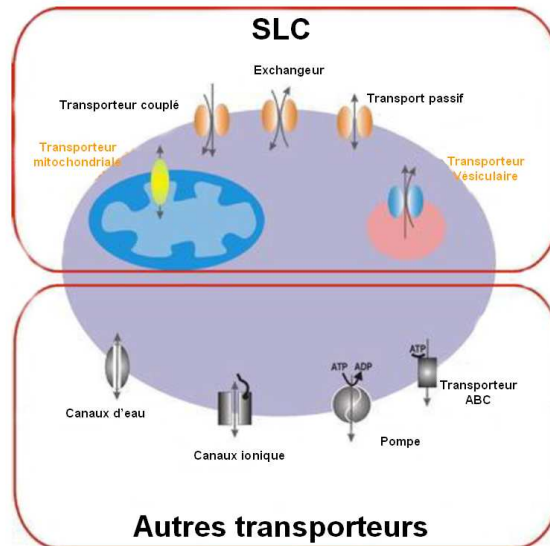


Figure 2. Les différents types de transporteurs exprimés dans la cellule. (Tiré de Hediger *et al.*, 2004).

En 1989, le projet « Human Genome Organisation » (HUGO) a permis d'établir une liste et une nomenclature des gènes qui appartiennent au génome humain (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). Grâce à ce projet, plusieurs familles de protéines ont été identifiées dont les SLC qui ont été classées en 46 superfamilles de protéines comprenant un total de 298 gènes soit environ 1% des gènes des chromosomes humains (Tableau 5) (Reuss, 1983 ; Hediger *et al.*, 2004).

Tableau 5. Nomenclature des familles SLC « solute carrier » proposée par l'HUGO « Human Genome Organization ».

Famille		<i>n</i>	Famille		<i>n</i>
SLC1	The high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family	7	SLC26	The multifunctional anion exchanger family	10
SLC2	The facilitative GLUT transporter family	14	SLC27	The fatty acid transport protein family	6
SLC3	The heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters	2	SLC28	The Na ⁺ -coupled nucleoside transport family	3
SLC4	The bicarbonate transporter family	10	SLC29	The facilitative nucleoside transporter family	4
SLC5	The sodium glucose cotransporter family	8	SLC30	The zinc efflux family	9
SLC6	The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family	16	SLC31	The copper transporter family	2
SLC7	The cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated amino-acid transporter family	14	SLC32	The vesicular inhibitory amino acid transporter family	
SLC8	The Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger family	3	SLC33	The acetyl-CoA transporter family	1
SLC9	The Na ⁺ /H ⁺ exchanger family		SLC34	The type-II Na ⁺ -phosphate cotransporter family	3
SLC10	The sodium bile salt cotransport family	6	SLC35	The nucleoside-sugar transporter family	17
SLC11	The proton coupled metal ion transporter family	2	SLC36	The proton-coupled amino acid transporter family	
SLC12	The electroneutral cation-Cl cotransporter family	9	SLC37	The sugar-phosphate/phosphate exchanger family	
SLC13	The human Na ⁺ -sulfate/carboxylate cotransporter family	5	SLC38	The System A and N, sodium-coupled neutral amino acid transporter family	6
SLC14	The urea transporter family		SLC39	The metal ion transporter family	14
SLC15	The proton oligopeptide cotransporter family	4	SLC40	The basolateral iron transporter family	1
SLC16	The monocarboxylate transporter family	14	SLC41	The MgtE-like magnesium transporter	3

SLC17	The vesicular glutamate transporter family	8	SLC42	family The Rh ammonium transporter family (pending)	3
SLC18	The vesicular amine transporter family	3	SLC43	The Na ⁺ -independent, system-L-like amino acid transporter family	2
SLC19	The folate/thiamine transporter family	3			
SLC20	The type-III Na ⁺ -phosphate cotransporter family				
SLC21/SLCO	The organic anion transporting family	11			
SLC22	The organic cation/anion/zwitterion transporter family	8			
SLC23	The Na ⁺ -dependent ascorbic acid transporter family				
SLC24	The Na ⁺ /(Ca ²⁺ -K ⁺) exchanger family	5			
SLC25	The mitochondrial carrier family	27			
Total					298

Variabilité interindividuelle d'expression et d'activité des EMX et des protéines de transport chez l'Homme

Tous les tissus humains peuvent produire des EMX et des protéines de transport. Les P450 sont principalement exprimés dans le foie, mais ils sont présents dans de nombreux organes et tissus. Certains P450 sont exclusivement exprimés dans des tissus extra-hépatiques, c'est le cas par exemple du CYP2F1 qui est sélectivement exprimé dans le poumon. Les enzymes de phase II ainsi que les protéines de transport dites de phase III ont été principalement décrits comme étant exprimés dans le foie. L'expression et/ou l'activité des EMX est/sont sous le contrôle de différents facteurs dont des facteurs non génétiques et des facteurs génétiques.

Variations d'expression d'ordre non génétique

D'une manière générale, le profil d'expression des EMX varie d'un tissu à l'autre qualitativement et quantitativement. De façon physiologique, le métabolisme des xénobiotiques évolue constamment au cours de la vie. De plus, certains états pathologiques peuvent être à l'origine de variations d'expression des EMX, comme l'insuffisance hépatique, les infections ou l'inflammation, qui en général diminuent leur activité métabolique globale (Tamasi *et al.*, 2000).

L'expression et l'activité des EMX peuvent également être modifiées de façon importante par l'exposition à certains composés chimiques environnementaux ou à des facteurs endogènes (hormones et cytokines). L'expression des EMX peut être induite, l'exemple du CYP1A2 induit par la fumée de tabac est caractéristique. L'expression des EMX peut aussi être inhibée par des xénobiotiques de façon réversible ou irréversible (Tableau 6). C'est un phénomène rapide. Un exemple particulièrement bien documenté est celui de l'inhibition des CYP3A par des constituants du jus de pamplemousse. Ce mécanisme est à l'origine d'interactions médicamenteuses (Michaud et Turgeon, 2003).

Tableau 6. Exemples d'inducteurs et d'inhibiteurs de certains cytochromes P450.

Cytochromes P450	Inducteurs	Inhibiteurs
CYP1A2	Brocolis Choux de Bruxelles Tabac Omeprazole Insuline	Amiodarone Cimétidine Fluvoxamine Interféron
CYP2B6	Phénobarbital	Ticlopidine
CYP2C8	Rifampicine	Trimethoprime
CYP2C19	Carbamazépine Prednisone Rifampicine	Chloramphénicol Cimetidine Fluoxétine Fluvoxamine Kétoconazole
CYP2C9	Rifampicine	Amiodarone Fluconazole Isoniazide
CYP2D6	Dexaméthasone Rifampicine	Paroxétine Quinidine Méthadone Cocaïne
CYP3A4, 5, 7	Barbituriques Carbamazépine Corticoïdes Antirétroviraux	Cimétidine Jus de pamplemousse Norfluoxétine Fluvoxamine

Mécanismes moléculaires

Comme pour toutes les protéines de l'organisme, la qualité et la quantité des enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation des xénobiotiques dépendent essentiellement de l'information portée par les gènes qui les codent. Ainsi des mutations affectant la séquence des gènes codant pour les enzymes du métabolisme ou les transporteurs des xénobiotiques (EMX) peuvent être à l'origine de la synthèse d'une protéine présentant une activité fonctionnelle réduite, augmentée ou nulle (Figure 3).

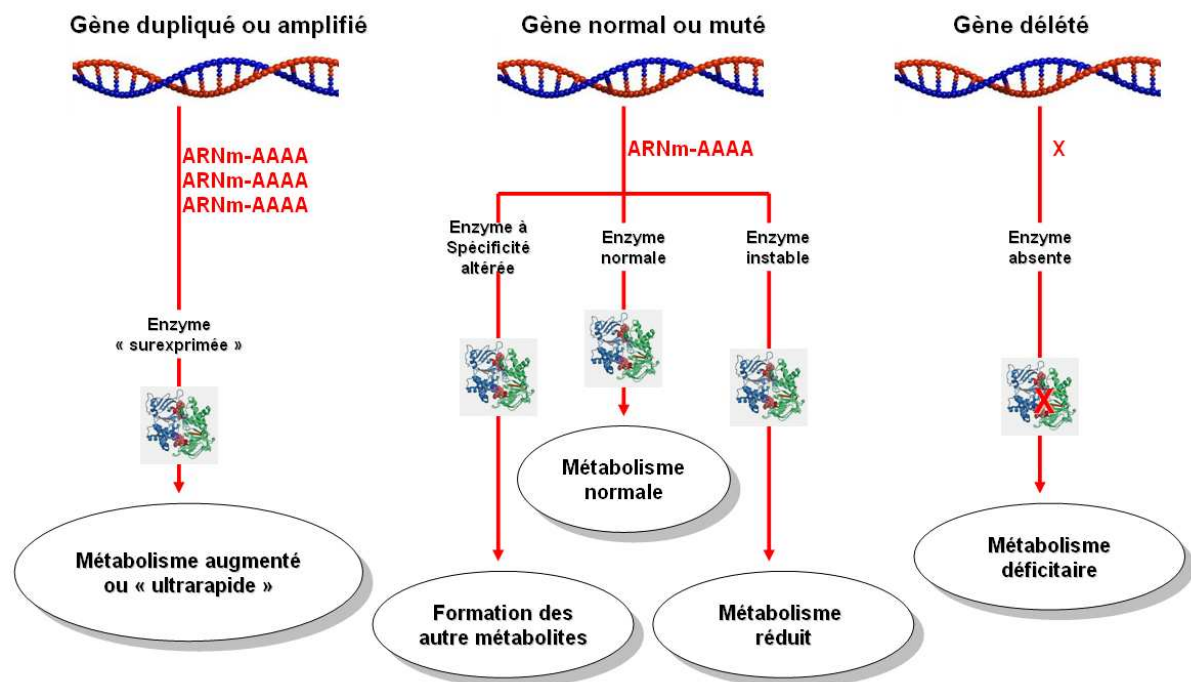


Figure 3. Bases moléculaires de la variation d'expression en fonction du génotype. (D'après Allorge et Loriot, 2004 ; Ingelman-Sundberg, 1999).

Les allèles non fonctionnels d'un gène peuvent être le résultat de macrolésions, comme une délétion complète du gène, ou de microlésions, c'est-à-dire de mutations ponctuelles entraînant un décalage du cadre de lecture ou frameshift, un codon stop ou un défaut d'épissage. D'autres allèles, porteurs de mutations faux-sens, ont pour conséquence une diminution ou une modification de l'activité fonctionnelle par altération de la structure tridimensionnelle de la protéine et de son site actif ou par modification de sa spécificité de substrat (Johansson *et al.*, 1994). Enfin, la présence de deux (ou plus de deux) copies du gène sur un même allèle est également possible ; elle génère un phénotype ultra-rapide. A titre d'exemple des allèles portant deux, trois, quatre, cinq, et même treize copies du *CYP2D6* ont été rapportés (Ingelman-Sundberg, 1997).

La fréquence et le nombre de mutations décrites varient beaucoup d'une enzyme à l'autre. De plus, pour une même enzyme, la fréquence des polymorphismes génétiques peut varier selon les origines ethniques (Dorne *et al.*, 2002 ; Bradford, 2002). Par exemple pour le CYP2D6, l'allèle CYP2D6*4 représente 12 à 21 % des allèles mutants déficitaires dans la population caucasienne contre seulement 1 % de la population asiatique ou 2 % dans la population noire-américaine (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Le programme de recherche de l'Equipe d'Accueil 4483, **Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine** a pour objectif de mieux comprendre et par conséquent, mieux prévoir et mieux prévenir, l'impact de l'environnement chimique sur la santé humaine, dont les conséquences médicales, sociales et économiques posent en particulier dans notre région, un véritable problème de santé publique et constituent une préoccupation majeure des pouvoirs publics, des acteurs de santé et des industriels de nombreux secteurs professionnels.

L'un des axes de recherche de l'EA 4483 porte sur l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine des différences de susceptibilité et de réponse des individus à leur environnement chimique, en recherchant et analysant les conséquences d'anomalies de gènes, dont le rôle dans la défense et l'adaptation de l'organisme à son environnement chimique est fondamental. Ces gènes codent pour des protéines responsables du transport et de l'activation ou la détoxification métabolique d'une multitude de composés chimiques environnementaux. Ces enzymes métabolisent non seulement de nombreux xénobiotiques mais également une grande variété de substances endogènes, tels que des acides gras, des acides biliaires, des stéroïdes, des prostaglandines ou des vitamines (Nelson *et al.*, 1996 ; Nebert *et al.*, 2002).

Les travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans ce projet d'équipe. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'identification et à la caractérisation du polymorphisme génétique de deux isoenzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P450, impliquées dans le métabolisme principalement endogène, les CYP4A11 et CYP4A22 (**Articles 1 et 2**). Les CYP4As interviennent dans la formation de métabolites vaso-actifs à partir de l'acide arachidonique comme l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE). Des travaux récents suggèrent que des anomalies génétiques de ces enzymes pourraient constituer un facteur de susceptibilité à l'hypertension artérielle essentielle (HTA).

Nous nous sommes également intéressés à l'identification du polymorphisme génétique d'une enzyme de phase II, la Glycine N-acyltransférase (GLYAT), impliquée dans le métabolisme de certains xénobiotiques (**Article 3**). Cette enzyme participe à la détoxification de xénobiotiques possédant un groupement carboxylique (comme l'aspirine, certains pesticides ou le toluène) *via* la conjugaison avec la glycine.

Parallèlement, nous avons également participé à d'autres travaux de recherche menés au sein du laboratoire notamment sur l'isoforme CYP2U1,

impliquée également dans le métabolisme de l'acide arachidonique (**Article 4**) ou sur les miARNs (MicroARN-155 et MicroARN-199a) et leurs implications dans le développement de la fibrose idiopathique pulmonaire (**Article 5**).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse, ont ainsi permis d'étudier le caractère hautement polymorphe de ces gènes, d'identifier et de caractériser de nouvelles variations de séquences, de mettre en évidence l'existence d'une variabilité interethnique du polymorphisme génétique et d'initier les analyses fonctionnelles des mutations candidates qui pourraient avoir un impact sur l'expression et/ou l'activité catalytique de ces enzymes.

II. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DU
POLYMORPHISME GENETIQUE DES CYTOCHROMES P450 4A11
ET 4A22, GENES CANDIDATS DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE
ESSENTIELLE

II.1 GENERALITES

II.1.1 Structure et métabolisme des eicosanoïdes

La découverte des prostaglandines par Von Euler (1937) et leur identification chimique par Bergström and Sjövall (1960) ont abouti à la découverte de toute une cascade de nouveaux médiateurs humoraux. Il s'agit de métabolites d'acides gras polyinsaturés, en particulier de l'acide arachidonique, appelés en général «eicosanoïdes», Figure 4.

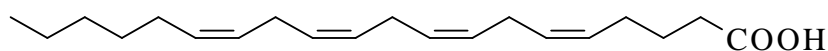


Figure 4. Structure de l'acide arachidonique ou acide eicosatétraénoïque.

L'importance des eicosanoïdes est soulignée par le fait qu'ils sont synthétisés dans la plupart des tissus et des organes et possèdent des propriétés biologiques multiples et puissantes (Ullrich *et al.*, 2001). La biosynthèse des différents eicosanoïdes dépend surtout des différentes voies enzymatiques dont les découvertes successives au cours des 40 dernières années ont permis de préciser leur rôle physiologique et ont ouvert le champ aux interventions pharmacologiques.

La première enzyme décrite a été la « prostaglandine synthase » identifiée comme une cyclooxygénase (COX) (Bergström *et al.*, 1964 ; Hamberg et Samuelsson, 1967). En 1971, Vane, Ferreira *et al.*, ainsi que Smith and Willis ont montré que l'aspirine et les autres médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la synthèse des prostaglandines, ce qui serait à la base de leur mécanisme d'action.

Au cours des années 1976-1980, une nouvelle voie enzymatique du métabolisme de l'acide arachidonique a été décrite, celle de la lipoxygénase (LOX) aboutissant à la formation des HETEs (5-,8-,12-,15- acides hydroxyeicosatétra énoïques), des leucotriènes et des lipoxines.

Le progrès ne s'arrêtait pas là, car une troisième voie enzymatique, celle des monooxygénases « cytochromes P450-dépendantes » (CYP) a été décrite à partir des années 1980, aboutissant à la production des différents époxydes (EET, acides époxyeicosatriénoïques et métabolites hydroxylés) et des HETEs (16-,17-,18-,19-,20- acides hydroxyeicosatétraénoïques).

