



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR  
Ecole Doctorale : Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
Ecole Doctorale : Biologie et Santé

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

SPECIALITE : **TOXICOLOGIE**

Thèse pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DES UNIVERSITES DE LILLE 2 et DE DAKAR

Présentée par : **Mme Aminata TOURE Ép. TOURE**

**Etude du polymorphisme génétique de la *N*-Acétyltransférase de type 2 (NAT2) dans la population sénégalaise : prévention de la toxicité et de l'échec thérapeutique de l'isoniazide dans la prise en charge de la tuberculose**

Soutenue le 10 Décembre 2012 devant le jury composé de :

<b>Rapporteurs :</b>	Mr Aynina	CISSE,	Professeur
	Mr Jean Pierre	GOULLE,	Professeur
<b>Examineurs :</b>	Mr Amadou	DIOUF,	Professeur
	Mr Michel	LHERMITTE,	Professeur

## **Je dédie ce travail :**

A mon mari en témoignage de ma gratitude pour ses encouragements, sa patience, son aide et son incitation à poursuivre mon rêve.

A mes enfants à qui je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur. Je vous adore

A feu mon père qui a toujours été présent pour moi. Reposes en paix.

A ma Mère en témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que je lui dois. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amour

A Maman Ayou pour tout

A Maimouna Diop, au docteur Ousmane Gueye et à leur famille

A toute ma famille pour leur encouragement et leur soutien

A la famille DEBARD de Lille pour leur soutien

A toute l'équipe du Centre Antipoison (CAP) du ministère de la santé et de l'action sociale et du Laboratoire de Toxicologie et d'hydrologie de l'UCAD

Ainsi qu'à tous mes amis en particuliers tous ceux qui m'ont procuré aide et réconfort durant les durs moments de ce travail. Avec toute mon affection.

## Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur le **Professeur Michel LHERMITTE**, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse malgré un calendrier très chargé et pour ses conseils avisés, sa grande disponibilité, son enthousiasme et sa patience. Toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions et pour votre présence et votre soutien sans faille.

Je remercie mon professeur, **Mr Amadou DIOUF**, de m'avoir permis d'intégrer l'équipe de toxicologie. Toute ma gratitude pour votre précieuse aide et de n'avoir négligé aucun effort pour m'apporter soutien et recommandation. Vos conseils et vos qualités de rigueur scientifique vont largement contribuer à ma formation et à ma carrière.

**Monsieur le Professeur Aynina CISSE**, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. C'est un grand honneur de vous compter parmi les membres du jury.

**Monsieur le Professeur Jean Pierre GOULLE**, merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse en acceptant d'être rapporteur et de l'honneur que vous nous faites en participant à ce jury.

**Monsieur le Professeur Mbacké SEMBENE** merci d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail malgré votre calendrier chargé. Qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance et de mes sincères remerciements.

J'adresse mes remerciements à **Monsieur le professeur Franck Broly**, Directeur de l'équipe d'accueil 4487, pour m'avoir fait l'honneur d'intégrer son équipe et permis d'effectuer mes manipulations au sein de son laboratoire au CBP.

**Madame le Docteur Delphine Allorge**, j'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez voulu accorder à la réussite de ce travail, de votre présence et de votre disponibilité à chaque fois que besoin était.

Je tiens également à remercier toute l'Equipe d'accueil **AE 4487** de la « Salle 31 » et du **laboratoire de Toxicologie et de Génopathies** du CBP de Lille pour leur aide précieuse, leurs conseils et leur soutien jour après jour.

Une pensée pour **Emmanuel Leroy**, sa famille, ses proches.

Un grand merci à **Mr Luc Humbert** pour sa gentillesse, son sérieux, sa disponibilité et son esprit scientifique. Merci pour les bons moments passés entre le labo et le self.

Merci au **Professeur Abdoul Almamy Hanne** et à toute son équipe, en particulier au **Dr Aliou Niang**

Ces trois années de travail ont été facilitées par les encouragements de toutes les personnes côtoyées quotidiennement au laboratoire et que je n'oublierais pas de remercier : Christian, Christelle, Anne, Bodalé, Bertrand, Patrick, Delphine, Aline, Camille, Isabelle, Christophe et Sylvain. Merci pour vos conseils avisés, votre disponibilité et votre gentillesse.

## **COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES**

### **Pr Pirouz Shirali**

EA4492, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque

### **Pr Abdoul Almamy Hann**

Service de Pneumophtisiologie du CHNU de Fann, Dakar

### **Dr Marie Sarr**

Coordonnatrice du programme nationale de lutte contre la tuberculose, Dakar

### **Pr Amadou Moctar Dieye**

Pharmacologie et Pharmacodynamie du département de Pharmacie de l'UCAD

### **Pr Ndéye Coumba TOURE-KANE**

Bactériologie-Virologie, CHNU Aristide Le Dantec, Dakar

## Publications et travaux

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

1. **Touré A**, Diop C, Cabral M, Fall M, Lhermitte M, Diouf A, Broly F, , Allorge D . Study of NAT2 gene polymorphisms in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population. *Mol Biol Rep.* 2012. DOI 10.1007/s11033-012-1931-2
2. **Aminata Touré**, Mathilde Cabral, Cheikh Diop, Nar Diéne, Mamadou Fall, Amadou Moctar Diéye, Amadou Diouf, Michel Lhermitte et Luc Humbert. Détermination du polymorphisme d'acétylation de la N-Acétyltransférase 2 dans la population sénégalaise par utilisation du test à la caféine. *Annales de toxicologie analytique.* 2012. DOI: 10.1051/ata/2012013
3. Christian Lacks Lino Cardenas, Aurore Devos, **Aminata Toure**, Jaime Cardenas Garcia, Abderraouf Kenani, Florence Migot-Nabias, Franck Broly et Dany Chevalier. Arachidonic acid  $\alpha$ -hydroxylase CYP4A11: inter-ethnic variations in the 8590T>C loss-of-function variant. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2): 1503-8.

### Communications orales

1. **Touré A.**, Cabral M., Diop C., Lam A., Mbaye-Séné M., Fall M., Diéye AM., Diouf A, Lhermitte M. Etude préliminaire du polymorphisme génétique de la N-acétyltransférase dans la population sénégalaise. 4<sup>ème</sup> conférence internationale sur les envenimations par morsures de serpent et piqûres de scorpion en Afrique : Epidémiologie, prévention et prise en charge des envenimations, 25-29 avril 2011, Dakar, Sénégal
2. **Touré Aminata**, Diouf Amadou et Lhermitte Michel. Etude du polymorphisme génétique de la N-Acétyltransférase 2 (NAT2) dans la population sénégalaise: prévention de la toxicité et de l'échec thérapeutique de l'isoniazide dans la prise en charge de la tuberculose. Doctoriales 2010 de l'école doctorale sciences de la vie, de la santé et de l'environnement (ED-SEV), 24-26 novembre 2010, Dakar, Sénégal

## LISTE DES TABLEAUX

---

- Tableau I.** Réactions de biotransformation de phase I
- Tableau II.** Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l'homme
- Tableau III.** Réactions de biotransformation de la phase II
- Tableau IV.** Protéines de phase III dites protéines de transport
- Tableau V.** Exemples de polymorphismes génétiques affectant la réponse aux médicaments
- Tableau VI.** Principaux allèles du gène *NAT2* humain
- Tableau VII.** Fidélité intermédiaire de la méthode de dosage des métabolites de la caféine
- Tableau VIII.** Justesse ou exactitude de la méthode
- Tableau IX.** Amorces utilisées dans l'amplification du gène *NAT2*
- Tableau X.** Mélange réactionnel pour l'amplification gène de la *NAT2*
- Tableau XI.** Conditions optimisées du programme PCR pour l'amplification de la *NAT2*
- Tableau XII.** Conditions optimisées du programme APLERA pour l'extension des amplimères
- Tableau XIII.** Position, nature, conséquence sur la protéine et fréquences des mutations identifiées sur la séquence nucléotidique du gène *NAT2* chez 96 patients sénégalais atteints de tuberculose
- Tableau XIV.** Nature et fréquence des allèles de *NAT2* identifiés chez 96 malades sénégalais atteints de tuberculose
- Tableau XV.** Génotype et phénotype prédit de la *NAT2* chez 96 malades sénégalais atteints de tuberculose

**Tableau XVI.** Proportions jointes des résultats de génotypage et de phénotypage chez 101 sujets

**Tableau XVII.** Paramètres MRM de l'INH, l'AcINH et d'EI

**Tableau XVIII.** Concentration plasmatique de l'INH et de l'AcINH à la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> heure chez les 79 sujets tuberculeux

**Tableau XIX.** Concentration plasmatique de l'INH et de l'AcINH à la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> heure en fonction du profil d'acétylation

**Tableau XX.** Proportions jointes des résultats de génotypage et de phénotypage chez 77 patients atteints de tuberculose



## LISTES DES FIGURES

---

- Figure 1.** Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques
- Figure 2.** Bases moléculaires des polymorphismes d'activité enzymatique
- Figure 3.** Conséquences cliniques des différents phénotypes métaboliques pour un médicament à index thérapeutique étroit
- Figure 4.** Profil de la concentration plasmatique de l'INH 6h après administration de dose fixe.
- Figure 5.** Les différentes voies d'activation et de détoxification des arylamines
- Figure 6.** Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8
- Figure 7.** Structure tridimensionnelle de la NAT2 Humaine : diagramme en ruban
- Figure 8.** Réaction de *N*-acétylation des xénobiotiques par les NAT.
- Figure 9.** Activation et inactivation des arylamines par *N*-acétylation, *O*-acétylation, et *N*-, *O*-acétylation catalysées par la NAT2
- Figure 10.** Les différentes voies de métabolisation de l'isoniazide chez l'Homme
- Figure 11.** Schéma des voies majeures de biotransformation de la caféine
- Figure 12.** Schéma simplifié des voies métaboliques d'activation des pré-cancérogènes chimiques de type arylamine
- Figure 13.** Chromatographie HPLC d'un extrait urinaire surchargé avec la caféine et ses métabolites (100 mg/l)
- Figure 14a.** Chromatogramme de la phase mobile utilisée pour le dosage de l'AFMU et du 1X
- Figure 14b.** Chromatogramme obtenu après injection au HPLC du l'AFMU seul
- Figure 14c.** Chromatogramme obtenu après injection au HPLC du 1X seul

- Figure 15a.** Courbe d'étalonnage de l'AFMU
- Figure 15b.** Courbe d'étalonnage du 1X
- Figure 16.** Vérification des fragments amplifiés : Migration des produits d'amplification sur gel d'agarose
- Figure 17.** Schématisation d'un résultat de séquençage après traitement informatique
- Figure 18.** Séquence codante du gène *NAT2* (873 nt) : *ENST00000286479*
- Figure 19.** Chromatogramme d'un échantillon de sérum analysé par LC-MS/MS
- Figure 20a.** Acquisition en mode daughter scan de l'INH
- Figure 20b.** Acquisition en mode daughter scan de l'AcINH

## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

ABC	:	ATP binding cassette
ABCP	:	ATP-binding cassette placentaire
ABP	:	Aminobiphényl
AcINH	:	Acétyl isoniazide
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AFMU	:	Acétamino-6-Formylamino-3-Méthyluracil
AG	:	Adénine-Guanine
AI	:	Acétyleur intermédiaire
AL	:	Acétyleur lent
AMM	:	Autorisation de Mise sur le Marché
AR	:	Acétyleur rapide
Arg	:	Arginine
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ASC	:	Aire sous la Courbe (AUC ou Area <i>Under Curve</i> )
BCRP	:	Breast cancer resistance protein
CFTR	:	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CG	:	Cytosine-Guanine
CoA-SAc	:	Acetyl coenzyme A
CoA-SH	:	Coenzyme A
Coll.	:	Collaborateurs
CV	:	Coefficient de variation
CYP	:	Cytochrome
CYP450	:	Cytochrome P450
Cys-His-Asp	:	Cystéine-histidine-aspartate
DAC	:	Déacétylase
dATP	:	Désoxyadénine triphosphate
dCTP	:	Désoxycytosine triphosphate
ddATP	:	Didésoxyadénine triphosphate
ddCTP	:	Didésoxycytosine triphosphate
ddGTP	:	Didésoxyguanosine triphosphate

ddNTP	:	didésoxynucléotide triphosphate
ddTTP	:	Didésoxythymidine triphosphate
dGTP	:	Désoxyguanosine triphosphate
dHPLC	:	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
dNTP	:	Désoxynucléotide triphosphate
DO	:	Densité optique
dTTP	:	Désoxythymidine triphosphate
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EMX	:	Enzyme du métabolisme des xénobiotiques
FDA	:	Food Drug Administration
Gln	:	Glutamine
GST	:	Glutathion-S-Transférase
HAP	:	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCL	:	Acide chlorhydrique
HIV	:	Human immunodeficiency virus
HPLC	:	High pressure liquid chromatography
HSS	:	High Strength Silica
Ile	:	isoleucine
INH	:	Isoniazide
IX	:	1-méthylxanthine
KCL	:	Chlorure de potassium
Lys	:	Lysine
MDR	:	Multi-drug resistance
MgCl <sub>2</sub>	:	Chlorure de magnésium
MI	:	Métaboliseur intermédiaire
ML	:	Métaboliseur lent
Moy	:	Moyen
MR	:	Métaboliseur rapide
MRP	:	Multi-drug resistance protein
MUR	:	Métaboliseur ultra-rapide
MXR	:	Multi xenobiotic resistance
NAT1	:	N-Acétyltransférase de type 1
NAT2	:	N-Acétyltransférase de type 2
PAS	:	Acide para-aminosalicylique

pb	:	Paire de base
PCR	:	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	:	PCR-Restriction fragment Length Polymorphism
P-gp	:	P-glycoprotéine
PhIP	:	2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4,5-β] pyridine
Prol	:	Proline
SAP	:	Shrimp alkaline phosphatase
SD	:	Standard de déviation
SI	:	Standard interne
SLC	:	Solute carrier
SLE	:	Systemic lupus erythematosus
SNP	:	Single nucleotide polymorphism
SSCP	:	Single strand conformation polymorphism
TB	:	Tuberculose
Thr	:	Thréonine
UDP	:	Uridine diphosphate
UGT	:	UDP-GlucuronosylTransférase
UV	:	Ultraviolet

# Sommaire

INTRODUCTION GENERALE .....	1
I. GENERALITES SUR LES N-ACETYLTRANSFERASES .....	16
1.1. Historique et évolution des données sur les NATs .....	17
1.2. Localisation, expression et structure des <i>NAT</i> .....	21
1.3. Principales fonctions des N-Acétyltransférases .....	26
1.4. Déterminisme génétique de la N-Acétyltransférases de type 2 (NAT2) .....	31
1.5. Méthodes de détermination du polymorphisme génétique de la NAT2 .....	35
1.5.1. Le phénotypage.....	35
1.5.2. Le génotypage.....	36
1.6. Association du polymorphisme génétique de la NAT2 avec des pathologies .....	38
1.6.1. NAT2 et cancer de la vessie .....	42
1.6.2. NAT2 et cancer colorectal .....	44
1.6.3. NAT2 et cancer du sein.....	46
1.6.4. NAT2 et hépatotoxicité.....	47
1.6.5. NAT2 et autres maladies.....	48
II. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA N-ACETYLTRANSFERASE DE TYPE 2 DANS LA POPULATION SENEGALAISE.....	51
2.1. Matériels et Méthodes .....	52
2.1.1. Population d'étude et échantillonnage urinaire.....	52
2.1.2. Validation de la méthode CLHP de dosage des métabolites de la caféine .....	52

2.2. Article 1 : « Détermination du polymorphisme d'acétylation de la N-Acétyltransférase 2 dans la population sénégalaise par HPLC : utilisation du rapport [AFMU/IX] pour évaluer l'activité enzymatique de la NAT2 ».....	58
<b>III. RECHERCHE DE MUTATIONS DU GENE DE LA N-ACETYLTRANSFERASE DE TYPE 2 DANS LA POPULATION SENEGALAISE PAR PCR-SEQUENÇAGE .....</b>	
3.1. Echantillons d'ADN analysés .....	69
3.2. Extraction de l'ADN .....	70
3.3. Contrôle qualitatif et quantitatif des ADN .....	70
3.4. Amplification par PCR et étude des mutations par séquençage .....	71
3.4.1. Amplification du fragment à séquencer.....	71
3.4.2. Analyse des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose.....	72
3.4.3. Purification enzymatique des amplicons .....	73
3.4.4. Extension des amplicons après marquage .....	74
3.4.5. Séquençage sur 3130 XL 16 capillaires (Applied Biosystems).....	75
3.5. Analyse in silico.....	77
3.6. Résultats .....	78
3.7. Corrélation génotype-phénotype .....	84
3.8. Discussion.....	84
3.9. Article 2: « Study of NAT2 genetic polymorphism in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population”.....	90
<b>IV. ETUDE DE LA CINETIQUE DE L'INH CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE TUBERCULOSE .....</b>	
4.1. Recrutement de patients atteints de tuberculose et échantillonnage de sang hépariné .....	101
4.2. Méthodes analytiques.....	102
4.2.1. Principe de la chromatographie et de la spectrométrie de masse ..	102

4.2.2. Appareillage .....	104
4.2.3. Réactifs .....	104
4.2.4. Méthode analytique.....	104
4.2.5. Calcul de l'indice d'acétylation.....	106
4.3. Résultats .....	107
4.4. Corrélation polymorphisme génétique de la NAT2 – cinétique de l'INH 110	
4.5. Discussion.....	111
4.6. Article 3 : Génotypage de la NAT2 chez des sujets sénégalais atteints de tuberculose : corrélation avec la cinétique de l'INH : en rédaction.....	114
DISCUSSION GENERALE .....	115
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	121
BIBLIOGRAPHIE .....	125





## **INTRODUCTION GENERALE**

De par son environnement, l'Homme est quotidiennement exposé à une grande variété de substances exogènes d'origines diverses, qui sont appelées xénobiotiques (du grec *xenos*, étranger). Il peut s'agir de produits naturels ou de synthèse, de polluants de l'environnement : toxines végétales, microorganismes et animales, pesticides, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants et colorants, additifs alimentaires.

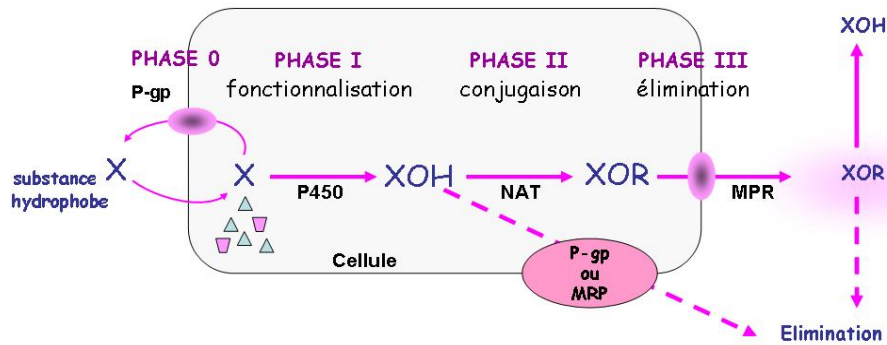
Ces xénobiotiques sont généralement des substances hydrophobes, rendant difficile leur élimination urinaire ou biliaire. Ils pénètrent aisément dans les phases lipidiques des membranes cellulaires avec une tendance naturelle à s'y accumuler engendrant ainsi une toxicité, voire une mort cellulaire inéluctable [Beaume et Lorient 2000].

Pour éviter cette accumulation et lutter contre les agressions, tous les organismes vivants ont développé, au cours de l'évolution, des systèmes enzymatiques de biotransformation et de détoxification. Le processus de détoxification représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes dans le but de faciliter leur biotransformation et leur excrétion hors de l'organisme [Parkinson et coll. 1996]. Cependant, compte tenu de l'immense variabilité des structures chimiques existantes et des réactions à catalyser, il existe une grande diversité d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX).

Le processus de détoxification se déroule en trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation (permettant d'éliminer les groupements hydrophobes et de neutraliser les groupements réactifs des xénobiotiques) : phases I et II, et des transporteurs actifs (permettant d'éliminer les substances exogènes de l'organisme) : phase III. Ces trois phases sont précédées par une phase « 0 » qui correspond à l'entrée des xénobiotiques dans la cellule (Figure 1).

Les enzymes de phase I sont des enzymes qui catalysent des réactions de fonctionnalisation. Elles permettent l'introduction d'un groupement fonctionnel qui a pour rôle de rendre la molécule plus polaire, plus hydrophile. Elles sont principalement représentées par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (Tableau 1). Les cytochromes P450 réalisent à eux seuls environ 90 % des réactions de phase I [Oestreicher et coll. 1999] qui 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 des réactions d'hydrolyse [Rendic, 2002] (Tableau I). 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.



**Figure 1** : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques.

*X* : xénobiotique hydrophobe ; *XOH* : métabolite plus polaire du xénobiotique ; *XOR* : xénobiotique conjugué ; *P450* : Cytochrome P450 ; *NAT* : N-acétyltransferase ; *MRP* : Multi Drug Resistance Proteins ; *P-gp* : P-glycoprotéines. [D'après Allorge et Loriot, 2004].

**Tableau I** : Réactions de biotransformation de phase I.

<b>TYPE DE REACTION</b>	<b>ENZYMES</b>	<b>SUBSTRATS</b>
Oxydation	Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénases	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénases	Aldéhydes
	Flavine Monooxygénases	Amines tertiaires
	Monoamine oxydase	Amines
Réduction	Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénases	Aldéhydes, cétones
	Carbonyl réductases	Aldéhydes, cétones
Hydrolyse	Estérases	Esters
	Peptidases	Peptides
	Epoxyde hydrolases	Hydrocarbure aliphatiques polycycliques (HAP)

Les monooxygénases à cytochrome P450 sont essentielles pour effectuer des biotransformations 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. Plus de 60 isoformes ont été identifiées. Cependant, seule une dizaine d'entre elles sont majoritairement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (CYP 1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4) [Gueguen et coll., 2006] (Tableau II).

**Tableau II** : Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l'homme [Gueguen et coll., 2006]

<b>CYPS</b>	<b>SUBSTRATS</b>
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, tétrachlorure de carbone, vinylyes, acétaminophène, acétonitrile, chlorzoxazone
CYP3A4/5	Nifédipine, aflatoxine B1, cyclosporine, testostérone, éthinyloestradiol, rifampicine, érythromycine, lovastatine, midazolam
CYP4A11/12	Acides gras (oxydation et hydroxylation)
CYP4B1	Testostérone, coumarine

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 méthyle et glycine) des xénobiotiques ou de leur(s) métabolite(s) préalablement produit(s) par un processus de phase I. Elles regroupent plusieurs systèmes enzymatiques dont les N-Acétyltransférases (NATs), les *UDP*-Glucuronosyltransférases (UGTs) entre autres. 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 et sont en nombre limité. Les produits issus de cette phase II gagnent ainsi en hydrosolubilité, facilitant leur élimination par la bile ou les urines (Tableau III).

**Tableau III** : Réactions de biotransformation de la phase II [Batt et coll. 2007]

REACTIONS	ENZYMES	TYPE DE SUBSTRATS
Glucuroconjugaison	UDP-glucuronyltransférases	Phénols, thiols, amines, acides
Sulfoconjugaison	Sulfotransférases	Phénols, thiols, amines
Mercaptoconjugaison	Glutathion S transférases	Tout substrat électrophile
Méthylation	Méthyltransférases (O, N, S)	Phénols, amines, thiols
Acétylation	N-acétyltransférases	Amines
Glycinoconjugaison	Aminoacyltransférases	Acides carboxyliques

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

Enfin, pour être éliminés hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par des protéines de phase III, représentées surtout par deux superfamilles, d'une part, les protéines ABC (*ATP-Binding Cassette*) qui comprennent entre autres les MRP (*Multi Drug Resistance Protein*) et les P-glycoprotéines (P-gp), et d'autre part, les protéines SLC (*Solute Carrier*) (Tableau IV). Ces protéines de transport ont pour but d'évacuer hors de la cellule, le composé rendu hydrosoluble vers le système sanguin, en vue de son élimination rénale *via* les urines. De plus, une surexpression de certains transporteurs ABC peut provoquer une résistance des agents infectieux aux médicaments, une virulence des bactéries pathogènes, ou encore une résistance des cellules tumorales à des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie, conduisant à un échec de la chimiothérapie anticancéreuse [Filipits 2004].

**Tableau IV** : Protéines de phase III dites protéines de transport [Sugiura et coll. 2006]

FAMILLE	MEMBRES	FONCTIONS
ABCA	ABCA1 (ABC1)	Transport du cholestérol
	ABCA2 (ABC2)	Résistance aux médicaments
	ABCA3	Sécrétion 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 des 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

La majorité des enzymes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques est exprimée de façon ubiquitaire. Ainsi, on a longtemps considéré que les CYP450 étaient principalement exprimés dans le foie, mais ils sont en fait présents dans tous les tissus, où ils influencent la biodisponibilité des agents thérapeutiques et contribuent à la formation de métabolites dont la production *in situ* peut expliquer la toxicité du tissu-spécifique [Ding et Kaminsky, 2003].

En effet, les réactions métaboliques aboutissent la plupart du temps à une désactivation du xénobiotique, mais peuvent parfois conduire à la formation d'un métabolite plus actif, voire plus toxique, que le composé initial [Hotchkiss 1998, Sartorelli et coll. 2000].



L'équilibre entre la production des métabolites toxiques et celle des métabolites atoxiques dans un tissu dépend, au moins, partiellement, du profil des enzymes exprimées dans ce tissu.

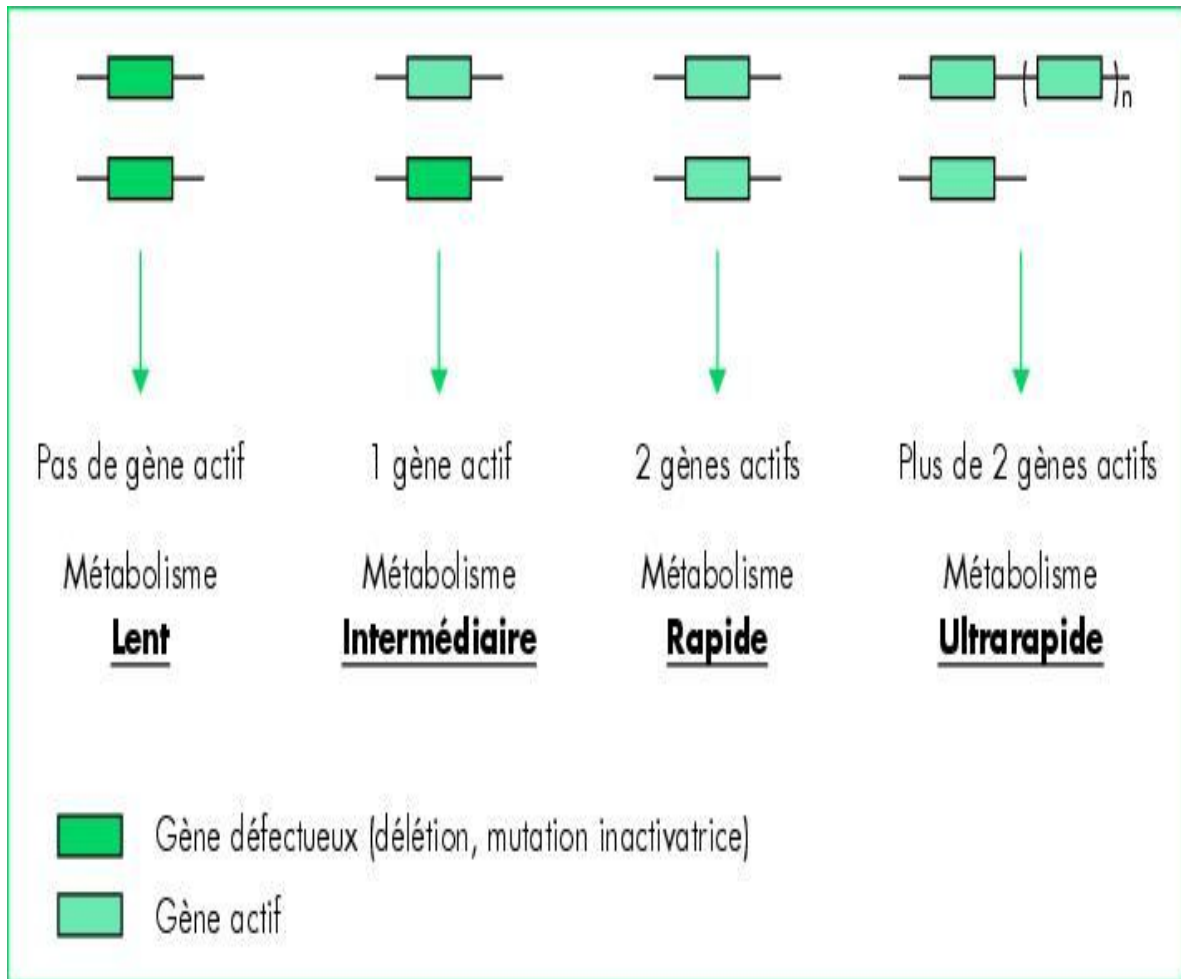
Ainsi, La tolérance de l'organisme aux xénobiotiques présente une importante hétérogénéité interindividuelle. Celle-ci résulte en grande partie d'une variabilité dans l'activité des enzymes de biotransformation, en raison de 2 types de facteurs qui interviennent dans la modulation et la régulation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX) :

- des facteurs externes environnementaux
- des facteurs intrinsèques en particulier les polymorphismes génétiques, qui traduisent les variations de la structure primaire d'un gène au sein d'une même espèce. Ces variations stables et transmises de manière mendélienne, constituent l'origine moléculaire de la diversité phénotypique intra-spécifique des individus.

Les polymorphismes génétiques affectant l'expression ou l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques s'expriment dans la population générale sous forme de différents phénotypes métaboliques, définissant au moins deux groupes d'individus : les métaboliseurs lents (ML), qui présentent un déficit d'activité enzymatique, et les métaboliseurs rapides (MR), à activité normale. Pour certaines enzymes, sont décrits également des métaboliseurs intermédiaires (MI), à activité plus réduite et des métaboliseurs ultra-rapides (MUR), chez qui l'activité enzymatique est augmentée (Figure 2). La fréquence des différents phénotypes est variable en fonction de l'enzyme et, pour une même enzyme, en fonction de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées [Gaedigk 2000, Lorient et Beaume 2004].

Les polymorphismes génétiques sont accompagnés d'effets fonctionnels et concernent de nombreuses enzymes de phase I comme de phase II. Les enzymes polymorphes majeurs en pharmacogénétique sont les enzymes du cytochrome P450 pour la phase I, et les *N*-acétyltransférases (NAT) et les Glucuronosyltransférases (GST) pour la phase II. Le Tableau V présente quelques exemples d'enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments pour lesquels des anomalies de réponse d'origine génétique ont été démontrées.

Les variants enzymatiques connus sont présents à des fréquences variables au sein des différentes populations humaines. Les différences phénotypiques peuvent cependant être discrètes et dépourvues d'impact clinique important.



**Figure 2** : Bases moléculaires des polymorphismes d'activité enzymatique.

*Dans le cas d'un médicament métabolisé par une enzyme, la capacité métabolique de l'individu dépend du nombre d'allèles fonctionnels du gène codant pour l'enzyme. Si les deux allèles sont inactivés (homozygote muté), on parle de métaboliseur lent (activité enzymatique absente ou diminuée). Si un seul des deux allèles est muté (hétérozygote), on parle parfois de métaboliseur intermédiaire. Si les deux allèles sont sauvages, on parle de métaboliseur rapide ou extensif. Dans certains cas assez rares, il peut exister une amplification du gène, conduisant à une augmentation de l'activité et à un phénotype de métaboliseur ultra-rapide [d'après De Chaisemartin et Lorient, 2005].*

**Tableau V.** Exemples de polymorphismes génétiques affectant la réponse aux médicaments [Zanger et coll. 2004].

<b>GENE ENZYMES DU METABOLISME</b>	<b>MEDICAMENTS- SUBSTRATS</b>	<b>CONSEQUENCES CLINIQUES LIEES AU POLYMORPHISME</b>
<i>CYP2C9</i>	Anticoagulants oraux (warfarine, acénocoumarol)	Hémorragies
	Sulfamides hypoglycémiants (glibenclamide, glipizide)	Hypoglycémie
<i>CYP2C19</i>	Oméprazole	Efficacité accrue chez ML, utilisation de doses adaptées
<i>CYP2D6</i>	Antidépresseurs tricycliques	Inefficacité chez MUR Toxicité chez ML
	Codéine	Absence d'analgésie chez ML (prodrogue)
<i>DPD</i>	5-Fluorouracile	Neurotoxicité
<i>NAT2</i>	Isoniazide	Neurotoxicité chez ML, Hépatotoxicité chez MR
<i>TPMT</i>	Azathioprine, mercaptopurine, thioguanine	Hématotoxicité chez ML, myélosuppression chez les MR
<i>UGT1A1</i>	Irinotécan	Diarrhée, neutropénie

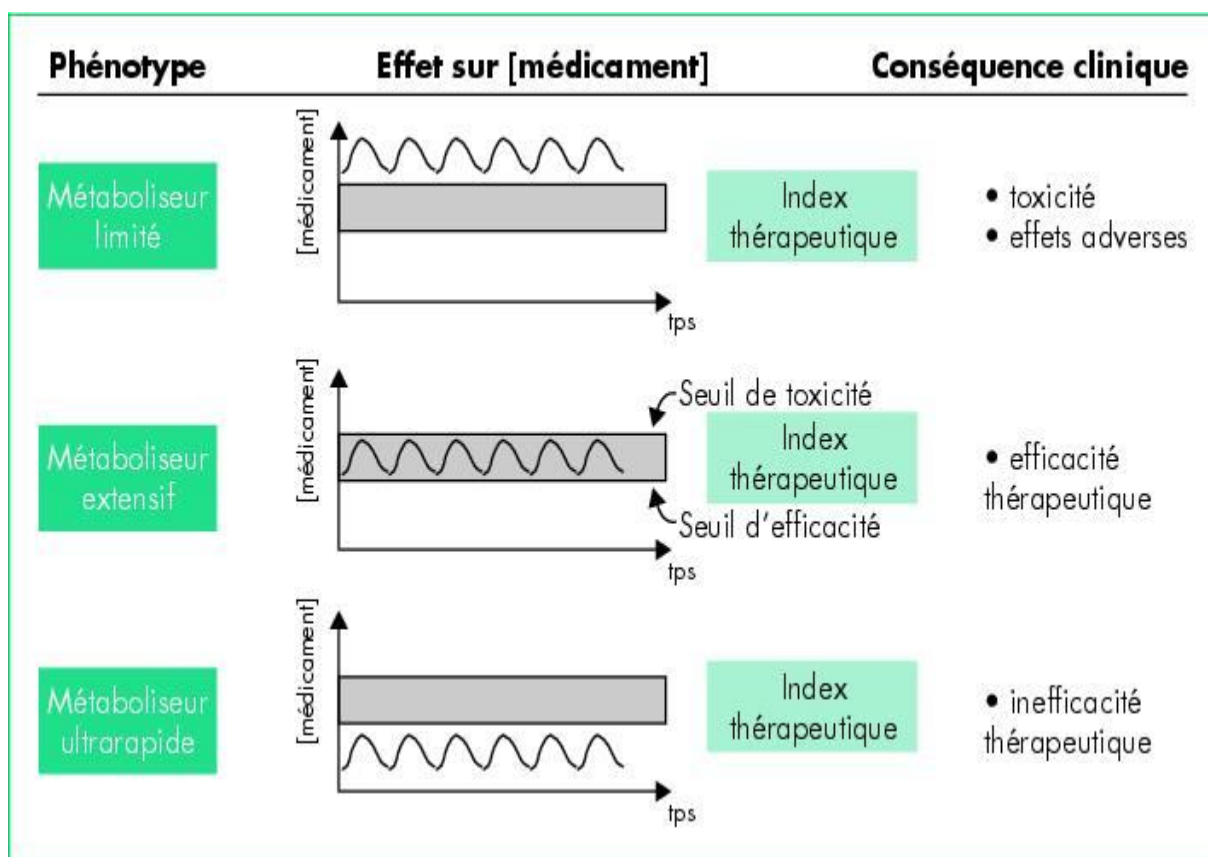
*CYP* : cytochromes P450 ; *DPD* : dihydropyrimidine déshydrogénase ; *NAT2* : N-Acétyltransférase 2 ; *TPMT* : thiopurine S-méthyltransférase ; *UGT* : uridine diphosphate glucuronosyltransférase ; *ML* : métaboliseurs lents ; *MUR* : métaboliseurs ultrarapides.