Ces trois voies donnent naissance à des médiateurs locaux biologiquement actifs, issus d'acides gras polyinsaturés formés à partir de phospholipides des membranes cellulaires stimulées, Figure 5.

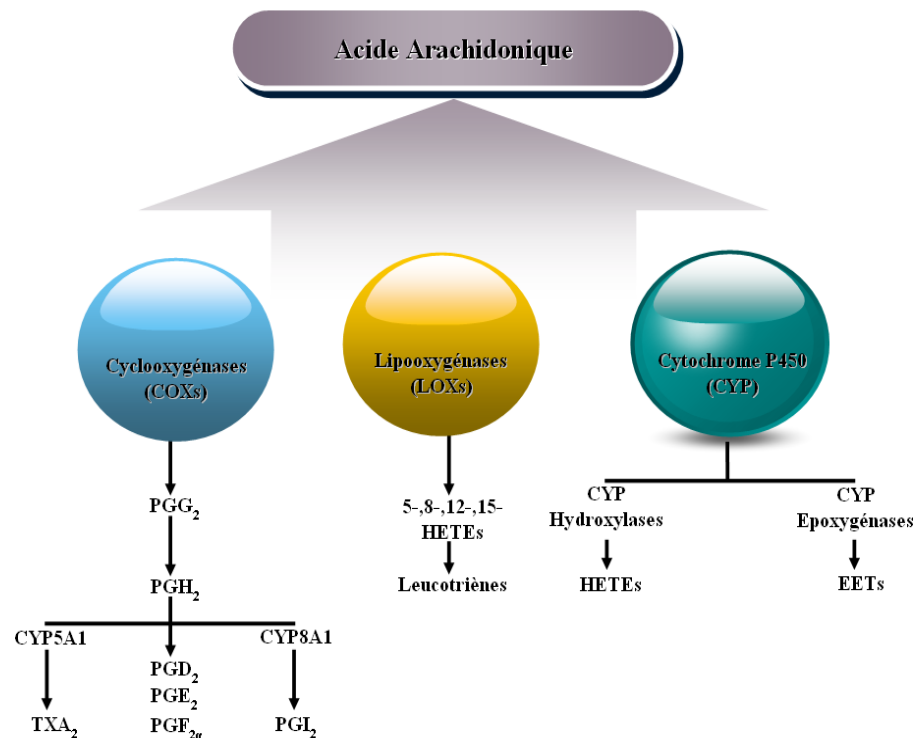


Figure 5. Cascade d'activation de l'acide arachidonique par la voie des cyclooxygénases, des lipoxygénases et des cytochromes P450.

II.1.2 Cascade d'activation de l'acide arachidonique par la voie des cytochromes P450.

L'acide arachidonique ou acide eicosatétraénoïque est un acide gras polyinsaturé présent surtout sous forme estérifiée au glycérol dans les membranes cellulaires. Il est formé par désaturation de l'acide linoléique, un acide gras essentiel, et dans une moindre proportion à partir des phospholipides (PLs) alimentaires. L'hydrolyse des PLs par des phospholipases induit la libération d'acide arachidonique.

Les cytochromes P450 catalysent la formation d'acides époxyeicosatriénoïques (EETs) (activité époxygénase) et d'acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) (activité hydroxylase) (Figure 6).

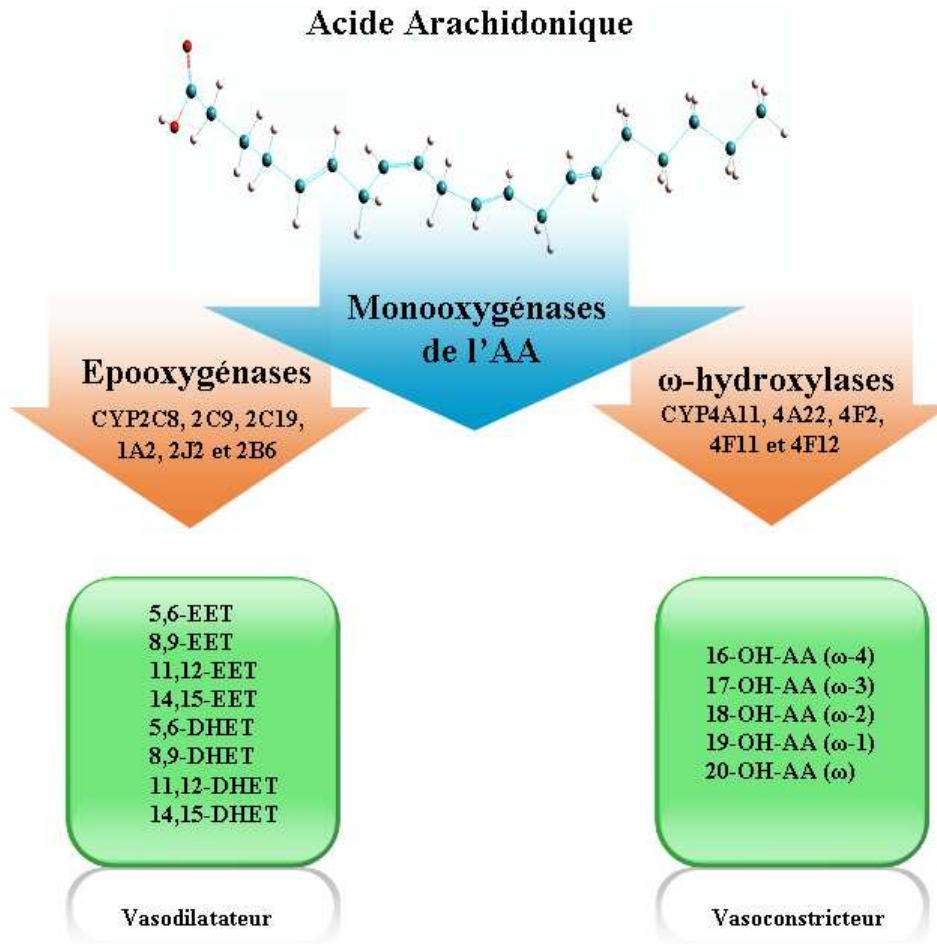


Figure 6. Métabolisme de l'acide arachidonique par la voie des cytochromes P450.

Les études biochimiques, enzymologiques et de la biologie moléculaire montrent que les isoformes CYP4A sont les ω -hydroxylases des acides gras prédominantes dans la plupart des tissus des mammifères (Oliw, 1994 ; Harder *et al.*, 1995). Les CYP4As interviennent dans le métabolisme des acides gras à moyennes et longues chaînes comme l'acide arachidonique, en donnant naissance à des métabolites vasoactifs : majoritairement l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE, ω -hydroxylation) (Lasker *et al.*, 2000 ; Miyata and Roman, 2005).

Différentes études ont été réalisées sur le modèle animal « spontaneously hypertensive rats » (SHR). La première effectuée par Sacerdoti *et al.*, 1988, et confirmée par Omata *et al.*, 1992, montre que la production rénale d'acide 20-HETE est plus élevée dans le modèle SHR. Une étude de Iwai *et al.*, 1995, a permis d'identifier le CYP4A2 comme gène régulé par la consommation de sel et a montré sa surexpression hépatique dans le modèle SHR. Enfin, plusieurs études ont montré que des agents inducteurs de l'hème oxygénase, réduisent la formation rénale de l'acide 20-HETE aboutissant à la prévention de l'hypertension artérielle dans le modèle animal SHR (Sacerdoti *et al.*, 1989 ; Escalante *et al.*, 1991).

Ainsi, toutes ces observations ont conduit à l'hypothèse que des variations de la synthèse de l'acide 20-HETE rénale pourraient jouer un rôle dans le développement de l'hypertension (McGiff and Quilley, 1999).

II.1.3 Hypertension artérielle essentielle et polymorphisme génétique des cytochromes P450

L'hypertension artérielle (HTA) est un trait complexe fréquent, responsable d'évènements cardiovasculaires morbides. Différentes études ont montré qu'il existe une origine mixte, environnementale et génétique à l'hypertension (Bonnardeaux *et al.*, 1995 ; Lifton, 1996 ; Kearney *et al.*, 2005). Plus de neuf fois sur dix, la cause exacte de l'hypertension artérielle n'est pas identifiée. On parle alors « d'hypertension artérielle essentielle » ou « primaire ».

Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'apparition d'une l'hypertension artérielle: hérédité, médicaments ou toxiques, facteurs nutritionnels ou environnementaux (consommation sodée, alcool, sédentarité, stress), excès pondéral (25% des sujets en surpoids sont hypertendus). L'Organisation Mondiale de la Santé a fixé des seuils de pression artérielle, en tenant compte à la fois des risques tensionnels et des inconvénients liés aux traitements (Tableau 7). Une tension est considérée comme normale si la pression artérielle systolique (PAS) est inférieure à 140 millimètres de mercure (mm Hg), et si la pression artérielle diastolique (PAD) est inférieure à 90 mm d'Hg.

Tableau 7. Valeurs limites des différents niveaux d'hypertension artérielle.

	Pression systolique	Pression diastolique
HTA sévère	> 180 mm Hg	> 110 mm Hg
HTA stade 2	> 160 mm Hg	> 100 mm Hg
HTA stade 1	> 140 et < 159 mm Hg	> 90 et < 99 mm Hg
Pré HTA	> 120 et < 139 mm Hg	> 80 et < 89 mm Hg

En 2000, on estime à environ 26,4% la proportion de sujets hypertendus (26,6% des hommes et 26,1% des femmes) et le chiffre de 29,2% devrait être atteint d'ici 2025 (29% des hommes et 29,5% des femmes). Parmi les 972 millions d'adultes hypertendus, 333 millions (34,3%), proviennent des pays développés, et 639 millions (65,7%), sont issus des pays en voie de développement. Le nombre d'adultes hypertendus d'ici 2025 pourrait augmenter de 60% et atteindre 1,56 milliard (Kearney *et al.*, 2005).

L'hypertension artérielle serait responsable d'un peu moins de 8 millions de décès par an dans le monde et de près de 100 millions de jours d'invalidité. Elle serait la cause de près de la moitié des accidents vasculaires cérébraux et des accidents cardiaques (Lawes *et al.*, 2008).

En France, l'HTA toucherait 10 à 15% de la population française (8 millions de personnes traités pour un coût de 3 milliards d'euros, probablement 14 millions de malades) (Mounier-Vehier *et al.*, 2002). Les chiffres ont tendance à augmenter, passant de 8,6 à 10,5 millions de personnes traitées entre 2000 et 2006, posant ainsi un problème de santé publique. La prise en charge a coûté près de 2,3 milliards d'euros en 2006, rien que pour les médicaments antihypertenseurs.

Le dépistage de marqueurs génétiques dans l'hypertension artérielle essentielle est important pour la prévision de l'évolution naturelle de cette affection et, éventuellement, pour la compréhension des mécanismes en cause. L'un des objets de cette approche est la prévention sélective, c'est à dire la possibilité de déceler les sujets particulièrement exposés et de suggérer des modifications à apporter à leur environnement en vue de prévenir ou de limiter l'ascension des chiffres tensionnels (Mongeau, 1987 ; Shih and O'Connor, 2008).

Les études d'association appliquent des techniques épidémiologiques classiques (études cas-contrôles pour les traits dichotomiques, études transversales de populations pour les traits continus) pour déterminer si la maladie ou le trait en question sont associés à un génotype, de la même façon qu'on examinerait le lien entre une maladie X et l'exposition Y. Alors que les analyses de liaison font partie des analyses d'association, toutes les études d'association ne sont pas forcément des études de liaison, car il n'est pas nécessaire d'avoir des familles. Les marqueurs les plus utilisés pour les analyses d'association sont les SNP. L'analyse peut se concentrer sur un ou plusieurs gènes candidats ou couvrir l'ensemble du génome humain (Genomewide association studies - GWAS). Le nombre de SNP que l'on peut mesurer simultanément grâce à des puces spécialisées a rapidement augmenté ces dernières années et, actuellement, un million de SNP sont analysés simultanément dans les études sur l'ensemble du génome

Formes mono- et polygéniques d'hypertension artérielle

Les formes monogéniques d'hypertension artérielle sont caractérisées par des mutations à haute pénétrance (à savoir une forte probabilité de développer la maladie pour la personne qui porte la mutation), résultant en une perte ou un gain de fonction important. Des polymorphismes de certains gènes impliqués dans ces maladies monogéniques pourraient également jouer un rôle dans l'HTA essentielle (Tobin *et al.*, 2008). Par exemple, Tobin et coll. ont décrit cinq polymorphismes communs dans le gène KCNJ1 (ROMK, canal potassique), dont chacun était associé avec une pression artérielle systolique d'environ 1,2-1,6 mmHg plus basse (Tobin *et al.*, 2008). Ji et coll. ont montré que des mutations rares (1,6%) dans les gènes SLC12A3 (NCCT, Na-Cl cotransporteur), SLC12A1 (NKCC2, Na-K-2Cl cotransporteur) et KCNJ1 (ROMK, canal potassique) sont associées à des pressions artérielles plus basses dans la population générale (Ji *et al.*, 2008). Les porteurs de ces mutations sont donc protégés contre l'HTA.

Il existe à l'heure actuelle plus de 100 gènes candidats pour l'HTA essentielle, identifiés grâce aux études de liaison et/ou d'association chez l'homme ou grâce aux études expérimentales chez l'animal. Il s'agit en général de gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation hydrosodée (Tableau 8).

L'un des plus étudiés est probablement le gène ACE codant pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Les personnes portant le génotype D/D ont une concentration plasmatique d'enzyme de conversion de l'angiotensine deux fois plus élevée que les personnes portant un génotype I/I ou I/D (Rigat *et al.*, 1990) Comme pour la grande majorité des gènes candidats pour l'HTA essentielle, les résultats ont été contradictoires avec certaines études trouvant une association (Schunkert *et al.*, 1994) et d'autres pas (Berge et Berg, 1994). Les difficultés à répliquer les résultats obtenus dans les études de type «gènes candidats» résultent probablement de plusieurs facteurs :

- 1) la taille d'échantillon trop petite pour détecter de faibles effets sur la pression artérielle ;
- 2) la prise en compte insuffisante des facteurs (environnementaux) confondants comme la consommation en sel ;
- 3) les phénotypes parfois mal caractérisés et
- 4) la couverture génétique insuffisante des gènes candidats.

Une étude par Eap et coll. suggère que l'association entre les gènes ABCB1 et CYP3A5 et la pression artérielle dépend de la consommation en sel des participants et illustre l'importance des interactions gène-gène et des interactions gène-environnement dans la pathogenèse de l'HTA essentielle (Eap *et al.*, 2007)

Tableau 8. Gènes candidats impliqués dans la régulation de la pression artérielle.

Mécanisme	Symbole et	nom du gène
Système rénine- Angiotensione- aldostérone	ACE	Angiotensin converting enzyme
	AGT	Angiotensinogen
	AGTR1	Angiotensin II receptor, type 1
	AGTR2	Angiotensin II receptor, type 2
	CYP11B1	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
	CYP11B2	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2
Système nerveux sympathique	REN	Renin
	ADRB1	Adrenergic, beta-1-, receptor
	ADRB2	Adrenergic, beta-2-, receptor
	ADRB3	Adrenergic, beta-3-, receptor
	DRD1	Dopamine receptor D1
	DRD2	Dopamine receptor D2
	DRD3	Dopamine receptor D3
	DBH	Dopamine beta-hydroxylase
	NPY	Neuropeptide Y
	NPY1R	Neuropeptide Y receptor 1
Transporteurs du Sodium	PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase
	SCNN1A	Sodium channel, nonvoltage-gate 1 alpha
	SCNN1B	Sodium channel, nonvoltage-gate 1 beta
	SCNN1G	Sodium channel, nonvoltage-gate 1 gamma
	SLC12A3	Solute carrier family 12, member 3, NaCl co-transporteur
Stéroïdes	SLC12A1	Solute carrier family 12, member 1, Na-K-2Cl co-transporteur
	HSD11B2	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase2
Peptides natriurétiques	NR3C2/MLR	Nuclear receptor subfamily 3, group C; mineralocorticoid receptor
	NPPB	Natriuretic peptide precursor B
	NPPA	Natriuretic peptide precursor A
	NPPC	Natriuretic peptide precursor C
Divers	NPR3	Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C
	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B
	ADD1	Adducin 1 (alpha)
	ADD2	Adducin 1 (alpha)
	ADD3	Adducin 1 (alpha)
	CYP3A5	Cytochrome P450 family 3, subfamily A, polypeptide 5
	GNB3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide
	EDN-1	Endothelin-1
	LPL	Lipoprotein lipase
	NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	

Les cytochromes P450 impliqués dans la production de métabolites vaso-actifs à partir de l'acide arachidonique sont connus pour leur nature polymorphe, il est donc probable que les différents variants puissent avoir des activités métaboliques différentes et que les quantités de métabolites vaso-actifs produits soient variables. Il pourrait alors exister un lien entre la

présence de certains variants et le risque accru d'apparition de pathologies vasculaires, par exemple l'hypertension ou de pathologies à composantes inflammatoires liées à la modification de synthèse de certains métabolites de l'acide arachidonique.