Le phénotype métabolique d'un individu peut être déterminé par deux types de méthodes : le phénotypage direct ou la prédiction par le génotypage. Les méthodes de phénotypage reposent sur la mesure directe de l'activité enzymatique ou, le plus souvent, sur l'administration d'un substrat-test, suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduel et/ou de ses métabolites. Dans le cas le plus général, on détermine alors le rapport métabolique entre la quantité de substance retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s), ce rapport étant le reflet de l'activité enzymatique étudiée. La valeur du rapport métabolique permet de classer les individus en métaboliseurs extensifs ou limités par comparaison à celle de l'antimode de distribution, déterminé au préalable de façon statistique, sur une grande population d'individus. Lorsque l'administration directe du médicament-test à l'individu n'est pas envisageable (par exemple pour les médicaments immunosuppresseurs potentiellement toxiques), ces tests de phénotypage *in vivo* peuvent être remplacés par des tests *ex vivo*. En fait, cette approche par mesure directe de l'activité enzymatique sur un tissu facilement accessible comme les érythrocytes ou les leucocytes serait préférable à la méthode par administration d'un médicament-test, plus contraignante. Malheureusement, la grande majorité des enzymes présentant un intérêt en pharmacogénétique est peu ou pas exprimée dans les tissus d'accès facile et non invasif [Allorge et Lorient, 2004]. De plus, l'interprétation du phénotype par ces méthodes est parfois difficile, voire impossible, par exemple en cas de co-administration de médicaments eux-mêmes substrats, inducteurs ou encore inhibiteurs, de l'enzyme testée. En effet, un phénomène de « phénocopie », qui classe les individus de manière erronée dans un phénotype MR ou ML, peut être induit par des interactions médicamenteuses.

Pour pallier ces inconvénients, il est possible, grâce à l'utilisation de techniques dites de génotypage, simples et rapides, basées sur l'analyse d'un échantillon d'ADN, d'offrir aux cliniciens la possibilité de prévoir et de prévenir, chez leurs patients, la survenue d'effets indésirables ou toxiques, considérés jusque-là comme une fatalité inhérente à la thérapeutique médicamenteuse, et ainsi d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi de nombreux traitements. Cette possibilité représente une révolution dans l'utilisation des médicaments à l'échelle individuelle et un réel espoir d'aboutir à une pharmacothérapie « sur mesure ».

Ainsi, les gènes codant pour différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques peuvent être analysés en routine, avant l'instauration d'un traitement. Après génotypage, les patients classés « métaboliseurs ultra-rapides », susceptibles d'éliminer trop

rapidement le médicament, verront éventuellement leur posologie augmentée afin d'éviter une inefficacité thérapeutique par sous-dosage. Les «métaboliseurs lents», quant à eux, susceptibles d'accumuler le médicament et de présenter des effets indésirables en relation avec un surdosage, verront leurs doses réduites. Chez les patients «métaboliseurs intermédiaires», il pourra être recommandé de suivre les concentrations circulantes pour adapter plus finement la posologie [Ikeda et coll. 2004]. Cette réadaptation de la posologie est surtout nécessaire pour les médicaments à index thérapeutique étroit (Figure 3).



**Figure 3 :** Conséquences cliniques des différents phénotypes métaboliques pour un médicament à index thérapeutique étroit. *Pour des doses standards d'un médicament à index thérapeutique étroit (c'est-à-dire présentant un écart faible entre les concentrations efficaces et les concentrations toxiques) et ici administré sous forme active, les métaboliseurs limités (lents) se retrouvent en situation de surdosage, avec un risque plus élevé d'apparition de signe de toxicité et d'effets indésirables, alors que les métaboliseurs ultrarapides se retrouvent en situation de sous-dosage, à l'origine d'une inefficacité du traitement [Lecomte et coll. 2006].*

Le support de la variabilité génétique de la réponse aux xénobiotiques réside ainsi dans les polymorphismes génétiques observés au niveau des transporteurs de ces xénobiotiques (en particulier les médicaments), des enzymes qui les activent ou les détoxiquent et des cibles protéiques de ces substances. La NAT2 occupe une place centrale au sein du métabolisme des molécules aromatiques ou arylamines telles que l'isoniazide (INH). A ce titre, elle pourrait être un facteur de variation supplémentaire dans la réponse au traitement et la survenue d'effets indésirables liée à l'utilisation de cet antibiotique, dans la mesure où une activité NAT2 élevée pourrait être corrélée à une augmentation de la concentration en acétylhydrazine, métabolite très réactif et hépatotoxique.

Ainsi des études analytiques sur le polymorphisme génétique de la NAT2 doivent être menées non seulement pour démontrer l'importance des polymorphismes génétiques pour la prédiction de l'efficacité et de la toxicité de l'INH, mais également pour une mise à disposition d'outil de surveillance de la mortalité liée à la tuberculose.

Ce travail de thèse a été réalisé en co-tutelle entre l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et l'Université du Droit et de la Santé de Lille 2 (France). Les travaux de laboratoire ont été effectués au sein de l'Equipe d'Accueil 4483 de l'Université de Lille 2, dirigée par le Professeur Franck Broly et au niveau du laboratoire de «Toxicologie et Génopathies» du Centre de Biologie Pathologie (CBP) du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille 2. L'Equipe d'Accueil AE 4483 s'intéresse à l'étude de la variabilité génétique des mécanismes de défense de l'organisme face à son environnement.

Les travaux réalisés ont porté sur la détermination du polymorphisme génétique de la N-Acétyltransférases de type 2 dans la population sénégalaise pour une optimisation de l'utilisation de l'isoniazide dans la prise en charge de la tuberculose et une prévention de sa toxicité. Cette étude a obtenu une autorisation du comité éthique du ministère de la santé et de l'action sociale qui érige les conditions de recherche et d'éthique au Sénégal.

Ce travail comporte deux parties. Dans la première, il est présenté l'état des principales connaissances actuelles sur les N-Acétyltransférases, enzymes de phase 2 de métabolisation des xénobiotiques et dans la seconde, il est exposé, sous forme d'articles acceptés ou soumis pour publication, les résultats des travaux concernant l'étude du profil d'acétylation de la NAT2 ; la recherche de mutations sur le gène *NAT2* dans la population sénégalaise et l'étude

de la cinétique de l'INH et du polymorphisme génétique de la NAT2 chez des patients atteints de tuberculose par HPLC.



## **I. GENERALITES SUR LES N-ACETYLTRANSFERASES**

Les arylamine-N-acétyltransférases (NAT) (NAT. EC 2.3.1.5) sont une famille unique d'enzymes de la phase II de biotransformation des xénobiotiques, qui acétylent les composés arylamines, arylhydrazines et arylhydroxylamines, en utilisant l'acétylcoenzyme A (acétylCoA) comme cofacteur [Weber et Hein 1985]. Deux isoenzymes des NATs, NAT1 et NAT2, ont été identifiées chez l'homme. Elles agissent comme des enzymes importantes dans la voie métabolique des amines primaires, des hydrazides et hydrazines. A côté de certains médicaments tels que l'isoniazide, la dapsons, l'acide para-aminosalicylique (PAS) et l'hydralazine. les *N*-acétyltransférases métabolisent également les xénobiotiques contenant des amines aromatiques par *N*- et/ou *O*-acétylation [Lang et coll. 1994].

Il a été démontré que les gènes codant les NAT1 et NAT2 sont polymorphes. Le polymorphisme génétique des NATs a été identifié pour la première fois chez des patients atteints de tuberculose traités par de l'isoniazide. L'étude de ce polymorphisme génétique a permis de mieux comprendre l'intérêt et le rôle du profil d'acétylation dans la genèse et l'évolution de certaines maladies, mais aussi les risques d'effets indésirables de certains médicaments [Evans 1992].

### **1.1. Historique et évolution des données sur les NATs**

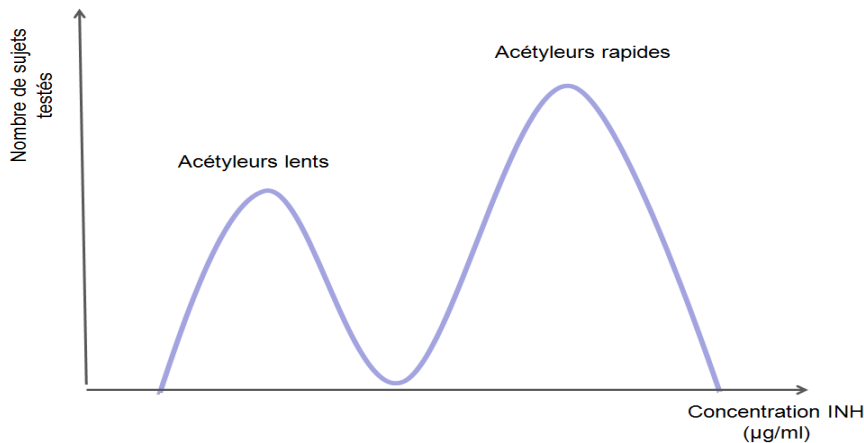
Au cours des dernières décennies, la recherche sur les arylamine-N-acétyltransférases a permis des découvertes importantes qui ont aidé les scientifiques à mieux intégrer le mécanisme polymorphique du métabolisme des médicaments et des xénobiotiques par les enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX).

Les premières références sur les réactions de *N*-acétylation par les NATs chez l'Homme remontent à 1926 [Muenzen et coll.1926].

Le polymorphisme des *N*-acétyltransférases représente l'un des exemples de variation pharmacogénétique décrits les plus documentés, depuis sa découverte au début des années 1950, en même temps que celle de la grande efficacité de l'isoniazide (INH) dans le traitement de la tuberculose [Hughes et coll. 1954].

Il a été démontré, suite à l'administration d'isoniazide, que si de nombreux patients excrétaient rapidement des dérivés d'INH sous forme de métabolites conjugués inactifs, d'autres conservaient plus longtemps une concentration plasmatique plus élevée non transformée, en relation avec l'élimination moins efficace du médicament. Des études

quantitatives, par le calcul du rapport entre métabolites conjugués et métabolites non conjugués, ont vite montré que les populations étudiées se divisaient en 2 groupes d'individus en ce qui concerne la vitesse d'élimination de l'INH : les uns dits acétyleurs rapides, les autres dits acétyleurs lents de l'INH (Figure 4).



**Figure 4:** Profil de la concentration plasmatique de l'INH 6h après administration de dose fixe. Les sujets sont divisés en deux groupes en fonction du rapport INH/AcINH. Au sein d'une population traitée par l'isoniazide, il est possible de distinguer des individus ayant une activité d'acétylation rapide et des individus acétyleurs lents. En pratique, on détermine des histogrammes représentant le nombre de sujets en fonction de la vitesse ou du pourcentage d'acétylation. Cette distribution bimodale est due à une différence génétique touchant la capacité de biotransformation due à l'activité de la N-acétyltransférase. Ce polymorphisme a essentiellement été mis en évidence avec l'isoniazide, mais il concerne toutes les substances métabolisées par la N-acétyltransférase de type 2.

Ces résultats ont suscité la curiosité des chercheurs sur les mécanismes pharmacologiques et génétiques de ce phénomène. Plusieurs études ont ensuite permis de constater qu'il existait deux N-acétyltransférases : NAT1 et NAT2. L'isoniazide étant métabolisé par la NAT2 [Kalow 2005].

Ce n'est que plus tard, que ces différences ont été attribuées à des variations de niveau d'activité de la NAT2, enzyme qui intervient dans le métabolisme de l'INH à côté du CYP1A2 [Evans et coll. 1960, Blum et coll. 1990]. Le travail effectué par l'équipe de Meyer

et coll. de l'Université de Bâle, a provoqué une impulsion spectaculaire des connaissances actuelles sur les *N*-acétyltransférases [Meyer et coll. 1990].

Différents travaux ont permis de démontrer que les variations de la séquence nucléotidique des NATs humaines étaient le résultat d'une baisse d'activité de ces protéines dans le foie [Blum et coll. 1991], entraînant ainsi des déficits de purification partielle de la NAT2 [Grant et coll. 1989], de clonage de NAT1 et NAT2 [Grant et coll. 1989, Blum et coll. 1990] et d'expression des recombinants protéiques de ces enzymes. D'autres études sur le rôle du polymorphisme génétique sur l'activité de la NAT2 ont été réalisées par Hein et coll. [Hein 1994].

Différentes expériences sur l'isoniazide, la sulfaméthazine et d'autres substrats des NATs, ont ainsi permis de classer les populations en fonction de leur profil d'acétylation : en acétyleurs lents (AL), en acétyleurs rapides (AR) et parfois en acétyleurs intermédiaires (AI) en fonction de l'activité des NATs. En effet, les métaboliseurs rapides ont une activité enzymatique normale et les métaboliseurs lents présentent une activité enzymatique diminuée, en rapport avec une quantité réduite d'enzyme au niveau du foie. Plus tard, il a été démontré que les acétyleurs lents présentent au niveau de la région codante du gène *NAT2*, des variations alléliques dues à des substitutions nucléotidiques.

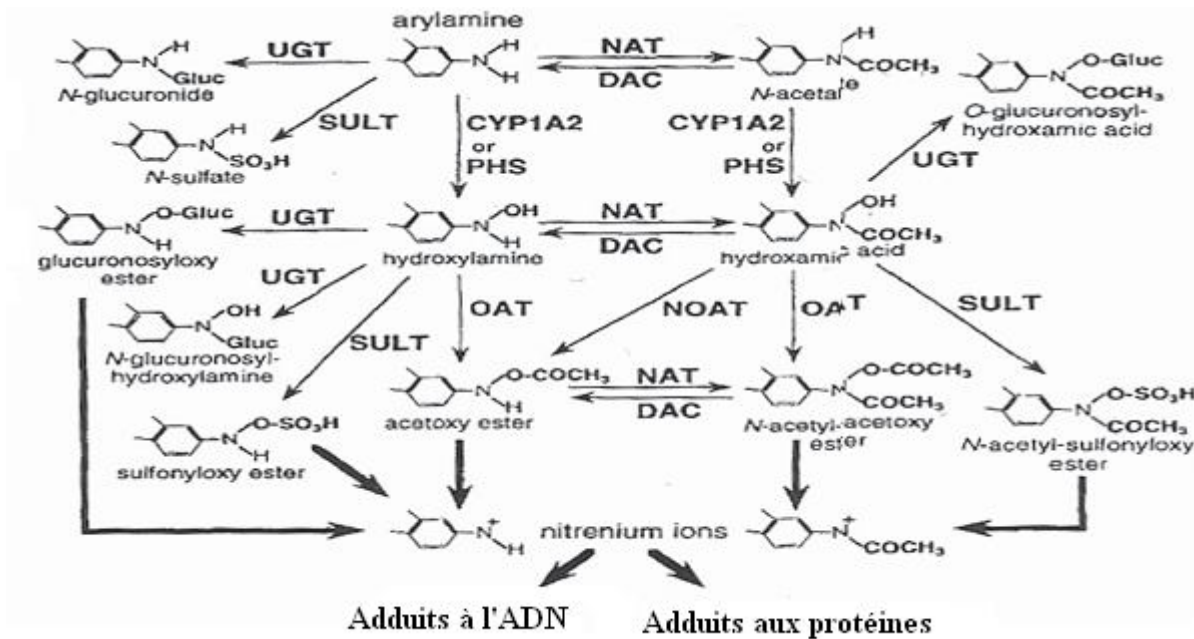
Peu de temps après la découverte de l'insuffisance de l'acétylation de l'isoniazide, il s'est avéré que la fréquence de ce défaut phénotypique diffère également beaucoup entre les groupes ethniques [Deguchi et coll. 1990, Sim et Hickman 1991, Deguchi 1992]. Aujourd'hui, la raison de cette variabilité inter-ethnique particulière est encore floue, plusieurs facteurs sont suspectés : une influence de la latitude géographique et le climat, les modes de vie et d'alimentation, ... [Kalow 2005, Sabbagh et coll. 2011].

D'autres médicaments couramment utilisés (autres que l'isoniazide) sont aussi touchés par le polymorphisme génétique de la NAT2. Il s'agit de la procaïnamide, de l'hydralazine, de la dapsonne et des sulfamides avec une augmentation des effets indésirables observés lors de l'utilisation de ces substances. Un substrat sélectif de la NAT1 est l'acide p.aminosalicylique (PAS). Cependant, la variation génétique de la NAT1 n'a été clairement établie qu'après les années 1990 [Vatsis et Weber 1993, Grant et coll. 1997] et le polymorphisme génétique de la NAT1 n'est pas aussi marqué que celui de la NAT2.

Le rôle du polymorphisme d'acétylation a été d'abord retenu comme élément important dans le processus d'élimination des produits pharmaceutiques ; mais son rôle dans l'activation et la détoxification des arylamines de l'environnement a également reçu une attention considérable. La littérature explore de plus en plus les différences génétiques des NAT sur les risques de survenue de cancer dans plusieurs tissus ou organes tels que la vessie, le sein, les poumons, le colon, le rectum, ... [Dalhoff et coll. 2005, Roemer et coll. 2008, Weistenhofer et coll. 2008].

C'est ainsi que, une plus grande attention est souvent portée au fait que divers produits chimiques industriels ayant un potentiel cancérigène, et les amines hétérocycliques mutagènes, sont considérés comme des substrats des deux N-Acétyltransférases [Hirvonen 1999]. La présence ou l'absence de ces transférases déterminera certaines incidences de cancer liées à l'exposition à ces drogues ou prodrogues [Butcher et coll. 2002]. Chez l'homme, ces molécules peuvent être transformées plus ou moins sélectivement par l'une ou l'autre des deux formes distinctes d'arylamine N-Acétyltransférases, en l'occurrence la N-Acétyltransférase de type I (NAT1) et la N-Acétyltransférase de type II (NAT2). Des tentatives ont été faites pour attribuer l'incidence du cancer dans différentes populations à des polymorphismes d'acétylation de ces deux enzymes [Brockton et coll. 2000].

Grant et collaborateurs, 1997, ont noté que l'ultime transformation d'une amine aromatique en métabolites inactifs ou réactifs (toxiques) par les NATs dépend d'un réseau complexe de facteurs, y compris les efficacités catalytiques des enzymes impliquées dans l'acétylation (à la fois NAT1 et NAT2, mais ainsi d'autres enzymes dont les cytochromes P450, l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase ou UDP-GT, les désacétylases microsomaux proches des NATs, ...) (Figure 5) [Grant et coll. 1997]. Ces autres enzymes étant, pour la plupart d'entre elles, modulées par des polymorphismes génétiques et/ou des influences environnementales. Des interactions complexes entre NATs et ces autres enzymes sont déterminantes dans la modulation des risques cancérigènes des arylamines [Hein et coll. 2000, Vaziri et coll. 2001].



- NAT:** N-acétyltransférase  
**NOAT:** N, O-acyltransférase intramolécule  
**CYP1A2:** Cytochrome P4501A2  
**UGT:** UDP-glucuronosyltransférase  
**OAT:** O-acétyltransférase  
**DAC:** Déacétylase microsomale  
**PHS:** Prostaglandine H synthase  
**SULT:** Sulfotransférase

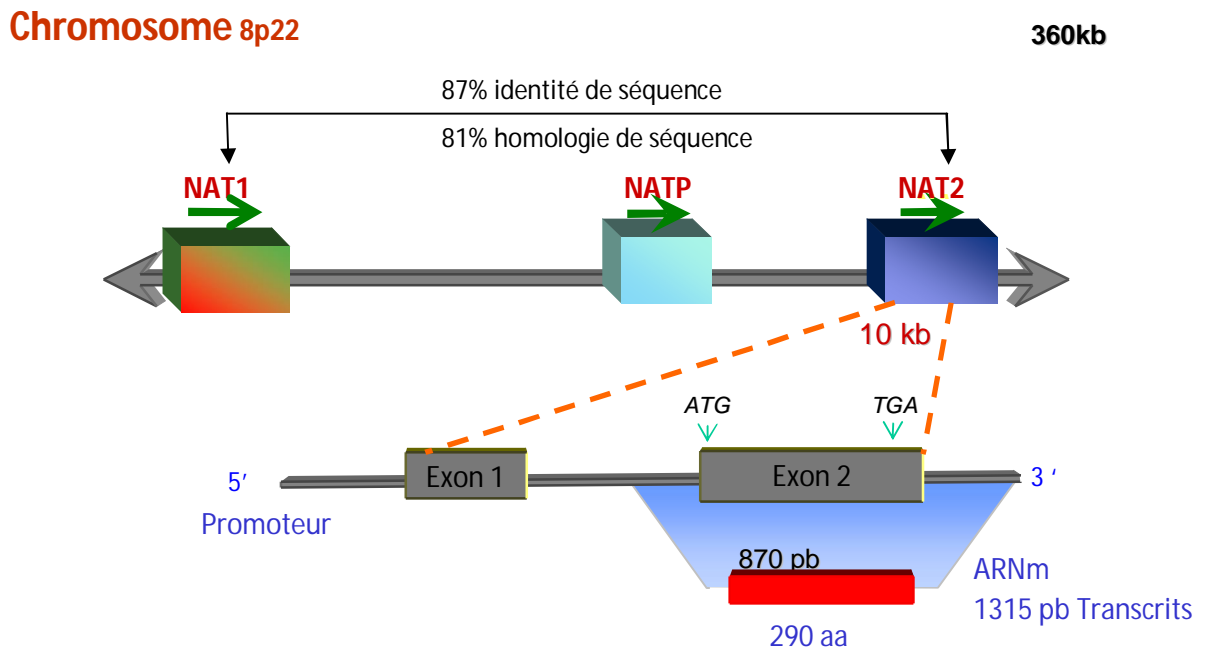
**Figure 5 :** Les différentes voies d'activation et de détoxication des arylamines [Grant et coll. 1997]

## 1.2. Localisation, expression et structure des NAT

Les deux formes enzymatiques des N-Acétyltransférases sont codées par deux gènes différents, la *NAT1* et la *NAT2*, décrits chez l'homme pour la première fois par Grant et collaborateurs en 1981 [Grant et coll. 1983]. Ces deux gènes sont séparés par 25 kb et localisés sur le bras court du chromosome 8 plus précisément dans la région 8p22 [Hichmann et coll. 1994, Boukouvala et Fakis 2005, Westwood et coll. 2006, Minchin et coll. 2007, Sim et coll. 2007 et coll. 2008, Grant 2008, Sim et coll. 2008a et 2008b]. Un troisième gène, la *NATP1*, a été identifié sur le même chromosome et constitue probablement un pseudogène. Il présente 79 et 80 % d'identité nucléotidique avec les *NAT1* et *NAT2* respectivement [Grant 2008]. Ce pseudogène renferme plusieurs mutations, expliquant son défaut d'expression.

L'expression des gènes *NAT1* et *NAT2* donne naissance à deux protéines fonctionnelles de 290 acides aminés (aa) qui ne diffèrent que par 55 acides aminés au niveau de la région C-terminale. Le gène *NAT1* a une taille de 33 kDa et le *NAT2*, une taille de 31 kDa. Ces deux gènes partagent 87 % d'homologie nucléotidique dans la région codante qui se traduit par 81

% d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés [Blum et coll. 1990, Grant et coll. 1983 et 1997] (Figure 6).



**Figure 6 :** Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8 [d'après Grant et coll. 1983, Blum et coll. 1990]

Les deux NATs humaines connues sont des enzymes cytosoliques. L'expression de la NAT2 est essentiellement hépatique et substantiellement gastro-intestinale (colon, pancréas et œsophage), tandis que l'enzyme NAT1 est bien plus exprimée et a été détectée dans de nombreux tissus extra-hépatiques [Deguchi 1992, Evans 1992].

Malgré l'existence de 81 % d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés entre les protéines NAT2 et NAT1, une grande sélectivité catalytique des deux enzymes a été démontrée [Blum et coll. 1990, Grant et coll. 1991].

D'un côté, la NAT1 est exprimée de façon monomorphique dans la majorité des tissus de l'organisme et est responsable du métabolisme de substrats tels les acides *p*-aminobenzoïque et *p*-aminosalicylique [Grant et coll. 1991]. L'activité de la NAT1 peut être modulée par divers facteurs, comme l'âge, le sexe, la maladie, la diète et les xénobiotiques [Spielberg 1996].

D'un autre côté, La NAT2 est surtout impliquée dans le métabolisme des arylamines (sulfaméthazine, procainamide), des hydrazines (isoniazide, hydralazine) et de la caféine [Evans et coll. 1960].

Cette sélectivité de substrats, liée à la structure des protéines de la NAT1 et de la NAT2, a été utilisée comme outil expérimental efficace pour la caractérisation cinétique de protéines recombinantes des NATs de types sauvage et mutant et de dresser des modèles de profils de mutation de chacune de ces enzymes [Dupret et coll. 1994, Goodfellow et coll. 2000, Rodriguez-Lima et Dupret 2002].

La NAT2 est sujette à un polymorphisme génétique. En effet, la NAT2 présente une expression bimodale ou trimodale fonction de la vitesse de dégradation des substances qui lui sont soumises, avec l'existence d'acétylateurs lents, rapides ou intermédiaires [Evans 1989, Meyer coll. 1990, Blum et coll. 1991].

Chez les individus de type acétyleur rapide, la NAT2 est exprimée dans le foie en quantité supérieure à celle de la NAT1 (12 fois environ), alors que le rapport des deux activités serait en faveur de NAT1 dans le cytosol colo-rectal et l'uroépithélium. Chez les acétyleurs lents, les contenus hépatiques en enzymes NAT1 et NAT2 seraient par contre comparables (activité NAT2 jusqu'à deux fois plus forte seulement) [Hein et coll. 1993]. Le phénotype acétyleur lent est dû à un taux hépatique diminué en enzyme NAT2 fonctionnellement active, atteignant un niveau résiduel.

Les études ont montré que le tissu hépatique avait toujours les mêmes taux d'ARNm que pour l'allèle de référence. Le phénotype acétyleur lent a dès lors été attribué à des défauts d'ordre traductionnel (efficacité de traduction diminuée) ou post traductionnel (dégradation accélérée de la protéine) [Blum et coll. 1990 et 1991].

La première structure tridimensionnelle d'une *N*-Acétyltransférase a été publiée en 2000 par Sinclair et collaborateurs, suivis de Sandy et coll. en 2002 et de Westwood et coll. en 2005. En dépit du fait que les *N*-acétyltransférases, sont d'origine bactérienne, elles ont fourni de nouvelles informations structurales et fonctionnelles sur l'enzyme humaine. Ces études ont, en effet, montré que chez l'Homme, l'enzyme présente une triade catalytique située au niveau de la partie N-Terminale. Elle est composée de la cystéine 68, de l'histidine et de l'aspartate (Cys-His-Asp). Des analyses structurales ont permis de distinguer trois domaines au niveau de la protéine NAT [Butcher et coll. 2002, Walraven et coll. 2008] (Figure 7).



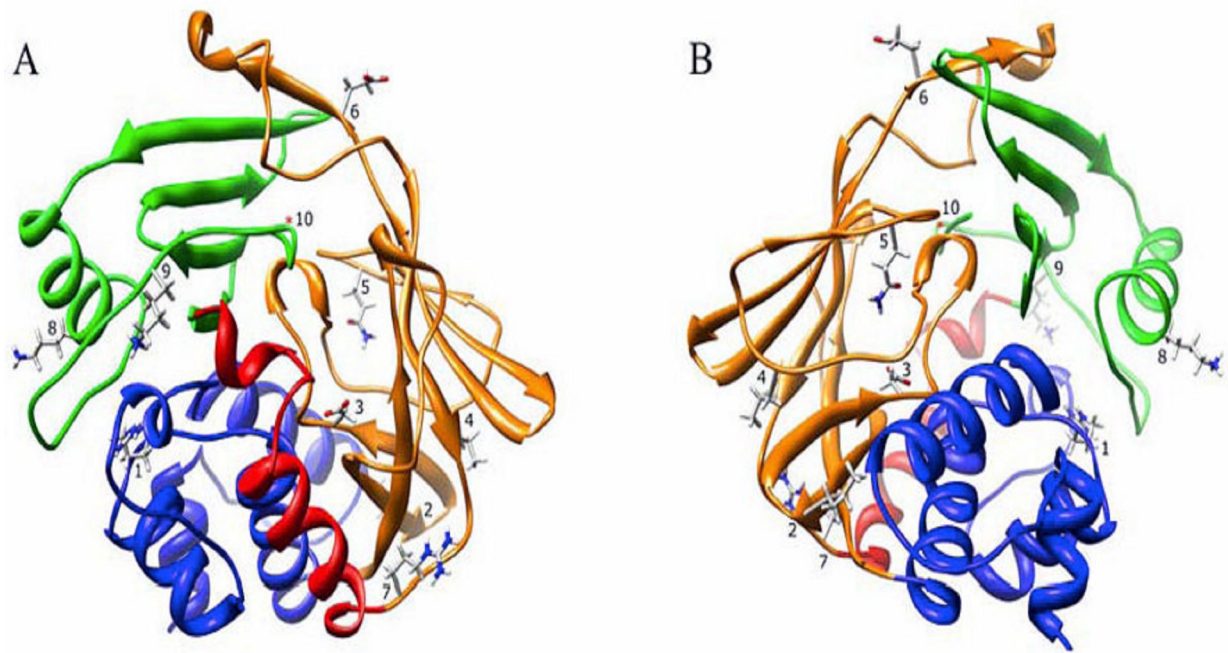
\* Le premier domaine s'étend du premier acide aminé jusqu'à l'acide aminé 90. Il forme une partie de la crevasse ou de la fente composée par la triade catalytique et constitue le lieu où la cystéine 68 va se combiner aux substrats. Ce domaine est le plus conservé entre les espèces.

\* Le deuxième domaine s'étend de l'acide aminé 90 jusqu'à l'acide aminé 210. Il forme l'autre partie de la crevasse et se présente essentiellement sous forme de bâtonnet  $\beta$ . Cette zone présente des particularités selon qu'il s'agisse de l'enzyme NAT1 ou NAT2, puisqu'au niveau de la position 93 et 125 les acides aminés sont différents, ce qui permet à l'enzyme NAT2 d'établir plusieurs liaisons interactives (F93 et S125 pour NAT2 et V93 et F125 pour NAT1).

\*le dernier domaine intéresse particulièrement le groupement carboxyle. Il est formé d'une combinaison entre des hélices  $\alpha$  et des bâtonnets  $\beta$ . C'est le domaine le plus diversifié entre les espèces.

La réaction d'acétylation se produit en deux étapes distinctes [Ambrosone et coll. 1998b] :

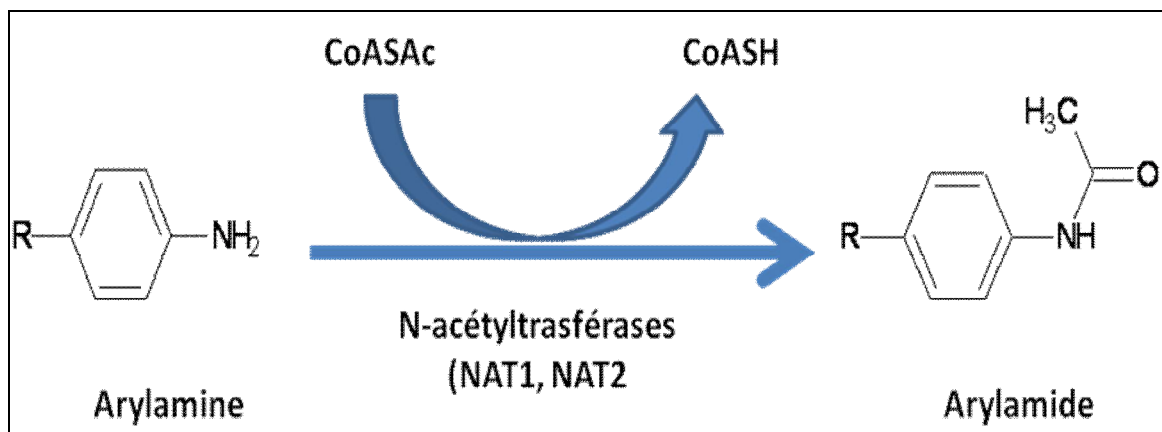
- d'abord, l'acétylcoenzyme A se lie à l'enzyme. Sa moitié est alors transférée sur la cystéine 68 de la protéine, le reste est libéré dans le cytoplasme.
- Durant la seconde étape, il s'établit une liaison entre le substrat et l'enzyme acétylée, la moitié du coenzyme A va donc être transférée au substrat. Après ce transfert, le produit acétylé se détache de l'enzyme.



**Figure 7:** Structure tridimensionnelle de la NAT2 Humaine : diagramme en ruban. La couleur du ruban indique les domaines protéiques de la NAT2 : domaine I (bleu), la région interdomaine (rouge), domaine II (orange), et le domaine III (vert). L'emplacement des résidus R64 (1), I114 (2), D122 (3), L137 (4), Q145 (5), E167 (6), R197 (7), K268 (8), K282 (9), et G286 (10) sont affichées et correspondent aux amino-acides des différents allèles. Deux orientations sont représentés, un sur le site d'entrée de substrat dans le site actif (A) et l'autre sur la face arrière de la structure (B) [D'après Walraven et coll. 2008].

### 1.3. Principales fonctions des N-Acétyltransférases

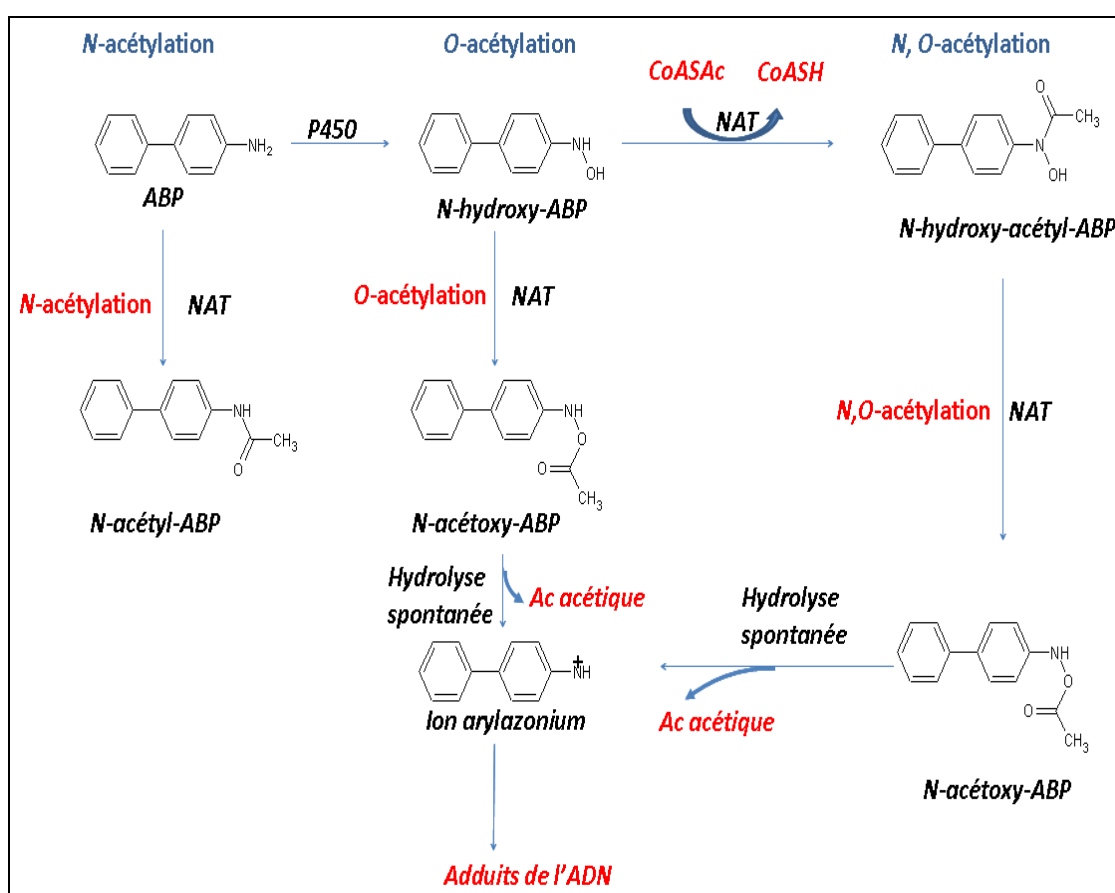
Les *N*-acétyltransférases (NATs) constituent une famille d'enzymes, qui comme leur nom l'indique, catalysent le transfert d'un groupement acétyle issu de l'acétylcoenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire ( $-NH_2$ ) ou hydrazine ( $-NH-NH_2$ ) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse (Figures 8). Le produit formé est une arylamide. [Rustan et coll. 2006, Grant 1993].