Les cytochromes P450 ω -Hydroxylases dans la voie d'activation de l'acide arachidonique

Les enzymes des sous familles CYP4A, 4B et 4F catalysent l' ω -hydroxylation des acides gras. Plusieurs isoformes de ces familles produisent l'acide 20-HETE lorsqu'elles sont incubées avec l'acide arachidonique (Hardwick *et al.*, 1987 ; Gibson, 1989 ; Powell *et al.*, 1998). Les gènes des sous familles *CYP4A* et *CYP4B* s'étendent sur un cluster de gènes très conservé du chromosome 4 chez la souris (Heng *et al.*, 1997), du chromosome 5 chez le rat et du chromosome 1 chez l'Homme. La sous famille *CYP4F* semble être la plus ancienne des sous familles d' ω -hydroxylases et s'étend dans une région différente chez l'Homme (chromosome 19) (Bell *et al.*, 1993).

Les ADN complémentaires (ADNc) codant pour 15 isoformes de la sous-famille CYP4A ont été identifiés dans diverses espèces (Nelson *et al.*, 1996). Un résumé des différentes isoformes responsables de l' ω -hydroxylation des acides gras chez différentes espèces est présenté dans le Tableau 9.

De plus, il a été reporté que les gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CYP2E1* pouvaient engendrer la formation de différents régioisomères des HETEs (Elbekai and El-Kadi, 2006). Le rôle des HETEs dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires a été documenté dans des travaux précédents (Roman *et al.*, 2000; Elbekai and El-Kadi, 2006). Notamment, l'acide 20-HETE constitue un puissant constricteur au niveau rénal, cérébral, mésentérique et au niveau des artérioles du muscle squelettique (Gebremedhin *et al.*, 1998 ; Kunert *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2001 ; Alonso-Galicia *et al.*, 2002).

Chuang *et al.*, ont identifié le seul représentant de la sous-famille CYP2U chez l'Homme. Il s'agit du cytochrome CYP2U1, récemment décrit comme participant au métabolisme de l'acide arachidonique (Chuang *et al.*, 2004). Cette hydroxylation est à l'origine de la production d'acides hydroxyeicosatétraénoïques, en particulier d'acide 20-HETE.

Tableau 9. Production des eicosanoïdes (EETs et HETEs) par les cytochromes P450 ω -hydroxylases à partir de l'acide arachidonique.

Isoforme	Espèce	Produit(s)	Tissus	Inducteurs	Références
CYP4A1	Rat	19-, 20-HETE	R, F, C	Fibrates(+), diabète, jeûne	Kimura <i>et al.</i> , 1989 ; Kroetz <i>et al.</i> , 1998 ; Nguyen <i>et al.</i> , 1999
CYP4A2	Rat	19-, 20-HETE, EETs	R, F, V, C, P	Fibrates, diabète, jeûne	Gibson <i>et al.</i> , 1989 ; Helvig <i>et al.</i> , 1998 ; Kimura <i>et al.</i> , 1989
CYP4A3	Rat	19-, 20-HETE, EETs	R, F, V, C, P	Fibrates, diabète, jeûne	Helvig <i>et al.</i> , 1998 ; Kimura <i>et al.</i> , 1989 ; Nguyen <i>et al.</i> , 1999
CYP4A11	Homme	19-, 20-HETE	F, R		Lasker <i>et al.</i> , 2000 ; Powell <i>et al.</i> , 1998
CYP4F2	Homme	20-HETE	F, R		Lasker <i>et al.</i> , 2000 ; Powell <i>et al.</i> , 1998
CYP4F3	Homme	Hydroxy-TB4	PMNs		Kikuta <i>et al.</i> , 1998
CYP4F11	Homme		F, R		Cui <i>et al.</i> , 2000
CYP4A10	Souris	19-, 20-HETE	F, R	Fibrates(+)	Bell <i>et al.</i> , 1993
CYP4A12	Souris	19-, 20-HETE	F, R	Fibrates (femelle)	Bell <i>et al.</i> , 1993
CYP4A14	Souris	12-Hydroxy-laurate	F, R	Fibrates(+)	Bell <i>et al.</i> , 1993
CYP4F14	Souris	Leucotriènes	F, R		Daikh <i>et al.</i> , 1994
CYP4B1	Souris	Hydroxy-acides gras			Imaoka <i>et al.</i> , 1995
CYP2J9	Souris	19-HETE	C		Qu <i>et al.</i> , 2001
CYP2E1	Homme	19-HETE	F, R	Ethanol	Laethem <i>et al.</i> , 1996 ; Rfkind <i>et al.</i> , 1995
CYP2U1	Homme	19-, 20-HETE	C, R		Chuang <i>et al.</i> , 2004

C, cerveau ; F, Foie ; LPS, lipopolysaccharide ; P, poumon ; PMNs, leucocytes polynucléaire neutrophiles ; R, rein.

II.1.4 Les cytochromes P450 de la sous-famille 4A

Les cytochromes de la sous-famille CYP4A interviennent dans la régulation du tonus vasculaire par l'intermédiaire de la production de l'acide 20-HETE (Powell *et al.*, 1998). En effet, ce dernier est responsable de l'inhibition des canaux K⁺ activés par le calcium dans les cellules musculaires lisses (Gebremedhin *et al.*, 1998). De plus, l'absence de *CYP4a14* provoque une hypertension chez la souris, preuve de l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la pression sanguine. Cette étude suggère que les homologues du CYP4A chez l'Homme pourraient également être impliqués dans l'hypertension (Holla *et al.*, 2001).

Les gènes de la sous famille CYP4A sont exprimé principalement au niveau rénal, mais aussi dans le tissu hépatique (Kawashima *et al.*, 1992, 1994 ; Elbekai and El-Kadi, 2006). Chez l'Homme, ils sont représentés par 2 membres, le *CYP4A11* (Simpson, 1997), et le *CYP4A22* récemment identifié (Bellamine *et al.*, 2003).

Il y a quelques années la localisation chromosomique, la séquence nucléotidique et la structure du *CYP4A11* et du *CYP4A22*, ont été identifiées chez l'Homme (Bell *et al.*, 1993 ; Bellamine *et al.*, 2003). Ces cytochromes P450 sont localisés sur le bras court du chromosome 1 (1p33) au sein d'un cluster de gènes de la famille CYP4 (Figure 7). Ils s'étendent sur 12,6 Kb et comprennent 12 exons (Bell *et al.*, 1993).

Des études plus récentes démontrent le rôle du CYP4A dans la régulation de la fonction rénale et de la pression sanguine chez l'Homme (Gainer *et al.*, 2005 et 2008 ; Mayer *et al.*, 2005, 2006 ; Fu *et al.*, 2008a, 2008b ; Sugimoto *et al.*, 2008 ; Ward *et al.*, 2008 ; Fava *et al.*, 2008 ; Hermann *et al.*, 2009 ; Ding *et al.*, 2010). Divers études ont examiné les associations entre des polymorphismes génétiques de deux enzymes métabolisant l'acide arachidonique en acide 20-HETE : le CYP4A11 et le CYP4F2 et le risque de développer une pathologie cardiovasculaire (Tableau 10).

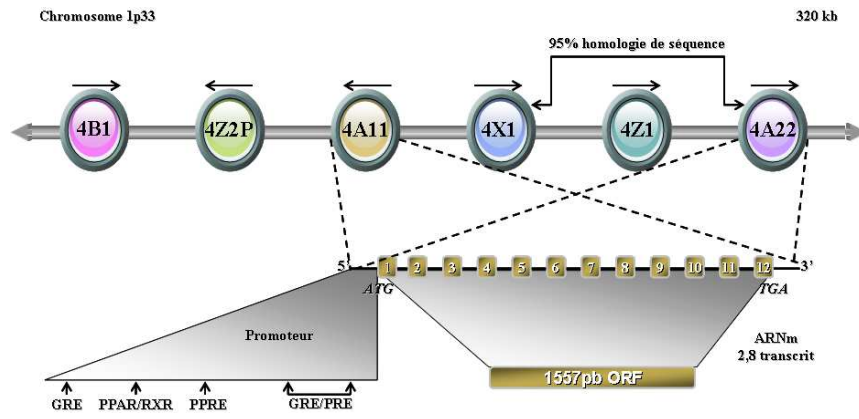


Figure 7. Organisation structurale du cluster de gènes de la famille CYP4 sur le chromosome 1 humain, région p33 et structure des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*.

Tableau 10. Association entre polymorphismes du *CYP4A11* et du *CYP4F2* et les pathologies cardiovasculaires.

	Pathologie	Ethnies	Association	Références
<i>CYP4A11</i> T8590C (rs1126742)	Hypertension	Afro américaine	Aucune association	Gainer <i>et al.</i> , 2005
	Hypertension	Blanc américaine	Risque élevé	Gainer <i>et al.</i> , 2005
	Hypertension	Afro américaine	Risque plus élevé chez les hommes atteints d'insuffisance rénale	Gainer <i>et al.</i> , 2008
	Hypertension	Caucasienne	Risque élevé	Mayer <i>et al.</i> , 2005
	Hypertension	Suédoise	Risque élevé	Fava <i>et al.</i> , 2008
	AVC ischémique MC	Suédoise Suédoise	Aucune association Aucune association	Fava <i>et al.</i> , 2008 Fava <i>et al.</i> , 2008
	Hypertension Hypertension	Japonaise Blanc australienne	Réduction du risque Aucune association	Fu <i>et al.</i> , 2008b Ward <i>et al.</i> , 2008
<i>CYP4A11</i> (rs2269231 and rs9333025)	Hypertension	Japonaise	Aucune association	Fu <i>et al.</i> , 2008b
<i>CYP4F2</i> V433M (rs2108622)	Hypertension	Blanc australienne	Risque élevé	Ward <i>et al.</i> , 2008
	Hypertension	Japonaise	Aucune association	Fu <i>et al.</i> , 2008a
	AVC ischémique	Suédoise	Risque élevé	Fava <i>et al.</i> , 2008
	AVC ischémique IM	Japonaise Japonaise	Réduction du risque Réduction du risque	Fu <i>et al.</i> , 2008a Fu <i>et al.</i> , 2009
<i>CYP4F2</i> (rs1558139)	Hypertension	Japonaise	Risque élevé	Fu <i>et al.</i> , 2008a
<i>CYP4F2</i> G421C	Hypertension	Chinoise	Risque élevé	Liu <i>et al.</i> , 2006

MC, maladies coronariennes ; IM, infarctus du myocarde ; AVC, Accident cardiovasculaire

Les cytochromes P450 4A11 et 4A22

Parmi les gènes candidats de l'hypertension artérielle essentielle, nous nous intéressons plus particulièrement aux gènes codant les isoformes CYP4A11 et CYP4A22 qui font partie de la superfamille des cytochromes P450 (CYP450) (drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html). Chez l'Homme, les CYP4A11 et CYP4A22 sont les seuls représentants de la sous famille CYP4A. Ils sont principalement exprimés au niveau hépatique et rénal, et sont inductibles par un certain nombre de composés proliférateurs de peroxisomes, comme les fibrates, les phtalates et les polluants environnementaux (Diaz *et al.*, 1993 ; Ito *et al.*, 1998 ; Bellamine *et al.*, 2003). Les CYP4As interviennent dans le métabolisme des acides gras à moyennes et longues chaînes comme l'acide laurique, l'acide palmitique et l'acide arachidonique. Le métabolisme de l'acide arachidonique donne naissance à des métabolites vaso-actifs : majoritairement l'acide 20-HETE (Lasker *et al.*, 2000 ; Miyata and Roman, 2005).

Le 20-HETE joue un rôle important sur la régulation de la résistance vasculaire rénale et sur la fonction tubulaire (Kroetz and Zeldin, 2002). Il agit comme un puissant vasoconstricteur au niveau des artérioles rénales. Il intervient également sur la réabsorption du sodium en inhibant l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase au niveau du tubule proximal, mais aussi avec l'inhibition du cotransport de Na⁺+K⁺+2Cl⁻ au niveau de l'anse de Henlé ascendante médullaire et agit par un effet comparable au furosémide (Escalante *et al.*, 1991 ; Roman, 2000 ; Fleming, 2001).

Il y a quelques années la localisation chromosomique, la séquence nucléotidique et la structure du *CYP4A11* et du *CYP4A22* ont été identifiées chez l'Homme (Bell *et al.*, 1993 ; Bellamine *et al.*, 2003). Ces cytochromes P450 sont localisés sur le bras court du chromosome 1 (1p33) au sein d'un cluster de gènes de la famille CYP4. Les gènes codant les CYP4A11 et CYP4A22 présentent 95% d'identité de séquence nucléotidique (Figure 4).

Le caractère polymorphe du *CYP4A11* a été démontré. Soixante dix polymorphismes ont été identifiés dans une population d'origine coréenne : 6 dans les régions codantes, 60 dans les introns et 4 dans la région 3'UTR (Cho *et al.*, 2005). Par ailleurs, plus de 120 SNPs du *CYP4A11* humain sont décrits dans la base de données de SNPs du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Au niveau moléculaire, la mise en évidence d'une mutation du *CYP4A11* (8590T>C, sur l'exon 11) produisant une substitution d'une phénylalanine en sérine en position 434 (F434S) a été reliée *in vitro* à une diminution de plus de 50% de l'activité du variant exprimé dans *Escherichia coli* (Gainer *et al.*, 2005). Conformément aux données *in vitro*, l'excrétion urinaire de l'acide 20-HETE chez les individus portant l'allèle muté C (génotypes TC et CC) a été diminuée par rapport à celle des individus portant l'allèle sauvage T (génotype TT) (Ward *et al.*, 2008). De même, les porteurs de l'allèle muté C ont présenté une diminution de la réponse de l'acide 20-HETE par rapport à son rôle régulateur de la réabsorption du NaCl, même après ajustement d'autres covariables telles que la concentration sérique d'insuline (Laffer *et al.*, 2008). En outre, les porteurs de l'allèle C ont présenté une pression artérielle diastolique ainsi qu'un taux d'aldostérone plus élevés (Laffer *et al.*, 2008).

Plusieurs études de corrélation génotype-phénotype sur des populations de patients d'origine caucasienne atteints d'hypertension ont montré une association entre le variant 8590C du *CYP4A11* et le phénotype hypertendu : étude MONICA : Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease (Mayer *et al.*, 2005), étude Tennessee et étude Framingham heart study (Gainer *et al.*, 2005). Cependant aucune association n'a été retrouvée dans une population de patients hypertendus Américains d'origine Africaine (Gainer *et al.*, 2005). Plusieurs études ont démontré que la fréquence du polymorphisme d'activité du *CYP4A11*-T8590C est plus élevée chez les afro-américain, suivi des japonais puis des caucasiens.

L'association entre l'allèle 8590C et l'hypertension artérielle reste encore controversée. Chez 120 patients hypertendus de race noire provenant de la cohorte Tennessee, le génotype 8590C a été retrouvé sans qu'aucune association ne soit mise en évidence avec le phénotype hypertendu. Par contre, cet allèle a été associé à une augmentation du risque à l'hypertension artérielle avec un OR de 2.31 chez 512 sujets d'origine caucasienne de la même étude (Gainer *et al.*, 2005). Dans le but de confirmer cette association entre le polymorphisme du *CYP4A11* et le phénotype hypertendu, 1538 sujets provenant de la cohorte Framingham ont été étudiés, l'OR retrouvé pour l'association entre l'allèle 8590C et l'hypertension est de 1.23 (Gainer *et al.*, 2005).

De même, une étude de corrélation phénotype-génotype a été réalisée chez 732 afro-américains hypertendus avec une insuffisance rénale (ASSK). Chez les hommes, le génotype 8590C a été associé avec une PAS très élevée et une pression pulsée à l'état de base ; mais cette association n'a pas été observée chez les femmes dans cette étude. Néanmoins, ce génotype a été associé avec une augmentation à l'incidence cumulative de la maladie rénale en phase terminale ou de décès parmi les individus avec une protéinurie élevée (Gainer *et al.*, 2008).

Cette association entre la variante du CYP4A11-T8590C et l'hypertension artérielle a été également étudiée dans un autre groupe : MONICA (MONitoring trends and determinants In Cardiovascular disease) chez 1397 individus. Les sujets portant le génotype CC ont présenté une PAS et une PAD très élevées ; cependant un effet de la variable T8590C sur le volume, la structure et la fonction cardiaque n'a pas été retrouvé (Mayer *et al.*, 2005). De même, une cohorte de 6002 Suédois porteurs de l'allèle C, ont présenté une prévalence plus élevée à l'hypertension artérielle (Fava *et al.*, 2008).

Au contraire, la fréquence des génotypes TC+TT a été retrouvée significativement plus élevée chez les individus hypertendus par rapport aux individus contrôles dans une population japonaise (Fu *et al.*, 2008b). Cependant, l'utilisation d'un modèle récessif avec un nombre faible d'individus homozygotes 8590CC a été un paramètre limitant dans cette étude. Deux autres polymorphismes du *CYP4A11* étudiés dans cette population japonaise, le rs2269231 et le rs9333025, n'ont pas montré une association significative avec l'HTA. Cependant, la fréquence de ces trois polymorphismes (haplotype A-T-G) est significativement plus élevée chez les hommes hypertendus par rapport au groupe témoin (Fu *et al.*, 2008a).

En 2003, une nouvelle isoforme : le CYP4A22, présentant 95% d'homologie nucléotidique avec le CYP4A11, a été découverte (Bellamine *et al.*, 2003), et pourrait également être un gène candidat de l'hypertension artérielle. A l'heure actuelle peu d'études ont été réalisées afin de caractériser la fonction et le polymorphisme de ce nouveau gène (Gainer *et al.*, 2005). En 2006, Hiratsuka *et al.* ont montré dans une population japonaise que cette isoforme présente une nature hautement polymorphe (Hiratsuka *et al.*, 2006). Cette étude a mis en évidence plusieurs variants naturels dans la région codante avec des fréquences élevées de 50% à 99%. Une mutation très intéressante retrouvée dans ce travail de recherche entraîne le changement d'une glycine en position 130 par une serine.

La fréquence de distribution de cette mutation dans la population japonaise est de 53% (Hiratsuka *et al.*, 2006). Parmi les membres des isoformes de la famille CYP4, la glycine en position 130 est un acide aminé très conservé. Dans un autre travail de recherche, une étude de mutagenèse dirigée sur le gène du *CYP4A11* a introduit une serine en position 130 à la

place de la glycine en montrant que ce changement provoque l'inactivation de la protéine CYP4A11 (Gainer *et al.*, 2005).

Ainsi, bien que le CYP4A11 et le CYP4A22 soient clonés et séquencés depuis plusieurs années et qu'un polymorphisme génétique d'activité du CYP4A11 puisse être un facteur de susceptibilité à une pathologie majeure, l'hypertension, les données issues de la littérature ne montrent pas d'études systématiques d'anomalies de séquence complète de ces deux gènes dans la population française.

C'est pourquoi, notre recherche a consisté dans un premier temps, à développer pour les CYP4A11 et CYP4A22, une stratégie de recherche et d'identification de mutations basée sur l'étude du polymorphisme de conformation d'ADN simple brin généré par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR-SSCP. De plus, afin d'évaluer la variabilité interethnique de ce polymorphisme génétique, cette stratégie a ensuite été appliquée à des populations d'origine ethniques différentes.

Dans un deuxième temps, nous avons également effectué une analyse in silico des variants identifiés précédemment avec pour la région promotrice une analyse en utilisant le logiciel MatInspector développé par Genomatix et pour les régions codantes une analyse par modélisation par homologie comparative.

*L'analyse fonctionnelle in vitro des variants des régions codantes par expression hétérologue dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a également été initiée, comprenant la mise au point méthodologique et la validation des cinétiques enzymatiques des CYP4As recombinants par la mesure de l'acide 12-hydroxylaurique par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem.*

II.2 ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE DES *CYP4A11* ET *CYP4A22*

Dans le cadre de nos travaux sur le polymorphisme génétique des cytochromes P450, le *CYP4A11* et le *CYP4A22*, la stratégie méthodologique utilisée consiste en une analyse structurale des gènes candidats à l'HTA, basée sur le criblage de leurs séquences codantes et régulatrices, complété par l'étude *in vitro* et *in silico* des conséquences fonctionnelles des nouveaux variants identifiés. Ces analyses seront complétées par des études de corrélation phénotype/génotype chez des populations de patients hypertendus parfaitement caractérisés sur le plan clinique.

Remarque : Toutes les méthodes utilisées sont décrites en détail dans les articles composant cette thèse.

II.2.1 Echantillons d'ADN analysés

Le nombre d'échantillons d'ADN génomique analysés dans notre étude est de 231, provenant de volontaires d'ethnies différentes :

Quatre vingt dix neuf échantillons sont issus d'une population de volontaires sains Français d'origine caucasienne, dont le recrutement a été réalisé au Centre d'Investigation Clinique de l'Hôpital Cardiologique CHRU de Lille. Trente six échantillons sont issus d'une population de volontaires d'origine gabonaise fournie par le Dr. F. Migot-Nabias du Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Institut de Recherche pour le Développement, Gabon. Soixante échantillons sont issus d'une population de volontaires d'origine péruvienne fournie par le Dr. J. Cardenas Garcia de la Faculté de Pharmacie et Biochimie de l'Université Catolica de Sante Maria d'Arequipa, Pérou. Trente six échantillons sont issus d'une population de volontaires d'origine tunisienne fournie par le Pr. A. Kenani de la Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie.

Pour chaque individu un consentement éclairé a été obtenu et 10 ml de sang ont été collectés sur EDTA. L'ADN génomique a été isolé et purifié à partir des leucocytes selon une procédure standard d'extraction au phénol/chloroforme ou à l'aide de kits commerciaux. La qualité et la concentration en acides nucléiques des échantillons ont été évaluées par mesure de leur densité optique à 260 et 280 nm.

II.2.2 Développement d'une stratégie d'analyse PCR-SSCP

Pour rechercher et identifier les mutations des *CYP4A11* et *CYP4A22*, nous avons développé une méthode d'analyse de la séquence codante et des régions flanquantes régulatrices en 5' et en 3' des gènes, basée sur l'étude du polymorphisme de conformation de fragments d'ADN simples brins générés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR-SSCP). Les séquences génomiques de référence du *CYP4A11* et du *CYP4A22* ont été obtenues à partir du site GenBank du NCBI avec les numéros GeneID: 1579 et GeneID: 284541.

Les gènes codant les *CYP4A11* et *CYP4A22* présentent 95% d'identité de séquence nucléotidique. La stratégie retenue est, dans une première étape, l'amplification spécifique de chacun des deux gènes complets en deux réactions longue PCR avec l'utilisation d'une enzyme Taq DNA polymérase haute fidélité. Dans une deuxième étape, les réactions longue PCR servent de matrice pour l'amplification spécifique de la région promotrice et l'amplification spécifique des 12 exons des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*, comprenant leurs séquences consensus flanquantes (sites donneur et accepteur d'épissage, codon d'initiation et de terminaison de la traduction).

Le principe de cette technique est fondé sur le fait que la mobilité des simples brins d'ADN soumis à une électrophorèse en milieu non dénaturant dépend étroitement de leur structure tridimensionnelle et par conséquent de leur séquence nucléotidique (Orita *et al.*, 1989). Toute variation de migration électrophorétique, observée entre les échantillons analysés et un échantillon témoin de séquence connue, traduit la présence d'une modification de séquence des fragments analysés. Le séquençage des fragments d'ADN correspondants permet de confirmer la présence et de déterminer la position et la nature de la ou des mutations détectées.

Cette technique SSCP apparaît particulièrement bien adaptée à la détection et à l'identification d'anomalies de séquence de nos gènes d'intérêt, qui ont des exons relativement courts, généralement de tailles inférieures à 300 pb. L'efficacité de cette technique étant corrélée à la taille des séquences analysées, elle est optimale pour des fragments PCR de 100 à 300 pb (Hayashi and Yandell, 1993 ; Sheffield *et al.*, 1993).

II.3 ANALYSE FONCTIONNELLE DES VARIANTS NATURELS DES CYP4As

II.3.1 Analyse *in silico* des variants de la région promotrice

L'analyse *in silico* de la région promotrice permet d'identifier les séquences consensus de facteurs de transcription et des éléments de réponse qui contrôlent l'expression transcriptionnelle du gène. L'analyse de la séquence sauvage et des variants alléliques naturels de la région promotrice des *CYP4As* (-1003 pb en amont de l'ATG) a été effectuée avec le logiciel MatInspector (Matrix Family Library Version 6.3) qui utilise la base de données MatBase de Genomatix. MatInspector attribue un coefficient de qualité optimisé (optimized matrix similarity) qui permet de minimiser les faux positifs des séquences non régulatrices. Une séquence consensus parfaite présente un coefficient de correspondance à la matrice égale à 1,00, la limite inférieure acceptable est de 0,80 (Cartharius *et al.*, 2005).

II.3.2 Analyse *in silico* des variants des régions codantes par modélisation par homologie comparative

La modélisation par homologie comparative permet l'analyse de la structure 3D des CYP450 et de leurs variants naturels, ainsi que l'étude des relations séquence-structure-activité.

Il est dans un premier temps nécessaire d'identifier des protéines de structure connue apparentée à la séquence à modéliser. Ces structures sont rassemblées dans une base de données : la Protein Databank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Pour trouver dans cet ensemble de données les structures de références les plus pertinentes, nous avons utilisé le logiciel BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool).

La deuxième étape consiste à aligner la séquence primaire à modéliser et les séquences de référence, en prenant soin de superposer les zones structurellement conservées. Parmi les logiciels effectuant cette opération cruciale pour la qualité du modèle final, ClustalW 1.81 est l'un des plus utilisés en raison de sa flexibilité dans la gestion des zones les moins conservées.

La troisième étape de la modélisation moléculaire fait appel aux logiciels Sybyl 6.9.1 (Tripos Inc., St. Louis, USA) et Jackal implémentés sur une station de travail Silicon Graphics Octane 2 fonctionnant sous environnement UNIX. Pour chaque alignement, les coordonnées des carbones α de la structure de référence sont transférées aux carbones α du modèle. Les chaînes latérales du modèle sont alors ajoutées et leur position spatiale est ajustée pour minimiser les contacts entre atomes en faisant appel à une bibliothèque de rotamères.

Enfin, la dernière étape consiste à évaluer le modèle obtenu tant au niveau de la structure secondaire que de la géométrie des acides aminés.

II.3.3 Analyse *in vitro* des variants des régions codantes par expression hétérologue dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un microorganisme eucaryote qui offre l'avantage de disposer naturellement des membranes cibles et de la machinerie de transport nécessaire à l'expression fonctionnelle de CYP450 hétérologues. Ce système d'expression hétérologue a déjà été employé avec succès pour l'étude fonctionnelle d'isoenzymes de la superfamille des CYP450 (Peyronneau *et al.*, 1992 ; Gonzalez and Korzekwa, 1995 ; Urban *et al.*, 1997). Cet hôte contient de faibles quantités de CYP450 endogènes. Dans des conditions de culture appropriées, la quantité totale de CYP450 endogènes est suffisamment faible au regard du niveau d'expression possible des CYP450 exogènes, pour être négligeable.

L'expression chez la levure de CYP450 humains nécessite, après clonage de l'ADNc correspondant à l'isoenzyme étudiée, d'en extraire la phase codante et de l'insérer entre les séquences promotrices et terminatrices de transcription de la levure. En pratique les cassettes « promotrices » utilisées contiennent à leur extrémité 3' un fragment de séquence de levure qui est transcrit et qui constitue la partie 5' non codante du messenger hétérologue hybride. Un positionnement précis du codon d'initiation du gène hétérologue dans ce messenger hybride est essentiel pour sa bonne traductibilité (Cullin and Pompon, 1988 ; Pompon, 1988).

Isolement de l'ADNc des *CYP4A11* et *CYP4A22*

Pour isoler l'ADNc des *CYP4A11* et *CYP4A22*, les ARN totaux d'une biopsie rénale humaine sont extraits à l'aide du kit RNA-Easy (Qiagen). Une première étape de rétrotranscription est réalisée sur un 1 µg d'ARN total par la transcriptase inverse de MMLV (Superscript II reverse transcriptase, Life Technologies Cergy Pontoise, France).

L'amplification de l'ADNc des *CYP4A11* et *CYP4A22* est ensuite effectuée par PCR sur 2 µL de produit de rétrotranscription, à l'aide d'amorces spécifiques ayant à leur extrémité 5' le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction XmaI (C/CCGGG) pour les amorces sens et SacII (CCGC/GG) pour l'amorce antisens (Tableau 11) et d'une polymérase hautement fidèle (AccuPrime Taq DNA Polymerase, Invitrogen). La PCR comprend 30 cycles consistant chacun en 3 étapes : 1 min à 94°C, 1 min à 60°C et 2 min à 68°C. Après purification, les produits PCR sont insérés dans le vecteur plasmidique PCR-Script Amp SK(+) (Stratagene, Amsterdam, Pays-Bas), puis clonés dans la souche de bactéries Epicurian Coli XL10-Gold à l'aide du kit PCR-Script Amp Cloning (Stratagene). Les différents variants alléliques naturels sont préparés par mutagenèse dirigée sur le plasmide contenant l'ADNc sauvage. Après extraction des ADN plasmidiques recombinants à l'aide du kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen), les inserts sont vérifiés par séquençage.

Tableau 11. Séquence des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le clonage des ADNc des *CYP4A11* et *CYP4A22*.

Nom des amorces	Séquences des amorces (5'-->3')
CYP4A11ADNcF	GGG CCCGGG AAAAATGAGTGTCTCTGTGCTGAGCCCCAGC
CYP4A22ADNcF	GGG CCCGGG AAAAATGAGTGTCTCTGTCTGAGCCCCAGC
CYP4A1122ADNcR	GGG CCGCGGTCA AAGCTGGTCCTTGTCTTCACAAGGG

Les sites de reconnaissance de l'enzyme de restriction XmaI (C/CCGGG) pour les amorces sens et SacII (CCGC/GG) pour l'amorce antisens sont soulignés et en gras.

Les plasmides contenant les ADNc sauvage ou mutés sont sous clonés aux sites XmaI et SacII du plasmide pV60, en aval du promoteur GAL-CYC1 inducible par le galactose (Figure 8). Après amplification dans une souche de bactéries DH5 α (Invitrogen, Cergy-pontoise, France), les plasmides purifiés sont utilisés pour transformer une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* W(R) selon la méthode à l'acétate de lithium décrite par Gietz *et al.*, 1992.

Les levures W(R) ainsi que le plasmide d'expression pV60, ont été gracieusement fournis par le Dr. Denis Pompon, du Centre de génétique moléculaire, CNRS, UPR 9061, Gif sur Yvette.

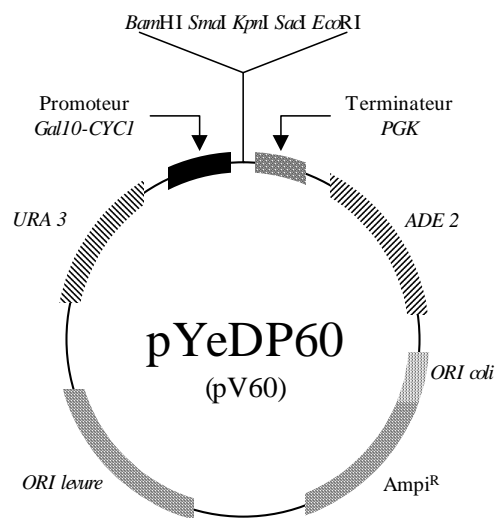


Figure 8. Vecteur d'expression dans la levure pYeDP60 (pV60). URA 3, ADE 2 : marqueurs de sélection ; insert : site de clonage ; pGAL10-CYC1-TPGK : cassette d'expression ; Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline.