**Figure 8** : Réaction de *N*-acétylation des xénobiotiques par les NAT. *Les arylamines pouvant être des médicaments tels que la caféine, la dapsonne, l'isoniazide ou la sulfaméthoxazole ou des polluants tels que le 4-aminobiphényle, le  $\beta$ -naphthylamine, les amines hétérocycliques ou la benzidine, la 3,4-dichloroaniline [d'après Grant 1993].*

En plus des réactions de *N*-acétylation, les NATs peuvent catalyser la *O*-acétylation de substrats aromatiques *N*-hydroxylés, ainsi que la *N*-, *O*-transacétylation intramoléculaire de composés *N*-hydroxylés et *N*-acétylés.

La *N*-acétylation est considérée de façon générale comme exerçant une détoxication relative des arylamines puisque cette réaction les rend en effet moins actives, alors que la *O*-acétylation serait plutôt activatrice (Figure 9).



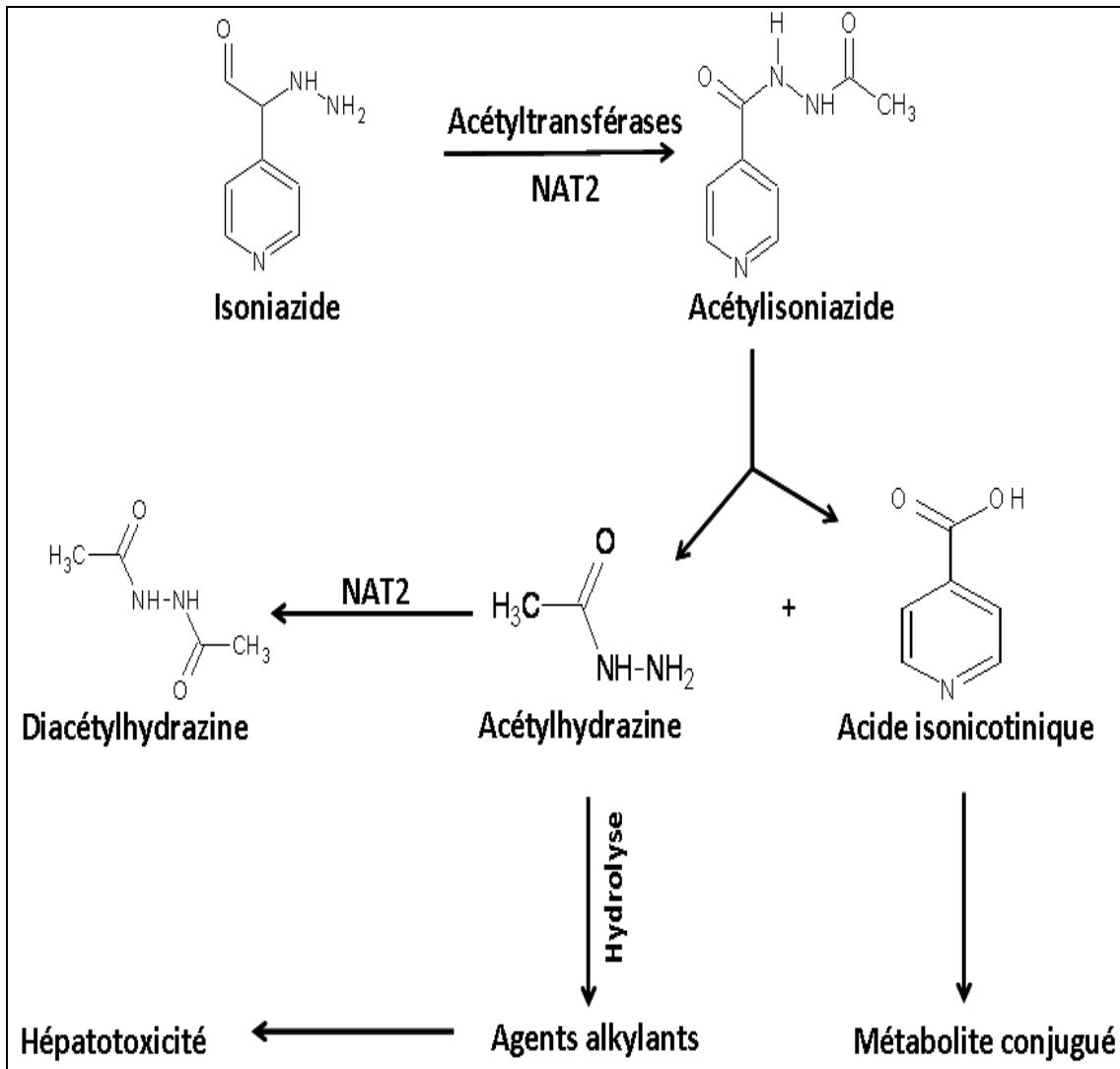
**Figure 9 :** Activation et inactivation des arylamines par *N*-acétylation, *O*-acétylation, et *N*-, *O*-acétylation catalysées par la NAT2. Ces réactions sont représentées pour la cancérigène arylamine 4-aminobiphényle (ABP), conduisant finalement à la formation d'électrophiles hautement réactifs qui se lient à l'ADN et pouvant conduire à des phénomènes de mutagénèse et de cancérigénèse. [D'après Hein et coll. 1992]

Cependant, les *N*-acétyltransférases agissent aussi sur d'autres substrats représentés par des médicaments de type isoniazide, dapsonne, sulfamides..., mais aussi des polluants présents dans l'environnement et dans l'alimentation. Les substrats endogènes des NATs sont encore mal connus. Chez l'homme, ces molécules peuvent être métabolisées de façon sélective par la NAT1 ou la NAT2.

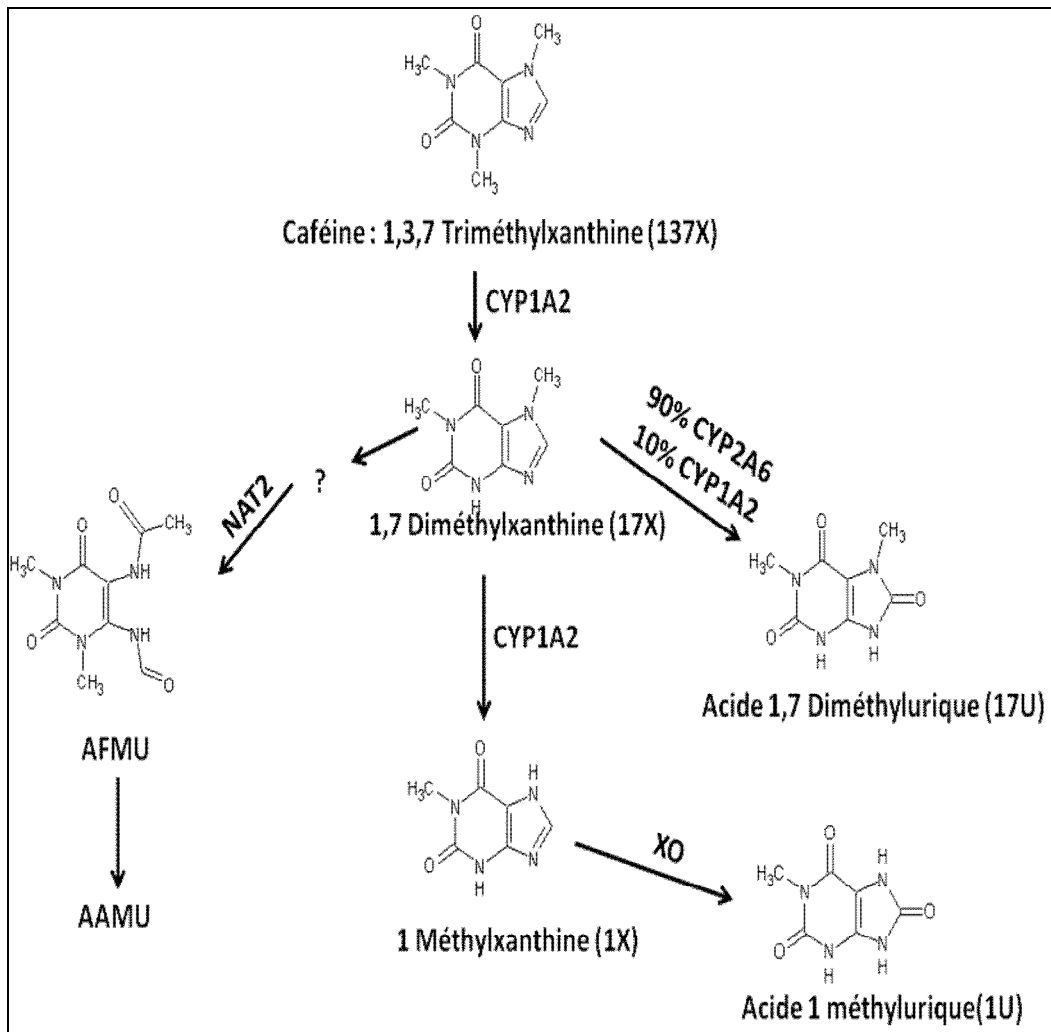
Dans tous les cas, la métabolisation des amines aromatiques et des carcinogènes hétérocycliques par les NATs correspond à une activation ou une détoxification de ces xénobiotiques.

Ainsi, la NAT2 catalyse la biodégradation de l'isoniazide pour donner naissance à la *N*-acétylisoniazide (AcINH) qui, à son tour va se métaboliser en acide nicotinique et acétylhydrazine. Ce dernier produit va à son tour subir une série d'acétylations pour entraîner la formation de métabolites réactifs, toxiques pour les cellules hépatiques avec fixation sur les protéines pour donner des adduits aux protéines et des phénomènes d'hépatotoxicité (Figure 10).

De même, la caféine est dégradée par la NAT2 pour donner principalement le 5-acétamino-6-formylamino-3-méthyluracil (AFMU), principal métabolite de la caféine utilisé dans le phénotypage de la NAT2 (Figure 11).



**Figure 10** : Les différentes voies de métabolisation de l'isoniazide chez l'Homme. [D'après Sotsuka et coll. 2011].



**Figure 11** : Schéma des voies majeures de biotransformation de la caféine (D'après Nyéki et coll. 2001]. *Métabolite* : **AFMU** = 5-acétamino-6-formylamino-3-méthyluracil ; **AAMU** = 5-acétamino-6-amino-3-méthyluracil. *Enzymes* : **NAT2** = N-acétyltransférase 2 ; **CYP** = Cytochrome P450 ; **XO** = Xanthine oxydase.

#### 1.4. Déterminisme génétique de la N-Acétyltransférases de type 2 (NAT2)

On emploie le terme « polymorphisme » à partir du moment où une mutation ou une variation génétique présente une fréquence de plus de 1 % dans la population. Sur les trois milliards de bases du génome humain, 99,9 % sont identiques d'un individu à l'autre. Le reste (0,1%) représente les variations ou polymorphismes, pourcentage infime, mais de trois millions de nucléotides, qui sont à la base des différences entre les individus. Rappelons que les polymorphismes résultent de trois types de variations de la séquence d'ADN [Nebert et Bingham 2001]:

- des « polymorphismes simples de nucléotides (SNPs) » ou polymorphismes touchant un seul nucléotide, qui correspondent à des substitutions de nucléotides.

- des insertions ou des délétions de bases, qui peuvent impliquer une seule base ou des centaines ou des milliers de nucléotides.

- des délétions d'ADN répétitif (tandem repeats, minisatellites, microsatellites, *Alu* segments qui sont des répétitions de séquences de paires, de triplets ou de quadriplets de nucléotides et qui s'enchaînent, répétées à l'identique).

Les récentes avancées acquises dans la connaissance de la génétique des NATs ont permis d'élucider certaines des bases moléculaires des différences phénotypiques de la *N*-acétylation observées chez l'homme. Il est maintenant bien connu que les gènes codant pour les NAT1 et NAT2 sont polymorphes et que ce polymorphisme génétique des NATs est bien identifié chez l'homme, le hamster, le lapin et la souris [Hein 1988, Grant et coll. 1992, Vatsis et coll. 1995, Roemer et coll. 2008, Weistenhofer et coll. 2008].

Les bases moléculaires du polymorphisme d'acétylation de la NAT2 sont devenues évidentes seulement après le clonage des gènes humains NATs et l'introduction des méthodes de génotypage telles que la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction PCR-RFLP [Hickman and Sim 1991, Bell et coll. 1993, Lin et coll. 1993, Cascorbi et coll. 1995, Doll et coll. 1995], la technique du polymorphisme de conformation des simples brins générée par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR-SSCP [Lo-Guidice et coll. 2000], les essais de ligature des oligonucléotides [Bigler et coll. 1997], l'analyse des hétéroduplexes en temps réel basée sur la capillarité [Wikman et coll. 2001], ou le test de génotypage par TAqMan de Applied Biosystems [Doll et Hein 2001, 2002].



Treize substitutions nucléotidiques ou SNP ponctuelles ont été identifiées dans la séquence codante du gène humain *NAT2* dans différentes populations (c.191G>A, c.341T>C, c.590G>A, c.857G>A, c.803A>G, c.282C>T, c.481C>T, c.345C>T, c.403C>G, c.434A>C, c.481C>T, c.638G>A, c.838G>A). D'autres SNP ont été retrouvés mais à des fréquences faibles selon les groupes ethniques. Selon le consensus sur la nomenclature du gène *NAT2* humain, les variants alléliques sont caractérisés par la combinaison d'un ou de quatre SNP présents dans le même allèle. Ainsi, 36 variants alléliques du gène *NAT2* existent selon la base de données sur la nomenclature des NATs. Parmi ceux-ci, la *NAT2\*4* est considérée comme l'allèle sauvage, responsable du phénotype acétyleur rapide. (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>).

Les premières études de génotypage ont permis de mettre en évidence la présence des substitutions nucléotidiques c. 481C>T, c.590 G>A, c.857G>A et c.191G>A. Ces SNP sont appelés M1, M2, M3 et M4 respectivement et codent tous pour un phénotype d'acétylation lente.

Les allèles *NAT2\*11A*, *\*12A*, *\*12B*, *\*12C* et *\*13*, sont considérés comme des allèles codant pour un phénotype rapide, car ils portent des mutations silencieuses (pas de changement de la séquence de la protéine) ou ils conduisent à des changements non conservatifs d'acides aminés sans impact sur l'activité de la protéine (par exemple, la Lys<sup>268</sup> substituée en Arg. dans la protéine *NAT2\*12*) [Lin et coll. 1993, Hein et coll. 1994, Cascorbi et coll. 1996]. Les allèles *NAT2\*10*, *\*11B*, *\*12D*, *\*17*, *\*18* et *\*19* sont porteurs de mutations faux-sens avec un changement d'acides aminés ayant pour conséquence une diminution de l'activité enzymatique. Ainsi, ils sont classés allèles « lents » [Lin et coll. 1994, Doll et coll. 1995, Shishikura et coll. 2000]. Des études ont aussi démontré que les 24 autres allèles de *NAT2* codent pour des enzymes instables, d'activité réduite et par conséquent, sont considérés comme des phénotypes acétyleurs lents [Ferguson et coll. 1994, Hein et coll. 1994, Hickman et coll. 1995, Leff et coll. 1999, Fretland et coll. 2001].

Il est intéressant de souligner que l'ensemble des allèles de la *NAT2* connus sont issus de la combinaison d'une vingtaine de SNP seulement, situés aux positions 111, 190, 191, 282, 341, 345, 364, 403, 411, 434, 481, 499, 590, 638, 759, 803, 838, 845, 857 et 859 de la région codante de la *NAT2*. Parmi ces allèles, treize sont considérés comme majeurs, c'est-à-dire rencontrés à des fréquences significatives dans plusieurs populations [Vatsis et coll. 1997] (Tableau VI).

Divers groupes alléliques sont désignés en fonction de la présence d'un SNP spécifique sur un de ses sites de fixation. Par exemple, le SNP aux positions 191 (Arg<sup>64</sup>Gln), 341 (Ile<sup>114</sup>Thr) et 590 (Arg<sup>197</sup>Gln) sont caractéristiques des groupes alléliques de la *NAT2\*14*, *\*5* et *\*6* respectivement, selon la base de données de la nomenclature de NAT.

Le gène *NAT2* présente ainsi plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques. Parmi ces différents allèles, certains sont associés à une activité normale de l'enzyme définissant, sur le plan phénotypique, les individus acétyleurs rapides ; d'autres sont associés à une activité diminuée, définissant ainsi les acétyleurs lents qui sont alors soit homozygotes, soit double hétérozygotes pour un des allèles variants. Ces allèles sont *NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7* et *NAT2\*14* [Grant et coll. 1997, Vatsis et coll. 1997]. Leurs proportions connaissent d'importantes variations selon l'origine ethnique. C'est ainsi que les populations caucasiennes comptent en moyenne des proportions équivalentes d'acétyleurs rapides et d'acétyleurs lents [Lin et coll. 1994]. Les populations nord-africaines comptent parmi les plus riches en acétyleurs lents, avec environ 90 % dans la population générale maghrébine [Hamdy et coll. 2003, Furet et coll. 2002, Dandara et coll. 2003]. La fréquence de distribution de chaque allèle est également différente selon la localisation géographique ; les allèles *NAT2\*5* et *NAT2\*6* comptent parmi les plus fréquents dans le monde, l'allèle *NAT2\*7* semble spécifique de la population asiatique et l'allèle *NAT2\*14* de la population africaine avec un gradient Est-Ouest (19 % en Guinée-Bissau, 3 % au Soudan et l'absence totale de cet allèle en Somalie) [Garte et coll. 2001, Lin et coll. 1994, Covaco et coll. 2003].

**Tableau VI** : Principaux allèles du gène *NAT2* humain [Vatsis et coll. 1997]

Polymorphisme	Position nucléotidique polymorphe (SNP)									Acides aminés changés	Activité enzymatique
	191	282	341	434	481	590	803	845	857		
<i>NAT2*4</i>	G	C	T	A	C	G	A	A	G		Accélérée
<i>NAT2*5A</i>			C		T					Ile <sup>114</sup> Thr	Diminuée
<i>NAT2*5B</i>			C		T		G				Diminuée
<i>NAT2*5C</i>			C				G				Diminuée
<i>NAT2*6A</i>		T				A				Arg <sup>197</sup> Gln	Diminuée
<i>NAT2*6B</i>						A					Diminuée
<i>NAT2*6C</i>		T				A	G				Diminuée
<i>NAT2*7A</i>								A		Lys <sup>268</sup> Arg	Diminuée
<i>NAT2*7B</i>		T						A			Diminuée
<i>NAT2*12A</i>							G			Lys <sup>268</sup> Arg	Accélérée
<i>NAT2*12B</i>		T					G				Accélérée
<i>NAT2*13</i>		T									Accélérée
<i>NAT2*14A</i>	A									Arg <sup>64</sup> Gln	Diminuée
<i>NAT2*14B</i>	A	T									Diminuée
<i>NAT2*17</i>				C						Gln <sup>145</sup> Pro	Inconnue
<i>NAT2*18</i>								C		Lys <sup>282</sup> Thr	Inconnue

## 1.5. Méthodes de détermination du polymorphisme génétique de la NAT2

Le polymorphisme génétique le plus courant de la NAT2 est le «polymorphisme simple de nucléotide ou SNP». Certains polymorphismes n'auront aucun effet, tandis que d'autres affecteront l'expression et la fonction de la protéine, ayant pour conséquence des phénotypes liés à des maladies et à une réponse aux traitements.

Deux approches méthodologiques sont utilisées pour déterminer le polymorphisme génétique de la NAT2 :

- les méthodes de phénotypage ou l'étude de l'activité enzymatique de la NAT2 par utilisation d'un substrat et étude du rapport des métabolites majeurs par CLHP,
- les méthodes de génotypage par la recherche des mutations du gène *NAT2* par des techniques de PCR.

### 1.5.1. Le phénotypage

Le phénotypage est principalement applicable dans le domaine des polymorphismes affectant la biodisponibilité des médicaments, et en particulier leur métabolisme.

La détermination phénotypique *in vivo* du polymorphisme génétique de la NAT2 consiste à quantifier les métabolites plasmatiques ou urinaires produits après l'administration d'une sonde métabolique.

Le phénotypage de la NAT2 a été longuement réalisé avec l'utilisation de médicaments comme la dapsonne et la sulfaméthazine. Ces composés-tests ont ensuite été exclus à cause des effets indésirables liés à leur consommation. L'introduction de la caféine comme substrat test a ensuite considérablement facilité la procédure de phénotypage [Grant et coll. 1984]. Cette méthode utilise le calcul du rapport urinaire des principaux métabolites de la caféine qui sont l'acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU) et la 1-méthylxanthine (1X).

Actuellement, la caféine est le substrat le plus communément utilisé comme sonde métabolique pour la détermination du statut d'acétylation. Elle est exempte de toxicité sur une large gamme de doses et permet de déterminer facilement, avec précision, et en toute sécurité le phénotype d'individus sains et malades [Fernandes et coll. 1998, Cnatingius et coll. 2000, Signorello et coll. 2001].

Le test consiste à faire ingérer au sujet 200 à 300 mg de caféine sous forme purifiée ou alimentaire (café, thé ou boisson à base de cola). Les urines sont collectées pendant les 24 heures (test classique) ou les 2 à 6 heures (test simplifié) suivant l'ingestion. Les métabolites de la caféine sont quantifiés à partir d'aliquotes de 200 µL d'urine par HPLC avec détecteur à barette de diodes.

Le phénotype d'acétylation est mis en évidence par la détermination de la vitesse de formation des métabolites conjugués éliminés dans les urines. La valeur du rapport métabolique des métabolites permet de classer les individus en métaboliseurs rapides ou lents par comparaison à une valeur d'antimode de distribution déterminée au préalable (de façon statistique) sur une grande population d'individus.

Ce test est préférentiellement utilisé pour la détermination phénotypique de *NAT2*, alors que l'acide amino-salicylique est le plus utilisé pour la détermination du phénotype de *NAT1*, avec le même principe.

Cependant, les méthodes de phénotypage présentent certains inconvénients (absence d'un substrat-test présentant toutes les qualités requises telles que la spécificité, l'innocuité ou les contre-indications) qui limitent leur utilisation. Le problème du phénotypage est qu'il est soumis aux facteurs de variation ayant un effet sur l'expression du génome et en particulier les facteurs environnementaux [Lefebvre et coll. 2002].

En pratique, le génotypage est plus largement utilisé que le phénotypage puisqu'il est applicable à l'analyse de l'ensemble des polymorphismes affectant non seulement la pharmacocinétique des médicaments, mais également leurs effets (récepteurs, cibles protéiques). Des études de corrélation phénotype/génotype, complétées parfois par la caractérisation fonctionnelle *in vitro* des variants, sont un préalable nécessaire à l'utilisation de ces tests.

### **1.5.2. Le génotypage**

Le génotypage consiste à déterminer, à partir d'un échantillon d'ADN, les nucléotides ou groupe de nucléotides qu'un animal possède à un emplacement précis de ses chromosomes où l'on sait qu'il existe une variation génétique. Chez les mammifères, chaque individu possède deux exemplaires de chaque chromosome (un paternel et l'autre maternel). Pour un

SNP, on dira donc qu'un animal a le génotype AG s'il possède les nucléotides A sur un chromosome et G sur l'autre. Un autre animal pourrait avoir le génotype CG, par exemple.

Les méthodes de génotypage reposent sur l'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire, la technique de PCR ou réaction de polymérisation en chaîne étant généralement à la base des méthodes utilisées en routine. Ces méthodes nécessitent le recueil préalable, par des techniques peu ou non invasives, d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique de l'individu (plus rarement l'ARN). La stratégie de génotypage appliquée est fonction d'un certain nombre de paramètres, en particulier la nature des mutations à identifier (mutations ponctuelles, délétion ou amplification du gène) et le nombre de mutations à identifier pour obtenir un taux d'efficacité de prédiction du phénotype le plus élevé possible (fonction de la fréquence des polymorphismes dans la population étudiée). La stratégie adoptée tient également compte du contexte clinique dans lequel le test est prescrit, à savoir dans un cadre purement préventif, avant l'introduction d'un traitement médicamenteux chez les patients à risque (phénotype non connu *a priori*) ou dans un cadre diagnostique pour expliquer un accident iatrogène ou une absence de réponse à un médicament donné (suspicion d'un phénotype déficitaire ou ultrarapide par exemple) [Allorge et Lorient 2004].

Enfin, comme nous l'avons mentionné précédemment, il convient d'adapter la stratégie de génotypage en fonction de l'origine ethnique ou géographique des individus, des variations interethniques dans la nature et de la fréquence de nombreux polymorphismes génétiques ayant été décrits [Gaedigk 2000].

La stratégie de génotypage du *NAT2* a permis d'identifier actuellement 36 variants alléliques du gène *NAT2* humain (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>). La présence des mutations de la *NAT2* (essentiellement des SNP) est recherchée à l'aide de tests simples de type PCR-RFLP ou PCR-digestion enzymatique (quand la mutation crée ou abolit un site de restriction), ou Allèle Spécifique-PCR (basée sur l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques complémentaires de la séquence normale ou de la séquence mutée).

La recherche des mutations sur le gène complet du gène *NAT2* peut se faire par PCR-séquençage qui permet de rechercher toutes les mutations sur le gène complet et d'identifier de rares ou de nouvelles mutations le cas échéant.

La prédiction du phénotype par génotypage présente l'avantage majeur de n'être pas soumise à l'influence de facteurs confondants (co-administration de médicaments, pathologies associées). Cependant, elle souffre encore de la nécessité d'appliquer un grand nombre de tests, au vu du nombre parfois élevé de mutations à détecter. L'espoir dans ce domaine repose sur le développement de nouvelles technologies de type de CLHP (CLHP en condition dénaturante), ou la discrimination allélique par PCR en temps réel (TaqMan® ou Lightcycler®), ou encore les puces à ADN ou biopuces qui, par la miniaturisation et l'automatisation des méthodes d'hybridation, permettront des tests de génotypage à « haut débit » et à « grande échelle » de l'ensemble des gènes impliqués dans les variations de réponse aux médicaments [Shi 2001].

### **1.6. Association du polymorphisme génétique de la NAT2 avec des pathologies**

Les gènes *NATs* et leurs polymorphismes ont suscité l'intérêt non seulement des pharmacologues, mais aussi d'épidémiologistes, de procéder à des investigations sur les facteurs étiologiques de maladies humaines complexes. Il est bien reconnu aujourd'hui que la susceptibilité individuelle à la maladie auto-immune, aux maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et en particulier malignes, est déterminée par divers facteurs génétiques et environnementaux. L'influence de l'environnement est principalement exercée par l'exposition à des polluants, des produits chimiques industriels ou à des éléments nuisibles de l'alimentation [Sim et coll. 1995, Mohrenweiser 2004]. Comme les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, les NATs catalysent les réactions métaboliques concurrentes, menant soit à la détoxification soit à la bioactivation de composés potentiellement nocifs qui entrent en contact avec le corps humain. C'est ainsi que, les liens possibles entre le polymorphisme du gène *NAT2* et la prédisposition à certaines maladies dont on soupçonne les composantes environnementales ont été largement étudiés.

Le rôle des NATs dans la carcinogenèse chimique a été discuté au cours des dernières années par Hein et ses collaborateurs [Hein et coll. 2000, Hein 2002].

Ensuite, plusieurs études ont exploré l'impact des différences génétiques des NATs sur les risques de survenue de divers cancers, de la vessie [Sartorelli et coll. 1998, Hein 2006, Pandey et coll. 2007, Weistenhofer et coll. 2008], du colorectum [Borlak et Reamon-Buettner 2006a, Lilla et coll. 2006, Roemer et coll. 2008, Huang et coll. 2009, Slattery et coll. 2009], d'autres sites gastro-intestinaux [Jain et coll. 2007], du sein [Sillanpaa et coll. 2005], de la tête

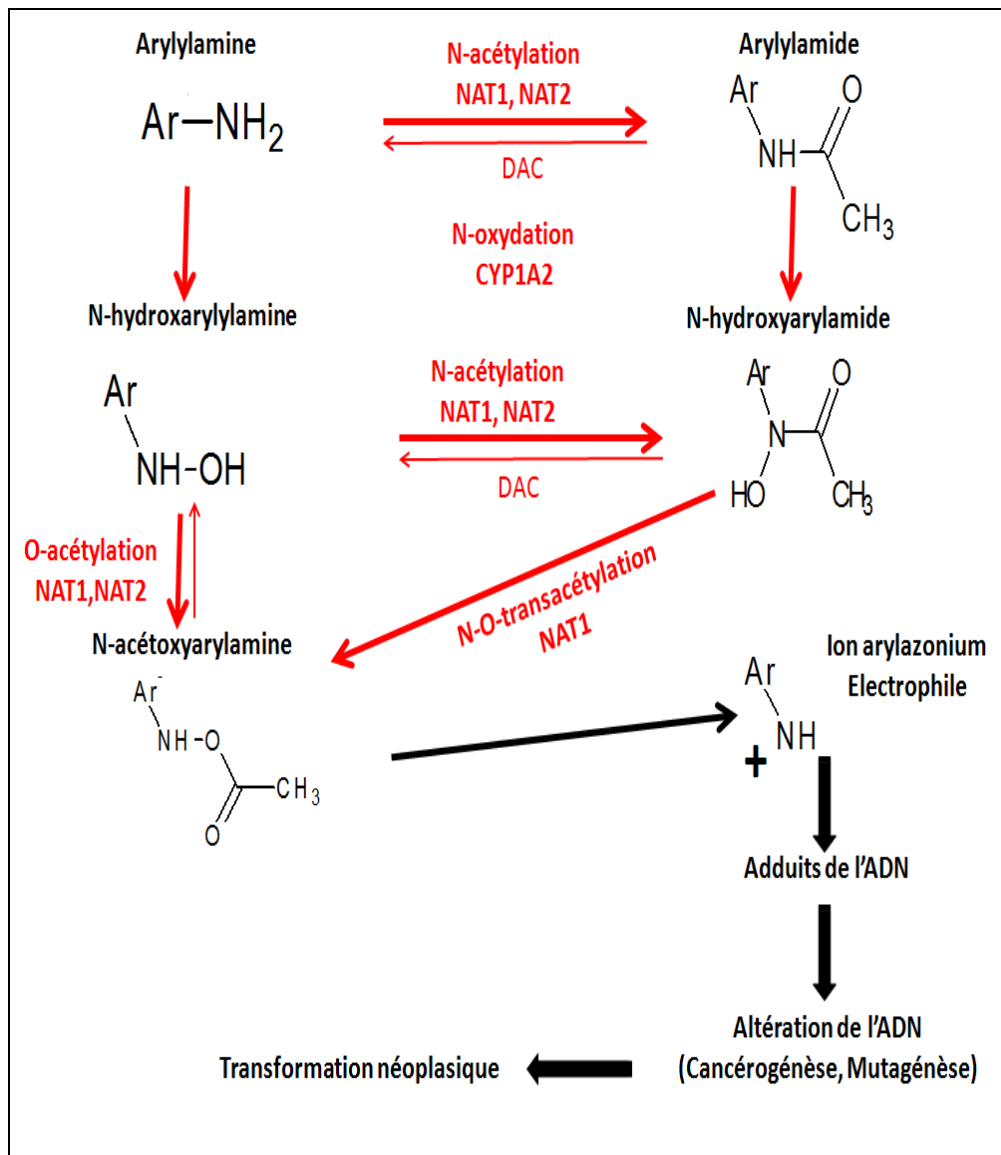
et du cou [Van Eyken et coll. 2007, Hernandez et coll. 2008], des poumons [Bouchardy et coll. 1998, Nikishina et coll. 2007], des ovaires [Delort et coll. 2008], mais aussi du lymphome, et d'autres états pathologiques tels que la maladie de Crohn, l'endométriose, les malformations congénitales, les maladies de Parkinson et le lupus [Boukouvala et Fakis 2005, Machida et coll. 2005, Carmichael et coll. 2006, Jensen et coll. 2006, Morton et coll. 2006, Fakis et coll. 2007 ]. La majorité des éléments de preuve des différences dans les risques dus au génotype *NAT2* est tirée d'études réalisées chez des sujets exposés à la fumée de cigarette, aux arylamines (2-naphtylamine et 4-aminobiphényle), ou chez des travailleurs exposés en milieu professionnel aux contaminants industriels comme la benzidine ou par l'intermédiaire des produits alimentaires (les amines hétérocycliques des viandes telles que le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4,5- $\beta$ ] pyridine ou PhIP). Bien que le rôle de la *NAT2*, notamment dans l'étiologie du cancer, puisse paraître relativement bien défini, dans certains cas (par exemple, le phénotype lent de la *NAT2* et le cancer de la vessie), dans d'autres cas, les données sont contradictoires. Ce n'est pas inattendu, étant donné qu'il existe, de nombreux facteurs en dehors du polymorphisme de la *NAT2*, également susceptibles de jouer un rôle dans la modulation du risque de cancer : (1) la variabilité dans d'autres systèmes enzymatiques pertinents tels que le *CYP1A2*, (2) le type et la durée de l'exposition, (3) des facteurs de susceptibilité toxicodynamique, (4) l'état clinique du malade, (5) la prise de médicaments, et (6) l'alimentation et les conditions de vie [Grant et coll. 1997].

L'influence du polymorphisme des NATs a été étudiée dans divers types de cancers. Le métabolisme de certains substrats communs aux *N*-acétyltransférases et au cytochrome P450 peut aboutir à la formation d'ions dits arylazoniums réactifs par perte spontanée d'un ion acétate. Ces ions se lient de façon préférentielle au niveau du résidu carboné 8 de la guanine. L'adduit par sa masse, ne peut se glisser dans l'hélice d'ADN, et va donc entraîner une distorsion dans la structure hélicoïdale, perturbant gravement la transcription avec formation d'adduits covalents de l'ADN. La liaison de ces ions à l'ADN est considérée comme une source potentielle de mutations et de par là même accroît la probabilité de cancérisation. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les *N*-Acétyltransférases 2 sont capables de participer à la formation de ces ions [Guengerich 1992]. Les précurseurs ainsi activés sont des amines cycliques et hétérocycliques provenant de sources environnementales telles que la fumée de cigarette, certains résidus de cuisson des aliments, ou encore des polluants industriels.



Les principales voies métaboliques conduisant à la formation de ces molécules réactives mettent en jeu, d'une part, des réactions de *N*-oxydation catalysées par les mono-oxygénases à cytochrome P-450 (en particulier les isoformes CYP1A1 et CYP1A2), et d'autre part, des réactions de *N*- et *O*-acétylation et de *N*-, *O*-transacétylation, potentiellement catalysées par les NAT2 et/ou les NAT1. La combinaison de ces activités enzymatiques peut induire l'apparition de composés acétoxyarylamine instables, à l'origine des ions arylazonium (Figure 12). D'autres activités enzymatiques pourraient également intervenir, en particulier de type cyclo-oxygénase, glucuronyltransférase et sulfotransférase. Par conséquent, toute variation dans l'activité de ces enzymes pourra potentiellement avoir des répercussions significatives sur le devenir des xénobiotiques qui auront pu pénétrer dans l'organisme [Grant 1993].