Des levures transformées avec un vecteur pV60 vide sont utilisées comme témoins négatifs d'activité. Les levures transformées sont ensuite cultivées selon le protocole de Pompon *et al.*, 1996, puis après induction de l'expression des CYP450 recombinants par le galactose, les cellules sont lysées mécaniquement par agitation avec des billes de verre et les microsomes sont préparés comme décrit par Peyronneau *et al.*, 1992.

Préparation des microsomes de levures recombinantes

Après culture pendant 48 heures à 28°C sous agitation et induction de l'expression des CYP450 recombinants par ajout de galactose, des quantités substantielles de levures ont été recueillies par centrifugation et resuspendues dans un tampon TES (Tris 50 mM, sorbitol 0,6 M, EDTA 1 mM, pH 7,4). Les microsomes ont été alors préparés par casse mécanique à l'aide de billes de verre (diamètre = 0,5 - 0,7 mm), puis purifiés comme décrit précédemment (Peyronneau *et al.*, 1992).

Dosage des protéines microsomales

Le dosage a été réalisé selon la méthode colorimétrique de l'acide bicinchoninique décrite par Smith *et al.* (1985). Cette méthode est réalisée avec le coffret de réactifs BCA Protein Reagent (Pierce, Rockford, USA). Une gamme de sérum albumine bovine sert de référence.

Mesure du CYP450 total

La mesure a été réalisée selon la méthode décrite par Omura et Sato (1964). Les microsomes sont dilués au 1/20ème dans un tampon Tris 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4. Après réduction par du dithionite de sodium et un bullage avec du monoxyde de carbone, le CYP450 total est déterminé après un balayage spectral de 390 à 500 nm, par la mesure de l'absorption à 450 nm. Cependant nous n'avons pas pu mesurer de spectre d'absorption significatif à 450 nm en utilisant les microsomes hétérologue de levure exprimant les CYP4As recombinant.

II.3.4 Cinétiques enzymatiques des CYP4As recombinants, mesure de l'acide 12-hydroxylaurique par GC-MS/MS

Pour évaluer l'impact des variants identifiés dans la séquence codante des CYP4As, nous avons développé une méthode de dosage de l'activité enzymatique en utilisant, pour la mise au point méthodologique, des microsomes commerciaux exprimant la protéine CYP4A11, et l'acide laurique comme substrat. L'activité enzymatique a pu être appréciée en mesurant le métabolite de l'acide laurique, le 12-hydroxylaurate à l'aide d'une technique basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS).

Réactifs

L'acide laurique, l'acide 12-hydroxylaurate, l'acide nonadecanoïque (étalon interne), l'acétonitrile et le méthanol proviennent de chez Sigma.

Le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), 1% Trimethylchlorosilane (TMCS) proviennent de chez GRACE. Le système de régénération du NADPH, le tampon phosphate pH 7,4 à 0,5 M et les microsomes recombinant ont été fournis par BD Biosciences.

Dosage de l'acide laurique et de l'acide 12-hydroxylaurate par GC-MS/MS

Une gamme de calibration de l'acide laurique et de l'acide 12-hydroxylaurate a été réalisée en utilisant des concentrations comprises entre 0,05 et 20 mg/L (0,05 ; 0,2 ; 2 ; 5 et 20 mg/L) à partir de solutions mères à 1 g/L dans le méthanol. A chaque point de la gamme ont été ajoutés 50 µL de standard interne (acide nonadecanoïque 1 mg/L).

Afin de déterminer la concentration obtenue à partir des incubations, 100 µL du milieu d'incubation et 50 µL de solution méthanolique d'étalon interne, l'acide nonadecanoïque à 1 mg/L ont été séchés sous azote à froid. A chaque tube (point de calibration ou incubat) sont ajoutés 50 µL de BSTFA, 1% TMCS. Après incubation 30 minutes à 60°C les solutions sont refroidies pendant 10 minutes, 1 µL de la solution est ensuite injecté dans le chromatographe en phase gazeuse.

Conditions expérimentales de la GC

L'injecteur est chauffé à 260°C en mode splitless ; les incubations sont éluées de la colonne (VARIAN, CP-SIL 5CB, 25 m x 0,25 mm; ID DF = 0,12) en utilisant le programme de température suivant : maintien de la colonne à 100°C pendant 1 minute, augmentation de 25°C/min jusqu'à 300°C, et maintien de cette température pendant 3 minutes.

Conditions expérimentales de la MS/MS

L'acide laurique et l'acide 12-hydroxylaurate sont détectés dans le premier spectromètre de masse par impact électronique (EI+).

On réalisera ensuite une détection en mode Multiple reaction monitoring (MRM), afin d'obtenir un maximum de sensibilité pour les molécules étudiées. Pour réaliser le mode MRM, pour chaque composé, un ion spécifique est sélectionné, il sera fragmenté selon une énergie de collision qui sera optimisée pour obtenir des ions fils (1 ion de quantification et 1 ion de qualification). Les transitions MRM en mode EI+ sont décrites dans le Tableau 12. Pour chaque point de calibration le rapport des surfaces de l'ion de quantification du composé est calculé grâce au logiciel Masslynx.

Tableau 12. Récapitulatif des temps de rétention et des transitions MRM en mode EI+ retenues pour la quantification et la qualification des différents analytes.

Molécules	Temps de rétention (minutes)	Transition MRM Energie de collision Quantification	Transition MRM Energie de collision Qualification
Acide laurique	7,98	257,1>74,9 - 19 V	257,1>131,1 - 13 V
Acide 12-hydroxylaurique	9,86	345,2>149,2 - 12 V	255,1>75,0 - 16 V
Acide nonadecanoïque	11,39	355,3>75,0 - 25 V	132,0>75,0 - 13 V

Les incubations ont pu être effectuées avec 30 mM d'acide laurique dans le méthanol. Pour réaliser les incubations, nous nous sommes inspirés du protocole recommandé par le fournisseur des microsomes commerciaux (BD Biosciences). La concentration conseillée par le fournisseur en pmol de cytochrome P450 ou de protéine totale est respectivement, d'1 pmol de CYP450/μL ou de 9,5 μg de protéines/μL.

Le milieu d'incubation d'un volume final de 100 μL est composé d'un système de régénération permettant un apport constant en NADPH,H+ cofacteur du CYP4A11. Ce milieu est constitué de 20 μL de tampon phosphate pH7,4 à 0,5M (BD Gentest Supersomes), 5 μL de solution A (BD Gentest Supersomes), 1 μL de solution B (BD Gentest Supersomes) et 1 μL de substrat. Le milieu est incubé 5 minutes à 37°C dans un bain marie. Le début de la réaction enzymatique (t=0) est déclenché par l'ajout de 2 μL de microsomes commerciaux ou 5 μL de microsomes à une concentration de 3,8 μg de protéines/μL, afin d'obtenir une concentration similaire aux microsomes commerciaux. Un témoin négatif constitué de microsomes contenant un plasmide vide (ne produisant pas de CYP4A11 recombinant) sera également traité par ajout de 3 μL d'une solution à 6,3 μg de protéines/μL. L'arrêt de la réaction est réalisé au bout de 20 minutes d'incubation par l'ajout de 200 μL d'acétonitrile. Enfin, 150μL du surnageant obtenu après agitation vigoureuse et centrifugation 5 minutes à 10000 g est conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. A partir de ces incubations le métabolite de l'acide laurique a pu être mis en évidence puis dosé.

Validation de la méthode de dosage

La linéarité de la méthode a été démontrée sur un intervalle de concentrations allant de 0,05 à 20 mg/L pour l'acide laurique et l'acide 12-hydroxylaurique avec un R^2 , respectivement de 0,9947 et 0,9995 (Figure 9).

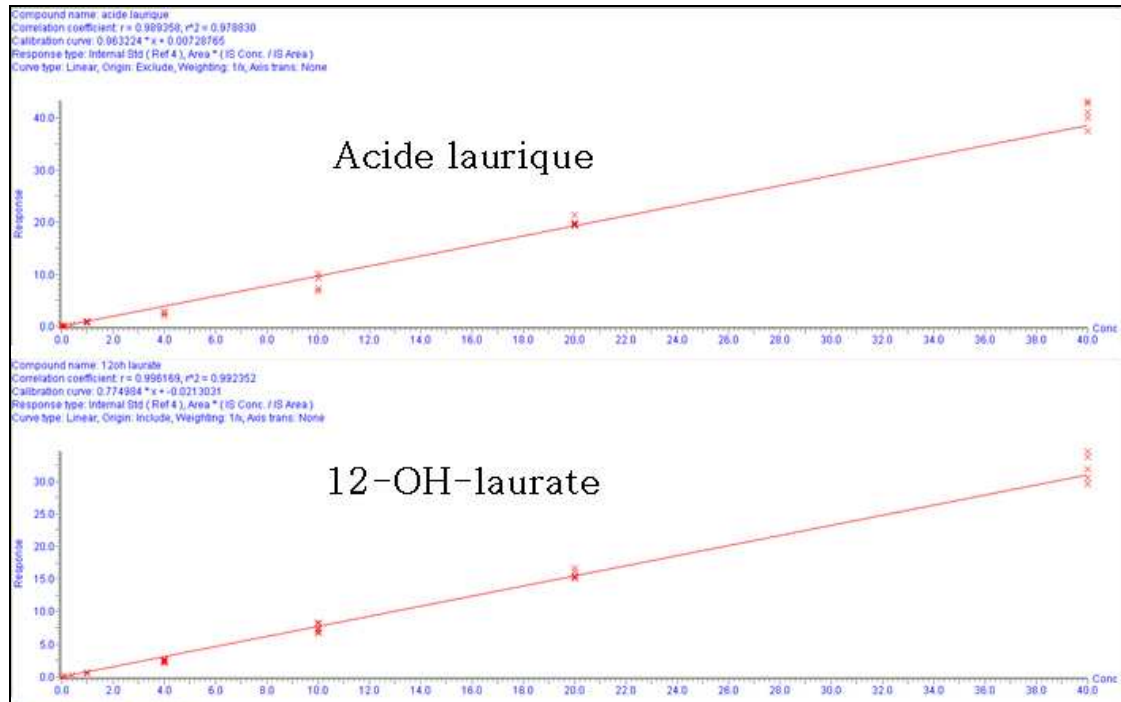


Figure 9. Droite de calibration de l'acide laurique et de son métabolite l'acide 12-hydroxylaurate.

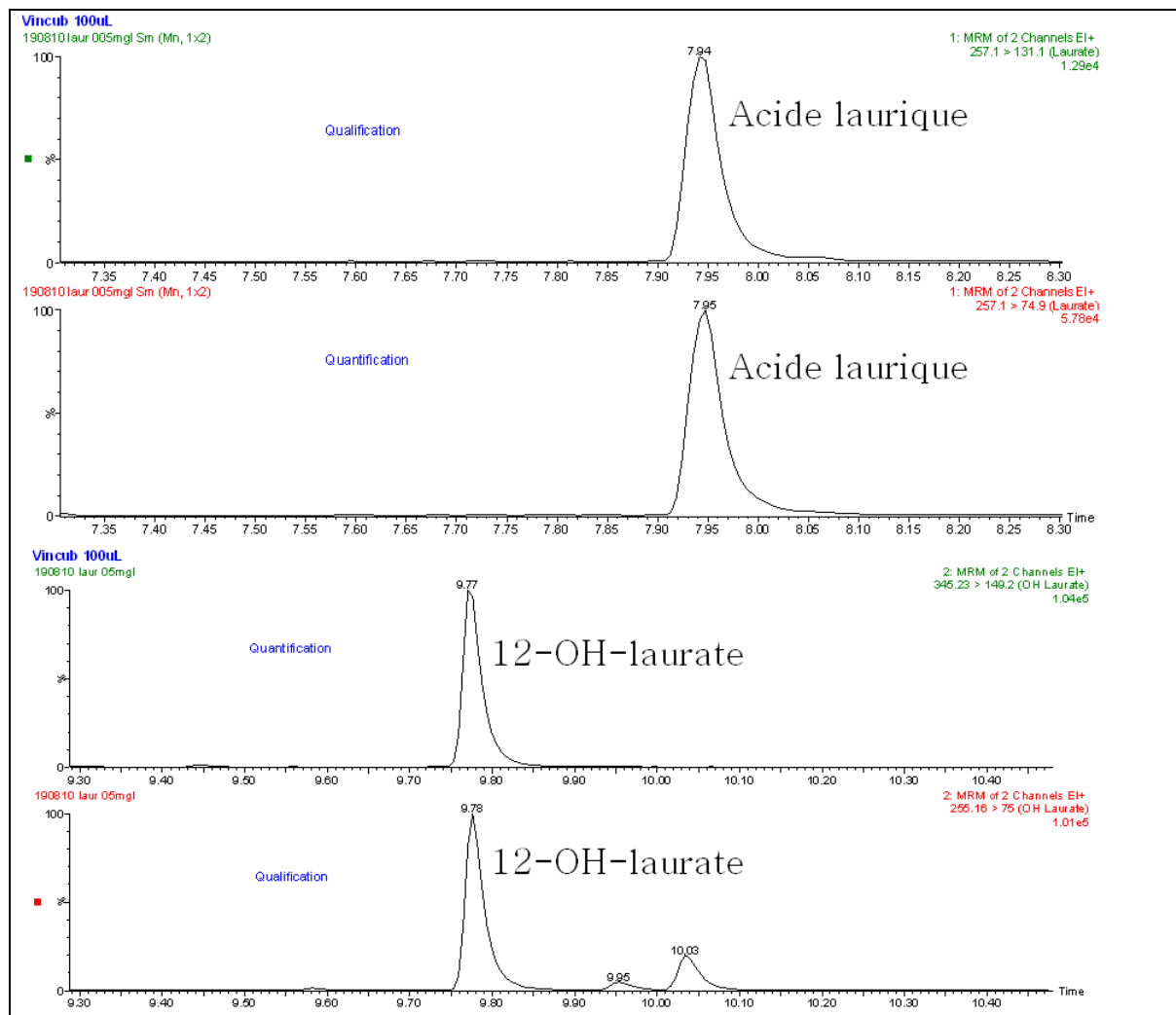


Figure 10. Chromatogrammes de détection de l'acide laurique et du métabolite le 12-hydroxylaurate après incubation avec des microsomes commerciaux.

La répétabilité et la fidélité répondent aux critères de validation ce qui démontre une bonne reproductibilité de la méthode (CV<20%).

Résultats

La LOD et la LOQ ont été déterminées à 0,05 mg/L pour l'acide laurique, à 0,005 et 0,05 mg/L pour l'acide 12-hydroxylaurique. Les résultats des tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont rapportés dans le Tableau 13. Les coefficients de variations sont inférieurs à 20%, la méthode est donc acceptable.

Tableau 13. Résultats des tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

		Répétabilité		Fidélité intermédiaire	
		pt 1	pt 2	pt 1	pt 2
Acide laurique	moyenne	0,18	0,50	0,20	0,44
	ET	0,01	0,08	0,02	0,07
	CV %	3,73	15,40	7,97	16,55
	justesse %	-11,08	0,10	1,00	-12,70
Acide 12-hydroxylaurique	moyenne	0,18	0,50	0,17	0,44
	ET	0,01	0,08	0,01	0,05
	CV %	3,08	15,34	3,93	11,16
	justesse %	-9,58	0,05	-14,50	-12,07

Les calculs de justesse par rapport aux concentrations cibles sont également inférieurs à 20%, démontrant une précision acceptable de la méthode.

Tableau 14. Mesures de l'activité enzymatique des Supersomes CYP4A11 recombinants.

Essais	Acide 12-hydroxylaurique (mg/L)	Activité (pmol de produits/min/pmol de P450)
1	0,55	19,1
2	0,86	29,9
3	0,68	23,6
4	0,88	30,6
Moyenne	0,74	25,78
Ecart type	0,15	5,44
CV %	21,10	21,10

Les incubations ont été répétées à 4 reprises, elles sont résumées dans le Tableau 7 ; la moyenne de 4 valeurs expérimentales d' ω -hydroxylation de l'acide laurique pour les microsomes commerciaux a été déterminée à 25,8 pmol de 12-hydroxylaurate formés/min/pmol de CYP450 présentant un écart-type de 5,4 et un CV de 21% pour une valeur théorique de 24 pmol/min/pmol de cytochrome P450, ces résultats nous permettent de valider notre protocole d'incubation enzymatique.

Cette méthode innove en effet, d'une part par son traitement d'échantillon réduit qui limite la durée d'analyse, ainsi que les erreurs de manipulation, et d'autre part, par l'utilisation d'un étalon interne qui permet de minimiser les facteurs de variation tels que la durée et la température lors de l'étape de dérivation.

Les incubations de microsomes CYP4A11 commerciaux nous ont également permis de démontrer que la méthode d'incubation enzymatique permettait d'obtenir des activités enzymatiques reproductibles et fidèles aux valeurs attendues. Les conditions sont alors remplies pour l'étude de

l'influence des mutations du gène *CYP4A11* sur l' ω -hydroxylation de l'acide laurique.

Néanmoins, les essais portant sur la protéine du CYP4A11 produite au laboratoire à partir d'ADNc CYP4A11 sauvage humain et exprimée dans la levure *Sacharomyces cerevisiae* ne montrent aucune activité enzymatique envers l'acide laurique. Ces résultats, suggèrent que la protéine du CYP4A11 exprimée dans la levure aurait une conformation différente de celle produite dans les microsomes commerciaux, exprimée dans des cellules d'insecte (BD Gentest™ Supersomes™, 456221).

L'utilisation de différents systèmes d'expression peut être impliqué dans la synthèse d'une protéine avec une conformation structurelle différente, c'est-à-dire, il y a pu avoir une réduction de taille moléculaire de la protéine, fait qui pourrait diminuer l'espace d'entrée du substrat dans la poche du site actif de la protéine, ne permettant l'entrée qu'aux petites molécules. Au contraire une augmentation de la taille du site active de la protéine ne permettrait pas la fixation de ces petites molécules, favorisant celle des molécules plus grandes. Ce phénomène est du en grand partie aux modifications post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles de chaque organisme.

Ces modifications post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles peuvent être :

- Stabilité du repliement.
- Adressage.
- Cascades de signalisation.
- Ancrage dans les membranes.
- Solubilité.
- Identité immunologique.

Dans notre travail de recherche, les microsomes commerciaux ont présenté une activité enzymatique avec l'acide laurique (C=12), ce qui n'a pas été le cas pour l'acide arachidonique (C=20). D'autre part, un premier essai avec les microsomes produits au laboratoire ont présenté une activité vis-à-vis de l'acide arachidonique qui a permis la détection du métabolite, l'acide 20-HETE.

Tableau 15. Modifications post-transcriptionnelles et/ou traductionnelles des différents hôtes utilisés dans l'expression *in vitro* de protéines ciblées.

Hôte	Avantages	Inconvénients
Bactérie		
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Génétique très bien connue - Nombreux outils de clonage commerciaux - Expression élevée - Facile à cultiver (fermentation) - Expression élevée (plusieurs g/L de protéine recombinante) 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas des modifications post-traductionnelles (glycosylation) - Faible potentiel de sécrétion
Eucaryote		
Levures (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Modifications post-traductionnelles (glycosylation simples, acylation...) - Outils de clonage commerciaux (<i>S. cerevisiae</i>) - Facile à cultiver - Bonne expression (plusieurs centaines de mg/L) 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible potentiel de sécrétion pour les grandes protéines
Cellules de mammifères (cellules chinoise Hamster Ovary, lignées permanentes...)	<ul style="list-style-type: none"> - Production de grosses protéines recombinantes complexes (protéines humaines, anticorps...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible rendement (10 mg/L max) - Coût élevé
Autres		
Insectes (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Systèmes de clonage dérivés du <i>Baculovirus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation industrielle pas encore opérationnelle

II.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de polymorphismes génétiques d'activité d'enzymes de la superfamille des CYP450 et de l'étude de leur rôle dans la susceptibilité aux pathologies multifactorielles complexes comme l'hypertension.

Ce travail a d'abord permis de développer une stratégie PCR-SSCP de recherche et d'identification de mutations pour les gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*. Cette stratégie a ensuite été appliquée à 4 populations de volontaires d'origine française, gabonaise, péruvienne et tunisienne. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une variabilité interethnique pour le polymorphisme d'activité du CYP4A11 g.T8590C associé au phénotype hypertendu.

Puis ces travaux nous ont permis d'identifier et de caractériser le polymorphisme génétique de l'ensemble des séquences promotrices et codantes des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*. Nous avons pu ainsi identifier de nouvelles mutations pour ces gènes.

L'analyse fonctionnelle *in silico* des mutations identifiées au niveau de la région promotrice, en utilisant le logiciel MatInspector de Genomatix, montre que ces mutations semblent avoir un impact limité sur la régulation transcriptionnelle des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22*.

L'analyse fonctionnelle *in silico* des mutations identifiées au niveau des régions codantes en utilisant la modélisation par homologie comparative, montre que par leur nature et leur position, un certain nombre de mutations faux-sens pourrait avoir un effet sur l'activité enzymatique. La construction des modèles 3D du CYP4A11 et CYP4A22, sur le modèle de référence du CYP3A4 devrait permettre d'affiner les connaissances des relations séquence-structure-activité des CYP4A11 et CYP4A22.

Ces résultats ont permis de proposer des mutations candidates pour l'analyse fonctionnelle *in vitro* afin de confirmer ces résultats *in silico*.

L'analyse fonctionnelle *in vitro* des mutations identifiées au niveau des régions codantes en utilisant un système d'expression hétérologue, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été initiée et l'analyse des cinétiques enzymatiques des différents variants naturels recombinants devrait nous éclairer sur l'impact fonctionnel des différentes mutations.

La mise au point de la méthode de dosage de l'acide laurique et de l'acide 12-hydroxylaurique nous a permis de doser ces molécules dans des préparations microsomales exprimant le CYP4A11 humain. L'utilisation de la

méthode GC-MS/MS pour cette application n'a jamais été décrite précédemment dans la littérature, à notre connaissance.

Finalement, après avoir identifié le polymorphisme génétique du *CYP4A11* et du *CYP4A22* et caractérisé les variants naturels, nous pourrons appliquer la détection des polymorphismes génétiques d'activités à des populations de patients atteints d'hypertension essentielle parfaitement caractérisées sur le plan clinique.

III. IDENTIFICATION DU POLYMORPHISME GENETIQUE DE LA GLYCINE N-ACYLTRANSFERASE (*GLYAT*)

III.1 GENERALITES

La glycine N-acyltransférase ou GLYAT est une enzyme impliquée dans la détoxification de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique par conjugaison d'un résidu de glycine.

L'activité glycine transférase est une des premières réactions biochimiques mise en évidence. Suite aux travaux réalisés par Friedrich Woehler sur les composés éliminés dans les urines « *waste materials of urine* », les enzymes de conjugaison aux acides aminés ont été étudiées dans la détoxification des xénobiotiques. En 1841, Alexander Ure a démontré pour la première fois chez l'Homme, que l'acide benzoïque était métabolisé en acide hippurique *via* cette activité enzymatique (Ure, 1841). En 1845, Dessaignes a mis en évidence la réaction de conjugaison chez l'Homme, en démontrant que l'acide hippurique éliminé dans les urines était obtenu par conjugaison de l'acide benzoïque à une molécule de glycine (Dessaignes, 1845) (Figure 11).

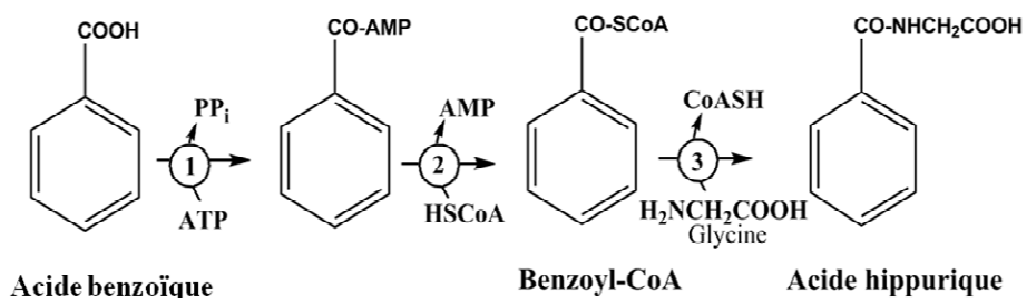


Figure 11. Métabolisme de l'acide benzoïque en acide hippurique. L'activation de l'acide benzoïque donne naissance à un composé acyl-adenylate (1), suivi par la formation d'un CoASH catalysée par la CoA-liagse (2) pour donner naissance au benzoyl-CoA qui est ensuite conjugué avec le groupement acyl de la glycine grâce à l'action de la glycine N-acyltransférase (3) pour former l'acide hippurique qui sera éliminé dans les urines.

En 1953 Schachter et Taggart ont identifié pour la première fois la glycine N-acyltransferase dans la mitochondrie hépatique bovine (Schachter and Taggart, 1953). En utilisant des protéines purifiées à partir des mitochondries hépatiques d'origine humaine, Webster (Webster *et al.*, 1976) a démontré qu'une enzyme était spécifique à la glycine comme acide aminé accepteur en utilisant le butyryl-CoA ou benzoyl-CoA comme acyl donneur (Webster *et al.*, 1976 ; Mawal and Qureshi, 1994 ; Kelley and Vessey, 1994).

Cette réaction de conjugaison à la glycine a lieu dans la matrice mitochondriale des cellules hépatiques et rénales, par deux réactions séquentielles. Dans un premier temps, une réaction riche en énergie transforme l'acide benzoïque activé en benzoyl-CoA grâce à une enzyme appelée l'acyl-CoA synthétase. Dans un deuxième temps, la partie N-terminale de la glycine est transférée sur le groupement acyl du benzoyl-CoA, grâce à l'enzyme Glycine N-acyltransferase (GLYAT, EC 2.3.1.13) (Kelly and Vessey, 1994 ; Mawal *et al.*, 1994).

Les xénobiotiques contenant un groupement carboxylique (-COOH) sont utilisés comme médicaments, pesticides, insecticides et additifs alimentaires (Tableau 16). Ces composés sont principalement métabolisés *via* la conjugaison aux acides aminés et particulièrement à la glycine. D'autres acides aminés sont également utilisés chez d'autres espèces, comme l'ornithine chez les oiseaux et les reptiles, la glutamine chez le lapin et le rat.

Tableau 16. Xénobiotiques métabolisés *via* la conjugaison aux acides aminés.

Xénobiotiques	Métabolites à fonction acide carboxylique	Conjugué acide aminé	Espèces	Références
Astemizole	Acide 4-fluorobenzoïque	Acide 2-[4-(fluorobenzoyl) aminé] acétique	Homme, rat, porc, chien	Meuldermans <i>et al.</i> , 1986
	Acide 2-(4-methoxyphényl) acétique	Acide 2-[[2-(4-methoxyphényl) aminé] acétique	Homme, rat, porc, chien	Meuldermans <i>et al.</i> , 1986
Azosemide	Acide thiophène-2-carboxylique	Acide 2-(thiophène-2-carboxylaminé) acétique	Rat	Suh <i>et al.</i> , 2003
Bromphéniramine	Acide 3-(4-bromophényl)-3-pyridine-2-yl-propanoïque	Acide 2-[[3-(4-bromophényl)-3-pyridine-2-yl-propanoyl] aminé] acétique	Homme, chien	Bruce <i>et al.</i> , 1988
Acide cinnamique	NA	Acide 2-(3-phénylprop-2-énoylaminé) acétique	Rat, souris	Nutley <i>et al.</i> , 1994
Permethrine	Acide 3-(2,2-dichloroéthényl)-2,2-diméthyl-cyclopropane-1-carboxylique	Acide 2-[[3-(2,2-dichloroéthényl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carbonyl] aminé] acétique	Homme	Ahn <i>et al.</i> , 2006
Triflusale	Acide 2-hydroxy-4-(trifluorométhyl) benzoïque	Acide 2-[[2-hydroxy-4-(trifluorométhyl) aminé] acétique	Homme	Murdoch et Plosker, 2006
m-Xylène	NA	Acide 2-[-3 (méthylbenzoyl) aminé] acétique	Homme	Campbell <i>et al.</i> , 1988

NA : non attribué.

Chez l'Homme, la conjugaison de l'acide salicylique avec la glycine est saturable à doses thérapeutiques (Levy, 1965a ; Levy 1965b).

L'acide valproïque (VPA), un anticonvulsant, est l'exemple classique de médicament hépatotoxique que séquestre la CoASH intramitochondriale. Le VPA est structuralement similaire à un acide gras et son métabolisme implique la formation de la valproyl-CoA dans la mitochondrie, que est ensuite transformée en Δ^2 -valproyl-CoA (déshydrogénation), 3-OH-valproyl-CoA (hydratation) et enfin en 3-keto-valproyl-CoA (déshydrogénation) (Li *et al.*, 1991).

La majeure partie du VPA dans la matrice de la mitochondrie est présente sous la forme de thioesters CoA. L'imperméabilité de la membrane mitochondriale empêche la sortie de ces derniers.

Contrairement au VPA, l'acide salicylique est largement métabolisé *via* une conjugaison avec la glycine (acide salicylurique). A doses thérapeutiques,

l'aspirine peut être associée au syndrome de Reye (altération de l'oxydation des acides gras) chez les enfants présentant des infections virales (Belay *et al.*, 1999).

Chez l'Homme, la GLYAT est principalement exprimée au niveau hépatique et rénal. Une activité GLYAT croissante est généralement observée de l'âge de 7 à 18 mois puis reste constante jusqu'à l'âge adulte.

La protéine GLYAT a été purifiée et biochimiquement identifiée à partir du tissu hépatique et rénal chez l'Homme, le boeuf, le mouton, le lapin et le singe (Webster *et al.*, 1976 ; Mawal *et al.*, 1994).

Chez l'Homme, le gène *GLYAT* a été localisé sur le chromosome 11 en position 12.1 et s'étend sur 23.2 kb. Il est composé de 6 exons, l'exon 1 étant non codant. Le gène *GLYAT* code pour une isoforme longue, dite GLYAT (a), composée de 296 acides aminés et une isoforme courte, dite GLYAT (b), composée de 163 acides aminés.

III.2 ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE DE LA *GLYAT*

III.2.1 Echantillons d'ADN analysés

Cinquante cinq échantillons ont été utilisés dans cette étude provenant d'une population de volontaires Français d'origine caucasienne. Pour chaque individu 10 ml de sang ont été collectés sur EDTA. L'ADN génomique a été isolé et purifié à partir des leucocytes selon une procédure standard d'extraction au phénol/chloroforme ou à l'aide de kits commerciaux. La qualité et la concentration en acides nucléiques des échantillons ont été évaluées par mesure de leur densité optique à 260 et 280 nm.

III.2.2 Développement d'une stratégie d'analyse PCR-SSCP

Pour rechercher et identifier les mutations de la *GLYAT*, nous avons développé une méthode d'analyse de la séquence codante et des régions flanquantes régulatrices en 5' et en 3' du gène, basée sur l'étude du polymorphisme de conformation de fragments d'ADN simples brins générés par réaction de polymérisation en chaîne. La séquence génomique de référence de la *GLYAT* a été obtenue à partir du site GenBank du NCBI avec le numéro GeneID: 10249.

III.4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude que nous avons effectuée a permis de montrer pour la première fois le polymorphisme génétique de la *GLYAT* dans une population française d'origine caucasienne.

Dans un premier temps, la stratégie PCR-SSCP a été appliquée à une population de 55 individus Français d'origine caucasienne. Ensuite, une analyse *in silico*, nous a permis d'évaluer l'impact des variants identifiés au niveau des régions promotrices et codantes du gène de la *GLYAT*.

Sept variations de séquence de la *GLYAT* ont été identifiées et quatre nouveaux allèles *GLYAT** ont été caractérisés. La localisation de certaines mutations dans des structures secondaires très conservées de la protéine suggère un impact sur l'activité catalytique de cette enzyme.

Compte tenu de l'implication de la *GLYAT* dans des processus de détoxications de nombreux xénobiotiques, il semble important d'analyser *in vitro* les conséquences fonctionnelles des polymorphismes génétiques identifiés, en particulier sur la quantité et/ou la qualité de la protéine synthétisée. Il reste également à examiner l'influence *in vivo*, du polymorphisme identifié sur l'activité de la *GLYAT*.

Ces résultats seront utiles pour de futures études d'association de ce polymorphisme génétique de la *GLYAT* avec les altérations de détoxications de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique comme l'aspirine, certains pesticides ou le toluène.