Au total, par la production de dérivés acétylés, les enzymes NAT1 et NAT2 doivent être considérées comme participant globalement à la détoxification de certains xénobiotiques, mais leur potentiel activateur peut aussi constituer, au moins localement au sein de certains tissus, une source d'apparition de métabolites toxiques. Ceux-ci sont en particulier capables de se fixer à des macromolécules (acides nucléiques, protéines) et d'altérer ainsi certaines fonctions cellulaires (Figure 12).



**Figure 12.** Schéma simplifié des voies métaboliques d'activation des pré-cancérogènes chimiques de type arylamine. [D'après Grant 1993]. Plusieurs voies enzymatiques peuvent s'associer pour produire des métabolites réactifs à partir de précancérogènes. La N-acétylation exercerait une détoxification relative des arylamines précancérogènes, en les rendant thermodynamiquement moins accessibles à l'oxydation. En revanche, la O-acétylation serait plutôt activatrice, de même que la N-hydroxylation catalysée par des mono-oxygénases à cytochrome P-450 (dont le CYP1A2). Les réactions de N- et O-acétylation et de N, O-transacétylation seraient catalysées plus ou moins sélectivement par NAT1 et NAT2. Ces cascades réactionnelles conduiraient à un même intermédiaire acétoxyarylamine instable se décomposant spontanément en ions arylazonium hautement électrophiles. Des réactions catalysées par des désacétylases (DAC) microsomiales ainsi que des activités cyclooxygénase, glucuronyltransférases et sulfotransférases (non représentées ici) pourraient moduler la quantité d'adduits formés et donc la probabilité de cancérisation. L'ensemble des activités enzymatiques de ce schéma n'est pas exprimé dans tous les tissus. Ainsi, la N-oxydation est essentiellement hépatique, tandis que NAT2 est principalement produite au niveau du foie et du côlon, et que NAT1 semble l'être au niveau de nombreux tissus, de même que l'activité DAC.

### 1.6.1. NAT2 et cancer de la vessie

L'implication du polymorphisme de la NAT2 dans la carcinogenèse de la vessie a été très étudiée, depuis que les arylamines ont été reconnues comme des composés responsables de la forte incidence de cancer de la vessie chez les travailleurs de l'industrie des colorants [Weisburger 1997]. Dans les années 1980, plusieurs investigations [Cartwright et coll. 1982, Risch et coll. 1995, Golka et coll. 2002] ont démontré que le phénotype acétyleur lent de la NAT2 est plus fréquent chez les patients caucasiens atteints de cancer de la vessie exposés professionnellement et de façon permanente à des arylamines tels que les travailleurs des industries du caoutchouc, du textile, ou de la chimie. Il existe un risque accru de cancer de la vessie, et le risque était plus grand chez les acétyleurs lents [Vineis et coll. 2001]. Ce risque n'est pas élevé chez les professionnels non exposés potentiellement aux arylamines, indépendamment du statut de l'acétyleur.

Des études basées sur le génotypage NAT2, ont également observé une sur-représentation considérable des phénotypes lents de NAT2 chez les patients atteints de cancer de la vessie et exposés à des arylamines soit par leurs occupations professionnelles (exposition chimique aux arylamines) ou par leurs habitudes tabagiques [Filiadis et coll. 1999, Inatomi et coll. 1999, Katoh et coll. 1999, Giannakopoulos et coll. 2002].

Hayes et collaborateurs en 1993, ont mené une étude auprès de travailleurs chinois d'une industrie de benzidine, fortement exposés et ont rapporté un risque égal pour le cancer de la vessie entre les acétyleurs rapides et les acétyleurs lents de la NAT2. La benzidine est une aryldiamine acétylée dans le foie préférentiellement par la NAT2 en N-acétylbenzidine et non en N, N'-diacétylbenzidine [Zenser et coll. 1996] tandis que la di-acétylbenzidine est un composé non toxique, la mono-acétylbenzidine est biologiquement active et peut former des adduits d'ADN dans les cellules urothéliales des sujets acétyleurs lents et rapides avec une efficacité égale [Rothman et coll. 1996]. Cependant, il faut aussi tenir compte des différences entre les fréquences d'allèles NAT2 acétyleurs lents chez les populations asiatiques et les autres populations (caucasiennes, américaines et africaines).

Diverses facettes de la relation entre le profil d'acétylation de la NAT2, l'histoire du tabagisme professionnel, et le risque de cancer de la vessie ont été examinées dans différentes ethnies [Cartwright et coll. 1982, Hanssen et coll. 1985, Mommsen et Wolf. 1985, Dewan et coll. 1995, Risch et coll. 1995, Brockmüller et coll. 1996, Okkels et coll. 1997, Peluso et coll. 1998, Schnakenberg et coll. 1998, Filiadis et coll. 1999, Inatomi et coll. 1999, Kim et coll.

2000,]. Les arylamines sont des composantes de la fumée de tabac et le tabagisme a longtemps été identifié comme un facteur de risque principal du cancer de la vessie, le cinquième cancer le plus fréquent aux États-Unis [Taylor et coll. 1998].

Un grand nombre d'études s'accordent que le phénotype NAT2 lent est un facteur de risque modéré, mais significatif, pour le cancer de la vessie en cas d'exposition même faible, à la fumée du tabac [Risch et coll. 1995, Brockmüller et coll. 1996, Okkels et coll. 1997, Inatomi et coll. 1999, Hung et coll. 2004, Tsukino et coll. 2004]. A faible dose d'exposition au tabac, l'accumulation d'adduits à l'ADN des arylamines est plus importante dans les cellules de la vessie des acétyleurs lents [Vineis et coll. 1994]. Un certain nombre de méta-analyses ont permis de réévaluer les résultats combinés des études antérieures, et de les confirmer [Green et coll. 2000, Johns et Houlston 2000, Marcus et coll. 2000a et b, Vineis et coll. 2001]. Il a été conclu que, le phénotype/génotype lent de la NAT2 devient un facteur de risque plus important pour le cancer de la vessie même lorsque de faibles doses d'exposition aux arylamines sont impliquées (odds ratio entre 1,5 et 1,75).

En outre, l'association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer de la vessie est plus importante chez les acétyleurs lents [Lu et coll. 2005]. Cette combinaison a conduit à un risque presque triplé du développement du cancer de la vessie chez les alcoolodépendants [Sanderson et coll. 2007].

La variabilité du risque de survenue du cancer de la vessie pourrait être liée aux différences de vitesse de métabolisation des arylamines et des amines hétérocycliques chez les acétyleurs lents et les acétyleurs rapides [Bock 1992, Kadlubar et Badawi 1995]. Chez les acétyleurs lents, il y a plus de métabolites *N*-hydroxy-arylamines formés dans le foie que chez les acétyleurs rapides et ceci suite à la compétition entre la voie de la NAT2 et celle des enzymes du cytochrome P450 (Figure 12). Ces *N*-hydroxyarylamines vont ensuite être transportées vers la vessie, soit sous forme glucurono-conjuguée, soit sous forme libre. Dans la vessie, ils pourraient ainsi former des ions arylazonium (ions aryl-nitreniums) et provoquer la formation d'adduits à l'ADN. Les allèles lents NAT2 \*5, \*6, \*7 et \*14 sont les allèles les plus retrouvés chez les patients à cancer de la vessie et à profil d'acétyleurs lents [Marcus et coll. 2000a].

Néanmoins, une absence de cohérence dans les résultats épidémiologiques a été observée dans les études individuelles. [Marcus et coll. 2000a, 2000b]. Des rapports

contradictoires dans la littérature, suggèrent l'absence d'association entre le génotype NAT2 et le cancer de la vessie [Schnakenberg et coll. 1998, Taylor et coll. 1998, Hsieh et coll. 1999, Kontani et coll. 2001]. Plusieurs facteurs ont été avancés pour expliquer ces incohérences, y compris les différences entre les techniques de génotypage ou de phénotypage utilisées, la classification des fumeurs ou le statut professionnel, et la puissance statistique limitée [Ilett et coll. 1999, Marcus et coll. 2000a et 2000b].

### **1.6.2. NAT2 et cancer colorectal**

Après le cancer de la vessie, le cancer colorectal est la maladie qui a été la plus étudiée en relation avec le polymorphisme génétique de la NAT2. Le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus fréquent dans les pays développés, et les preuves épidémiologiques confirment que la survenue de ces cancers colorectaux est aussi liée, au tabagisme, à l'exposition à des contaminants de l'environnement et à l'alimentation [Brockton et coll. 2000, Katoh et coll. 2000]. Par exemple, des chercheurs ont fait la corrélation entre des taux plus élevés de cancer colorectal et le phénotype rapide de la NAT2 en cas de consommation régulière et répétée de viande rouge cuite à très forte température comme lors de la cuisson au barbecue. Dans ces conditions, la cuisson va entraîner la formation d'arylamines à fort pouvoir cancérigène, par pyrolyse des acides aminés des protéines. [Brockton et coll. 2000, Hein et coll. 2000, Windmill et coll. 1997].

Mais, ces composés, le plus souvent impliqués dans le risque de cancer du côlon sont des amines hétérocycliques, qui sont relativement de mauvais substrats pour les enzymes NAT2. En effet, si les NAT2 parviennent quand même à *O*-acétyler les amines hétérocycliques au niveau du côlon, ces derniers sont majoritairement *N*-hydroxylés par les enzymes du cytochrome P450 pour donner naissance à des métabolites très réactifs [Vineis et McMichael 1996, Stillwell et coll. 1997].

Les dérivés *N*-hydroxylés pourront ensuite être convertis par les enzymes NAT2 au niveau du côlon en métabolites *O*-acétylés, instables qui se décomposent spontanément en ions nitreniums très réactifs, alkylants puissants, qui forment des adduits à l'ADN pouvant produire des mutations et initier ainsi un processus cancéreux. Par conséquent, les acétyleurs rapides sont à risque plus élevé de cancer du côlon dû à la formation de ces métabolites réactifs. Toutefois, des différences inter-ethniques ont également été démontrées pour ce type de cancer [Probst-Hensch et coll. 1995].

Le rôle du polymorphisme génétique de la NAT2 dans les cancers colorectaux a été étudié avec des modèles animaux. Ces modèles animaux sont particulièrement utiles dans l'exposition aux cancérogènes du moment que l'âge et le régime alimentaire peuvent être soigneusement assortis, et la variabilité génétique des gènes autres que celui de la NAT2 est virtuellement éliminée [Hein et coll. 2000].

Des niveaux plus élevés d'adduits à l'ADN par fixation du PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine) ont été détectés dans le côlon des rats acétyleurs rapides. Ces études confirment donc le rôle d'acétylation de la NAT2 dans la prédisposition génétique au cancer colorectal. Ce qui suggère que les acétyleurs rapides homozygotes exposés à des niveaux élevés d'amines hétérocycliques par la consommation de viande rouge trop cuite ont un risque plus élevé de développer un cancer du colon [Purewal et coll. 2000].

Dans l'ensemble, la preuve d'une association entre le polymorphisme génétique de la NAT2 et le cancer colorectal est équivoque. Les preuves d'une association entre le statut acétyleur rapide et le risque de cancer colorectal proviennent le plus souvent d'études utilisant les méthodes de phénotypage. Alors que les résultats des méthodes de génotypage de la NAT2 ne montrent généralement pas une bonne corrélation [Brocton et coll. 2000]. Néanmoins, des résultats d'études plus récentes, confirment l'association entre le statut acétyleur rapide de la NAT2 et le cancer colorectal avec les deux techniques (génotypage et phénotypage), bien que la preuve soit plus probante avec le phénotypage [He et coll. 2005, Borlak et Reamon-Buettner 2006b, Lilla et coll. 2006, Huang et coll. 2007, Mahid et coll. 2007]. Cette distinction entre le phénotype et le génotype peut s'expliquer par le fait que des facteurs additionnels influencent le phénotype, en plus de la mesure des marqueurs génétiques, y compris d'autres types de variantes, le régime alimentaire, la consommation de médicaments, et le style de vie qui peuvent affecter l'activité de la NAT2.

Le tabagisme est également un facteur de risque du cancer du côlon, mais l'interaction entre la NAT2 et le tabagisme, qui était évidente pour le cancer de la vessie, n'a pas été aussi claire pour le cancer colorectal [Brocton et coll. 2000]. Des études ont révélé des associations entre le tabagisme et les points de terminaison des différentes maladies liées au cancer du côlon (telles que les polypes hyperplasiques) mais avec un effet nul ou seulement modeste du polymorphisme génétique de la NAT2. Mais, il a été observé un risque accru d'adénomes au niveau du côlon chez les fumeurs acétyleurs rapides par rapport aux acétyleurs lents qui n'avaient jamais fumé [Probst-Hensch et coll. 1995, Bell et coll. 1995].

### 1.6.3. NAT2 et cancer du sein

Le sein est un autre tissu cible pour les composés cancérigènes entrant en contact avec le corps humain. Le cancer du sein est une maladie multifactorielle avec comme facteurs prédisposants la consommation de viande rouge et le tabagisme, entre autres [Williams et Phillips, 2000]. Les données épidémiologiques sur le cancer du sein ne lient pas directement le polymorphisme génétique de la NAT2 à cette maladie [Agüндеz et coll. 1995, Hunter et coll. 1997, Ambrosone et coll. 1998b, Gertig et coll. 1999, Matheson et coll. 2002, Lee et coll. 2003, Kocabas et coll. 2004, Van der Hel et coll. 2004]. Cependant, le phénotype acétyleur lent a été impliquée en tant que facteur marginal prédisposant du cancer du sein lorsque d'autres facteurs, tels que le tabagisme actif ou passif, la consommation excessive de viande rouge trop cuite ou la ménopause sont pris en compte [Ambrosone et coll. 1996, Millikan et coll. 1998, Huang et coll. 1999, Deitz et coll. 2000, Morabia et coll. 2000, Krajinovic et coll. 2001, Chang-Claude et coll. 2002].

En outre, l'activité enzymatique de la NAT2 semble être plus élevée dans les tissus mammaires malins que dans les tissus sains. Ces observations suggèrent que l'étude de la NAT2, en ce qui concerne le cancer du sein, devrait être effectuée à différents niveaux, depuis le génotype, jusqu'à l'efficacité catalytique en passant par la transcription, la traduction et la stabilité des protéines [Geylan et coll. 2001].

Beaucoup de travaux ont montré une association entre le tabagisme, l'alimentation et un risque plus élevé de cancer du sein chez les sujets acétyleurs lents pour la NAT2 [Ambrosone et coll. 1996, Huang et coll. 1999].

En dehors du profil d'acétylation de la NAT2, les sujets fumeurs et non fumeurs ont un même rapport de risque pour le cancer du sein. Donc le profil acétyleur lent de la NAT2 ralentit la capacité du corps à se débarrasser des amines aromatiques et des substances cancérigènes contenues dans la fumée de cigarette et favorise ainsi la formation d'adduits à l'ADN incriminés dans la genèse des cancers d'une manière générale [Pfau et coll. 1998, Stone et coll. 1998]. Des niveaux plus élevés d'adduits d'ADN ont été retrouvés dans les tissus mammaires des sujets acétyleurs lents que dans ceux des sujets acétyleurs rapides [Pfau et coll. 1998].

Cette association était plus marquée chez les patientes ménopausées. En effet, les acétyleurs lents ont un taux réduit de métabolisation des amines aromatiques et

hétérocycliques, et chez ces individus, l'évolution des arylamines vers la voie d'hydroxylation qui forme des métabolites réactifs d'ADN est favorisée [Chang-Claude et coll. 2002, Dupret et Rodrigues-Lima 2005].

Néanmoins, Alberg et coll. 2004, ont montré que le génotype acétyleur rapide de la NAT2 est associé à un risque accru de carcinome mammaire en particulier chez les patientes ménopausées, indiquant que la NAT2 agissait davantage comme un activateur de procarcinogènes que comme un détoxifiant. Cette association doit être vérifiée étant donné le très petit nombre d'homozygotes NAT2 acétyleurs rapides considérés et en plus, cette association n'a pas été observée dans d'autres études. Par exemple, dans les cas de cancer du sein chez des taïwanais, il a été constaté que le risque de cancer du sein n'a pas été significativement influencé par les polymorphismes de la NAT2 [Kuo et coll. 2007].

#### **1.6.4. NAT2 et hépatotoxicité**

Le rôle des enzymes de métabolisation des xénobiotiques dans la carcinogenèse hépatique est à prévoir chez les patients atteints d'un cancer du foie lié à l'environnement puisque, outre l'hépatite virale, le cancer du foie peut être lié à des substances environnementales. Les résultats obtenus chez les patients atteints d'un cancer primitif du foie non lié à l'hépatite virale sont cohérents et indiquent une association pertinente, du profil d'acétylation de la NAT2 et de la prédisposition au cancer du foie.

Le polymorphisme génétique de la NAT2 est surtout associé à l'hépatotoxicité médicamenteuse, car la NAT2 étant la principale enzyme impliquée dans le métabolisme de l'isoniazide, est exprimée au niveau du foie. La diminution ou la perturbation de l'activité de la NAT2 pourrait entraîner l'accumulation des précurseurs, tels que l'hydrazine et l'acétylhydrazine dans le foie, conduisant à l'hépatotoxicité de ce médicament [Timbrell 1979, Noda et coll. 1983, Lauterburg et coll. 1985].

Mais contrairement à la plupart des cancers, il y a eu très peu d'études qui ont exploré le rôle du profil d'acétylation de la NAT2 dans le processus de survenue du cancer du foie, en particulier dans celui de l'hépatocarcinome.

Trois allèles NAT2 acétyleurs lents sont principalement associés à l'hépatotoxicité de l'INH induite par l'enzyme NAT2 : NAT2\*5B, NAT2\*6A et NAT2\*7B [Deguchi et coll. 1990,



Cascorbi et coll. 1995, Gross et coll. 1999, Hein et coll. 2002, Huang et coll. 2002, Sharma et coll. 2002].

Rodrigo et coll. 1999, ont démontré, en Espagne, que les acétyleurs lents avaient un risque faible de développer la cirrhose du foie induite par l'INH, même chez les sujets alcool-dépendants.

L'association entre le polymorphisme génétique de la NAT2 et le carcinome hépatocellulaire a été mise en évidence par Yu et coll. en 2000, mais uniquement chez des patients fumeurs et exposés à d'autres toxiques de l'environnement via l'alimentation et diagnostiqués acétyleurs rapides.

En Asie, des études ont établi une association entre le phénotype acétyleur lent de la NAT2 et l'hépatotoxicité médicamenteuse des antituberculeux [Deguchi et coll. 1990], en particulier de l'INH chez des sujets Taïwanais, [Huang et coll. 2002 et 2003], indiens [Pande et coll. 1996, Hussain et coll. 2003] et japonais [Ohno et coll. 2000, Hiratsuka et coll. 2002, Shimizu et coll. 2006].

#### **1.6.5. NAT2 et autres maladies**

L'association entre le type d'acétylation et le risque d'autres maladies a été extensivement étudiée. Les deux modes d'acétylation (lent et rapide) paraissent jouer un rôle majeur dans l'augmentation du risque de développement de plusieurs maladies en plus des cancers [Gawronska-Szklarz et coll. 1999, Chan et coll. 2003].

Comme les composés chimiques présents dans le tabac sont inactivés par les enzymes de phase II, il a démontré que le risque de cancer du larynx peut être modifié par des variations du profil génétique de la NAT2. Mais, les résultats globaux indiquent qu'aucune association significative entre le polymorphisme de la NAT2 et le risque de cancer du larynx n'est à prévoir [Borlak et coll. 1994, Gajecka et coll. 2005]

En ce qui concerne le cancer du poumon, plusieurs études, fondées sur l'hypothèse que l'acétylation lente pourrait augmenter le risque de cancer du poumon, ont été menées. Cette hypothèse a été renforcée par des études indiquant que l'acétylation lente, surtout si elle est associée à un défaut de génotypes pour d'autres enzymes de phase II, peut conférer une susceptibilité accrue à la formation d'adduits au niveau des poumons. Mais les preuves actuelles suggèrent que le polymorphisme NAT2 seul ne constitue pas un facteur de risque

pertinent dans le processus de survenue du cancer du poumon. Toutefois, ce polymorphisme peut renforcer l'effet d'autres facteurs génétiques et/ou de l'environnement [D'Errico et coll. 1999].

Bien qu'une relation de risque puisse être définitivement écartée pour le lupus érythémateux disséminé (SLE), une maladie inflammatoire de l'intestin et l'endométriose [Zschieschang et coll 2002], d'autres études seraient nécessaires pour statuer sur le rôle du polymorphisme génétique de la NAT2 dans le mécanisme étiologique de certaines maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et les maladies parodontales [Rocha et coll. 1999, Bandmann et coll. 2000, Cooper et coll. 2004]. Les résultats actuels ne sont pas concluants mais suggèrent une relation possible avec polymorphisme génétique de la NAT2.

Dans le diabète sucré, la relation possible avec le phénotype rapide peut être évoquée, mais en raison des nombreux changements métaboliques liés à cette maladie, des études de génotypage supplémentaires sont nécessaires [Yalin et coll. 2007].

Ainsi, depuis plus de 50 ans, les chercheurs en pharmacogénétique ont fondé leur compréhension dans le rôle des NATs dans le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques et sur les maladies humaines. Les études pharmacologiques et toxicologiques ont permis de mieux comprendre la structure et le mécanisme catalytique moléculaire des NATs et d'élucider leur implication dans la genèse de plusieurs maladies dont les cancers.

Les incohérences parfois rapportées dans les résultats issus des études de l'implication du polymorphisme génétique de la NAT2 et du risque de survenue de quelques pathologies peuvent s'expliquer par :

- les différences de susceptibilité individuelle dans l'exposition aux xénobiotiques,
- les méthodes utilisées (méthodes génotypiques et / ou phénotypes),
- la taille parfois insuffisante des échantillons,
- l'implication d'autres gènes de susceptibilité et d'autres facteurs liés à l'environnement ou à l'alimentation.

La prescription thérapeutique individualisée sur la base de facteurs génétiques semble aujourd'hui devenir une réalité compte tenu des progrès sur la connaissance des conséquences fonctionnelles des polymorphismes de la NAT2, l'identification des cibles médicamenteuses telle que l'INH, fortement utilisée dans le traitement de la tuberculose à forte prévalence dans nos pays et le développement de technologies performantes de génotypage et/ou de phénotypage (rapides et peu coûteuses).

## **II. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA N-ACETYLTRANSFERASE DE TYPE 2 DANS LA POPULATION SENEGALAISE**

L'étude de l'activité enzymatique de la NAT2 dans la population sénégalaise a été basée sur l'utilisation de la caféine comme substrat en se référant à des études déjà menées sur la NAT2 dans d'autres populations [Grant et coll. 1983, Kilbane et coll. 1990, Tang et coll. 1991, Betchel et coll. 1993, Khelil et coll. 2007].

## **2.1. Matériels et Méthodes**

### **2.1.1. Population d'étude et échantillonnage urinaire**

Deux cent quarante sept (247) sujets supposés sains âgés de 15 à 65 ans (moyenne 29,2 ± 2 ans); composés de 135 femmes (54,7 %) et de 112 hommes (45,3 %), ont été recrutés parmi la population générale après consentement éclairé et dans l'anonymat. Les sujets fumeurs et alcool-dépendants, les femmes enceintes ou sous contraception et les sujets présentant des pathologies sous jacentes ont été exclus de l'étude.

Des échantillons d'urines ont été recueillis après consommation de trois (3) tasses de café correspondant à une dose de 300 mg de caféine. La collecte des urines pour l'étude a été réalisée entre la 3<sup>ème</sup> heure et la 24<sup>ème</sup> heure après. Les sujets avaient auparavant observé une diète de xanthines et d'aliments susceptibles de contenir de la caféine pendant les 24 heures précédant le prélèvement.

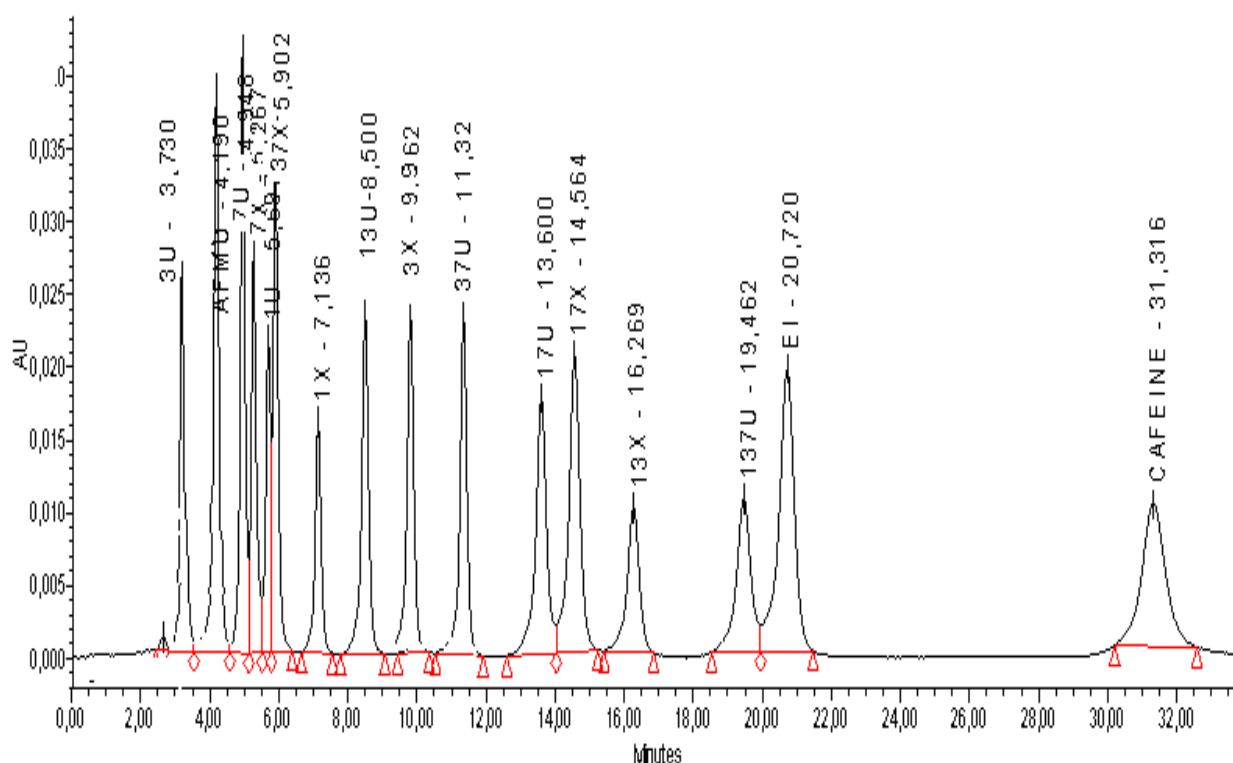
Immédiatement après, les urines collectées ont été acheminées au laboratoire dans une glacière (température = 4°C). Un aliquote de 10 mL de chaque échantillon a été réalisé et acidifié à pH 3,5 avec de l'acide chlorhydrique (HCL) 6N afin de maintenir la stabilité de l'AFMU et d'éviter sa transformation spontanée et non enzymatique en 5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracil (AAMU). Enfin, les aliquotes ont été conservés au laboratoire à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses.

### **2.1.2. Validation de la méthode CLHP de dosage des métabolites de la caféine**

Les métabolites de la caféine ont été dosés par CLHP et le rapport des deux principaux métabolites (AFMU et 1X) a été utilisé pour phénotyper la population testée en acétyleurs lents et acétyleurs rapides. La technique CLHP a été d'abord validée et les paramètres de validation sont la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude et la limite de détection et de quantification. Le standard interne utilisé est la β hydroxy-éthyl-théophylline à 50 mg/L dans du méthanol.

### 2.1.2.1. Vérification des pics chromatographiques des métabolites

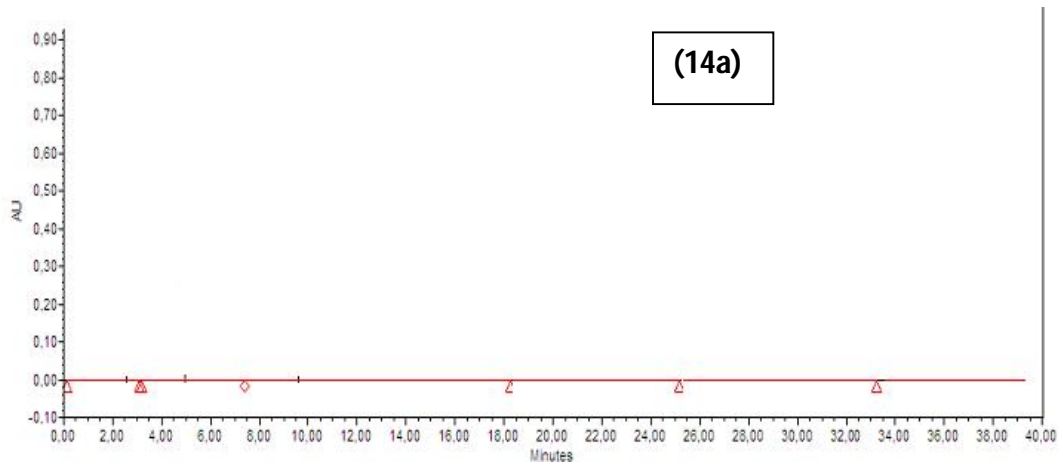
Après préparation des solutions mères, il a été injecté 50  $\mu$ L de ces préparations sur la colonne de chromatographie CLHP après extraction. Les temps de rétention et les pics chromatographiques ont été notés pour chaque métabolite. Ensuite, ces solutions mères ont été utilisées pour composer un mélange de tous les métabolites à une concentration de 5mg/L afin d'étudier la chronologie de l'éluion des métabolites et une éventuelle co-éluion (Figure 13).



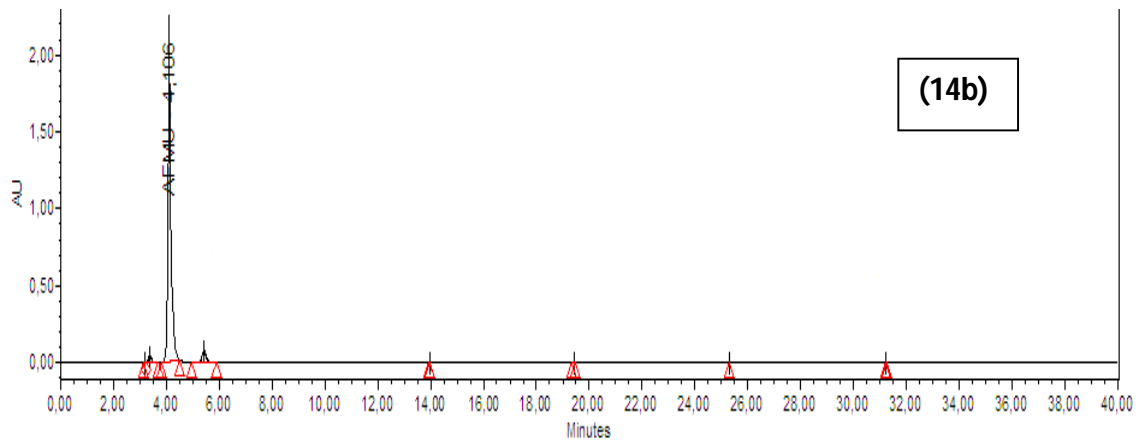
**Figure 13** : Chromatographie CLHP d'un extrait urinaire surchargé avec la caféine et ses métabolites (100 mg/L).

### 2.1.2.2. Spécificité de la méthode

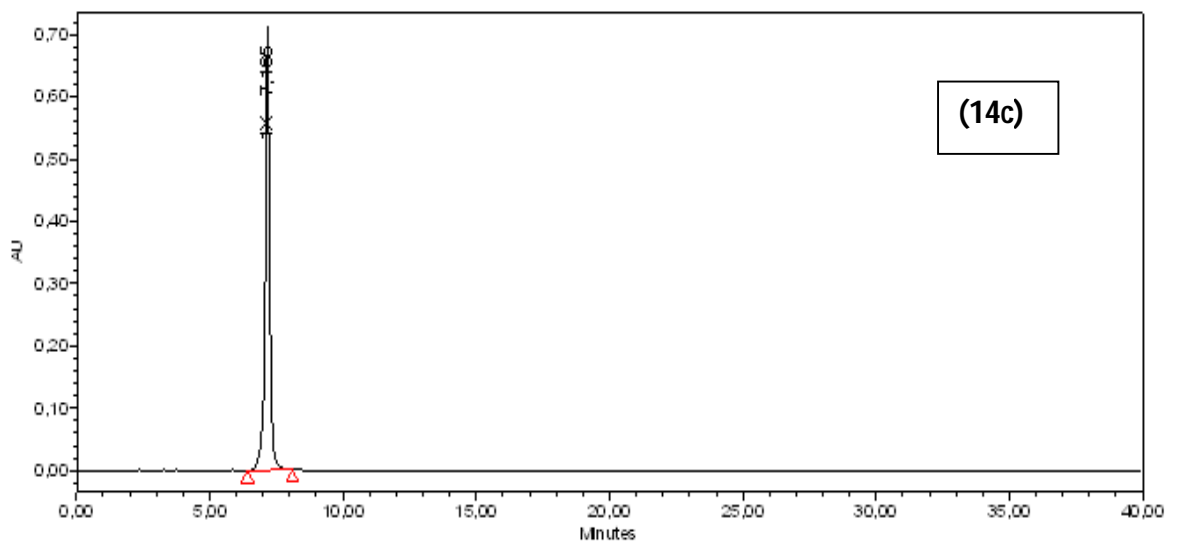
La spécificité du dosage de chaque substance analysée a été caractérisée par la présence de pic spécifique. Pour cela, il a été injecté une solution de la phase mobile (acide acétique 0,05 %). Des solutions témoins contenant chacune un seul métabolite standard (AFMU et 1X) ou le standard interne (SI) ont été aussi injectés (Figure 14).



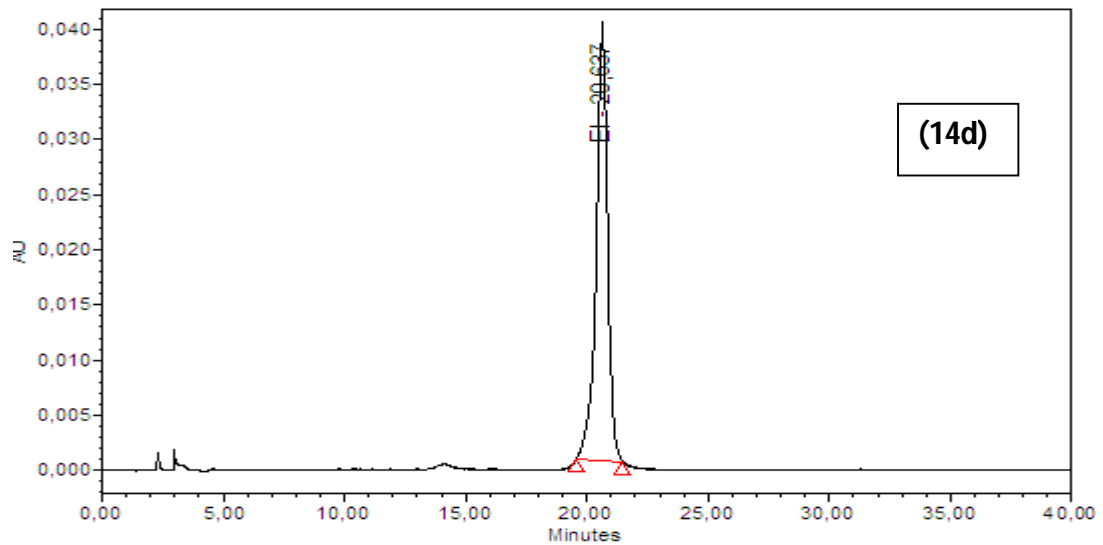
**Figure 14a** : Chromatogramme de la phase mobile utilisée pour le dosage de l'AFMU et du 1X



**Figure 14b** : Chromatogramme obtenu après injection au HPLC du l'AFMU seul



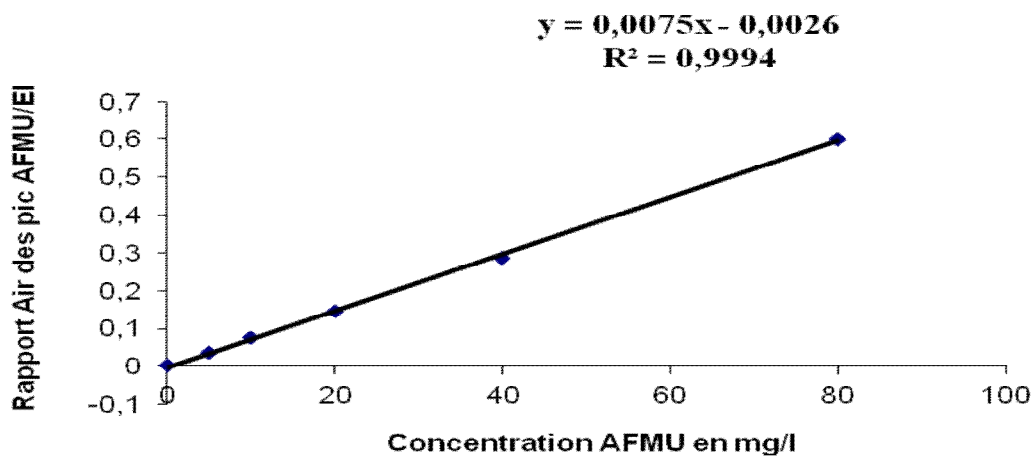
**Figure 14c** : Chromatogramme obtenu après injection au HPLC du IX seul



**Figure 14d** : Chromatogramme obtenu après injection au HPLC de l'étalon interne seul

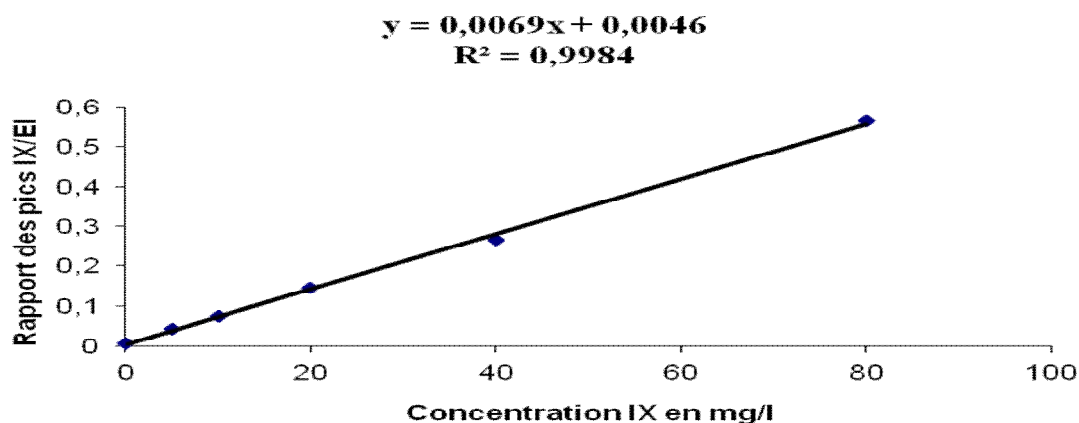
### 2.1.2.3. Linéarité des courbes étalons de l'AFMU et de la IX

Cinq (5) points de gamme ont été préparés pour tracer les courbes d'étalonnage de l'AFMU et du 1X afin d'étudier la proportionnalité entre les concentrations introduites et celles obtenues (Figure 15).



**Figure 15a** : Courbe d'étalonnage de l'AFMU





**Figure 15b** : Courbe d'étalonnage du 1X

#### 2.1.2.4. Fidélité ou Précision de la méthode

La précision est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en effectuant une analyse à plusieurs reprises dans des conditions déterminées et identiques. Elle comporte 2 paramètres qui sont la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Elle est estimée par le coefficient de variation CV (Tableau 7).

- **Répétabilité** : elle est obtenue par injection de solutions constituant l'échantillon standard du 1X et de l'AFMU 5 fois, le même jour. La répétabilité est appréciée par la valeur du CV. La concentration des solutions standards du 1X ou de l'AFMU utilisée est égale à 40 mg/mL.

- **Fidélité intermédiaire** : elle est estimée à partir de l'analyse de cinq (5) séries de concentration intermédiaires aux standards (10 ; 15 ; 30 ; 50 et 75 mg/L) du 1X et de l'AFMU et ceci pendant 5 jours (Tableau 7).

**Tableau VII** : Fidélité intermédiaire (N=5)

Substances	Concentrations introduites en mg/L									
	10		15		30		50		75	
	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)
AFMU	10,97 +/- 0,6	4,86	15,51 +/- 0,8	4,88	30,06 +/- 1,2	3,48	50,004 +/- 1,6	2,92	75,16 +/- 2,5	3
1X	10,93 +/- 0,6	5,17	15,92 +/- 0,7	4,19	30,99 +/- 1,1	3,45	51,43 +/- 0,9	1,88	75,50 +/- 0,7	0,92

### 2.1.2.5. Exactitude ou justesse de la méthode

Elle est représentée par l'étroitesse de l'accord entre la valeur vraie et le résultat obtenu (ou plutôt la moyenne des résultats obtenus). Pour vérifier l'exactitude de la méthode utilisée dans ce travail, nous avons réalisé 6 dosages de solutions titrées à 5, 10, 20, 40 et 80 mg/L respectivement de l'AFMU et du 1X. La valeur moyenne et le CV sont ensuite calculés (Tableau 8).

**Tableau VIII : Justesse ou exactitude de la méthode**

[AFMU] introduites (mg/L)	Moy des [AFMU] calculées mg/L +/- SD	CV (%)	[1X] introduites (mg/L)	Moy des [1X] calculées (mg/L) +/- SD	CV (%)
5	5,386 +/- 0,364	7,574	5	5,506 +/- 0,429	8,719
10	10,48 +/- 0,567	6,054	10	10,4684 +/- 0,513	5,486
20	20,776 +/- 0,865	4,656	20	20,5682 +/- 0,455	2,472
40	40,937 +/- 0,876	2,394	40	40,1474 +/- 0,818	2,278
80	80,29044 +/- 1,181	1,645	80	80,1312 +/- 0,790	1,103

### 2.1.2.6. Limite de détection et de quantification

La limite de détection d'une méthode (LDM) est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

La limite de quantification d'une méthode (LQM) est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LDM. Donc  $LQM = 10 \times s$ .

Les limites de détection sont de 0,3 mg/L pour l'AFMU et de 0,5 mg/L pour le 1X. Les limites de quantification sont de 1,23 mg/L pour l'AFMU et de 1,71 mg/L pour le 1X.

Les détails de la méthodologie et les résultats obtenus sont décrits dans l'article 1

- 2.2. **Article 1** : « Détermination du polymorphisme d'acétylation de la N-Acétyltransférase 2 dans la population sénégalaise par HPLC : utilisation du rapport [AFMU/IX] pour évaluer l'activité enzymatique de la NAT2 »





















### **III. RECHERCHE DE MUTATIONS DU GENE DE LA N-ACETYLTRANSFERASE DE TYPE 2 DANS LA POPULATION SENEGALAISE PAR PCR-SEQUENÇAGE**

Il est désormais reconnu que des anomalies de la séquence codante du gène *NAT2* peuvent entraîner une altération de son activité enzymatique et ainsi être à l'origine de variations inter-individuelles dans la réponse aux médicaments tels que l'isoniazide. Ainsi, pour des doses standard de ce médicament, les individus porteurs d'un ou de deux allèles non fonctionnels du gène *NAT2* présentent un risque accru de développer une toxicité avérée d'organes cibles dus à un temps de demi-vie prolongé de l'INH ou à l'accumulation excessive du métabolite cytotoxique, l'acétylhydrazine, douée de toxicité hépatique et capable de se lier à l'ADN pour former des adduits.

Le génotypage constitue la méthode de référence pour identifier les différentes mutations inactivatrices du gène *NAT2* afin de pouvoir prédire le phénotype d'acétylation des sujets pour une meilleure optimisation du traitement de la tuberculose.

Dans le cadre de nos travaux, la stratégie utilisée pour l'étude des mutations de la *NAT2* a consisté en une analyse moléculaire du gène *NAT2* par PCR-Séquençage directe afin d'identifier les différentes mutations existantes dans la population sénégalaise. Ces analyses ont été complétées par l'étude des allèles obtenus par combinaisons d'un ou de plusieurs substitutions nucléotidique ou SPN. Le profil génotypique permet de prédire le phénotype et de classer les sujets en acétyleurs lents ou rapides selon les profils.

### **3.1. Echantillons d'ADN analysés**

Deux cent un (201) échantillons d'ADN génomique, provenant de sujets volontaires sains ou atteints de tuberculose, ont été analysés dans cette étude. Le recrutement des sujets sains a été effectué dans les écoles de formation professionnelle et à l'université de Dakar.

Les sujets atteints de tuberculose, ont été recruté au service clinique de pneumophtisie du centre hospitalier et universitaire de Fann.

Pour chaque individu, un consentement éclairé a été obtenu et des échantillons de sang veineux ont été collectés sur EDTA. L'analyse du polymorphisme du gène *NAT2* a été effectuée à partir d'ADN obtenus après extraction à partir du sang total, purification et amplification par PCR-Séquençage.

### **3.2. Extraction de l'ADN**

La source majeure pour extraire de l'ADN est les globules blancs. A partir du sang total, l'ADN génomique a été extrait à l'aide de deux kits selon les instructions du fournisseur : Nucléon BACC3<sup>ND</sup> (Amersham Pharma Biotech, saclay, France) et NucléonSpin<sup>ND</sup> (Macherey-Nagel Eurl, France).

Le kit NucléoSpin<sup>ND</sup> a été utilisé pour les échantillons de faible volume (200µl-2mL) et le kit Nucléon BACC3<sup>ND</sup> pour les échantillons de volume plus important (à partir de 5mL).

Les différentes phases d'une extraction d'ADN sont respectées c'est-à-dire la lyse cellulaire pour faire éclater les globules rouges avec une solution détergente, la déprotéinisation avec la protéinase K ou le perchlorate de sodium (selon les kits), l'extraction de l'ADN par le chloroforme et sa précipitation par l'éthanol.

### **3.3. Contrôle qualitatif et quantitatif des ADN**

Les concentrations des différents extraits d'ADN ont été déterminées par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm et aussi de 280 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. En effet, les acides nucléiques absorbent aussi bien à 260 nm qu'à 280 nm mais ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN ; une densité optique de 1 à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin. Un spectromètre Nanodrop<sup>ND</sup> (thermo Scientific, Courtaboeuf, France) a été utilisé. La pureté de l'ADN a été déterminée par le rapport de la densité optique à 260 nm et aussi à 280 nm (DO 260 /DO 280 nm) et ce rapport doit être compris entre 1.8 et 2,0 afin de pouvoir considérer l'ADN débarrassé des protéines cellulaires donc pur. D'autres part la mesure de la DO à 270 nm et le calcul du rapport DO 260 nm / DO 270 nm est effectué pour s'assurer que la solution contient peu ou pas d'alcool résiduel. Ce rapport d'absorption doit être inférieur à 1. Le logiciel fournit directement la concentration d'ADN en ng/µL. Ensuite les échantillons d'ADN sont gardés à +4°C jusqu'à la réalisation des techniques de PCR et de Séquençage.

### 3.4. Amplification par PCR et étude des mutations par séquençage

#### 3.4.1. Amplification du fragment à séquencer

La partie codante de la NAT2 a été amplifiée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une paire d'amorce sens et antisens a été utilisée (Tableau IX) afin d'amplifier le gène codant de la protéine de la NAT2.

**Tableau IX** : Amorces utilisées dans l'amplification du gène NAT2

Gène	Appellation des amorces	Séquences des amorces 5'→3'	Orientation des amorces
NAT2	NAT2 F	5'-GTTTTTCTTGCTTAGGGGATC-3'	Sens
	NAT2 R (NAT2_M4bis)	5'-ATTAGTGAGTTGCGTGATACATA-3'	Antisens

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 25 µL contenant (Tableau X) : Tris-HCL 20 mM (pH 8,4), KCL 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, amorces sens et antisens 400 mM, *Taq* Polymerase 1,25 U, dNTP 0,2 mM (Promega, Chambonnières-les-Bains, France), 200 ng d'ADN génomique et eau stérile. Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur Gradient (Eppendorf, Le Pecq, France) et les conditions optimisées sont décrites dans le tableau XI. Des témoins négatifs ont permis de contrôler l'absence de contamination pendant la manipulation.

**Tableau X** : Mélange réactionnel pour l'amplification gène de la NAT2

Réactifs	Volume par tube (µL)
H2O	18,4
TP 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75
Dntp mix	0,2
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Taq	0,15
ADN	1

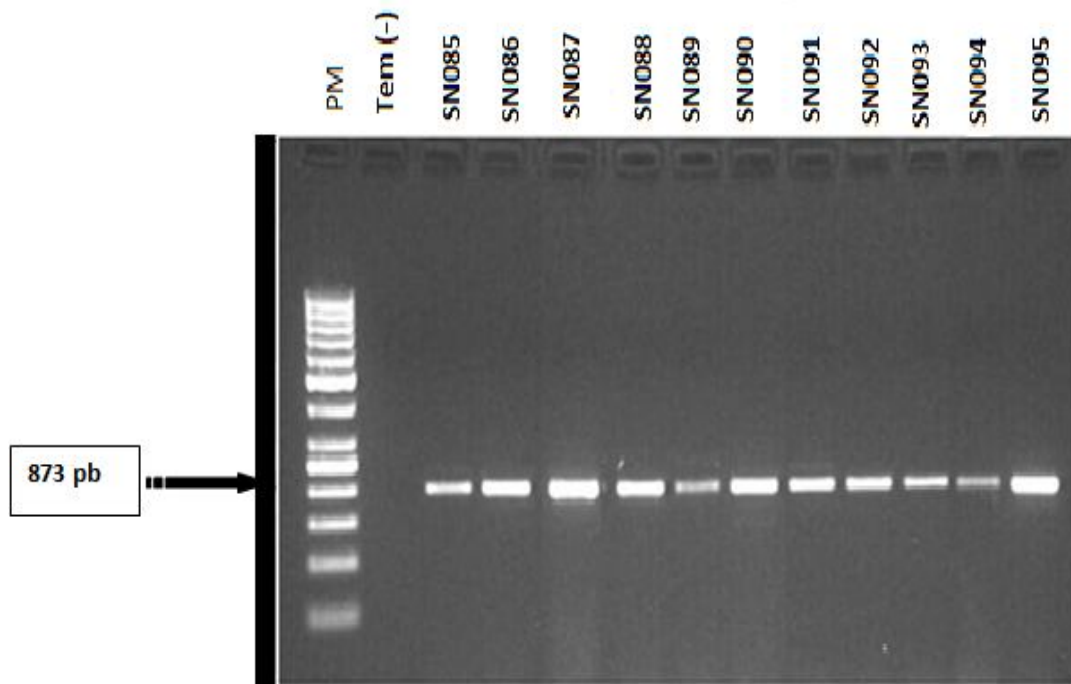


**Tableau XI** : Conditions optimisées du programme PCR pour l'amplification de la NAT2.

<b>Étapes de la PCR</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps en minutes</b>
Pré-dénaturation	94	2
Dénaturation	94	1
Hybridation	58	1
Extension	72	1
Nombre de cycles	30 Cycles	
Elongation finale	72	7
Stop	10	Hold

### 3.4.2. Analyse des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de contrôler les produits d'amplification, un gel d'agarose à 2% a été réalisé (2g d'agarose dans 100 mL de tampon Tris-Borate-EDTA, ajout de 5 µL d'iodure de propidium à 1 mg/mL). Ensuite, 2 µL de produits amplifiés sont mélangés à 2 µL d'une solution de bromophénol en solution dans du glycérol, puis déposés dans les puits du gel déjà préparé. On dépose également un témoin de poids moléculaire (DNA molecular weight market XIV, 100-1500 bp, Réf. 1172193301, Roche). Le gel migre 10 minutes à 100V/80 mA dans une cuve d'électrophorèse Sub-Cell Gt<sup>ND</sup> (Biorad, Marne La Coquette, France). La lecture du gel s'effectue sous UV dans un imageur GelDoc Xr<sup>ND</sup> (Biorad). La taille des fragments est vérifiée sur le logiciel Quantity One 6.6 (Biorad). (Figure 16).



**Figure 16** : Vérification des fragments amplifiés : Migration des produits d’amplification sur gel d’agarose. *Un témoin de poids moléculaire (100-1500 pb) est déposé à gauche afin de contrôler la taille des fragments amplifiés.*

### 3.4.3. Purification enzymatique des amplicons

La purification des amplicons a été faite par combinaison de deux enzymes : la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase de Roche Meylan, France) et l’exonucléase I (USB, Wycombe Lane, UK). Cinq microlitres (5µL) du produit de PCR sont mélangés à 1µL de SAP et 0,5 µL d’exonucléase. Ensuite, le mélange a été soumis à une purification au thermocycleur avec une phase d’activation des enzymes à 37°C pendant 30 min puis leur inactivation à 80°C pendant 15 min. Cette étape a permis d’éliminer tous les risques d’erreur due aux interférences de la PCR (excès de dNTP, sels, amorces et Taq).

Une technique de purification sur membrane de silice QiaQuick<sup>ND</sup> (Qiagen, Courtaboeuf, France) a été utilisée pour les échnatillons de concentration d’ADN relativement faible.

#### 3.4.4. Extension des amplicons après marquage

Le séquençage de l'ADN a été effectué directement sur les fragments amplifiés en utilisant la méthode de Sanger ou méthode des terminateurs de chaînes marquées (didéoxy-chain-terminatoïn). Cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une des amorces utilisées pour l'amplification des fragments à analyser. L'extension de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase thermostable dépourvue d'activité 5'→3'. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés ainsi qu'une faible concentration des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Ceux-ci agissent comme des poisons terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau du nucléotide correspondant au ddNTP incorporé. Il en résulte un mélange de fragments de taille croissante, se terminant tous au niveau d'un des ddNTP. Un traceur fluorescent fixé au ddNTP permet une détection ultérieure. Le kit BigDye<sup>ND</sup> terminator 3.1 (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) est utilisé selon les instructions du fournisseur. Il comprend le BigDye<sup>ND</sup> terminator contenant l'ADN polymérase, les dNTP, ainsi que les ddNTP marqués par un fluorochrome et le tampon de séquençage (permettant la polymérisation des fragments dans des conditions optimales) Les extensions sont réalisées dans un thermocycleur Gradient<sup>ND</sup> (Eppendorf) sous le programme APLERA décrit dans le tableau 1XII.

**Tableau XII** : Conditions optimisées du programme APLERA pour l'extension des amplimères.

<b>Etapes du programme</b>	<b>Température en °C</b>	<b>Temps en min. ou sec.</b>
<b>T1</b> Pré-dénaturation	96	1 min
<b>T2</b> Dénaturation	96	10 sec
<b>T3</b> Hybridation	50	10 sec
<b>T4</b> Polymérisation	60	4 min
Nombre de cycles	T2 à T4 : 25 Cycles	
Stop	4	Hold

#### **3.4.5. Séquençage sur 3130 XL 16 capillaires (Applied Biosystems)**

Les produits d'extension ont été dans un premier temps purifiés par tamisage moléculaire sur une résine P10 (Biorad) afin d'éliminer les produits en excès (ddNTP, enzyme, tampon, ...). La résine, en suspension dans du tampon EDTA 1X, a été ensuite répartie sur une plaque MultiScreen<sup>ND</sup> (Millipore, Molsheim, France). Après centrifugation à 3500 tpm, durant 3 minutes à +4°C, la plaque de filtration a été placée sur une plaque MicroAmp<sup>ND</sup> (Applied Biosystems) où les produits purifiés ont été recueillis. Les produits d'extension ont été filtrés à travers la résine par centrifugation à 3500 tpm durant 3 minutes à 4°C. Cinq microlitres (5µL) d'eau stérile ont été ajoutés pour éviter une évaporation des échantillons quand la plaque se retrouvera dans l'atmosphère du séquenceur. Enfin la plaque a été scellée par un septa hermétique (Applied Biosystems).

Le protocole de séquençage utilisé permet l'analyse de 300 à 800 paires de bases. La matrice des capillaires est constituée de gel POP7<sup>ND</sup> (Applied Biosystems). Les fragments amplifiés migrent par électrophorèse capillaire en parallèle à un marqueur de taille. Chaque fragment de taille variable passe devant un laser capable d'exciter le fluorochrome marquant le ddNTP qui émet un signal à une longueur d'onde spécifique. Ce signal sera ensuite converti par un algorithme en fluorogramme coloré. Ces fluorogrammes sont assemblés donnant la séquence du fragment étudié (Figure 17).



**Figure 17 :** Schématisation d'un résultat de séquençage après traitement informatique. Chaque fragment de taille variable passe devant un laser capable d'exciter le fluorochrome marquant le ddNTP qui émet un signal à une longueur d'onde spécifique. Ce signal est converti par un algorithme en fluorogramme coloré visible au niveau de la station de travail du séquenceur (fenêtre du haut). Les fluorogrammes sont assemblés donnant la séquence du fragment étudié (fenêtre du bas). La séquence est analysée sur le logiciel SeqScape 2.5 (en bas), elle est comparée à la séquence de référence (en jaune).

La séquence de référence est issue de la base de données d'*Ensembl Genom Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). La séquence sauvage utilisée est *ENST00000286479* (Figure 18). Le logiciel SeqScape 2.5 détecte les différences possibles entre la séquence à étudiée et la séquence de référence. Il permet de mettre en évidence les mutations faux sens, les insertions ou délétions d'un ou de plusieurs nucléotides et ceci à l'état homozygote ou hétérozygote. Ensuite l'existence des mutations observées sera vérifiée dans la base de données d'*Ensembl*.

Le génotypage de la NAT2 dans la population sénégalaise a concerné la recherche de mutations inactivatrices les plus rencontrées (M1 à M4) et des rares retrouvées dans des populations isolées et à des fréquences faibles.

```
ATGGACATTGAAGCATATTTTGAAGAATTGGCTATAAGA AACTCTAGGAACAAAT
TGGACTTGGAAACATTA ACTGACATTCTTGAGCACCAGATCCGGGCTGTTCCTTT
GAGAACCTTAACATGCATTGTGGGCAAGCCATGGAGTTGGGCTTAGAGGCTATTT
TTGATCACATTGTAAGAAGAAACCGGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTC AATCAACT
TCTGTACTGGGCTCTGACCACAATCGGTTTTTCAGACCACAATGTTAGGAGGGTAT
TTTTACATCCCTCCAGTTAACAAATACAGCACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTGCA
GGTGACCATTGACGGCAGGAATTACATTGTTCGATGCTGGGTCTGGAAGCTCCTCC
CAGATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCTT
GCATTTTCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAAATCAGGA
GAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAATTCTCATCTCCTGCCAAAGAA
GAAACACCAAAAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTCGAACAATTGAAGATTTT
GAGTCTATGAATACATACCTGCAGACGTCTCCAACATCTTCATTTATAACCACATC
ATTTTGTTCCCTTGACAGACCCAGAAAGGGGTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCA
CCTATAGAAAATTCAATTATAAAGACAATACAGATCTGGTTCGAGTTTAAA ACTCT
CACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAAGATTTCCCTTGGGG
AGAAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGGATCCCTTACTATTTAG
```

**Figure 18** : Séquence codante du gène *NAT2* (873 nt) : *ENST00000286479*  
(<http://www.ensembl.org/index.html>)

### 3.5. Analyse in silico

La banque de données **Uniprot NAT2** a permis de voir si les mutations observées ont une conséquence significative sur la protéine et pour ce logiciel, la NAT2 humaine est connue sous le N° P11245. De même, les conséquences des mutations identifiées peuvent être évaluées *in silico* grâce au programme **PolyPhen**. Ce programme permet d'analyser le taux de conservation des acides aminés de la protéine considérée au sein d'un grand nombre d'espèces animales, des propriétés physico-chimiques des résidus échangés et de la proximité spatiale de la substitution par rapport aux différents domaines fonctionnels de la protéine. Le programme est libre d'accès et est disponible à l'adresse suivante : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.

L'utilisation du logiciel **NAT2PRED** ( Kuznetsov et coll. 2009) nous a permis de déterminer le phénotype de la NAT2 en utilisant les résultats de génotypage de cette enzyme. Le logiciel NAT2PRED est un serveur qui met en œuvre un modèle surveillé afin de déterminer la méthode de reconnaissance et de déduction du phénotype de la NAT2 en fonction des mutations retrouvées au niveau du gène de la NAT2 dans les positions 282, 341, 481, 590, 803 et 857. Cette reconnaissance des mutations a été complétée par le consensus sur

la nomenclature des allèles de la NAT2 publié en 1995 et réactualisé en juillet 2011 (<http://n-acetyltransferasenomenclature.louisville.edu/>).

La comparaison statistique de la distribution des mutations dans les populations a été réalisée par le test du  $\chi^2$  avec un seuil de signification maximum de 5 % et un intervalle de confiance calculé à 95 % et les fréquences des mutations ont été comparées par la loi de Hardy-Weinberg.

Pour étudier la concordance des deux méthodes (phénotypage et génotypage), nous avons utilisé le test statistique de Kappa avec la formule de la constante de Kappa  $k = 2(ad - bc)/(n1.n4 + n3.n2)$

### **3.6. Résultats**

Les 201 échantillons d'ADN génotypés provenaient d'une population d'étude composée de 105 sujets sains et de 96 patients atteints de tuberculose Les sujets sains (66 femmes et 39 hommes), étaient âgés de 16 à 65 ans (29,25 +/- 5,7 ans). Les patients atteints de tuberculose étaient âgés de 17 à 68 ans avec une moyenne de 31 ans +/- 11 ans. Le poids de ces malades a varié entre 36 à 74 kg avec une moyenne de 57 kg +/- 7,4 kg.

Les résultats du génotypage de la NAT2 chez les 105 sujets sains non apparentés sont décrits et discutés dans l'article 2 « **Article sur «Study of NAT2 gene polymorphisms in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population »**

Chez les malades atteints de tuberculose, les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux XIII, XIV et XV.

**Tableau XIII** Position, nature, conséquence sur la protéine et fréquences des mutations identifiées sur la séquence nucléotidique du gène *NAT2* chez 96 patients sénégalais atteints de tuberculose

Mutations rs	Localisation <sup>a</sup>	acide Aminé changé	Effet Fonctionnel sur l'enzyme	Fréquence Allèles (%)		Fréquence génotype			<i>p</i> value <sup>b</sup>	
						Observée		Attendue		
						N=105	%	%		%
rs1801279	<b>c.191G&gt;A</b>	p.Arg64Gln	Réduction	G	91	GG	78	81	81,9	0,29
				A	9	AA	0	0	0,9	
						GA	18	19	17,2	
rs1041983	<b>c.282C&gt;T</b>	p.Tyr94Tyr	Silencieux	C	51	CC	23	24	26	0,42
				T	49	TT	21	22	24	
						CT	52	54	50	
rs1801280	<b>c.341T&gt;C</b>	p.Ile114Thr	Réduction	T	73	TT	49	51	54	0,12
				C	27	CC	4	4	7	
						TC	43	45	39	
rs45532639	<b>c.345C&gt;T</b>	p.Asp115Asp	Silencieux	C	99	CC	94	98	98	0,92
				T	1	TT	0	0	/	
						CT	2	2	2	
rs12720065	<b>c.403C&gt;G</b>	p.Leu135Val	Inconnue	C	99	CC	95	99	99	0,96
				G	1	GG	0	0	/	
						CG	1	1	1	
rs1799929	<b>c.481C&gt;T</b>	p.Leu161Leu	Silencieux	C	76	CC	53	55	57	0,28
				T	24	TT	4	4	6	
						CT	39	41	37	
rs1799930	<b>c.590G&gt;A</b>	p.Arg197Gln	Réduction	G	72	GG	50	52	52	0,78
				A	28	AA	7	7	40	
						GA	39	41	8	



**Tableau XIII (Suite et fin)**

rs1208	<b>c.803A&gt;G</b>	p.Lys268Arg	Nul	A	70	AA	43	46	49	0,06
				G	30	GG	5	6	9	
						AG	48	49	42	
rs563935	<b>c.838G&gt;A</b>	p.Val280Met	Inconnu	G	98	GG	92	97	96	0,84
				A	2	AA	0	0	/	
						GA	4	3	4	
rs179931	<b>c.857G&gt;A</b>	p.Gly286Glu	Réduction	G	96	GG	89	92	93,1	0,72
			Substrat-	A	4	AA	0	0	6,8	
			dépendante			GA	7	8	0,1	

<sup>a</sup>Les sites polymorphes ont été numérotés considérant le numéro +1, l'acide aminé A du codon d'initiation de traduction dans la séquence codante de NAT2 dans la base Ensembl (Numéro d'accèsion GenoM navigateur) (<http://www.ensembl.org/index.html>).

<sup>b</sup>Si la valeur p du test de  $\chi^2$  est  $< 0,05$ , l'équilibre de Hardy-Weinberg n'est pas respectée.

**Tableau XIV Nature et fréquence des allèles de NAT2 identifiés chez 96 malades sénégalais atteints de tuberculose**

	191G>A	282C>T	341T>C	345C>T	403C>G	481C>T	590G>A	638C>T	803A>G	838G>A	857G>A	n=192	%
<b>NAT2*4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>21</b>	<b>10,9</b>
<b>*5A</b>	-	-	C	-	-	T	-	-	-	-	-	33	17,2
<b>*5B</b>	-	-	C	-	-	T	-	-	G	-	-	12	6,3
<b>*5D</b>	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	5	2,6
<b>*5M</b>	-	-	C	-	-	T	-	-	G	A	-	1	0,5
<b>Total NAT2*5</b>												<b>51</b>	<b>26,6</b>
<b>*6A</b>	-	T	-	-	-	-	A	-	-	-	-	36	18,8
<b>*6B</b>	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	1	0,5
<b>*6C</b>	-	T	-	-	-	-	A	-	-	-	A	10	5,2
<b>*6J</b>	-	T	-	-	-	-	A	-	G	-	-	3	1,6
<b>*6L</b>	-	T	-	T	-	-	A	-	-	-	-	1	0,5
<b>Total NAT2*6</b>												<b>51</b>	<b>26,6</b>
<b>*7A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	1	0,5
<b>*7B</b>	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	1	0,5
<b>*7C</b>	-	T	-	-	-	-	-	-	G	-	A	4	2,1
<b>Total NAT2*7</b>												<b>6</b>	<b>3,1</b>
<b>*12A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	9	4,7
<b>*12B</b>	-	T	-	-	-	-	-	-	G	-	-	7	3,6
<b>*12C</b>	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	6	3,1
<b>*12H</b>	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	1	0,5
<b>Total NAT2*12</b>												<b>23</b>	<b>12</b>
<b>NAT2*13A</b>	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>20</b>	<b>10,4</b>
<b>*14A</b>	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	2,6
<b>*14B</b>	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	3,6
<b>*14E</b>	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	7	3,6
<b>Total NAT2*14</b>												<b>19</b>	<b>9,9</b>
<b>Nouvel allèle (838)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	1	<b>0,5</b>

**Tableau XV** Génotype et phénotype prédit de la *NAT2* chez 96 malades sénégalais atteints de tuberculose

Génotype	Nombre de sujets	Fréquence (%)	Phénotype prédit
<i>NAT2</i> *5/*5	5	5,2	Lent
<i>NAT2</i> *5/*6	16	16,7	Lent
<i>NAT2</i> *5/*7	4	4,2	Lent
<i>NAT2</i> *5/*14	10	10,4	Lent
<i>NAT2</i> *6/*6	7	7,3	Lent
<i>NAT2</i> *6/*7	1	1	Lent
<i>NAT2</i> *6/*14	4	4,2	Lent
<b>Total Lent</b>	<b>47</b>	<b>49</b>	
<i>NAT2</i> *4/*4	1	1	Rapide
<i>NAT2</i> *4/*5	1	1	Rapide
<i>NAT2</i> *4/*6	7	7,3	Rapide
<i>NAT2</i> *4/*12	3	3,1	Rapide
<i>NAT2</i> *4/*13	6	6,3	Rapide
<i>NAT2</i> *4/*14	2	2,1	Rapide
<i>NAT2</i> *5/*12	9	9,4	Rapide
<i>NAT2</i> *6/*12	4	4,2	Rapide
<i>NAT2</i> *6/*13	4	4,2	Rapide
<i>NAT2</i> *7/*13	1	1	Rapide
<i>NAT2</i> *12/*12	1	1	Rapide
<i>NAT2</i> *12/*13	4	4,2	Rapide
<i>NAT2</i> *13/*13	1	1	Rapide
<i>NAT2</i> *13/*14	3	3,1	Rapide
<b>Total Rapide</b>	<b>47</b>	<b>49</b>	
<i>NAT2</i> *6/* <i>new</i> (838)	1	1	non classé
<i>NAT2</i> *5/*12 <i>H</i>	1	1	non classé
<b>Total non classés<sup>a</sup></b>	<b>2</b>	<b>2</b>	
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100</b>	

<sup>a</sup>Deux des 96 malades testés avaient un phénotype acétylateur inconnu car ils étaient hétérozygotes pour un allèle acétylateur lent et un allèle à effet fonctionnel inconnu.

Le tableau XIII donne les différentes mutations ou SNP retrouvées chez les 96 malades atteints de tuberculose et leur fréquence.

L'analyse par séquençage de la région codante de la NAT2 chez ces malades a permis l'identification de 10 mutations (ou SNPs) décrites dans le tableau XIII. Les mutations 191G>A (9 %), c.282 C>T (49 %), c.341T>C (27 %), c.481 C>T (24 %), c.590 G>A (28 %) et c.803 G>A (30 %) sont les plus fréquentes. Parmi ces 5 mutations, deux (c.341 T>C et c.590 G>A) sont des mutations faux sens, entraînant ainsi une réduction de l'activité enzymatique de la NAT2. Les trois autres (c.282 C>T, c.481 C>T et c.803 G>A), sont des mutations silencieuses sans aucun effet sur l'activité catalytique de la NAT2.

Cinq autres mutations ont été retrouvées à des fréquences comprises entre 1 et 5 %. Ces mutations correspondent soit à des mutations silencieuses (C.345C>T), soit à des mutations d'effet encore inconnu (c.403C>G and c.838G>A), soit à des mutations dont l'effet inactivateur est substrat-dépendante (c.857G>A).

La combinaison de ces mutations a permis de déterminer, selon la nomenclature sur les allèles NAT2, les allèles retrouvés chez les patients testés. Au total, 22 allèles, dont l'allèle de référence *NAT2\*4*, ont été mis en évidence (tableau XIV).

Les allèles *NAT2\*5* et *NAT2\*6* sont les plus fréquents suivis des allèles *NAT2\*12*, *NAT2\*4* et *NAT2\*13*.

La distribution du génotype NAT2 chez les 96 sujets tuberculeux testés est décrite dans le tableau XV. Les génotypes lents *NAT2\*5/\*6* et *NAT2\*5/\*14* sont retrouvés respectivement chez 16,7 et 10,4 % des sujets. Les génotypes rapides *NAT2\*4/\*6* et *NAT2\*4/\*13* et *NAT2\*5/\*12* sont retrouvés chez 7,3 ; 6,3 et 9,4 % respectivement.

A partir de ces génotypes, nous avons prédit le phénotype d'acétylation de ces 96 patients, tandis que 2 personnes sont restées non classés (phénotype inconnu), car ils étaient porteurs d'un allèle acétyleur lente et un allèle à effet inconnu. Au total, sur les 96 patients testés, nous avons obtenu une prévalence de phénotypage équivalent de 49 % d'acétyleurs lents et 49 % d'acétyleurs rapides et 2 % présentaient un phénotype d'acétylation inconnu.