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Sur les trois milliards de bases qui composent le génome humain, 99,9% sont identiques d'un individu à l'autre. Le pourcentage de variations ou polymorphismes restant est infime (0,1%), mais représentent cependant trois millions de nucléotides qui sont à la base des différences entre les individus. Parmi elles, on compte la sensibilité individuelle aux médicaments ou aux xénobiotiques, due en partie au polymorphisme génétique affectant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

La compréhension des mécanismes génétiques à l'origine des variations inter-individuelles de l'activité s'est considérablement améliorée au cours des vingt dernières années. Paradoxalement, l'application de ces connaissances reste limitée et, en clinique, un génotypage prédictif n'est généralement pas réalisé en routine (Becquemont, 2003).

Les résultats obtenus au cours de ce travail de recherche ont permis la détection d'un grand nombre de mutations connues et de nouvelles mutations. Au total pour le *CYP4A11*, 10 mutations ont été identifiées et 5 allèles caractérisés, dont deux sont porteurs de mutations faux-sens. Pour le *CYP4A22*, 16 mutations ont été identifiés et 5 allèles porteurs de mutations faux-sens ont été caractérisés. Afin d'être complète, cette étude devrait être poursuivie par une analyse des différents loci de ces gènes. En effet, des délétions partielles ou totales, ainsi que des amplifications de gènes sont des anomalies qui affectent parfois la structure de certains gènes (Ingelman-Sundberg, 1997). De tels réarrangements de loci ont été par exemple décrit pour le *CYP2A6* (Oscarson, 2001), le *CYP2D6* (McLellan *et al.*, 1997a) et la *GSTM1* (McLellan *et al.*, 1997b). La recherche de ces macrolésions pourrait être effectuée par Southern blot ou par PCR en temps réel (par exemple avec la technologie Taqman).

Certaines mutations identifiées apparaissent particulièrement intéressantes et, de par leur nature et localisation, suggèrent l'existence d'un polymorphisme d'activité pour les enzymes CYP4A11 et CYP4A22. Il s'agit du polymorphisme (g.-845A>G) au niveau de la région promotrice du *CYP4A11* localisé près du site de fixation d'un facteur de transcription PPAR/RXR. Ce polymorphisme g.-845A>G est associé au phénotype hypertendu chez une population japonaise et provoque une réduction *in vitro* d'environ 30% de la transcription du gène (Sugimoto *et al.*, 2008).

Au niveau de la région codante du CYP4A11, trois mutations faux-sens entraînent la production de nouveaux variants protéiques, il s'agit de la p.Ser404Phe, la p.Phe434Ser et la p.Arg505His. La mutation p.Phe434Ser provoque une diminution de l'activité catalytique de plus de 50% et a été associée au phénotype hypertendu dans différentes populations (Gainer *et al.*, 2005 ; Mayer *et al.*, 2005 et 2008 ; Fu *et al.*, 2010 ; Sugimoto *et al.*, 2010). Notre travail de recherche a permis de mettre en évidence une variabilité interethnique de distribution de la fréquence de ce polymorphisme dans de nouvelles populations, encore non étudiées.

Les raisons de telles différences interethniques pourraient correspondre en partie, à des pressions de sélection qui se sont exercées depuis des milliers d'années (alimentation, maladie, environnement, climat).

La variabilité du polymorphisme génétique du *CYP4A11* dans les populations noires et les populations caucasiennes pourrait contribuer à des différences interethniques de susceptibilité à l'hypertension artérielle essentielle ou de réponse à certains xénobiotiques et, par conséquent, de susceptibilité à des maladies cardiovasculaire à composante génétique et environnementale.

Les informations disponibles concernant le polymorphisme génétique du *CYP4A22* et leurs conséquences sur l'activité catalytique sont à l'heure actuelle limitées. Hiratsuka *et al.* ont mis en évidence la nature polymorphe du gène *CYP4A22* (Hiratsuka *et al.*, 2006). Gainer *et al.* ont démontré que le changement d'une glycine en position 130 par une serine entraînait la production d'une protéine CYP4A11 non fonctionnelle (Gainer *et al.*, 2005). Ce variant est retrouvé avec une fréquence assez élevée (53%) chez la population japonaise étudiée par Hiratsuka *et al.* Dans notre étude, nous avons observé que la fréquence du variant CYP4A22 p.Gly130Ser est de 47% chez les Français d'origine caucasienne. Cela pourrait suggérer que 53% de notre population porte un allèle p.Gly130, produisant une protéine CYP4A22 fonctionnelle qui pourrait ainsi participer à la formation de l'acide 20-HETE au niveau rénal.

A l'heure actuelle, le variant g.T8590C (p.Phe434Ser) du CYP4A11 et le variant g.G4628A (p.Gly130Ser) du CYP4A22 sembleraient être les variants les plus intéressants par leur impact sur l'activité catalytique de ces enzymes. La construction des structures 3D du CYP4A11 et CYP4A22, nous a permis d'identifier des mutations candidates pour les analyses fonctionnelles *in vitro* et des cinétiques enzymatiques. Par ailleurs, nous avons initié les essais avec l'expression du CYP4A11 et du CYP4A22 humains dans un système d'expression hétérologue, la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, une méthode analytique de dosage de l'activité enzymatique des protéines CYP4As a été mise au point au laboratoire. Ces travaux devraient nous permettre

d'analyser les conséquences des nouvelles mutations sur l'activité catalytique des CYP4As. Les mutations ayant un effet sur la protéine pourront être retenues pour de futures études de corrélation génotype-phénotype chez des populations de patients hypertendus parfaitement caractérisés sur le plan clinique. Enfin, ces résultats pourraient être utiles afin d'établir de nouveaux facteurs génétique de susceptibilité à l'hypertension artérielle essentielle chez l'homme et dans un avenir plus lointain à l'élaboration de nouveaux traitements de cette pathologie.

La glycine N-acyltransférase ou GLYAT est une enzyme impliquée dans la détoxification de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique par conjugaison d'un résidu de glycine.

Sept variations de séquence de la *GLYAT* ont été identifiées et quatre nouveaux *allèles GLYAT** ont été caractérisés. La localisation des certaines mutations dans des structures secondaires très conservées de la protéine suggère un impact sur l'activité catalytique de cette enzyme.

La poursuite de cette étude portera sur l'analyse fonctionnelle *in vitro* des mutations de la région promotrice avec une analyse d'un gène rapporteur la luciférase et pour les mutations faux sens identifiées dans la région codante de la *GLYAT*, l'utilisation du système d'expression hétérologue, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Ces résultats seront utiles pour de futures études d'association de ce polymorphisme génétique de la *GLYAT* avec les altérations de détoxications de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique comme l'aspirine, certains pesticides ou le toluène.

L'étude que nous avons effectuée a permis de confirmer l'efficacité et la fiabilité de la technique PCR-SSCP pour la détection rapide de mutations chez un grand nombre de sujets. Cependant, d'autres techniques étaient applicables à cette recherche, par exemple le séquençage reste certainement la méthode la plus directe. Cette technique reste néanmoins lourde et coûteuse pour l'analyse d'un large panel d'échantillons. La Chromatographie Liquide Haute Performance en conditions dénaturantes ou dHPLC, qui présente un taux de sensibilité supérieur à 90%, est une technique relativement récente de plus en plus utilisée (Xiao and Oefner, 2001). Cette méthode est basée sur la détection des hétéroduplexes. Cependant les mutations à l'état homozygote ne sont pas détectées sauf à créer artificiellement des hétéroduplexes en ajoutant un produit PCR correspondant à la séquence sauvage.

La PCR-SSCP, stratégie que nous avons choisi, semblait la technique la plus adaptée. Il apparaît que plus de 80% des mutation présentes sur des fragments PCR d'environ 300pb sont détectées, si l'analyse est effectuée avec au moins deux conditions électrophorétiques différentes (concentration du gel, temps de migration, température) (Ravnik-Glavac *et al.*, 1994).

De nouveaux outils de séquençage (puces à ADN, d-HPLC robotisé ou séquenceur multicapillaires), et de nouvelles technologies d'analyse du profil d'expression du génome de cellules et de tissus, fonctionnant à très haut débit et à grande échelle (microarray technology, puces à ADN) devraient permettre l'analyse de l'ensemble du polymorphisme de familles de gènes et également de leur expression.

L'ensemble des résultats de ces recherches devrait permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la genèse et de l'évolution des pathologies complexes à composante génétique et environnementale. Ces travaux pourraient aussi permettre d'identifier de nouveaux facteurs de prédisposition génétique de ces affections, ce qui, sans doute, aurait des implications sur le diagnostic, la prévention, l'amélioration du traitement de ces pathologies et, dans un avenir plus lointain, pourrait permettre l'élaboration de nouveaux traitements de ces affections.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Ahn KC, Ma SJ, Tsai HJ, Gee SJ, Hammock BD. An immunoassay for a urinary metabolite as a biomarker of human exposure to the pyrethroid insecticide permethrin. *Anal Bioanal Chem* (2006) 384:713–722.
- Allorge D, Lorient MA. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. *Ann Biol Clin* (2004) 63: 499–511.
- Alonso-Galicia M, Maier KG, Greene AS, Cowley AW Jr, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the renal and vasoconstrictor actions of angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2002) 283:60–68.
- Alving AS, Carson PE, Flanagan Cl, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* (1956) 124: 484–485.
- Becquemont L. Clinical relevance of pharmacogenetics. *Drug Metab Rev* (2003) 35:277–285.
- Belay ED, Bresee JS, Holman RC, Khan AS, Shahriari A, Schonberger LB. Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997. *N Engl J Med* (1999) 340:1377–1382.
- Bell DR, Plant NJ, Rider CG, Na L, Brown S, Ateitalla I, Acharya SK, Davies MH, Elias E, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Elcombe CR. Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem J* (1993) 294:173–180.
- Bellamine A, Wang Y, Waterman MR, Gainer JV 3rd, Dawson EP, Brown NJ, Capdevila JH. Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans. *Arch Biochem Biophys* (2003) 409:221–227.
- Berge KE, Berg K. No effect of insertion/deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level or variability. *Clin Genet* (1994) 45:169–74.
- Bergström S, Daniel NH, Samuelsson B. The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid. Prostaglandins and related factors. *Biochim Biophys Acta* (1964) 90:207–210.
- Bergström S, Sjövall J. The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta Chemica Scan* (1960) 14:1701–1705.
- Beutler E. study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. *Am J Hematol* (1993) 42: 53–58.

- Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* (1995) 91:96–102.
- Bories G, Pascal G. *Xénobiotiques* (1996). Pages 426–452. Editeurs : Riboli E, Decloître F, Collet–Ribbing C. Tec&Doc, Lavoisier, Londres, NY.
- Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* (2002) 3: 229–243.
- Bruce RB, Turnbull LB, Newman JH, Pitts JE. Metabolism of brompheniramine. *J Med Chem* (1968)11:1031–1034.
- Campbell L, Wilson HK, Samuel AM, Gompertz D. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. *Br J Ind Med* (1988) 45:127–132.
- Canivenc–Lavier MC, Vernevaut MF, Totis M, Siess MH, Magdalon J, Suschetet M. Comparative effects of flavonoids and model as inducers of cytochrome P450 1A and 2B isozymes in rat liver. *Toxicology* (1996) 114: 19–27.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* (2005) 21:2933–2942.
- Cho BH, Park BL, Kim LH, Chung HS, Shin HD. Highly polymorphic human CYP4A11 gene. *J Hum Genet* (2005) 50:259–263.
- Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovich M, Jones G, Korczak B. CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* (2004) 279:6305–6314.
- Cui X, Nelson DR, Strobel HW. A novel human cytochrome P450 4F isoform (CYP4F11): cDNA cloning, expression, and genomic structural characterization. *Genomics* (2000) 68:161–166.
- Cullin C, Pompon D. Synthesis of functional mouse cytochromes P-450 P1 and chimeric P-450 P3-1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* (1988) 65:203–217.
- Daikh BE, Laethem RM, Koop DR. Stereoselective epoxidation of arachidonic acid by cytochrome P-450s 2CAA and 2C2. *J Pharmacol Exp Ther* (1994) 269:1130–1135.
- Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* (2006) 86:849–899.

- Dessaigues V. Nouvelles recherches sur l'acide hippurique, l'acide benzoique et le sucre de gelatine. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences* (1845) 21:1224-1227.
- Diaz S, Moreno MA, Dominguez L, Suarez G, Blanco JL. Application of a diphasic dialysis technique to the extraction of aflatoxins in dairy products. *J Dairy Sci* (1993) 76:1845-1849.
- Ding H, Cui G, Zhang L, Xu Y, Bao X, Tu Y, Wu B, Wang Q, Hui R, Wang W, Dackor RT, Kissling GE, Zeldin DC, Wang DW. Association of common variants of CYP4A11 and CYP4F2 with stroke in the Han Chinese population. *Pharmacogenet Genomics* (2010) 20:187-194.
- Dorne JL, Walton K, Slob W, Renwick AG. Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: is the kinetic default uncertainty factor adequate? *Food Chem Toxicol* (2002) 40: 1633-1656.
- Eap CB, Bochud M, Elston RC, Bovet P, Maillard MP, Nussberger J, Schild L, Shamlaye C, Burnier M. CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt. *Hypertension* (2007) 49:1007-14.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther* (2006) 112:564-587.
- Escalante B, Sacerdoti D, Davidian MM, Laniado-Schwartzman M, McGiff JC. Chronic treatment with tin normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (1991) 17:776-779.
- Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* (2004) 429: 464-468.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* (2000) 286: 487-491.
- Fava C, Montagnana M, Almgren P, Rosberg L, Lippi G, Hedblad B, Engström G, Berglund G, Minuz P, Melander O. The V433M variant of the CYP4F2 is associated with ischemic stroke in male Swedes beyond its effect on blood pressure. *Hypertension* (2008) 52:373-380.
- Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature New Biol* (1971) 231:237-239.
- Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res* (2001) 89:753-62.
- Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Matsumoto K, Ozawa Y, Ma Y. Haplotype-based case study of human CYP4A11 gene and cerebral infarction in Japanese subject. *Endocrine* (2008a) 33:215-222.

- Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Ozawa Y, Ma Y. A haplotype of the CYP4A11 gene associated with essential hypertension in Japanese men. *J Hypertens* (2008b) 26:453-461.
- Gainer JV, Bellamine A, Dawson EP, Womble KE, Grant SW, Wang Y, Cupples LA, Guo CY, Demissie S, O'Donnell CJ, Brown NJ, Waterman MR, Capdevila JH. Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation* (2005) 111:63-69.
- Gainer JV, Lipkowitz MS, Yu C, Waterman MR, Dawson EP, Capdevila JH, Brown NJ; AASK Study Group. Association of a CYP4A11 variant and blood pressure in black men. *J Am Soc Nephrol* (2008) 19:1606-1612.
- Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER, Harder DR. Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca²⁺ current. *J Physiol* (1998) 507:771-781.
- Gerloff T. Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Arch Pharmacol* (2004) 369:268.
- Gibson GG. Comparative aspects of the mammalian cytochrome P450 IV gene family. *Xenobiotica* (1989) 19:1123-1148.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* (1992) 20:1425.
- Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Frichs CS, Ramamathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* (2004) 22: 23-30.
- Gonzalez FJ, Korzekwa KR. Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1995) 35:369-390.
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient debrisoquine metabolism. *Nature* (1988) 331: 442-446.
- Gradelet S, Le Bon AM, Berges R, Suschetet M, Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1 induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* (1997) 19: 403-411.

- Grant DM. Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis* (1991) 14:421-430.
- Hamberg M, Samuelsson B. The mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E1 and F1•. *J Biol Chem* (1967) 242:5336-5343.
- Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res* (1995) 32:79-92.
- Hardwick JP, Song BJ, Huberman E, Gonzalez FJ. Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochrome P-450LA omega). Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *J Biol Chem* (1987) 262:801-810.
- Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* (1993) 2:338-346.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch* (2004) 447:465-8.
- Helvig C, Dishman E, Capdevila JH. Molecular, enzymatic, and regulatory characterization of rat kidney cytochromes P450 4A2 and 4A3. *Biochemistry* (1998) 37:12546-12558.
- Heng YM, Kuo CS, Jones PS, Savory R, Schulz RM, Tomlinson SR, Gray TJ, Bell DR. A novel murine P-450 gene, *Cyp4a14*, is part of a cluster of *Cyp4a* and *Cyp4b*, but not of *CYP4F*, genes in mouse and humans. *Biochem J* (1997) 325:741-749.
- Hermann M, Hellermann JP, Quitzau K, Hoffmann MM, Gasser T, Meinertz T, Münzel T, Fleming I, Lüscher TF. CYP4A11 polymorphism correlates with coronary endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease--the ENCORE Trials. *Atherosclerosis* (2009) 207:476-479.
- Hiratsuka M, Nozawa H, Katsumoto Y, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Mizugaki M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population. *Mutat Res* (2006) 599:98-104.
- Holla VR, Adas F, Imig JD, Zhao X, Price E Jr, Olsen N, Kovacs WJ, Magnuson MA, Keeney DS, Breyer MD, Falck JR, Waterman MR, Capdevila JH. Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:5211-5216.
- Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc* (1954) 70: 266-273.