### 3.7. Corrélation génotype-phénotype

La corrélation entre les résultats de génotypage et de phénotypage a été réalisée chez 101 sujets sains pour lesquels le phénotypage et le génotypage ont pu être réalisés, les résultats étant interprétables.

Parmi ces 101 sujets, nous avons obtenu 11 sujets pour lesquels les résultats de génotypage et de phénotypage étaient discordants. Avec le test de concordance Kappa, nous avons obtenu une valeur de  $k = 0,78$  [avec  $k = 2(ad - bc)/(n1.n4 + n3.n2)$ ].

Tableau XVI : Proportions jointes des résultats de génotypage et de phénotypage chez 101 sujets

		Génotypage		
		Lent	Rapide	Total
Phénotypage	Lent	39 (a)	0 (b)	39 (n1)
	Rapide	11 (c)	51 (d)	62 (n2)
	Total	50 (n3)	51 (n4)	101

Deux des sujets de profil indéterminé avec les résultats de génotypage (*NAT2\*14/\*12H* et *NAT2\*5/\*12H*) sont de phénotype rapide avec la méthode de phénotypage. Alors que le *NAT2\*5/403* est un phénotype lent avec le phénotypage.

### 3.8. Discussion

Le gène *NAT2*, dont l'expression est responsable du polymorphisme «classique» d'acétylation », présente une variabilité interindividuelle et est impliqué dans le métabolisme de divers xénobiotiques dont les médicaments et certains cancérigènes. Le polymorphisme du *NAT2* est attribué à la variabilité du polymorphisme des nucléotidiques simples brins (SNP), leur présence ou leur absence résulte des variations de la capacité d'acétylation de l'enzyme codant pour ce gène [Hein 2006, Boukouvala et coll 2005]. L'association entre le phénotype d'acétylation et le génotype de la *NAT2* a été démontrée par plusieurs études [Grant et coll. 1984, Meyer et coll. 1990, Ohsako et Deguchi 1990, Tanigawara et coll.2002, Rychlik-Sych et coll. 2006, Norton et coll. 2008]. Les variants alléliques de la *NAT2* ont été étudiés pour la

première fois pour leur association avec le métabolisme de l'INH et les effets indésirables induits par ce médicament chez les patients tuberculeux [Mitchell et coll. 1976, Hayes et coll. 1993, Agundez et coll. 1996, Adams et coll. 2003]. En effet, Le polymorphisme de *NAT2* se traduit par l'expression de variants enzymatiques dont les propriétés fonctionnelles engendrent l'existence des phénotypes « acétyleur lent » et « acétyleur rapide », pouvant être responsables de variations d'expression ou d'activité des enzymes du métabolisme des médicaments [Deguchi 1992 ; Vatsis et coll, 1995 et 1997].

Dans cette présente étude qui constitue la première au Sénégal, nous avons pour but de déterminer la fréquence des allèles et des génotypes de la *NAT2* chez 201 sujets sénégalais (105 sujets sains et 96 patients atteints de tuberculose) par une stratégie PCR-séquençage.

La méthode de séquençage est la méthode de référence en termes d'identification des mutations ponctuelles bien que, malgré une bonne sensibilité des séquenceurs automatisés désormais utilisés couramment, il arrive que certaines mutations à l'état hétérozygote soient difficiles à repérer. De plus, le séquençage direct reste une méthode laborieuse et relativement coûteuse, encore mal adaptée à l'analyse de nombreux échantillons d'ADN surtout dans nos pays à ressources limitées [Millikan et coll. 1998, Taylor et coll. 1998, Adams et coll. 2003].

Nous avons obtenu 11 variations de séquences (SNP) déjà connus et décrites dans la littérature (c.191 G>A, c.282 C>T, c.341 T>C, c.345 C>T, c.403 C>G, c.481 C>T, c.590 G>A, c.638 G>A, c.803 A>G, c.838 G>A and c.857 G>A) [Sabbagh et coll. 2007, Magalon et coll. 2008, Teixeira et coll. 2010, Talbot et coll. 2010, Ebeshi et coll. 2011].

Ces différentes mutations ont des impacts connus sur l'activité de la *NAT2*. La mutation c.191 G>A réduit nettement l'activité de la *NAT2* par la rupture du pont essentiel pour la formation de sels minéraux. Ce SNP est considéré comme la seule mutation réductrice de l'activité enzymatique dont l'impact sur la structure de *NAT2* peut être facilement expliqué. [Pompoe et coll. 2002]. Les mutations c.341 T>C, c.590 G>A, et c.857 G>A sont également des mutations réductrices de l'activité de la *NAT2* par dégradation des protéines cytosoliques [Hein 2002, Zang et coll 2004].

La mutation c.590 G>A est fréquente dans la plupart des populations sauf chez les amérindiens où elle est très rare [Spielberg 1996, Xie et coll. 1997, Sabbagh et coll. 2008]. Les études fonctionnelles de cette variante chez les bactéries, les levures et les cellules de mammifères montrent une réduction de l'activité *NAT2* et du taux de protéines en raison de la

thermostabilité des protéines hébergeant cette mutation [Hein et coll. 1994 et 1995, Fredland et coll. 2001, Svensson et Hein. 2005].

Par contre, le SNP c.803 A>G n'entraîne pas de changements dans l'expression, la stabilité ou l'activité catalytique de la NAT2 [Hickman et coll. 1995, Hein et coll. 2006, Zang et coll. 2007]. Le SNP c.857 G>A est plus fréquente dans la population asiatique que dans les autres groupes de sujets [Grant et coll. 1997].

Ainsi, les résultats suggèrent que le phénotype lent de la NAT2 n'est pas exprimé de façon homogène dans l'organisme mais serait plutôt lié à divers mécanismes fonction de la nature des SNP et des allèles. Certaines mutations entraînent une dégradation de la protéine NAT2 donc une diminution de la teneur en protéine fonctionnelle mais dans ce cas, l'effet fonctionnel sur le médicament ou la drogue ne change pas ; d'autres entraînent une altération de l'affinité de la NAT2 pour les xénobiotiques avec des effets fonctionnels pouvant être observés [Lubin et coll. 2007].

Les mutations c.282 C>T, c.341 T>C, c.481 C>T, c.590 G>A et c.803 A>G ont été retrouvées à des fréquences élevées chez les sujets sains et chez les patients atteints de tuberculose. Ces mêmes mutations sont retrouvées à des fréquences similaires chez les caucasiens [Roots et coll. 1992], les asiatiques [Deguchi et coll. 1990] et chez d'autres sujets africains (Bissau guinéens, maliens et sud africains) [Ebisawa et coll. 1991, Bell et coll. 1993, Deloménie et coll. 1996, Cavaco et coll. 2003, Dandara et coll. 2003]. Cependant, le SNP c.590 G>A est retrouvé chez les sujets atteints de tuberculose à une fréquence plus élevée que chez les sujets sains ( $p < 0,05$ ). Cette mutation a été déjà mise en évidence chez des sujets nigériens à des taux de 30 % [Ebeshi et coll. 2011]. Cette même mutation a été retrouvée par Singh et coll. en 2009 dans une population indienne atteinte de tuberculose à une prévalence de 32 % [Singh et coll. 2009]. La mutation c.590 G>A est responsable d'une diminution de l'activité enzymatique de la NAT2, entraînant ainsi une prise en charge de la métabolisation de l'IHN chez les traités par cette molécule par la voie des CYP1A2 avec formation d'hydroxylamine, hépatotoxique [Noda et coll. 1983, Lauterburg et coll. 1985].

La mutation c.638 G>A n'a pas été détectée chez les sujets atteints de tuberculose. Le SNP c.638 G>A est une mutation rare dont l'effet sur l'activité enzymatique de la NAT2 reste encore inconnu.

L'implication de ces SNP dans les risques de survenue de certaines maladies a été déjà prouvée [Hein et coll. 1994 et 1995 ; Fredland et coll. 2001 ; Zang et coll. 2004]. Des études ont montré que la mutation c.341 T>C codant pour l'allèle *NAT2\*5*, est fortement incriminée dans la survenue du cancer du sein chez les sujets fumeurs (tabagiques) due à une forte réduction de l'activité enzymatique de la protéine [van der Hel et coll. 2003].

Un total de 36 allèles a été retrouvé chez les 201 sujets testés. A côté de l'allèle sauvage *NAT2\*4*, les allèles *NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7*, *NAT2\*12*, *NAT2\*13* et *NAT2\*14* ont été mis en évidence. L'allèle *NAT2\*6A* est plus fréquent chez les patients tuberculeux avec des fréquences de 18,8 %. Cet allèle a été retrouvé chez 33 % nigériens sains [Ebeshi et coll 2011]. Chez les américains, les arabes, les indiens et les noirs africains du sud, l'allèle 4 est plus fréquent, suivi de l'allèle 6 [Hiratsuka et coll. 2002, Kukongviriyapan et coll. 2003, Chen et coll. 2006, Yuliwulandari et coll. 2008].

L'allèle *NAT2\*14*, codé par le SNP c.191 G>A, a été retrouvé chez 10 % des sujets testés (sains et tuberculeux). Cette allèle est spécifique des africains et n'est pas retrouvée chez les autres populations [Ebisawa et Deguechi 1991, Bell et coll. 1993, Dandara et coll. 2003].

Les différents génotypes observés ont permis de classer les sujets en acétyleurs lents et en acétyleurs rapides. Chez les 201 sujets génotypés (105 sujets sains et 96 malades tuberculeux), les deux groupes sont répartis de façon presque équivalente avec 48.2 % et 48,8 % d'acétyleurs lents et rapides respectivement. Cependant, 3 % des sujets sont restés non classés car possédant des allèles d'activité fonctionnelle inconnue.

Chez les tuberculeux, la répartition est la même avec 49 % d'acétyleurs lents et rapides. Nos résultats sont différents de ceux obtenus chez les populations de la Nouvelle-Guinée qui enregistrent 100 d'acétyleurs rapides [Bell et coll. 1993]. Chez les asiatiques, entre 60 et 90 % sont des acétyleurs lents avec des différences ethniques observées en fonction des localités : 74 % d'acétyleurs lents chez les indiens du sud [Anitha et Banerjee 2003], 73 % des populations de Hong Kong [Magalon et coll. 2008] et 58 % des sujets de Singapour [Lin et coll 1993]. Chez les caucasiens, 30 à 70 % sont des acétyleurs lents [Furet et coll. 2002, Patin et coll. 2006].

En Afrique, plus de 90 % des marocains [Danadara et coll. 2003], 50 % des algériens [Khelil et coll. 2007] sont des acétyleurs lents. Patin et coll, 2006 ont trouvé chez des populations africaines des taux d'acétyleurs lents et rapides divers en fonction des origines



avec des génotypes à effet fonctionnel inconnu. En Somalie, 70 % des sujets sont des acétyleurs rapides, chez les pygmées du Cameroun et du Gabon, 54,8 % et 56,6 % sont respectivement des acétyleurs rapides [Patin et coll. 2006].

La NAT2 assure, à côté du CYP1A2, la détoxification des amines aromatiques et des risques de toxicité de différents organes peuvent être observés chez les individus en fonction du profil d'acétylation [Badawi et coll. 1995].

Nous avons obtenu des discordances entre les deux méthodes utilisées. Mais l'accord obtenu entre les deux tests biologiques correspond à 78,17 % de l'accord maximal qu'il pourrait atteindre. Donc nous pouvons conclure que le degré d'accord entre les deux méthodes est bon selon Landis et Koch qui ont proposé un classement de l'accord en fonction de la valeur de Kappa [Landis et Koch 1977]. O'Neil et coll. ont trouvé une discordance de 56 % entre le phénotypage et le génotypage dans une population américaine atteinte de SIDA [O'Neil et coll. 2000]. Une discordance de 86 % est également retrouvée chez des sujets de Minnesota en Amérique [Straka et coll. 2006]. D'autres études ont trouvé des discordances variant entre 2 % et 7 % [Blum et coll. 1991, Hickman et Sim 1991, Graf et coll. 1992, Mrozikiewicz et coll. 1994, Cascorbi et coll. 1995, Gross et coll. 1999].

Cette discordance n'est pas due à des défaillances dans les différentes phases de traitement de laboratoire car les différentes étapes de la phase pré-analytique ont été respectées et l'acidification des urines après collecte a été effectuée. Pour le génotypage, le séquençage direct est une méthode de détermination précise des SNP qui permet de mettre en évidence les différentes mutations et allèles de la NAT2 ; alors que les autres méthodes telles que la PCR-RFLP sont incapables de préciser les polymorphismes bialléliques avec 2 ou plusieurs SNP [Hosking et coll. 2004].

Cette discordance peut être due aux polymorphismes situés dans la région régulatrice non codante du gène. En effet, si les SNP situés dans la région non codante perturbent la qualité ou la quantité de la protéine, le phénotype métabolique peut être affecté, indépendamment de l'analyse complète des SNP de la région codante [Boukouvala et coll. 2005, Straka et coll. 2006] d'autant plus que le séquençage direct utilisé est limité à la région codante.

Le phénotype peut aussi être influencé par un certain nombre de facteurs, y compris l'alimentation, les maladies et la pharmacothérapie. Selon la pro-drogue test et le procédé

analytique utilisé, les phénotypes d'acétylation ne sont souvent pas clairement séparés mais présentent une variabilité continue et se chevauchent en raison de nombreux facteurs génétiques et / ou environnementaux, y compris le grand nombre et la diversité des génotypes NAT2 présents chez l'homme [Cartwright et coll. 1982, Cascorbi et coll. 1995, Cascorbi et Roots 1999]. La caféine est plus généralement utilisée comme une sonde d'investigation pour la détermination du phénotype NAT2 [Grant et coll. 1984] et des corrélations de génotype/phénotype NAT2 excellentes ont été rapportées [Cascorbi et coll. 1995, Grant et coll. 1997]. Bien que l'administration de caféine soit une méthode relativement non envahissante pour déterminer le phénotype d'acétylation de la NAT2, cette méthode exige la quantification de métabolites secondaires avec les intermédiaires clés qui sont inconnus.

De même, des effets génétiques et/ou environnementaux d'autres systèmes enzymatiques (par exemple, le cytochrome P450 ou la xanthine oxydase) peuvent affecter les niveaux des métabolites utilisés dans la détermination du phénotype [Cribb et coll. 1994].

Ainsi, nous remarquons que les enzymes du métabolisme sont génétiquement régulées. La présence d'une mutation sur une enzyme peut engendrer des variants à activité catalytique importante, intermédiaire ou dans certains cas à la réduction ou à la suppression totale de l'activité. Par conséquent, la variabilité pharmacogénétique et toxicogénétique doit être prise en considération lors de la détermination des paramètres cinétiques des substances médicamenteuses pour une utilisation sécuritaire.

**3.9. Article 2: « Study of NAT2 genetic polymorphism in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population”**

|

|

|

|







|

|

#### **IV. ETUDE DE LA CINETIQUE DE L'INH CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE TUBERCULOSE**

Le concept de la médecine personnalisée est apparu comme un des moyens d'améliorer la réponse thérapeutique et de minimiser les effets indésirables des médicaments. D'importantes variations fonctionnelles et polymorphiques de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments ont maintenant été identifiées avec une influence sur la concentration systémique du médicament. La *N*-acétyltransférase 2 est un élément important du métabolisme de biotransformation de l'INH, et a d'abord été reconnue chez les patients atteints de tuberculose traités avec cet antibiotique. [Evans et coll. 1960, Kubota et coll. 2007].

Plus de 50 ans après son introduction, l'isoniazide, qui est métabolisé par la NAT2, reste l'un des médicaments de base utilisés dans le traitement de la tuberculose, en combinaison avec d'autres molécules, ou encore seul comme agent prophylactique. La tuberculose est aujourd'hui ré-émergente et considérée comme une question majeure de santé publique, causant environ 1,7 million de décès dans le monde en 2010 [WHO 2011]. Au Sénégal, environ 12.000 nouveaux cas d'infection tuberculeuse sont recensés par an avec 65 % de localisation pulmonaire contagieux et 2 à 4 % de mortalité [Rapport PNT 2008]. Grâce au recours à des protocoles thérapeutiques très efficaces (comme le traitement directement supervisé ou TDO ou directly observed therapy qui utilise l'association de différentes molécules en auto-administration) et à la prise en charge gratuite du traitement pour tous les malades sans exclusive, le Sénégal a enregistré un taux de succès thérapeutique qui est passé de 64 % en 2002, à 72 % en 2005 et à 85 % en 2007 [Rapport PNT, Sénégal 2008].

Malgré ce succès fort appréciable dans la lutte contre la tuberculose qui place notre pays parmi les premiers en Afrique, la prise en charge de la maladie reste toutefois confrontée à plusieurs contraintes qui fragilisent les objectifs du programme national sénégalais (PNT) centrés autour d'un dépistage à hauteur de 70 % et d'une guérison frôlant le taux de 85 % (Rapport PNT, Sénégal 2008). L'absence de connaissances sur le profil du phénotype d'acétylation de l'isoniazide (INH) chez les sénégalais constitue une lacune qui peut altérer la bonne réussite du protocole de traitement de cette maladie. En effet l'isoniazide est un médicament de choix de première ligne, utilisé dans le traitement de la tuberculose.

En dépit des doses de médicaments prescrites avec un schéma thérapeutique multidrogue (pyrazinamide, isoniazide, éthambutol, rifampicine), les patients présentent une grande variation des concentrations plasmatiques et les réactions indésirables aux médicaments tels que l'hépatite sont souvent observées [Eichelbaum et coll. 1992]. Les

patients qui sont acétyleurs lents sont connus pour être à risque de la plupart des toxicités induites par les médicaments, tandis que les acétyleurs rapides peuvent subir un échec thérapeutique. Par conséquent, les études de l'influence des génotypes de la NAT2 sur la capacité de métabolisme de l'isoniazide peuvent aider à personnaliser et optimiser les schémas thérapeutiques en les rendant thérapeutiquement plus efficaces tout en réduisant les effets indésirables liés à l'utilisation de ce médicament [Weinshilboum 2003].

La connaissance du profil d'acétylation de l'INH dans la population sénégalaise constitue donc un outil pharmacologique et toxicologique indispensable dans la lutte contre la tuberculose.

Les travaux de cette thèse ont permis d'étudier les différentes mutations de la NAT2 retrouvées les sujets atteints de tuberculose et qui ont été relatés dans le chapitre 3 de ce document. La cinétique de l'INH a été aussi étudiée chez ces malades atteints de tuberculose afin de proposer un schéma thérapeutique utilisable dans la prise en charge efficace de cette maladie.

#### **4.1. Recrutement de patients atteints de tuberculose et échantillonnage de sang hépariné**

Le recrutement des patients atteints de tuberculose a été effectué en collaboration avec le service de pneumo-phtisiologie du centre hospitalo-universitaire de Fann (Dakar) après consentement écrit des patients et sur présentation de l'autorisation du comité éthique. Soixante dix neuf (79) patients atteints de tuberculose, composés de 45 hommes et de 34 femmes ont été inclus dans l'étude. Ils étaient tous nouvellement diagnostiqués positifs aux bacilles de Koch, naïfs de tout traitement antibiotique, et le prélèvement a été effectué par ponction veineuse sur tube hépariné à T3 heures et à T6 heures après administration par voie orale de 5 mg d'isoniazide par kg de poids corporel (Isoniazid Tablets BP 100 mg de Macleods Pharmaceuticals LTD). Les patients présentant une insuffisance hépatique ou rénale susceptible de modifier le métabolisme ou l'élimination du médicament ont été écartés. Les sérums ont été récupérés après centrifugation juste après le prélèvement et conservés à – 80 °C jusqu'au moment des manipulations.

## **4.2. Méthodes analytiques**

Le dosage de l'isoniazide (INH) et de son métabolite l'acétylisoniazide (AcINH), ont été réalisés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/MS-MS) qui est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Une unité UPLC/MS-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide et un spectromètre de masse. L'UPLC/MS-MS est une technique de chromatographie liquide permettant la séparation des constituants d'un mélange. Elle repose sur l'emploi de phases stationnaires composées de particules de diamètre inférieur ou égal à 2µm (contre 3 à 5 µm en CLHP). Cette diminution de taille des particules permet d'utiliser des gammes de débit plus grandes que la CLHP tout en conservant une bonne efficacité. Le spectromètre de masse brise pour cela chaque molécule en fragments ionisés et détecte ses fragments en fonction de leur rapport masse sur charge.

### **4.2.1. Principe de la chromatographie et de la spectrométrie de masse**

L'UPLC/MS-MS repose sur le même principe que la CLHP : les composés à analyser sont injectés sous forme liquide et poussés par une phase mobile liquide dans la colonne. Ils vont y être séparés grâce aux interactions entre les solutés, la phase mobile et la phase stationnaire. Il en résulte un temps de rétention qui permet de caractériser les pics correspondant aux molécules sur un chromatogramme. Les molécules, une fois séparées, sont ensuite dirigées vers le spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse est une technique physique permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Un spectromètre de masse se compose de quatre parties :

- Le système d'introduction dans lequel l'échantillon est injecté directement (infusion) ou indirectement (chromatographie) dans le spectromètre de masse ;
- La source d'ionisation qui permet d'ioniser les molécules afin d'obtenir un rapport masse sur charge ( $m/z$ ) ;
- L'analyseur sépare les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  ;

- Le détecteur permet la transformation du courant ionique en courant électrique.

- L'ionisation par électrospray permet la formation de microgouttelettes de soluté à l'extrémité d'un fin capillaire, porté à un potentiel élevé. Ces microgouttelettes vont se charger par gain (électrospray+ ou ES+) ou perte (électrospray- ou ES-) d'un proton et, sous l'effet d'un gaz, vont subir une désolvatation. Les ions vont être guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués à un cône d'échantillonnage jusqu'à l'analyseur.

- Le détecteur MS/MS est constitué de 2 analyseurs quadripolaires séparés par une cellule de collision soumise à une tension déterminée et dans laquelle est injecté un gaz de collision (l'argon), ceci dans le but de provoquer une fragmentation donnant des ions fils, qui seront séparés ensuite par le second quadripôle.

Ainsi, la spectrométrie de masse en tandem permet divers modes de fonctionnement et d'acquisition :

- Le mode « balayage » ou « scan » utilise le premier quadripôle et permet de balayer une gamme de masses définie afin d'obtenir le spectre de masse de chaque pic. Il trouve son intérêt dans le screening et les études structurales.

- Le mode « daughter scan » utilise le premier quadripôle en tant que filtre de masse et le second quadripôle en mode balayage afin de déterminer, après fragmentation dans la cellule de collision, un spectre d'ions fils (tableau XVII).

- Le mode « Multiple Reaction Monitoring » ou MRM : dans ce mode de détection, les deux analyseurs MS1 et MS2 sont réglés pour contrôler une masse sélectionnée. Les ions sélectionnés par MS1 ne sont détectés que s'ils produisent un fragment donné par une réaction choisie. L'absence de balayage autorise un temps d'acquisition plus grand du précurseur et des ions fragments, ce qui confère à la technique une grande sensibilité associée à une forte augmentation de la sélectivité.



#### **4.2.2. Appareillage**

La séparation chromatographique a été réalisée sur un chromatographe Liquide Ultra Performance (UPLC) Acquity (waters Corporation, Milford, Ma, USA), équipé d'une colonne HSS C18 2,1 x 150 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  (Waters Corporation). L'UPLC est couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Xevo TQD (Waters Corporation) muni d'une interface electrospray. Le logiciel de pilotage du système est le logiciel MassLynx V4.1 (Waters Corporation).

#### **4.2.3. Réactifs**

Tous les réactifs utilisés sont de qualité CLHP grade. Le méthanol proviennent de VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois (France), l'acétonitrile, l'eau désionisée de Biosolve (France), l'acide formique, le formiate d'ammonium et la  $\beta$  hydroxy éthyl théophylline de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

L'INH et l'AcINH ont été également achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

#### **4.2.4. Méthode analytique**

Nous avons utilisé une technique qui a été déjà validée au laboratoire de Toxicologie du Centre de Biologie Pathologie (CBP) pour le dosage des médicaments dont l'INH.

La méthode est linéaire de 0,1 mg/L à 20 mg/L; sa limite de quantification (LOQ) correspond au point bas de la calibration soit 0,1 mg/L.

##### **4.2.4.1. Préparation des échantillons**

Pour tenir compte des pertes inhérentes lors des manipulations et des variations d'acquisition, le dosage a été réalisé en présence d'un étalon interne (EI) ( $\beta$  hydroxy éthyl théophylline à 16 mg/L dans du méthanol) qui a été ajouté avant les différentes étapes de traitement de l'échantillon.

Des aliquotes de 100  $\mu\text{L}$  de sérum ont été déprotéinisés par ajout de 350  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile en présence de 50  $\mu\text{L}$  d'étalon interne. Les tubes ont été agités au vortex pendant 30 sec et centrifugés pendant 5 min à 10000 tpm. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  du surnageant a été ensuite prélevé et dilué dans 900  $\mu\text{L}$  de phase mobile. Après agitation, 10  $\mu\text{L}$  de ce mélange final ont été injectés dans l'UPLC-MS/MS.

#### 4.2.4.2. Conditions chromatographiques

La phase mobile est constituée d'un mélange de formiate d'ammonium à 5 mM pH 3 (A1) et d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (B1) (95/5 ; v/v) et le débit de la phase mobile est de 0,4 ml/min selon un gradient de 95 % de A1 et 5 % de B1 pendant 5 mn, ensuite 5 % de B1 et 95 % de A1 à partir de la 5<sup>ème</sup> min et à partir de la 7<sup>ème</sup> min, retour aux conditions initiales (95 % de A1 et 5 % de B1). La température de la colonne a été maintenue à 50°C.

#### Paramètres d'acquisition

Les paramètres d'acquisition utilisés sont :

- Tension capillaire : 3 KV
- Température de source : 140 °C
- Température de solvatation : 500 °C
- Débit de gaz : 1000 litres/ heure
- Cône de gaz : 50 litres /heure
- Ionisation : electrospray positif
- Acquisition : mode MRM (voir tableau XVII)

**Tableau XVII** : Paramètres MRM de l'INH, l'AcINH et d'EI

Molécule	MM* (g/mol)	Transition MRM	Energie de collision (eV)	Tension de cône (V)
Isoniazide (INH)	137	138 > 79.1	24	30
		138 > 121	12	
Acétylisoniazide (AcINH)	179	180 > 121	22	30
		180 > 138	14	
EI (β hydroxy éthyl théophilline)	224	225 > 124	25	35
		225 > 181	19	

\*MM = Masse molaire

#### 4.2.5. Calcul de l'indice d'acétylation

Pour répartir les patients atteints de tuberculose en acétyleurs rapides et lents, nous avons utilisé la méthode de Vivien et coll [Vivien et coll. 1973]. Cette méthode consiste à calculer l'indice d'acétylation en fonction de la concentration plasmatique en l'INH à la 3<sup>ème</sup> heure (T3h) après une prise orale. Vivien et coll ont montré qu'il existait une corrélation linéaire entre la dose d'INH (per os) et la concentration plasmatique en INH : le rapport dose / concentration est constant pour chaque patient ; la pente des droites dose / concentration a une valeur différente pour chaque patient : c'est l'indice d'acétylation I<sub>3</sub>.

$$I_3 = (C_3 + 0,6) / \text{dose (mg/kg)}$$

Avec C<sub>3</sub> = concentration plasmatique de l'INH à la 3<sup>ème</sup> heure, en mg/L

Pour interpréter les résultats, une valeur médiane de I<sub>3</sub> a été considérée :

I<sub>3</sub> < 0,45 : acétyleur rapide

I<sub>3</sub> = 0,45-0,65 : acétyleur intermédiaire

I<sub>3</sub> > 0,65 : acétyleur lent

L'indice d'acétylation permet ensuite de déterminer la dose quotidienne d'INH permettant d'obtenir une concentration recommandée d'INH de 1,5 µg/mL à la 3<sup>ème</sup> heure.

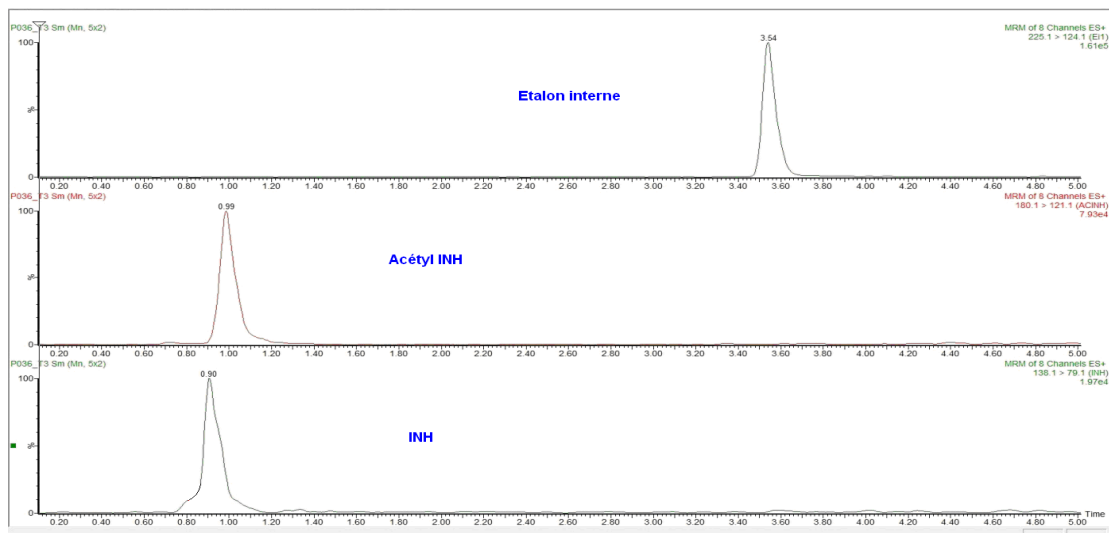
$$\text{Dose quotidienne en mg/24h} = [\text{poids (kg)} \times (0,6 + C_3)] / I_3 = [\text{poids (kg)} \times (0,6 + 1,5)] / I_3$$

### 4.3. Résultats

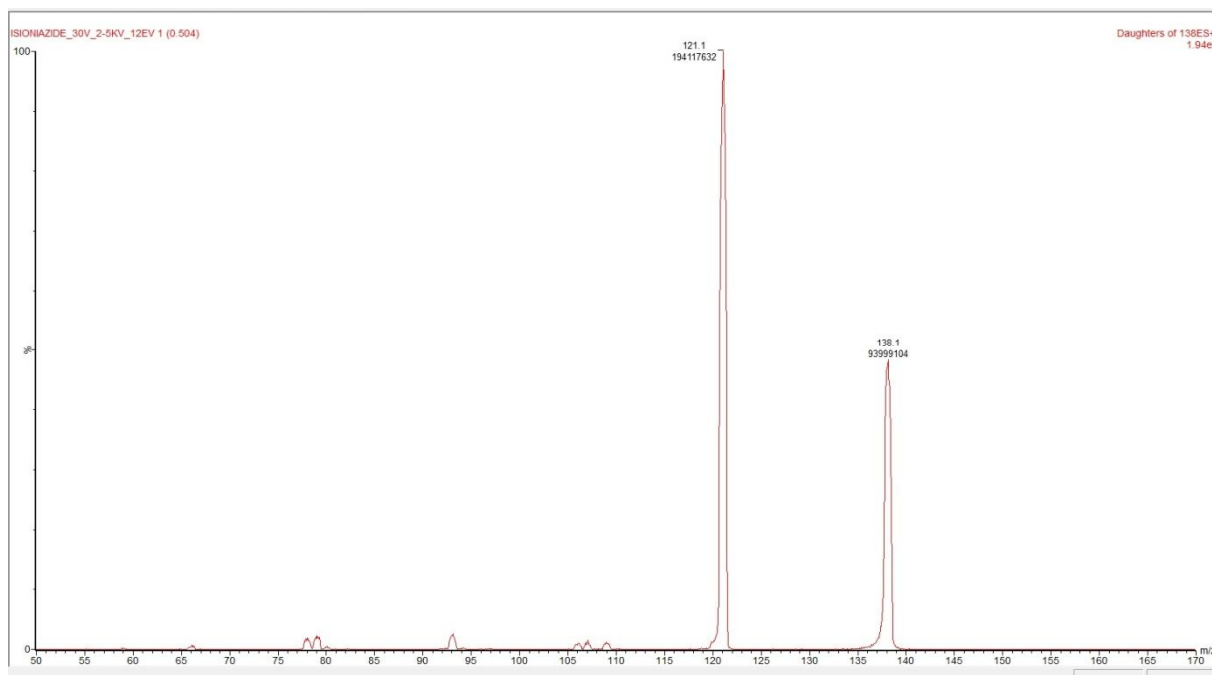
Les sujets tuberculeux testés étaient âgés de 18 à 74 ans avec une moyenne d'âge de  $31 \pm 11$  ans. Le sexe ratio était de 1,2 en faveur des hommes (57 % d'hommes et 43 % de femmes).

Dans les conditions analytiques appliquées, l'INH a été éluée à un temps de rétention de 0,90 min environ, l'AcINH à 0,98 min et l'EI à 3,54 min (voir figure 19).

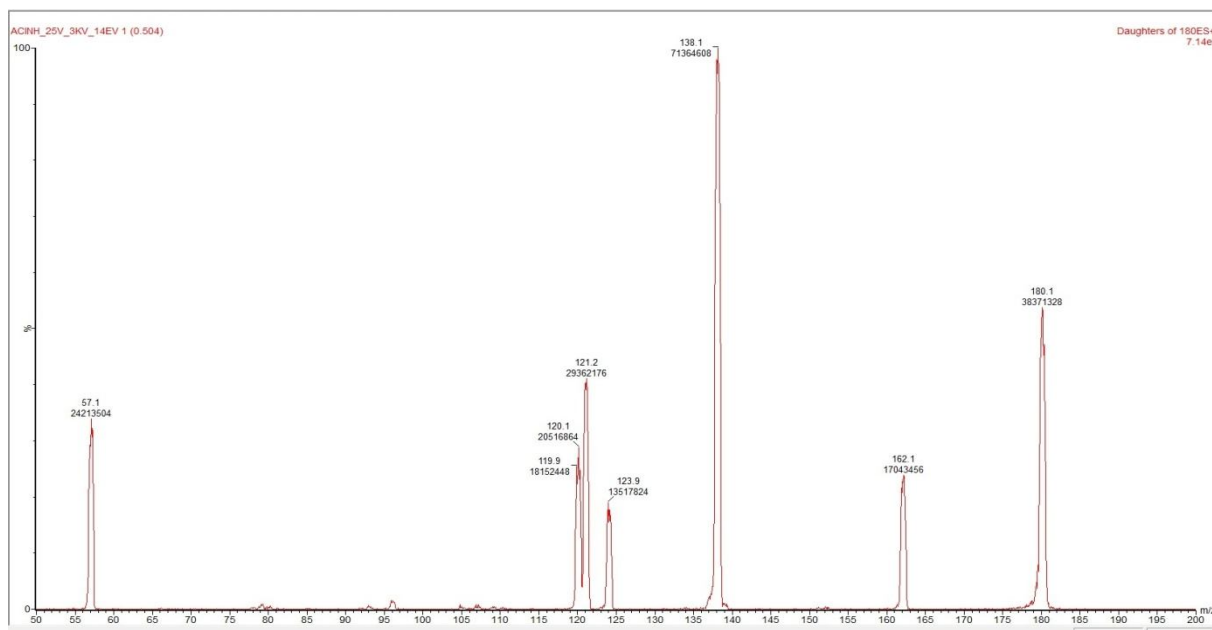
L'acquisition du spectre de masse avec une tension de cône 30 V, a permis de former l'ion moléculaire protoné  $[M + H]^+$  de rapport  $m/z = 138$  pour l'isoniazide et  $m/z = 180$  pour l'AcINH (figure 20).



**Figure 19** : Chromatogramme d'un échantillon de sérum analysé par LC-MS/MS.



**Figure 20a** : Acquisition en mode daughter scan de l'INH



**Figure 20b** : Acquisition en mode daughter scan de l'AcINH.

Les concentrations d'INH obtenues après administration par voie orale de 5 mg/kg de poids corporel ont varié entre 1,10 mg/L et 13,10 mg/L avec une moyenne de  $4,78 \pm 3,03$  mg/L pour l'isoniazide à la 3<sup>ème</sup> heure et entre 0,1 et 9,5 mg/L à la 6<sup>ème</sup> heure. Celles de l'acétylisoniazide étaient comprises entre 0,1 et 3,7 à la 3<sup>ème</sup> heure et entre 0,1 et 2,2 à la 6<sup>ème</sup> heure (tableau XVIII).

**Tableau XVIII** : Concentration plasmatique de l'INH et de l'AcINH à la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> heure chez les 79 sujets tuberculeux

	T3 heures (mg/L)	T6 heures (mg/L)
Isoniazide	4,78 ± 3,03 (1,10 - 13,10)	2,60 ± 1,97 (0,1 - 9,5)
Acétylisoniazide	1,34 ± 0,96 (0,1 - 3,7)	0,56 ± 0,5 (0,1 - 2,2)

L'utilisation de l'indice d'acétylation I<sub>3</sub> a permis de répartir les patients testés en deux groupes phénotypiques: acétyleurs lents et acétyleurs rapides. Nous avons obtenu chez ces patients atteints de tuberculose, 44,3 % d'acétyleurs rapides et 55,7 % d'acétyleurs lents.

Le tableau XIX nous donne les concentrations de l'INH et de l'AcINH à T3 heures et à T6 heures chez les patients tuberculeux en fonction de leur profil d'acétylation.

A T3 heures, les concentrations d'INH ont varié entre 2,8 et 13,1 mg/L chez les acétyleurs lents et entre 1,3 et 3,5 mg/L chez les acétyleurs rapides. Les concentrations de son métabolite AcINH, étaient comprises entre 0,2 et 3,7 selon le profil d'acétylation.

A T6 heure, la concentration de l'INH était comprise entre 0,1 et 2,2 mg/L chez les acétyleurs lents et entre 0,1 et 1,2 mg/L chez les acétyleurs rapides.

**Tableau XIX** : Concentration plasmatique de l'INH et de l'AcINH à la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> heure en fonction du profil d'acétylation

	Acétyleurs Lents		Acétyleurs rapides	
	T3 heures (mg/L)	T6 heures (mg/L)	T3 heures (mg/L)	T6 heures (mg/L)
<b>Isoniazide</b>	6,79 ± 2,70 (2,8 - 13,10)	3,5 ± 2,25 (0,1 - 9,5)	2,37 ± 0,6 (1,3 - 3,5)	1,53 ± 0,67 (0,5 - 3,1)
<b>Acétylisoniazide</b>	1,52 ± 0,60 (0,2 - 3,7)	0,77 ± 0,6 (0,1 - 2,2)	1,13 ± 0,8 (0,2 - 3,1)	0,41 ± 0,32 (0,1 - 1,2)

#### 4.4. Corrélation polymorphisme génétique de la NAT2 – cinétique de l’INH

**Tableau XX** : Proportions jointes des résultats de génotypage et de phénotypage chez 77 patients atteints de tuberculose

		Génotypage		
		Lent	Rapide	Total
Phénotypage	Lent	35 (a)	7 (b)	42 (n1)
	Rapide	9 (c)	26 (d)	35 (n2)
	Total	44 (n3)	33 (n4)	77

Le coefficient de concordance Kappa k est de 58 % entre la méthode de phénotypage utilisant l’indice d’acétylation et la méthode de génotypage par PCR ; avec deux indéterminés au génotypage (lent au phénotypage) qui n’ont pas été pris en compte.

#### 4.5. Discussion

Durant ces deux dernières décennies, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) s'est avérée une puissante technique pour la caractérisation de la structure de métabolites inconnus présents dans des échantillons biologiques et leur quantification et elle est largement utilisée dans les études de métabolisme. Ces diverses applications, tant qualitatives que quantitatives, sont liées à ses caractéristiques : sensibilité et spécificité [Ng et coll. 2007, Fang et coll. 2010]. Cependant, la technique est composée d'appareillage lourd et coûteux pour beaucoup de laboratoires ; d'où l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance couplée à une barette de diodes en routine pour le dosage des médicaments et pour le suivi thérapeutique des patients à risque [Zhou et coll. 2010, Ayyappan et coll. 2011].

La distribution de patients atteints de tuberculose a été faite en fonction de l'indice d'acétylation et a donné 44,3 % d'acétyleurs rapides et 55,7 % d'acétyleurs lents chez les sujets atteints de tuberculose.

Cette distribution rejoint celle que nous avons eue chez les sujets sains. En Afrique du sud, une étude menée chez des enfants atteints de tuberculose a donné 39 % d'acétyleurs lents et 61 % d'acétyleurs rapides [Schaaf et coll 2005]. Mais, cet auteur avait utilisé une dose de 10 mg/kg de poids corporel en se basant sur les recommandations internationales telles que l'Académie Américaine de Pédiatrie stipulant que l'enfant doit recevoir plus de drogue pour plus de prudence et pour s'assurer que les enfants acétyleurs rapides disposent d'une dose adéquate d'INH afin que tous les compartiments de l'organisme soient correctement imprégnés [American Academie of Pediatrics, 2003]. Dans notre étude, nous avons exclu les enfants de moins de 15 ans pour une meilleure harmonisation des résultats.

La cinétique de l'INH après administration par voie orale d'une dose de 5 mg/kg de poids corporel a permis de calculer les moyennes des concentrations d'INH et d'AcINH à T3h et T6h.

Le point coïncidant à 3 heures après administration (T3h) correspond aux conditions optimales après l'administration de dose de 5 mg/ml d'INH pour étudier l'indice d'acétylation ; car correspondant au temps auquel le ratio de la concentration du métabolite et celle de la molécule mère existe de façon stable pour les acétylateurs lents [Hutchings et Routledge 1986, Machimo et coll. 1992, Smith et coll. 1997].



Les valeurs des paramètres cinétiques ( $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ ,  $T_{1/2}$ , AUC et  $C_{\max}$ ) n'ont pas été calculées dans cette étude parce que le nombre de points obtenus étaient faibles (2 points T3h et T6h). Cependant, l'étude des concentrations moyennes chez les acétyleurs lents et les acétyleurs rapides nous permet de voir si la concentration d'INH obtenue en fonction des profils d'acétylation est située dans la zone des concentrations actives d'INH.

La diminution de la concentration d'INH dans le sang n'est pas directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration plasmatique d'AcINH. Ceci est dû à l'effet de premier passage hépatique subis par le médicament et son métabolite avec un indice linéaire de l'activité de l'enzyme. Ce constat a permis d'avoir une vision plus claire de l'utilisation du ratio molécule / métabolite pour la répartition de la population en fonction de la vitesse d'acétylation [Jackson et coll. 1986]. Ainsi, plusieurs chercheurs ont utilisé le ratio [AcINH] / [INH] comme paramètre de choix pour la détermination du phénotype d'acétylation [Hutchings et Routledge 1986, Mashimo et coll. 1992, Smith et coll. 1997, Ellard et coll. 1993, Pariente-Khayat et coll. 1997].

Des études ont montré qu'une concentration d'INH comprise entre 3 et 5 mg/L était souhaitée T 2 heures après l'administration du médicament [Peloquin 1992] ; alternativement il a été suggéré qu'une concentration de 1,5 mg/l à T 3 heures est désirable pour obtenir une quantité de médicament efficace contre les mycobactéries [Vivien et col. 1958]. Mais les cas d'association des médicaments tels que la rifampicine ne doivent pas être négligés. En effet, en présence de régime multithérapeutique, les différences démontrées entre les phénotypes lents et les phénotypes rapides d'INH ne vont pas probablement être d'ordre thérapeutique mais plutôt toxique [Ellard 1984]. Cependant, en présence de refus d'observance, [Mitchison 1998] de malabsorption du médicament, [Peloquin 1996], ou la thérapie intermittente largement espacée [Weiner et coll. 2003 et 2005], l'échec thérapeutique peut être bien justifié chez les acétyleurs rapides. Ainsi, le choix de la dose la plus appropriée d'INH pour obtenir une bonne efficacité doit être équilibrée avec la possibilité de toxicité du médicament en fonction du profil d'acétylation de la NAT2.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent des concentrations supérieures aux valeurs recommandées à T3 heures aussi bien chez les acétyleurs lents que chez les acétyleurs rapides. Il est donc possible de penser qu'une dose inférieure à 5 mg/kg de poids corporel devrait être considérée dans le traitement de la tuberculose au Sénégal pour éviter surtout des phénomènes de toxicité liés au phénotype lent.

En tenant compte de la littérature et des études antérieures menées sur des patients atteints de tuberculose, une dose de 3 mg/kg peut être proposée pour les acétyleurs lents et une dose de 6 mg/kg pour les acétyleurs rapides ; ceci dans le but d'atteindre les concentrations bactéricides de l'INH et éviter en même temps les cas de toxicité hépatique et neuro-phérophérique [Tuberculosis Chemotherapy Centre 1963, Ohno et coll. 2000, Hiratsuka et coll. 2002].

Dans notre étude, la concordance entre le génotypage et le phénotype par étude de la concentration plasmatique de l'INH et des ratios métaboliques à 3 heures après la dose a donné un coefficient de concordance Kappa (k) de 58 %. Ce résultat correspond à une concordance modérée entre les deux techniques. Ceci suggère que les concentrations plasmatiques d'INH sont :

- soit basses en raison de l'augmentation acetylation du médicament et par conséquent aussi des métabolites, chez les phénotypes acetylateurs rapides ;
- soit il existe une divergence entre la concentration plasmatique de l'INH et le ratio métabolique liée à une mauvaise absorption du médicament.

Le débat a été toujours compliqué quand il est devenu clair qu'il y avait des différences significatives entre des individus dans leur capacité d'éliminer l'INH [Bönicke et Reif 1953, Hughes 1953]. Ainsi à cause des différences considérables de réponse à l'exposition à l'INH, il est urgent pour chaque pays, d'étudier le profil de sa population dans l'intérêt de disposer des éléments de suivi des conséquences thérapeutiques et toxiques possibles liées à l'utilisation de certains médicaments et de certaines associations de drogues.

Quelle que soit la raison, les concentrations plasmatiques de l'INH peuvent être un indicateur pour l'ajustement des doses à administrer pour une amélioration de la réponse clinique. Le profil d'acétylation des individus fournit des informations de valeur sur leurs réponses thérapeutiques, pharmacologiques et toxicologiques et constitue un paramètre de pronostic de la sensibilité inhabituelle à la toxicité de médicaments ou drogues utilisés dans le traitement de diverses maladies.

**4.6. Article 3 : Génotypage de la NAT2 chez des sujets sénégalais atteints de tuberculose : corrélation avec la cinétique de l'INH : en rédaction**

## **DISCUSSION GENERALE**

La sensibilité individuelle aux médicaments et autres xénobiotiques est due en partie au polymorphisme génétique affectant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Le premier objectif de ce travail était d'évaluer l'étendue et la nature du polymorphisme génétique de la NAT2 dans la population sénégalaise.

La N-acétyltransférase est responsable du métabolisme des xénobiotiques, et des substances carcinogènes dont celles présentes dans l'environnement, dans le tabac et dans l'alimentation. Leur déficit total ou partiel conduit à un défaut de détoxification avec un effet génotoxique, favorisant ainsi l'apparition de certaines maladies dont les cancers.

Le polymorphisme d'activité de la NAT2 a fait l'objet d'une recherche intense ces dernières années. L'intérêt porté à l'étude de cette enzyme se justifie par son rôle majeur dans le métabolisme des substances arylamines et hydrazines et des conséquences cliniques qui en découlent. Ce polymorphisme est aussi lié à une augmentation de la susceptibilité à la toxicité à certains médicaments et au risque de cancérisation due aux amines aromatiques, aux hétérocycliques et aux hydrazines cancérogènes [Hein et coll. 2000].

Les patients présentant un déficit d'activité NAT2 ont un risque accru de développer, sous traitement avec certaines substances comme l'isoniazide, une toxicité hépatique, neurologique ou un lupus érythémateux systémique pouvant être fatal, alors que les patients à activité NAT2 élevée peuvent présenter un échappement thérapeutique, par métabolisme excessif des doses thérapeutiques des médicaments [Clark 1985].

Dans notre travail, nous avons étudié la répartition des polymorphismes du gène NAT2 codant pour l'enzyme de la N-acétyltransférase intervenant dans la phase II de détoxification, dans une population sénégalaise de sujets sains et de malades atteints de tuberculose. Afin de tester l'existence d'une association entre ces polymorphismes, la cinétique de l'INH, molécule de base de la prise en charge de la tuberculose a été suivie.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité enzymatique de la NAT2 par la méthode à la caféine par utilisation du rapport [AFMU] / [1X] qui sont les principaux métabolites de la caféine pour la ségrégation de la population en acétyleurs lents et rapides. Le phénotypage est indiscutablement la méthode de choix pour connaître à un instant donné la capacité métabolique d'un sujet vis-à-vis d'un substrat donné, et permet ainsi de définir la première dose d'attaque efficace d'un traitement et normalement non toxique [Evans 2002, Regueiro et Mardini 2002, Dubinski 2003]. La Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP, qui présente un taux de sensibilité supérieur à 90 %, est une technique relativement récente de plus en plus utilisée pour étudier le phénotype d'acétylation par des substances « sondes » comme la caféine [Grant et coll. 1984, Khelil et coll. 2007, Straka et coll. 2010].

Le phénotypage de la NAT2 a permis de classer les individus testés en fonction de l'indice d'acétylation. Ainsi, nous avons obtenu sur les 247 sujets sains testés, 63,8 % d'acétyleurs lents et 36,2 % d'acétyleurs rapides. Chez les caucasiens, environ 50 % des sujets sont des acétyleurs lents [Cascorbi et coll. 1997, Meyer et Zanger 1997, Gross et coll. 1999], chez les asiatiques, moins de 30 % sont des acétyleurs lents [Evan 1992, Yu et coll. 1994, Bakayev et coll.2004]. Alors que chez les sujets africains, les rares résultats obtenus sont souvent ceux de génotypage ; les algériens enregistrent 55 % d'acétyleurs lents par la technique de phénotypage [Khelil et coll. 2007], les zimbabwéens, 58 % [Nhachi 1988] et les égyptiens, plus de 90 % [Hashem et coll 1969].

Cependant, la détermination du phénotype NAT2 par phénotypage a, d'une part, des inconvénients liés à la technique elle-même car la mise en œuvre est délicate, et d'autre part, l'activité de la NAT2 peut varier en fonction de certains facteurs tels que l'origine ethnique de l'individu ou des traitements associés. Toutes ces limites justifient l'utilisation du génotypage pour prédire le phénotype des individus. En effet, nos travaux, ainsi que de nombreux autres, a confirmé que le polymorphisme d'activité de la NAT2 était la conséquence de mutations du gène, de fréquence variable en fonction des ethnies.

L'étude que nous avons effectuée a permis de confirmer l'efficacité et la fiabilité de la technique PCR-séquençage pour la détection rapide de mutations chez un grand nombre de sujets. D'autres techniques étaient applicables à cette recherche mais le séquençage reste certainement la méthode la plus directe et la plus précise, même si le risque de manquer une mutation à l'état hétérozygote existe lorsque l'on séquence de l'ADN double brin. Cette technique reste cependant lourde et coûteuse pour l'analyse d'un large panel d'échantillons.

Nous avons démontré que le gène de la *NAT2* est polymorphe dans la population sénégalaise et démontré pour la première fois que, chez les sénégalais, la *NAT2* présente une distribution bimodale avec une répartition des populations en acétyleurs lents et rapides.

Au total, l'analyse des mutations du gène *NAT2* a permis de mettre en évidence et de confirmer 11 anomalies des séquences nucléotidiques déjà décrites, comprenant 4 SNP inactivateurs de la NAT2 avec réduction de l'activité enzymatique (c.191 G>A, c.341 C>T,

c.590 G>A et c.857 G>A). Les SNP C.282 C>T, c.345 C>T, c481 C>T et c.803 G>A sont des mutations synonymes, qui entraînent des changements d'acides aminés mais pas d'effet sur la protéine ou sur l'activité enzymatique. Parmi les mutations identifiées, trois sont d'effet inconnu (c.403 C>G, c.638 C>T et c.838 G>A) et ces SNP correspondent à des mutations rares [Patin et coll. 2006, Teixeira et coll. 2007 et 2010, Sabbagh et coll. 2008].

A côté de ces substitutions nucléotidiques, le gène *NAT2* présente plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs SPN. Parmi les différents allèles du gène *NAT2*, certains sont associés à une activité normale de l'enzyme définissant sur le plan phénotypique, les individus acétyleurs rapides et d'autres, sont associés à une activité diminuée, définissant ainsi les acétyleurs lents, qui sont alors soit homozygotes soit double hétérozygote pour un des allèles acétyleur lent [Deloménie et coll. 1996, Daly 2003, Allorge et Lorient 2004].

Les allèles identifiés dans la population sénégalaise sont le *NAT2\*4*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7*, *NAT2\*12*, *NAT2\*13* et *NAT2\*14*. Ces allèles ont été déjà mis en évidence par d'autres études dans des populations diverses [Grant et coll. 1997, Vatsis et coll. 1997, Ambrosone et fred 1998a, Butcher et coll. 2002]. Leur proportion connaît d'importantes variations selon l'origine ethnique [Garte et coll. 2001, Teixeira et coll. 2010, Ebeshi et coll. 2011]. L'allèle le plus représenté est le *NAT2\*5* (35,7 %) qui code pour un phénotype lent et qui entraîne une inhibition de l'activité enzymatique de la *NAT2*. Cet allèle *NAT2\*5* est également retrouvé chez d'autres populations avec des proportions similaires : 31,5 % chez les tunisiens [Bendjemana et coll. 2006], 33 % chez les nigériens [Ebeshi et coll. 2011], 46 % dans les populations caucasienne [Garte et coll. 2001].

En ce qui concerne l'allèle *NAT2\*14*, qualifié d'allèle rare, car non détecté dans les populations caucasiennes, japonaises, chinoises et indiennes [Lin et coll. 1994], celui-ci est rencontré avec une fréquence de 10 % dans notre population. Cette fréquence se rapproche de celle trouvée chez les Américains d'origine Africaine (8.3%) et chez les Gabonais (9 %) [Bell et coll. 1993, Deloménie et coll. 1996].

Chez les sujets atteints de tuberculose, la fréquence des allèles est différente d'un allèle à un autre, avec 26,6 % pour l'allèle *NAT2\*5*, 26,6 % pour l'allèle *NAT2\*6*, 3,1 % pour l'allèle *NAT2\*7* et presque 10 % pour l'allèle *NAT2\*14*. Ces résultats se rapprochent des résultats obtenus lors d'une étude similaire sur la population caucasienne sauf pour l'allèle *NAT2\*14*

qui est plus fréquent dans la population sénégalaise malade [Vatsis et coll. 1991, Hichman et coll. 1994, Cavaco et coll. 2003].

Si l'on considère les différents génotypes du gène *NAT2*, nous notons que les génotypes *NAT2\*5/NAT2\*5* et *NAT2\*5/NAT2\*6* sont plus fréquents chez les sujets sains (13,3 % chacun) alors que chez les patients atteints de tuberculose, les génotypes *NAT2\*5/NAT2\*6* et *NAT2\*5/NAT2\*14* sont les plus représentés avec respectivement 16,7 % et 10,4 %. Ces génotypes sont associés à l'augmentation de la susceptibilité d'apparition d'effets toxiques car codant pour des phénotypes lents avec possibilité de formations de métabolites hépatotoxiques et carcinogènes [Rustan et coll. 1993, Pervers et coll. 2002, Adams et coll. 2003].

Les résultats globaux ont permis d'obtenir, après génotypage, 47,6 % d'acétyleurs lents et 48,6 % d'acétyleurs rapides chez les sujets sains ; alors que chez les 96 patients atteints de tuberculose, la distribution est équivalente avec 49 % d'acétyleurs lents et 49 % d'acétyleurs rapides. Cette distribution chez les sujets sains et les patients atteints de tuberculose ne montre pas de différences. Cependant, ces résultats corroborent ceux trouvés par d'autres études [Brocvielle et coll. 2003, Singh et coll. 2009].

De plus, il semble persister une discordance entre le phénotype mesuré et le phénotype prédit par génotypage aussi bien chez les sujets sains que chez ceux atteints de tuberculose. Des résultats ont déjà montré une discordance entre les deux méthodes variant entre 2 à 10 % des individus [Blum et coll. 1991, Hickman et Sim 1991, Graf et coll. 1992, Mrozikiewicz et coll. 1994, Cascorbi et coll. 1995, Gross et coll. 1999]. Cette discordance reflète, d'une part, les limites respectives de ces techniques, et d'autre part, la connaissance encore incomplète de l'enzyme *NAT2* chez certaines populations et, en particulier, des mécanismes moléculaires à l'origine de la variabilité inter- et intra-individuelle en terme d'activité.

La cinétique de l'INH a montré des résultats supérieurs aux concentrations actives du médicament à  $T_{3h}$ . Par conséquent, une réadaptation des doses doit être envisagée en fonction du profil d'acétylation.

L'efficacité thérapeutique de l'INH aux concentrations usuelles semble être analogue quel que soit le statut d'acétyleur du patient [Parrot et coll. 1983]. Cependant, il existe peu d'études permettant d'affirmer que ces posologies sont optimales pour tous les patients, d'autant qu'il faut tenir compte de l'effet produit par les autres médicaments coadministrés.



En revanche, il est reconnu que les acétyleurs lents sont à plus haut risque de développer une hépatotoxicité que les acétyleurs rapides [Dickinson et coll. 1981, Pande et coll. 1996, Huang et coll. 2002]. Toutefois, il n'est pas formellement démontré qu'il existe une relation entre des concentrations sériques élevées d'INH et les deux principaux effets indésirables de l'INH : hépatotoxicité et neurotoxicité. L'utilité de l'adaptation d'une posologie systématique de l'INH en fonction du statut de l'acétylation est controversée. Parrot et coll., 1983, n'ont observé aucune différence significative en termes de troubles toxiques entre une posologie adaptée à I<sub>3</sub> et la posologie standard de 5mg/kg/j chez des patients de moins de 50 ans, sans comorbidité associée ni trouble neurologique majeur. A l'inverse, Cheminat et coll., 1983, ont observé une élévation moindre des transaminases lorsque l'adaptation de posologie après phénotypage selon la méthode de Vivien [Vivien et coll. 1973] était réalisée dès la mise en route du traitement. Toutefois, aucun cas d'hépatite n'était signalé chez les patients de cette étude. Il a été proposé chez l'enfant une adaptation systématique des posologies à partir de l'index d'inactivation. D'autres préconisent une adaptation uniquement chez les sujets à index extrême [Houin et Tillement 1980]. La possibilité d'ajuster la posologie à chaque malade par la mesure de la concentration sérique à la troisième heure est mentionnée dans l'AMM de certains médicaments comme le Rimifon<sup>R</sup> commercialisé en France et au Sénégal.

Le phénotypage ou le génotypage seul pourraient par ailleurs être utiles, soit pour alerter sur la nécessité de suivre au plus près les marqueurs du fonctionnement hépatique (transaminases) chez les acétyleurs lents [Huang et coll. 2002], soit pour préconiser deux ou trois posologies standard en fonction du type d'acétyleur [Parking et coll. 1997, Kinzig-Schippers et coll. 2005]. Mais des études cliniques plus larges sont encore nécessaires pour valider cette approche.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La multiplicité des réactions face aux agressions dues à des facteurs environnementaux, et en particulier des procancérogènes chimiques, ne saurait être réduite à la mise en cause d'un seul facteur, fût-ce une enzyme de biotransformation. Il est clair que la mise à jour de l'étiologie de ces mécanismes, par essence graduels et multifactoriels, passe par une analyse poussée des interactions génome-environnement qui ne saurait être envisagée qu'à travers une approche globale et multidisciplinaire. Les outils de la génétique fournissent déjà des données précises capables de faire progresser nos connaissances.

Les *N*-acétyltransférases constituent dans ce contexte un élément important d'un puzzle moléculaire dont de nombreuses pièces restent cependant à découvrir. Les enjeux de ces recherches sont importants tant en ce qui concerne la compréhension de certains mécanismes de cancérisation que dans le cadre de la mise au point de nouvelles molécules médicamenteuses.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont amélioré la connaissance des mécanismes moléculaires à l'origine du polymorphisme d'activité de la NAT2 au Sénégal et permettent de proposer aux cliniciens une stratégie d'analyse complète du gène *NAT2*, rapide et efficace, pour évaluer le risque individuel de développer des effets indésirables sous certains médicaments à médiation enzymatique comme l'isoniazide.

L'activité de la NAT2 d'un individu peut être déterminée par des méthodes de phénotypage ou prédites par des méthodes de génotypage. La connaissance du phénotype et/ou du génotype NAT2 d'un patient représente une véritable aide à la thérapeutique, qui permet aux cliniciens d'adapter la posologie des médicaments arylamines et hydrazines en fonction du statut métabolique de l'individu, voire de choisir un traitement alternatif. Ces tests de phénotypage et de génotypage sont déjà utilisés dans certains laboratoires hospitaliers du sud telle que la France, mais cette pratique n'est probablement pas encore assez largement répandue dans nos pays à ressources limitées. Le choix de la méthode utilisée pour déterminer le statut phénotypique NAT2 des individus se fait principalement en fonction des moyens techniques disponibles dans le laboratoire et de son expérience dans le domaine.

Les recherches menées dans le domaine de la pharmacogénétique et de la toxicogénétique des traitements à base de médicaments potentiellement toxiques ou pouvant s'avérer inefficaces chez certains individus, présentent non seulement un intérêt purement médical, mais aussi économique. La connaissance prospective des patients à risque de

développer des effets indésirables à un traitement médicamenteux devrait permettre de mieux maîtriser les coûts en terme de santé publique, en évitant la prescription de traitements longs, coûteux, voire inutiles ou dangereux pour un certain nombre de sujets. La généralisation des tests de génotypage, en vue d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments, n'est certes pas encore une réalité, mais les différents acteurs du monde de la santé et les représentants des autorités de tutelle doivent prendre conscience de l'importance des phénomènes pharmaco-toxico-génétiques. Les variations de réponse aux médicaments, d'origine génétique, sont désormais reconnues comme un problème médical et de santé publique majeur et des recommandations d'utilisation de tests pharmaco-toxico-génétiques ont été ajoutées dans les notices de plusieurs médicaments sur décision de certaines agences de régulation comme la FDA.

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.

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 certaines 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.

Il serait par conséquent, intéressant de prévoir dans nos perspectives :

1. D'établir le polymorphisme NAT2 dans une population plus importante afin d'avoir des résultats représentatifs de la population.
2. De suivre la cinétique de la NAT2 dans une population de malades atteints de tuberculose et d'étudier l'impact du polymorphisme génétique de la NAT2 chez ces patients à long terme et l'implication du polymorphe de la NAT2 dans la genèse de certaines pathologies sous-jacentes chez les tuberculeux traités par l'INH.

3. De choisir une population de malades présentant un cancer connu pour être fortement lié à la consommation de tabac, notamment le cancer des poumons et le cancer de la sphère ORL qui sont des cancers très présents dans notre pays.

4. De les comparer avec une population témoins non fumeurs, par rapport au degré de consommation de cigarette, afin de mieux cerner l'implication des polymorphismes des enzymes de la phase II dans la susceptibilité aux cancers dépendants du tabac.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abzalov RA, Nigmatullina RR, Khairullina GN, Garmonov SY, Shakirova LS, Evgenev MI. Effect of physical training on Sulphamethazine acetylation rate. *Bull Exp Biol Med.* 2000; 130 (12):1141-3.

Adams C, Werely CJ, Victor T, Hoal E, Rossouw G, Van Helden P. Allele frequencies for GST and NAT2 differ in African population groups and may be associated with oesophageal cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41(4): 600-605

Agence nationale de la statistique et de la démographie du Sénégal. Juin 2008. Résultats définitifs du troisième recensement général de la population et de l'habitat. 2002. 163p.

Agüндеz JAG, Ladero JM, Olivera M, Abildua R, Roman JM, Benitez J Genetic analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in breast cancer patients. *Oncology.* 1995; 52: 7-11

Agüндеz JAG, Menaya JG, Tejada R, Lago F, Chavez M, Benitez J. Genetic analysis of the NAT2 and CYP2D6 polymorphisms in white patients with non-insulindependent diabetes mellitus. *Pharmacogenetics.* 1996; 6: 465–472

Agüндеz JAG, Jimenez-Jimenez FJ, Luengo A, Molina JA, Orti-Pareja M, Vazquez A, Ramos F, Duarte J, Coria F, Ladero JM, Alvarez-Cermeno, JC, Benitez J. Slow allotypic variants of the NAT2 gene and susceptibility to early-onset Parkinson's disease. *Neurology.* 1998; 51: 1587-1592

Agüндеz JA. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab.* 2008; 9: 520-531

Agüндеz JA, Golka K, Martinez C, Selinski S, Blaszkewicz M and Garcia-Martin E. Unraveling Ambiguous NAT2 Genotyping Data. *Clin Chem.* 2008; 54 (8): 1390–1394.

Alberg AJ, Daudt A, Huang HY, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ, Strickland PT, Bell DA: N-acetyltransferase-2 (NAT2) genotypes, cigarette smoking and risk of breast cancer. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28: 187-193.

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 ; 62 (5): 499-511

Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Shields, PG. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *J Am Med Assoc.* 1996 ; 276: 1494–1501

Ambrosone CB, Fred K. NAT polymorphisms, reactions and susceptibility to cancer. In biomarkers: *Medical and workplace applications.* 1998a: 190-210.

Ambrosone CB, Freudenheim JL, Sinha R, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. Breast cancer risk, meat consumption and N-acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphisms. *Int J Cancer* 1998b; 75: 825-830

American Academy of Pediatrics. Tuberculosis. In: Pickering LK, ed. Red Book: 2003 Report of the Committee on Infectious Diseases, 26th edn. Elk Grove Village, IL: *Am Aca Pedias*. 2003: 642–660

Anitha A and Banerjee M. Arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism in the ethnic populations of South India. *Int J Mol Med*. 2003; 11: 125-131

Ayyappan J, Umapathi P and Darlin Quine S. Development and validation of a stability indicating high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the estimation of isoniazid and its related substances in fixed dose combination of isoniazid and ethambutol hydrochloride tablets. *Afr J Pharma Pharmacol*. 2011; 5(12): 1513-1521

Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP, Kadlubar FF. “Role of aromatic amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human bladder.” *Cancer Res*. 1995; 55 (22): 5230-5237

Bakayev VV, Mohammadi F, Bahadori M, Sheikholslami M, Javeri A, Masjedi MR, Velayati AA. Arylamine N-acetyltransferase 2 slow acetylator polymorphisms in unrelated Iranian individuals. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004; 60: 467-471.

Bandmann O, Vaughan J, Holmans P, Wood N. Detailed genotyping demonstrates association between the slow acetylator genotype for NAT2 and familial parkinson's disease. *Mov Disord*. 2000; 15: 30-35

Batt AM, Livertoux MH, Ferrari L. Les biotransformations des médicaments et des toxiques. In Vanbourdolle M. Toxicologie, sciences, mathématiques, physiques et chimiques. Paris : *Wolters Kluwer SA*. 2007 : 25-53

Beaume P, Lorient M. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques : L'homme et son environnement. *Méd/Sci*. 2000 ; 16 (10) : 1051-1056

Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW. Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1689-1692

Bell DA, Stephens E, Castriano T, Umbach DM, Watson M, Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Duncan H and Strange RC. Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995; 55: 3537-3542

Bendjemana K, Abdennebi M, Jmal SGA, Ghanem A, Touati S, Boussen H, Ladgham A, Guemira F. Genetic polymorphism of glutathion-S transferases and N-acetyltransferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience. *Bull Cancer*. 2006; 93 (3) : 297-302

Betchel YC, Bonaiti-Pellie C, Poisson N, Magnette J, Bechtel PR. A population and family study of N-acetyltransferase using caffeine urinary metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54: 134-141

Bigler J, Chen C, Potter JD. Determination of human NAT2 acetylator genotype by oligonucleotide ligation assay. *Biotechniques*. 1997; 22(4): 682-684



Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA. Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol.* 1990; 9: 193-203

Blum M, Demierre A, Grant D, Heim M, Meyer U. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1991; 88: 5237-5241

Bock KW. Metabolic polymorphisms affecting activation of toxic and mutagenic arylamines. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13(6): 223-226

Bönicke R, Reif W. Enzymatische Inaktivierung von Isonikotinsäure hydrazide in menschlichen und Tierschen Organismus. *Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1953; 220: 321-333

Borlak J and Reamon-Buettner SM. N-Acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in Parkinson's disease. *BMC Med Genet.* 2006a; 7(30): Pp 9

Borlak J and Reamon-Buettner, SM. N-Acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients. *BMC Med Genet.* 2006b; 7(58): Pp 9

Borlak J, Harsamy V, Schneble H, Haegele K. PNAT and CYP2D6 gene polymorphism in epileptic patients. *Biochem Pharmacol.* 1994; 48: 1717-1720

Bouchardy C, Mitrunen K, Wikman H, Husgafvel-Pursiainen K, Dayer P, Benhamou, S, and Hirvonen A. N-Acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics.* 1998; 8: 291-298

Boukouvala S, Fakis G. Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev.* 2005; 37: 511-564

Boukouvala S, Sim E: Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterization of alternative transcripts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 343-351.

Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* 1996; 56: 3915-3925

Brockton N, Little J, Sharp L, Cotton SC. N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 846-861

Brocvielle H, Muret P, Goydadin AC, Boone P, Broly F, Kantelip JP, Humbert P. N-acetyltransferase 2 acetylation polymorphism: prevalence of slow acetylators does not differ between atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Skin Pharmacol. Appl Skin Physiol.* 2003; 16: 386-392

Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E and Minchin RF. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2: 30-42

Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lawsen MF, Kadlubar FF. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics*. 1992; 2(3): 116-27.

Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Iovannisci DM, and Lammer E. Risk of limb deficiency defects associated with NAT1, NAT2, GSTT1, GSTM1, and NOS3 genetic variants, maternal smoking, and vitamin supplement intake. *Am J Med Genet. A* 2006; 140: 1915-1922

Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA. The role of N-acetyltransferase phenotype in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*. 1982; 2: 842-846

Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet*. 1995; 57: 581-592

Cascorbi I, Brockmoller J, Bauer S, Reum T, Roots I. NAT2\*12A (803A(G) codes for rapid arylamine N-acetylation in humans. *Pharmacogenetics*. 1996; 6:257-259.

Cascorbi I, Brockmoller J, Mrozikiewicz PM, Müller A, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev*. 1999; 31(2):489-502.

Cascorbi I, Roots I. Pitfalls in N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics*. 1999; 9(1): 123-127

Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A4\*1B and NAT2\*14 alleles in a native African population. *Clin Chem Lab Med*. 2003 ; 41: 606-609

Chan, DK, Lam MK, Wong R, Hung WT, Wilcken DE. Strong association between N-acetyltransferase 2 genotype and PD in Hong Kong Chinese. *Neurology*. 2003; 60: 1002-1005

Chang-Claude J, Kropp S, Jager B, Bartsch H, Risch A. Differential effect of NAT2 on the association between active and passive smoke exposure and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2002. 11: 698-704

Cheminat JC, Paire M, Lvarenne J, Ducarrouge C, Molina C. Intérêt de la détermination de l'INH plasmatique au cours du traitement antituberculeux. *Rev Fr Mal Respir*. 1983 ; 11 : 867-873

Chen B, Li JH, Xu YM, Wang J, Cao XM. The influence of NAT2 genotypes on the plasma concentration of isoniazid and acetylisoniazid in Chinese pulmonary tuberculosis patients. *Clin Chim Acta*. 2006; 365: 104-108

Clark DW. Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*. 1985; 29: 342-375.

Cnattingius S, Signorello LB, Annerén G, Clausson B, Ekbom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 2000; 43 (25): 1839-1845.