- Imaoka S, Hiroi T, Tamura Y, Yamazaki H, Shimada T, Komori M, Degawa M, Funae Y. Mutagenic activation of 3-methoxy-4-aminoazobenzene by mouse renal cytochrome P450 CYP4B1: cloning and characterization of mouse CYP4B1. *Arch Biochem Biophys* (1995) 321:255-262.
- Ingelman-Sundberg M. The Gerhard Zbinden Memorial Lecture. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes. Implications for toxicity of drugs and other xenobiotics. *Arch Toxicol Suppl* (1997) 19:3-13.
- Ito O, Alonso-Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol* (1998) 274:395-404.
- Iwai J, Kanayama Y, Negoro N, Okamura M, Takeda T. Gene expression of endothelin receptors in aortic cells from cyclosporine-induced hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1995) 22:404-409.
- Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* (2008) 40:592-9.
- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P450D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol* (1994) 46: 452-459.
- Kawashima H, Kusunose E, Kikuta Y, Kinoshita H, Tanaka S, Yamamoto S, Kishimoto T, Kusunose M. Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid omega-hydroxylase. *J Biochem* (1994) 116:74-80.
- Kawashima H, Kusunose E, Kubota I, Maekawa M, Kusunose M. Purification and NH₂-terminal amino acid sequences of human and rat kidney fatty acid omega-hydroxylases. *Biochim Biophys Acta* (1992) 1123:156-162.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J, « Global Burden of hypertension : analysis of worldwide data ». *The Lancet* (2005) 365:217-223.
- Kelley M, Vessey DA. Characterization of the acyl-CoA:amino acid N-acyltransferases from primate liver mitochondria. *J Biochem Toxicol* (1994) 9:153-158.
- Kikuta Y, Kato M, Yamashita Y, Miyauchi Y, Tanaka K, Kamada N, Kusunose M. Human leukotriene B₄ omega-hydroxylase (CYP4F3) gene: molecular cloning and chromosomal localization. *DNA Cell Biol* (1998) 17:221-230.
- Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology* (2002) 27:291-297.

- Kimura S, Hanioka N, Matsunaga E, Gonzalez FJ. The rat clofibrate-inducible CYP4A gene subfamily. I. Complete intron and exon sequence of the CYP4A1 and CYP4A2 genes, unique exon organization, and identification of a conserved 19-bp upstream element. *DNA* (1989) 8:503-516.
- Kirchheiner J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjoqvist F, Spina E, Brockmoller J. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* (2001) 104: 173-192.
- Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* (1998) 273:31581-31589.
- Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* (2002) 13:273-283.
- Kunert MP, Roman RJ, Alonso-Galicia M, Falck JR, Lombard JH. Cytochrome P-450 omega-hydroxylase: a potential O(2) sensor in rat arterioles and skeletal muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) 280:1840-1845.
- Kupiec TC, Raj V, Vu N. Pharmacogenomics for the forensic toxicologist. *Journal of Analytical Toxicology* (2006) 30: 65-72.
- Laethem RM, Balazy M, Koop DR. Epoxidation of C18 unsaturated fatty acids by cytochromes P4502C2 and P4502CAA. *Drug Metab Dispos* (1996) 24:664-668.
- Laffer CL, Gainer JV, Waterman MR, Capdevila JH, Laniado-Schwartzman M, Nasjletti A, Brown NJ, Elijovich F. The T8590C polymorphism of CYP4A11 and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in essential hypertension. *Hypertension* (2008) 51:767-772.
- Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD, Powell PK. Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11. *J Biol Chem* (2000) 275:4118-4126.
- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease 2001. *Lancet* (2008) 371:1513-1518.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* (1998) 279: 1200-1205.
- Levy G. Pharmacokinetics of salicylate elimination in man. *J Pharm Sci* (1965a) 54:959-967.

- Levy G. Salylurate formation demonstration of michaelis-menten kinetics in man. *J Pharm Sci* (1965b) 54:496.
- Li J, Norwood DL, Mao LF, Schulz H. Mitochondrial metabolism of valproic acid. *Biochemistry* (1991) 30:388-394.
- Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* (1996) 272:676-680.
- Liu H, Zhao YY, Gong W, Shi JP, Fu LY, Wang J, Li GY, Lü JY. [Correlation analysis and identification of G421C in regulatory region of CYP4F2 gene with essential hypertension]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* (2006) 28:143-147.
- Lorentz CP, Wieben ED, Tefferi A, Whiteman DAH, Dewald GW. Primer on medical genomics – Part 1: history of genetics and sequencing of the human genome. *Mayo Clin Proc* (2002) 77: 775.
- Mancinelli L, Cronin M, Sadée W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmaSci* (2000) 2: 2-3.
- Manson MM, Ball HW, Barrett MC, Clark HL, Judah DJ, Williamson G, Neal GE. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and phase II drug metabolizing enzymes and aflatoxine B1 metabolism. *Carcinogenesis* (1997) 18: 1729-1738.
- Marsh S, Mc Leod HL. Pharmacogenetics of irinotecan toxicity. *Pharmacogenomics* (2004) 5: 835-843.
- Mawal YR, Qureshi IA. Purification to homogeneity of mitochondrial acyl coa:glycine n-acyltransferase from human liver. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 205:1373-1379.
- Mayer B, Lieb W, Götz A, König IR, Aherrahrou Z, Thiemig A, Holmer S, Hengstenberg C, Doering A, Loewel H, Hense HW, Schunkert H, Erdmann J. Association of the T8590C polymorphism of CYP4A11 with hypertension in the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *Hypertension* (2005) 46:766-771.
- Mayer B, Lieb W, Götz A, König IR, Kauschen LF, Linsel-Nitschke P, Pomarino A, Holmer S, Hengstenberg C, Doering A, Loewel H, Hense HW, Ziegler A, Erdmann J, Schunkert H. Association of a functional polymorphism in the CYP4A11 gene with systolic blood pressure in survivors of myocardial infarction. *J Hypertens* (2006) 24:1965-1970.
- McGiff JC, Quilley J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* (1999) 277:607-623.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA, Rannug A, Ingelman-Sundberg M. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* (1997b) 52:958-965.

- McLellan RA, Oscarson M, Seidegård J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* (1997a) 7:187-191.
- Meuldermans W, Hendrickx J, Lauwers W, Hurkmans R, Swysen E, Heykants J. Excretion and biotransformation of astemizole in rats, guinea-pigs, dogs, and man. *Drug Devel Res* (1986) 8:37-351.
- Michaud V, Turgeon J. L'importance clinique des interactions médicamenteuses reliées aux isoenzymes du cytochrome P450: de la fiction à la réalité. *Pharmactuel* (2003) 36: 88-96.
- Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res* (2005) 41:175-193.
- Mongeau JG. Heredity and blood pressure in humans: an overview. *Pediatr Nephrol* (1987) 1:69-75.
- Mounier-Vehier C, Amah G, Covillard J, Prise en charge de l'HTA essentielle et du niveau de risque cardiovasculaire : Enquête nationale PHENOMEN. *Arch Mal Cœur Vaiss* (2002) 95:667-672.
- Murdoch D, Plosker GL. Triflusal: a review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation. *Drugs* (2006) 66:671-692.
- Nebert DW, Menon AG. Pharmacogenomics, ethnicity, and susceptibility genes. *Pharmacogenomics J* (2001) 1: 19-22.
- Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* (2002) 360:1155-1162.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* (1996) 6:1-42.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* (1996) 6: 1-42.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* (2004) 14:1-18.
- Nguyen X, Wang MH, Reddy KM, Falck JR, Schwartzman ML. Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol* (1999) 276:246-253.

- Nutley BP, Farmer P, Caldwell J. Metabolism of trans-cinnamic acid in the rat and the mouse and its variation with dose. *Food Chem Toxicol* (1994) 32:877-886.
- Oestreicher K, Desmeules J, Piguet V, Dayer P. Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Med Hyg* (1999) 57: 793-800.
- Oliw EH. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Prog Lipid Res* (1994) 33:329-354.
- Omata K, Abraham NG, Schwartzman ML. Renal cytochrome P-450-arachidonic acid metabolism: localization and hormonal regulation in SHR. *Am J Physiol* (1992) 262:591-599.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* (1964) 239:2370-2378.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* (1989) 8:2766-2770.
- Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* (2001) 29:91-95.
- Oscarson M. Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medicine. *Clin Chem Lab Med* (2003) 41: 573-580.
- Parkinson A, Ogilvie B. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. Chapter 6. Editeur Klaassen CD. McGraw Hill Companies: (1996) 113-186.
- Peyronneau MA, Renaud JP, Truan G, Urban P, Pompon D, Mansuy D. Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Eur Biochem* (1992) 207:109-116.
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol* (1996) 272:51-64.
- Pompon D. cDNA cloning and functional expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* of beta-naphthoflavone-induced rabbit liver P-450 LM4 and LM6. *Eur J Biochem* (1988) 177:285-293.
- Powell PK, Wolf I, Jin R, Lasker JM. Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther* (1998) 285:1327-1336.

- Qu W, Bradbury JA, Tsao CC, Maronpot R, Harry GJ, Parker CE, Davis LS, Breyer MD, Waalkes MP, Falck JR, Chen J, Rosenberg RL, Zeldin DC. Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega-1 hydroxylase predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* (2001) 276:25467-25479.
- Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* (1994) 3:801-807.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human cytochrome P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* (2002) 61: 255-259.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* (2002) 34:83-448.
- Reuss L. Basolateral KCl co-transport in a NaCl-absorbing epithelium. *Nature* (1983) 26;305:723-6.
- Rifkind AB, Lee C, Chang TK, Waxman DJ. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* (1995) 320:380-389.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* (1990) 86:1343-6.
- Roman RJ, Maier KG, Sun CW, Harder DR, Alonso-Galicia M. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyecosatetraenoic acid and epoxyecosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2000) 27:855-865.
- Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry* (1991) 30:3247-3255.
- Sacerdoti D, Abraham NG, McGiff JC, Schwartzman ML. Renal cytochrome P-450-dependent metabolism of arachidonic acid in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* (1988) 37:521-517.
- Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* (1989) 243:388-390.
- Schachter D, Taggart JV. Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis. *J Biol Chem* (1953) 203:925-934.

- Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* (1994) 330:1634-8.
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* (1993) 16:325-332.
- Shih PA, O'Connor DT. Hereditary determinants of human hypertension: strategies in the setting of genetic complexity. *Hypertension* (2008) 51:1456-1464.
- Simpson AE. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* (1997) 28:351-359.
- Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biol* (1971) 231:235-237.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* (1985) 150:76-85.
- Sugimoto K, Akasaka H, Katsuya T, Node K, Fujisawa T, Shimaoka I, Yasuda O, Ohishi M, Ogihara T, Shimamoto K, Rakugi H. A polymorphism regulates CYP4A11 transcriptional activity and is associated with hypertension in a Japanese population. *Hypertension* (2008) 52:1142-1148.
- Suh OK, Kim SH, Lee MG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of azosemide. *Biopharm Drug Dispos* (2003) 24:275-297.
- Sweet DH. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* (2005) 204:198-215.
- Tamasi V, Vereczkey L, Falus A, Monostory K. Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflamm Res* (2000) 52: 322-333.
- Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, Hajat C, Raleigh SM, Palmer TM, Caulfield M, Burton PR, Samani NJ. Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population. *Hypertension* (2008) 51:1658-64.
- Ullrich V, Zou MH, Bachschmid M. New physiological and pathophysiological aspects on the thromboxane A(2)-prostacyclin regulatory system. *Biochim Biophys Acta* (2001) 1532:1-14.
- Urban P, Mignotte C, Kazmaier M, Delorme F, Pompon D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J Biol Chem* (1997) 272:19176-19186.

- Ure A. On gouty concretions, with a new method of treatment. *Med Chir Trans* (1841) 24:30–35.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* (1971) 231:232–235.
- Vogel F. Moderne probleme der Humanenetik. *J Ergeb Inn Med Kinderheilkd* (1959) 12: 52–125.
- Von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and in certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* (1937) 88:213–234.
- Wang MH, Zhang F, Marji J, Zand BA, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M. CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2001) 280:255–261.
- Ward NC, Tsai IJ, Barden A, van Bockxmeer FM, Puddey IB, Hodgson JM, Croft KD. A single nucleotide polymorphism in the CYP4F2 but not CYP4A11 gene is associated with increased 20-HETE excretion and blood pressure. *Hypertension* (2008) 51:1393–1398.
- Webster LT, Siddiqui UA, Lucas SV, Strong JM, Mieyal JJ. Identification of separate acyl-CoA:glycine and acyl-CoA:L-glutamine N-acyltransferase activities in mitochondrial fractions from liver of rhesus monkey and man. *J Biol Chem* (1976) 251:3352–3358.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* (2001) 17:439–474.
- Zhang J, Cashman JR. Quantitative analysis of FMO gene mRNA levels in human tissues. *Drug Metab Dispos* (2006) 34: 19–26.

Identification et caractérisation du polymorphisme génétique des cytochromes P450 4A11 et 4A22 (*CYP4A11* et *CYP4A22*) et de la Glycine N-acyltransférase (*GLYAT*)

L'organisme a développé au cours de l'évolution des systèmes enzymatiques capables de transformer de nombreuses molécules étrangères ou xénobiotiques, le plus souvent de nature hydrophobe, en métabolites suffisamment hydrophiles pour être plus facilement excrétés par voie urinaire et/ou biliaire. Certaines de ces enzymes sont également impliquées dans des processus cataboliques ou de biosynthèses de composés endogènes (acides gras, rétinoïdes, stéroïdes, prostaglandines...).

Ces enzymes jouent ainsi un rôle fondamental à la fois dans la défense de l'organisme face à son environnement chimique et dans des processus physiologiques essentiels. On comprend dès lors que s'il existe, chez certains individus, des anomalies de séquence ou de structure des gènes codant pour ces enzymes, une partie de la population présentera une susceptibilité particulière à certaines molécules de l'environnement, voire des dysfonctionnements de certaines réactions biologiques indispensables. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans cette démarche. Dans un premier temps, ils ont consisté à évaluer la nature et l'étendue de la variabilité de la séquence nucléotidique de trois gènes codants pour les enzymes *CYP4A11*, *CYP4A22* et la Glycine N-acyltransférase (*GLYAT*). Dans un deuxième temps, les analyses fonctionnelles des variations de séquence identifiées ont été abordées par des approches *in silico* et *in vitro*.

Les cytochromes P450 4A11 et 4A22, participent à la biotransformation de composés endogènes et sont impliqués plus particulièrement dans la voie d'activation de l'acide arachidonique. Des travaux récents suggèrent que des anomalies génétiques de ces enzymes constituent des facteurs de susceptibilité à l'hypertension artérielle. Nous avons ainsi analysé les variations de séquence des gènes *CYP4A11* et *CYP4A22* dans des échantillons d'ADN provenant de volontaires sains. Au total, 26 polymorphismes ont été identifiés et 5 nouveaux allèles *CYP4A** ont été caractérisés pour chaque isoforme. Les structures 3D des protéines *CYP4A* ont été construites et validées pour l'analyse de l'impact des mutations identifiées. Les travaux d'analyses de mutations candidates retenues ont été initiés avec la mise au point d'une méthodologie GC-MS/MS de dosage de l'activité enzymatique des *CYP4As*. Ce travail représente la première description et caractérisation du polymorphisme génétique des isoformes *CYP4A* dans une population française.

La glycine N-acyltransférase ou *GLYAT* est une enzyme impliquée dans la détoxification de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique par conjugaison d'un résidu de glycine. Sept variations de séquence de la *GLYAT* ont été identifiées et quatre nouveaux allèles *GLYAT** ont été caractérisés. La localisation des certaines mutations dans des structures secondaires très conservées de la protéine suggère un impact sur l'activité catalytique de cette enzyme. Ces résultats seront utiles pour de futures études d'association de ce polymorphisme génétique de la *GLYAT* avec les altérations de détoxications de xénobiotiques contenant un groupement carboxylique comme l'aspirine, certains pesticides ou le toluène.