Cooper GS, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS, Taylor JA. N-acetyltransferase genotypes in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004; 31: 76–80

Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. CYP3A\*1B and NAT2\*14 alleles in a native African population. *Clin chem Lab med.* 2003; 41(4): 606-609

Cribb AE, Isbrucker R, Levatte T, Tsui B, Gillespie CT and Renton KW. Acetylator phenotyping: the urinary caffeine metabolite ratio in slow acetylators correlated with a marker of systemic NAT1 activity. *Pharmacogenetics.* 1994 ; 4: 166-170

D'Errico A, Malats N, Vineis P, Boffetta P. Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. In: Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. Vineis P, Malats N, Lang M, D'Errico A et coll, Eds. *IARC Sci Pub.* 1999; 148: 323-394

Dalhoff K, Jensen KB, and Poulsen HE. Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Methods Enzymol.* 2005; 400: 618–627

Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(1): 27-41

Dandara C, Masimirembwaa CM, Magimbab A, Kaayab S, Sayib J, Sommersb DK, Snymanc JR, Haslera JA. Arylamine N acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C>T and 590G>A. *Pharmacogenetics.* 2003; 13: 55-58

De Chaisemartin L, Loriot MA. Pharmacogenetics of anticancer drugs. *Pathol Biol.* 2005; 53: 116-124

Deguchi T. Sequences and expression of alleles of polymorphic NAT of human liver. *J Biol Chem.* 1992; 267:18140-18147

Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem.* 1990; 265: 12757-12760

Deitz AC, Zheng W, Leff MA, Gross M, Wen WQ, Doll MA, Xiao GH, Folsom AR, Hein DW. N-acetyltransferase-2 genetic polymorphism, well-done meat intake, and breast cancer risk among postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2000; 9: 905-910

Deloménie C, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2\*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics.* 1996; 6: 177-185

Delort L, Chalabi N, Satih S, Rabiau N, Kwiatkowski F, Bignon YJ, and Bernard-Gallon DJ. Association between genetic polymorphisms and ovarian cancer risk. *Anticancer Res.* 2008; 28: 3079-3081

Dewan A, Chattopadhyay P, Kulkarni PK. N-acetyltransferase activity--a susceptibility factor in human bladder carcinogenesis. *Indian J Cancer.* 1995 ; 32(1): 15-19.

Dickinson DS, Mailey WC, Hirschowitz BI, Song SJ, Eidus L, Hodgkin MM. Risk factors for isoniazid (INH) – induced liver dysfunction. *J Clin Gastroenterol.* 1981; 3: 271-279

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 149-173

Doll MA, Fretland AJ, Deitz AC, Hein DW. Determination of human NAT2 acetylator genotype by restriction fragment length polymorphism and allele specific amplification. *Anal Biochem.* 1995; 231: 412-420

Doll MA, Hein DW. Comprehensive human NAT2 genotype method using single nucleotide polymorphism-specific polymerase chain reaction primers and fluorogenic probes. *Anal. Biochem.* 2001. 288: 106-108

Doll MA, Hein DW. Rapid genotype method to distinguish frequent and/or functional polymorphisms in human N-acetyltransferase-1. *Anal. Biochem.* 2002; 301: 328-332. Dubinsky MC. Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2003; 5(6): 506-511

Dupret JM, Goodfellow GH, Janezic SA, Grant DM. Structure-function studies of human arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2; functional analysis of recombinant NAT1/NAT2 chimeras expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1994; 269: 26830-26835

Dupret JM, Rodrigues-Lima F. Structure and regulation of the Drug-Metabolizing Enzymes Arylamine N-Acetyltransferases. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 311-318

Ebeshi BU, Bolajil OO, Masimirembwa CM () Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms' frequencies in Nigerian populations. *Afr J Pharm Pharmacol Res.* 2011; 1: 1-6

Ebisawa T and Deguchi T. Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 177: 1252-1257

Eichelbaum M, Kroemer HK and Mikus G. Genetically determined differences in drug metabolism as a risk factor in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* 1992 ; 64-65: 115-122

Ellard GA. The potential clinical significance of isoniazid acetylator phenotype in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Tubercle.* 1984; 65: 211-227

Ellard GA, Gammon PT, Tiitinen H. Determination of the acetylator phenotype from the ratio of urinary excretion of acetylisoniazid to acid-labile isoniazid: A study in Finnish Lapland. *Tubercle.* 1993; 54: 201-210

Evans DAP, Manley KA, and Mc Kusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J.* 1960; 13: 485-491

Evans DAP. Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. *J Med Genet.* 1984; 21: 243-253

Evans DAP. N-Acetyltransferase. *Pharmacol Ther.* 1989; 42: 157-234

Evans DAP. N-acetyltransferase. In: Kalow W.ed. Pharmacogenetics of drug metabolism. *New York: Pergamon Press*. 1992: 95-178

Evans DAP. N-acetyltransferase. In: Genetic Factors in Drug Therapy. Cambridge University Press: *Cambridge*. 1993: 211-302

Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way. *Pharmacogenetics*. 2002; 12(6): 421-423.

Fakis G, Boukouvala S, Kawamura A, and Kennedy S. Description of a novel polymorphic gene encoding for arylamine N-acetyltransferase in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*), a model animal for endometriosis. *Pharmacogenet Genom*. 2007; 17:181–188

Fang PF, Cai HL, Li HD, Zhu RH, Tan QY, Gao W, Xu P, Liu YP, Zhang WY, Chen YC, Zhang F. Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2010. 878; 2286–2291

Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Hein DW. Cloning, expression and functional characterisation of two mutant (NAT2191 and NAT2341/803) and wild-type human polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) alleles. *Drug Metab. Dispos*. 1994; 22: 371-376

Fernandes O, Sabharwal M, Smiley T, Pastuszak A, Koren G and Einarson T. Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Repr Toxicol*. 1998; 12 (4): 435–444.

Filiadis IF, Georgiou I, Alamanos Y, Kranas V, Giannakopoulos X, Lolis D. Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case-control study. *J Urol*. 1999; 161: 1672-1675

Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2004; 1(2): 229-234

Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics*. 2001; 11(3): 207-215

Furet Y, Bechtel Y, Le Guellec C, Bechtel PR, Autret-Leca E, Paintaud G. Clinical relevance of N-acetyltransferase type 2 (NAT2) genetic polymorphism. *Therapy*. 2002; 57: 427-431

Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2000; 38: 61-68

Gajecka M, Rydzancz M, Jaskula R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with risk of the laryngeal cancer. *Mutat Res*. 2005; 574: 112-123

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10: 1239-1248.

- Gawronska-Szklarz B, Luszawska-Kutrzeba T, Czaja-Bulsa G, Kurzawski G. Relationship between acetylation polymorphism and risk of atopic diseases. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 65: 562-569
- Gelber R, Peters JH, Gordon GR, Glazko AJ and Levy L. The polymorphic acetylation of dapsone in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1971; 12: 225-238
- Gertig DM, Hankinson SE, Hough H, Spiegelman D, Colditz GA, Willett W, Kelsey KT, Hunter DJ. N-acetyltransferase 2 genotypes, meat intake and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1999; 80: 13-17
- Geylan YS, Dizbay S, Guray T. Arylamine N-acetyltransferase activities in human breast cancer tissues. *Neoplasma.* 2001; 48: 108-111
- Giannakopoulos X, Charalabopoulos K, Baltogiannis D, Chatzikiriakidou A, Alamanos Y, Georgiou I, Evangelou A, Agnantis N, Sofikitis N. The role of Nacetyltransferase-2 and glutathione S-transferase on the risk and aggressiveness of bladder cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 3801-3804
- Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM. The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett.* 2002; 128: 229-241
- Goodfellow GH, Dupret JM., Grant DM. Identification of amino acids imparting acceptor substrate selectivity to human arylamine acetyltransferases NAT1 and NAT2. *Biochem J.* 2000; 348: 159-166
- Graf T, Broly F, Hoffmann F, Probst M, Meyer UA, Howald H. Prediction of phenotype for acetylation and for debrisoquine hydroxylation by DNA-tests in healthy human volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992; 43:399-403
- Grant, DM, Tang, BK and Kalow W. Variability in caffeine metabolime. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1983; 33: 591-601
- Grant DM, Tang BK and Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br. J. clin. Pharmac.* 1984; 17: 459-464
- Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA. Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(10): 3978
- Grant DM, Blum M, Beer M and Meyer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-Acetyltransferases, A comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol. Pharmacol.* 1991; 39(2): 184-191
- Grant DM, Blum M, and Meyers UA. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes. *Xenobiotica.* 1992; 22: 1073-1081
- Grant DM. Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics.* 1993; 3: 45-50
- Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, Yu VL, Grewal R. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res.* 1997; 376(1-2): 61-70

Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. 1984. *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 58(7):S788-93; discussion S794-5

Grant DM. Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Curr Drug Metab*. 2008; 9: 465-470

Green J, Banks E, Berrington A, Darby S, Deo H, Newton R. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer*. 2000; 83: 412-417

Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R, Kadlubar F. Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8: 683-692

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin*. 2006. 64: 535-48

Guengerich FP. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther* 1992; 54: 17- 61

Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MSE, Mizugaki M. Genotype and allele frequencies of *TPMT*, *NAT2*, *GST*, *SULT1A1* and *MDR-1* in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55: 560–569

Hanssen HP, Agarwal DP, Goedde HW, Bucher H, Huland H, Brachmann W, Ovenbeck R. Association of N-acetyltransferase polymorphism and environmental factors with bladder carcinogenesis. Study in a north German population. *Eur Urol*. 1985; 11(4): 263-266

Hashem N, Khalifa S, Nour A. The frequency of isoniazid acetylase enzyme deficiency among Egyptians. *Am J Phys Anthropol*. 1969; 31: 97–102

Hayes RB, Bi W, Rothman N, Broly F, Caporaso N, Feng P, You X, Yin S, Woosley RL, Meyer UA. N-acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 675-678

He LJ, Yu YM, Qiao F, Liu JS, Sun XF, and Jiang LL. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 4268-4271

Hein, D. W. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1988; 948(1): 37-66

Hein DW, Rustan TD, Doll MA, Bucher KD, Ferguson RJ, Feng Y, Furman EJ, Gray K. Acetyltransferases and susceptibility to chemicals. *Toxicol Lett*. 1992; 64-65: 123–130

Hein DW, Doll MA, Gray K, Feng Y, Ferguson R. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1633-1638

Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K. Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *Hum Mol Genet*. 1994; 3 (5): 729-734

Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Ferguson RJ. Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and Nhydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res.* 1995; 55 (16): 3531-3536

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev.* 2000; 9(1): 29-42

Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2002; 506-507: 65-77

Hein DW. N-Acetyltransferase 2 genetic polymorphism: Effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene.* 2006; 25: 1649–1658

Hein DW, Fretland AJ, Doll MA. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. *Int J Cancer.* 2006; 119(5): 1208-1211

Hein DW and Doll MA. Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediaire and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenetics.* 2012; 13: 31-34

Hernandez A, Xamena N, Surralles J, Galofre P, Velazquez A, Creus A, and Marcos R. Role of GST and NAT2 polymorphisms in thyroid cancer. *J Endocrinol Invest.* 2008 ; 31: 1025-1031

Hickman D, Sim E. N-acetyltransferase polymorphism: comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42: 1007-1014

Hickman D, Rish A, Buckle V, Spurr N, Jeremiah S. Chromosomal localization of human gene arylamine NAT. *Biochem.* 1994; 297: 441-445

Hickman D, Palamanda JR, Unadkat JD, Sim E. Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine n-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in Escherichia coli. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50(5): 697-703

Hickman D, Pope J, Patil SD, Fakis G, Smelt V, Stanley LA, Payton M, Unadkat JD, Sim E. Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine. *Gut.* 1998; 42: 402-409.

Hildebrand M and Seifert W. Determination of acetylator phenotype in Caucasians with caffeine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989; 37: 525-526

Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, et al. Genotyping of the Nacetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002; 17: 357-362

Hirvonen A. Chapter 20: polymorphic NATs and cancer predisposition. *IARC Sci Publ.* 1999; 148: 251-270

Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I and Xu CF. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12: 395-399



Hotchkiss SAM. Dermal metabolism. In: Roberts, M.S., Walters, K.A. (Eds.) *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Marcel Dekker Inc, New York. 1998: 43-101

Houin G, Tillement JP. Conséquences thérapeutique de la mesure de l'indice d'inactivation de l'isoniazide au cours du traitement antituberculeux. *Therapie*. 1980 ; 35 : 597-605

Hsieh FI, Pu YS, Chern HD, Hsu LI, Chiou HY, Chen CJ. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of cigarette smoking-related bladder cancer. *Br J Cancer*. 1999; 81: 537-541

Huang CC, Chien WP, Wong RH, Cheng YW, Chen MC, Chou MC, Lee H. NAT2 fast acetylator genotype is associated with an increased risk of colorectal cancer in Taiwan. *Dis. Colon Rectum*. 2007; 50: 981-989

Huang CC, Chien WP, Wong RH, Cheng YW, Chen MC, Lee H. NAT2 fast acetylator genotype and MGMT promoter methylation may contribute to gender difference in K-RAS mutation occurrence in Taiwanese colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen*. 2009; 5: 127-133

Huang CS, Chern HD, Shen CY, Hsu SM, Chang KJ. Association between Nacetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *Int J Cancer*. 1999; 82: 175-177

Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. 2002; 35: 883-889

Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. 2003; 37: 924-930

Hughes HB. On the metabolic fate of isoniazid. *J Pharmacol Exp Therap*. 1953; 109: 444-454

Hughes HB, Biehl J, Schmidt L. Metabolism of isoniazid in man. *Am Rev Dis*. 1954; 70: 266-273

Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, Gelatti U, Spaliviero M, Placidi D, Carta A, Scotto di Carlo A, Porru S. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer*. 2004; 110: 598-604

Hunter DJ, Hankinson SE, Hough H, Gertig DM, Garcia-Closas M, Spiegelmn D, Manson JAE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Kelsey K. A prospective study of NAT2 acetylation genotype, cigarette smoking and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 2127-2132

Hussain Z, Kar P, Husain SA. Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian J Exp Biol*. 2003; 41: 1226-1232

Hutchings A, Routledge PA. A simple method for determining acetylator phenotype using isoniazid. *Br J Clin Pharmac*. 1986; 22 : 343-345

Ikeda Y, Umemura K, Kondo K, Sekiguchi K, Miyoshi S, Nakashima M. Pharmacokinetics of voriconazole and cytochrome P450 2C19 genetic status. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 587-588

Ilett KF, Kadlubar FF, Minchin RF. 1998 International meeting on the arylamine N-acetyltransferases: synopsis of the workshop on nomenclature, biochemistry, molecular biology, interspecies comparisons and role in human disease risk. *Drug Metab. Dispos.* 1999; 27: 957-959.

Inatomi H, Katoh T, Kawamoto T, Matsumoto T. NAT2 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to bladder cancer in Japanese. *Int J Urol.* 1999; 6: 446-454

Jackson PR, Tucker GT, Lennard MS, Woods HF. Polymorphic drug oxidation: pharmacokinetic basis and comparison of experimental indices. *Br J Clin Pharmacol.* 1986; 22: 541-550

Jain M, Kumar S, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC and Mittal B. Association of genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and susceptibility to oesophageal cancer in north Indian population. *Cancer Invest.* 2007; 25: 340-346

Jensen LE, Hoess K, Mitchell LE, Whitehead AS. Loss of function polymorphisms in NAT1 protect against spina bifida. *Hum Genet.* 2006; 120: 52-57

Johns LE, Houlston RS. N-acetyltransferase-2 and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 36: 221-227

Kadlubar FF and Badawi AF, Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 1995; 82-83: 627-632

Kalow W. Interethnic differences in drugs response. In Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF. *Drugs and the pharmaceutical sciences. Pharmacogenomics, 2nd edition: Taylor and Francis.* 2005; 221- 246

Kato R. Metabolic activation of mutagenic heterocyclic aromatic amines from protein pyrolysates. *Crit Rev Toxicol.* 1986; 16: 307-348

Katoh T, Inatomi H, Yang M, Kawamoto T, Matsumoto T, Bell DA. Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and risk of urothelial transitional cell carcinoma among Japanese. *Pharmacogenetics.* 1999; 9: 401-404

Katoh T, Nagata N, Kitagawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T. Inherited polymorphism in the NAT1 and NAT2 genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2000; 85: 46-49

Kaufmann GR, Wenk M, Taeschner W, Peterli B, Gyr K, Meyer UA and Haefeli WE. N-Acetyltransferase 2 polymorphism in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60: 62-67

Kawamura AK, Graham J, Mushtaq Ad, Tsiftoglou SA, Vath GM, Hanna PE, Wagner CR, Sim E. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69: 347-359

Khelil M, Tayebi B, Djerdjouri B. Polymorphisme d'acétylation de la caféine chez une population algérienne. *J Soc. Alge. Chim.* 2007; 17 (1): 65-76

Kilbane AJ, Silbart LK, Manis M, Beitins IZ and Weber WW. Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 1990; 47:470-477

Kim WJ, Lee HL, Lee SC, Kim YT, Kim H. Polymorphisms of N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase mu and theta genes as risk factors of bladder cancer in relation to asthma and tuberculosis. *J Urol.* 2000; 164(1): 209-213

Kinzig-Schippers M, Tomalik-Scharte D, Jetter A, Scheidel B, Jakob V, Rodamer M, Cascorbi I, Doroshenko O, Sörgel F and Fuhr U. Should We Use N-Acetyltransferase Type 2 Genotyping To Personalize Isoniazid Doses? *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 1733-1738

Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Karakaya AE. N-acetyltransferase (NAT2) polymorphism and breast cancer susceptibility: a lack of association in a case-control study of Turkish population. *Int. J. Toxicol.* 2004; 49 (5) 23: 25-31.

Kontani K, Kawakami M, Nakajima T, Katsuyama T. Tobacco use and occupational exposure to carcinogens, but not N-acetyltransferase 2 genotypes are major risk factors for bladder cancer in the Japanese. *Urol Res.* 2001; 29: 199-204

Krajcinovic M, Ghadirian P, Richer C, Sinnott H, Gandini S, Perret C, Lacroix A, Labuda D, Sinnott D. Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: role of carcinogen-metabolising enzymes and gene-environment interactions. *Int J Cancer.* 2001; 92: 220-225

Kubota R, Ohno M, Hasunuma T, Iijima H, Azuma J. Dose-escalation study of isoniazid in healthy volunteers with the rapid acetylator genotype of arylamine N-acetyltransferase 2. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63: 927-933

Kukongviriyapan V, Prawan A, Tassaneyakul W, Aiamsa-ard J and Warasiha B. Arylamine N-acetyltransferase-2 genotypes in the Thai population. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 55: 278-281

Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res.* 2007; 631: 62-68

Kuznetsov IB, McDuffie M, Moslehi R. A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype. *Bioinformatics.* 2009; 25 (9): 1185-1186

Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977; 33: 159-174

Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994; 3(8): 675-682

Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL, Mitchell JR. Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin Pharmacol Ther.* 1985; 38: 566-571

- Lecomte T, Laurent-Puig P, Lorient MA. Pharmacogénétique en hépato-gastroentérologie. *Hépatogastro* 2006 ; 13(4) : 275-287
- Lee KM, Park SK, Kim SU, Doll MA, Yoo KY, Ahn SH, Noh DY, Hirvonen A, Hein DW, Kang D. N-acetyltransferase (NAT1, NAT2) and glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) polymorphisms in breast cancer. *Cancer Lett.* 2003; 196: 179-186
- Lee WEJD, Zhao B, Seow-Choen F. Relationship between polymorphism of N-acetyltransferase gene and susceptibility to colorectal carcinoma in a Chinese population. *Pharmacogenetics.* 1998; 8: 513-517
- Lefebvre H, Tossier-Klop G, Toutain PL, Hatey F. Evaluating variability in drug response: pharmacogenetics. *Am Acad Vet Pharmacol Toxicol.* Charlotte, Juin 2002
- Leff, M. A., Fretland, A. J., Doll, M. A., Hein, D. W. Novel human N-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 34519-34522
- Lilla C, Verla-Tebit E, Risch A, Jäger B, Hoffmeister M, Brenner H, Chang-Claude H. Effect of NAT1 and NAT2 genetic polymorphisms on colon cancer risk associated with exposure to tobacco smoke and meat consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 99-107
- Lin HJ, Ya Han C, Lin BK and Hardy S. Slow Acetylator Mutations in the Human Polymorphic N-acetyltransferase Gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics, and Whites: Application to Metabolic Epidemiology. *Am J Hum Genet.* 1993; 52: 827-834
- Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics.* 1994; 4: 125-134
- Lo-Guidice, J.-M., Allorge, D., Chevalier, D., Debuyse`re, H., Fazio, F., Lafitte, J.-J., Broly, F. Molecular analysis of the N-acetyltransferase 1 gene (NAT1\*) using polymerase chain reaction-restriction fragment-single strand conformation polymorphism assay. *Pharmacogenetics.* 2000 ; 10 : 293-300
- Lorient MA, Beaune P. La pharmacogénétique: le lien entre gènes et réponse aux médicaments. *Méd/Sci.* 2004; 20: 634-636
- Lu CM, Chung MC, Huang CH, Ko YC. Interaction effect in bladder cancer between N-acetyltransferase 2 genotype and alcohol drinking. *Urol Int.* 2005; 75(4): 360-364
- Lubin JH, Kogevinas M, Silverman D, Malats N, Garcia-Closas M, Tardon A, Hein DW, Garcia-Closas R, Serra C, Dosemeci M, Carrato A, Rothman N. Evidence for an intensity-dependent interaction of NAT2 acetylation genotype and cigarette smoking in the Spanish Bladder Cancer Study. *Int J Epidemiol.* 2007; 36: 236-241
- Machida H, Tsukamoto K, Wen CY, Shikuwa S, Isomoto H, Mizuta Y, Takeshima F, Murase K, Matsumoto N, Murata I, Kohno S, Wen CY. Crohn's disease in Japanese is associated with a SNP-haplotype of N-acetyltransferase 2 gene. *World J Gastroenterol.* 2005 ; 11: 4833-4837
- Magalon H, Patin E, Austerlitz F, Hegay T, Aldashev A, Quintana-Murci L, Heyer E. Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16: 243-251

Mahid SS, Colliver DW, Crawford NP, Martini BD, Doll MA, Hein DW, Cobbs GA, Petras RE, and Galandiuk S. Characterization of N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms and haplotype analysis for inflammatory bowel disease and sporadic colorectal carcinoma. *BMC Med Genet.* 2007; 8(28): Pp 7

Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmüller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk : a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2000b; 9: 461-467

Marcus PM, Vineis P, Rothman N. NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics.* 2000a; 10: 115-122

Mashimo M, Suzuki T, Abe M, Deguchi T. Molecular genotyping of N-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Hum Genet.* 1992; 60: 139-143

Matheson MC, Stevenson T, Akbarzadeh S, Probert DN. GSTT1 null genotype increases risk of premenopausal breast cancer. *Cancer Lett.* 2002; 181: 73-79

Meisel P. Arylamine N-acetyltransferases and drug response. *Pharmacogenomics.* 2002; 3: 349-366

Meyer UA, Zanger UM, Grant D, Blum M. Genetic polymorphisms of drug metabolism. In: Testa B (ed) Advances of drug research. *Academic London.* 1990. 19: 197-241

Meyer UA and Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 1997; 37: 269–296

Millikan RC, Pittman GS, Newman B, Tse CKJ, Selmin O, Rockhill B, Savitz D, Moorman PG, Bell DA. Cigarette smoking, N-acetyltransferases 1 and 2, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1998; 7: 371-378

Minchin RF, Reeves PT, Teitel CH, McManus ME, Mojarrabi B, Ilett KF, Kadlubar FF. N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 185: 839-844

Minchin RF, Hanna PE, Dupret JM, Wagner CR, Rodrigues-Lima F, Butcher NJ. Arylamine N-acetyltransferase I. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 1999-2005

Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, Snodgrass WR, Nelson SD. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1976; 84:181–192

Mitchison DA. How drug resistance emerges as result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 10–15

Mohrenweiser HW. Genetic variation and exposure related risk estimation: will toxicology enter a new era? DNA repair and cancer as a paradigm. *Toxicol Pathol.* 2004; 32(Suppl. 1): 136-145

Mommsen S, Wolf H. N-acetyltransferase phenotypes in bladder tumour patients with and without carcinoma in situ in selected site biopsies. *Scand J Urol Nephrol*. 1985; 19(3): 203-204

Morabia A, Bernstein MS, Bouchardy I, Kurtz J, Morris MA. Breast cancer and active and passive smoking: the role of the N-acetyltransferase 2 genotype. *Am J Epidemiol*. 2000; 152: 226-232

Morton LM, Schenk M, Hein DW, Davis S, Zahm SH, Cozen W, Cerhan JR, Hartge P, Welch R, Chanock SJ, Rothman N, and Wang SS. Genetic variation in N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Pharmacogenet Genom*. 2006; 16: 537-545

Mrozikiewicz PM, Drakoulis N, Roots I. Polymorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genes in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther*. 1994; 56: 626-634

Muenzen JB, Cerecedo LR, Shervin CP. Comparative metabolism of certain aromatic acids: Acetylation of amino compounds. *J Biol Chem*. 1926; 67: 469-476

Muscat JE, Pittman B, Kleinman W, Lazarus P, Stellman SD and Richie JrJP. Comparison of CYP1A2 and NAT2 Phenotypes between Black and White Smokers. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76(7): 929–937

Nebert DW and Bingham E. Pharmacogenomics: out of the lab and into the community. *Trends Biotechnol*. 2001; 19(12): 519-523

Nebert DW and Roe AL. Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *Science of the Total Environment*. 2001; 274(1–3): 93-102.

Ng KY, Zhou H, Zhang YL, Hybertson B, Randolph T, Christians U. Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with on-line extraction. *J Chromatogr B*. 2007; 847: 188–198

Nhachi CFB. Polymorphic acetylation of sulphamethazine in a Zimbabwe population. *Medical Genetics*. 1988; 25: 29-31

Nikishina MV, Vavilin VA, Makarova SI and Lyakhovich VV. Analysis of associations of NAT2 gene polymorphisms with the risk of lung cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2007; 143: 83-86

Noda A, Hsu KY, Noda H, Yamamoto Y, Kurozumi T. Is isoniazid-hepatotoxicity induced by the metabolite, hydrazine? *J UOEH*. 1983; 5: 183-190

Norton JT, Witschi MA, Luong L, Kawamura A, Ghosh S, Stack MS, Sim E, Avram MJ, Appella DH, Huang S: Synthesis and anticancer activities of 6-amino amonafide derivatives. *Anticancer Drugs*. 2008, 19:23-36

Nyéki A, Biollaz J, Kesselring UW, Décosterd LA. Extraction less method for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary caffeine metabolites for N-acetyltransferase 2, cytochrome P450 1A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J chromatogr B*. 2001; 755(1-2): 73-84

Oestreicher K, Desmeules J, Piguet V, Dayer P. Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Med Hyg.* 1999; 57: 793-800

Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4: 256-261

Ohsako S and Deguchi T. Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:4630-4634

Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H. Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1997; 6: 225-231

O'Neil WM, Drobitch RK, MacArthur RD, Farrough MJ, Doll MA, Fretland J, Hein DW, Crane LR and Svensson CK. Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: discordance between methods for phenotype determination and genotype. *Pharmacogenetics.* 2000; 10: 171-182.

Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK. Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax.* 1996; 51: 132-136

Pandey SN, Modi DR, Choudhuri G, and Mittall B. Slow acetylator genotype of N-acetyl transferase2 (NAT2) is associated with increased susceptibility to gallbladder cancer: The cancer risk not modulated by gallstone disease. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6: 91-96

Pariente-Khayat A, Rey E, Gendrel D, Vauzelle-Kervrotan F, Crémier O, Athis P, Badoual J, Olive G and Pans G. Isoniazid acetylation metabolic ratio during maturation in children. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 62 (4): 377-384

Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HI, van Helden PD, van der Walt BJ, Donald PR, van Jaarsveld PP. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155(5): 1717-1722

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

Parrot R, Boval C, Grosset J, Gaillard JP. Adapter ou ne pas adapter la posologie de l'isoniazid? *Rev Fr Mal Respir.* 1983 ; 11 : 705-712

Patin E, Harmant C, Kidd K, Kidd J, Froment AS, Mehdi Q, Sica L, Heyer E, Quintana-Murci L. Sub-Saharan African Coding Sequence Variation and Haplotype Diversity at the NAT2 Gene. *Hum Mutat.* 2006; 27(7): 720

Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring: principles and application in mycobacterial infections. *Drug Ther.* 1992; 22: 31-36.

Peloquin CA, Nitta AT, Burman WJ, Brudney KF, Miranda-Massari JR, McGuinness ME, Berning SE, Gerena GT. Low antituberculosis drug concentrations in patients with AIDS. *Ann Pharmacother.* 1996; 30(9): 919-925.

Peluso M, Airoidi L, Armelle M, Martone T, Coda R, Malaveille C, Giacomelli G, Terrone C, Casetta G, Vineis P. White blood cell DNA adducts, smoking, and NAT2 and GSTM1 genotypes in bladder cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(4): 341-346

Pervers F, Firzori, Bondy, Aysegul A, Shahin. Aromatic DNA adduits and polymorphisms of CYP1A1, NAT2 and GSTM1 in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2002; 23(2): 301-306

Pfau W, Stone EM, Brockstedt U, Carmicheal PL, Marquardt H, Phillips DH. DNA adducts in human breast tissue: association with *N*-acetyltransferase-2 (NAT2) and NAT1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1998; 7: 1019-1025

Probst-Hensch NM, Haile RW, Ingles SA, Longnecker MP, Han CY, Lin BK, Lee DB, Sakamoto GT, Frankl HD, Lee ER, Lin HJ. Acetylation polymorphism and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 1995; 55: 2017-2020

Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNT) au Sénégal : Rapport annuel 2008.

Purewal M, Fretland AJ, Schut HAJ, Hein DW, Wargovich MJ. Association between acetylator genotype and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) DNA adduct formation in colon and prostate of inbred Fischer 344 and Wistar Kyoto rats. *Cancer Lett.* 2000; 149(1-2): 53-60

Rao KVN, Mitchison DA, Nair NGK, Prema K, Tripaty SP. Sulphadimidine acetylation test for classification of patients as slow and rapid inactivators of isoniazid. *Brit Med J.* 1970; 3: 495-497

Regueiro M, Mardini H. Determination of thiopurine methyltransferase genotype or phenotype optimizes initial dosing of azathioprine for the treatment of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002 ; 35(3): 240-244.

Reidenberg MM, Drayer DE, Lecy M and Warner H. Polymorphic acetylation of procainamide in man. *Clin Pharmacol ther.* 1975; 17: 722-730

Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002; 34: 83-448

Risch A, Wallace DMA, Bathers S, Sim E. Slow acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 231-236

Rocha L, Garcia C, de Mendoca A, Gil JP, Bishop DT, Lechner MC. N-Acetyltransferases (NAT2) genotype and susceptibility to sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics.* 1999; 9: 9-15

Rodrigo L, Alvarez V, Rodriguez M, Pérez R, Alvarez R, Coto E. N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P450IIE1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case-control study. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34(3): 303-307

Rodriguez S, Gaunt TR and Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol.* 2009; 169: 505-514



- Rodriguez-Lima F, Dupret JM. 3D model of human arylamine N-acetyltransferase 2: structural basis of the slow acetylator phenotype of the R64Q variant and analysis of the active-site loop. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 ; 291: 116-123
- Roemer HC, Weistenhofer W, Lohlein D, Geller F, Blomeke B, and Golka K. N-Acetyltransferase 1 in colon and rectal cancer cases from an industrialized area. *J Toxicol Environ Health A.* 2008; 71: 902-905
- Roots I, Drakoulis N and Brockmüller J. Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts, methodology and data review. In: Pharmacogenetics of Drug Metabolism. Kalow W (Ed). *Pergamon, New York.* 1992; p815-841.
- Rothman N, Bhatnagar VK, Hayes RB, Zenser TV, Kashyap SK, Butler MA, Bell DA, Lakshmi V, Jaeger M, Kashyap R, Hirvonen A, Schulte PA, Dosemeci M, Hsu F, Parikh DJ, Davis BB, Talaska G. The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 5084-5089
- Rustan T, Hein D, Feng Y, Doll M, Ferguson R. Metabolic activation aromatic and deactivation of carcinogens by NAT1 and NAT2 . *Carcinogenesis.* 1993; 14:1633-1638
- Rychlik-Sych M, Skretkiewicz J, Gawronska-Szklarz B, Górnik W, Sysa-Jedrzejowska A, Skretkiewicz-Szarmach K. Acetylation genotype and phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Pharmacol Rep.* 2006; 58: 22-29
- Sabbagh N, Delaporte E, Marez D, Lo-Guidice J, Piette F and Broly F. NAT2 genotyping and efficacy of sulfasalazine in patients with chronic discoid lupus erythematosus. *Pharmacogenetics.* 1997; 7 (2): 131-5
- Sabbagh A, Darlu P, Langaney A, Poloni ES. Haplotype tagging efficiency and tagSNP sets portability in worldwide populations in NAT2 gene. *Bull Mém Soc d'Anthrop de Paris.* 2007; 19(3-4): 233-241
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gérard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES. Worldwide distribution of NAT2 diversity: Implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genetics.* 2008; 9: 21
- Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B, Poloni ES. Arylamine N-Acetyltransferase 2 (NAT2) Genetic Diversity and Traditional Subsistence: A Worldwide Population Survey. *PLoS ONE.* 2011; 6 (4): 10p
- Sanderson S, Salanti G, Higgins J. Joint effects of the N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(7): 741-51
- Sandy J, Mushtaq A, Kawamura A, Sim E, Noble M. The structure of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*, an enzyme which inactivates the antitubercular drug isoniazid. *J Mol Biol.* 2002; 318: 1071-1083
- Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Goen T, Griffin P, Schnakenberg E, Ehlers C, Feyerabend W, Werdin R, Hubotter R, Dreikorn K, Schloot, W. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) and loss of heterozygosity in bladder cancer patients. *Clin Genet.* 1998; 53: 396-402

Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Goen T, Griffin P, Hotchkiss SAM, Larese F, Montomoli L, Perkins J, Schmelz M, Van De Sandt J, Williams F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2000; 8: 133-152

Schaaf HS, Parkin DP, Seifart HI, Werely CJ, Hesselning PB, van Helden PD, Maritz JS, Donald PR. Isoniazid pharmacokinetics in children treated for respiratory tuberculosis. *Arch Dis Child.* 2005; 90: 614-618

Schnakenberg E, Ehlers C, Feyerabend W, Werdin R, Hubotter R, Dreikorn K, Schloot W. Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) and loss of heterozygosity in bladder cancer patients. *Clin Genet.* 1998; 53: 396-402

Sekine A, Saito S, Iida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S, Nakamura Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1, and L1CAM in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2001; 46 (6): 314-319

Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK. Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 916-919

Shi M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by highthroughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem.* 2001; 47: 164-72

Shimizu Y, Dobashi K, Mita Y, Endou K, Moriya S, Osano K, Koike Y, Higuchi S, Yabe S, Utsugi M, Ishizuka T, Hisada T, Nakazawa T, Mori M. DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity. *Tuberculosis (Edinb).* 2006; 86: 374-381

Shishikura K, Hohjoh H, Tokunaga, K. Novel allele containing a 190C>T nonsynonymous substitution in the N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Human Mutat.* 2000; 5: 581.

Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekblom A, Rane A and Cnattingius S. Caffeine Metabolism and the Risk of Spontaneous Abortion of Normal Karyotype Fetuses. *Obstet Gynecol.* 2001; 98 (6): 1059-1066

Sillanpää P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, Vainio H, Mitrunen K. NAT2 slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2005; 114: 579-584

Sim E, Hickman D. Polymorphism in human N-acetyltransferase - the case of the missing allele. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12: 211-213

Sim E, Stanley LA, Risch A, Thygesen P. Xenogenetics in multifactorial disease susceptibility. *Trends Genet.* 1995; 11: 509-512

Sim E, Westwood I, Fullam E. Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007; 3: 169-184

Sim E, Walters K, Boukouvala S. Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev.* 2008a; 40: 479-510

Sim E, Lack N, Wang CJ, Long H, Westwood I, Fullam E, Kawamura A. Arylamine N-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology*. 2008b; 254: 170-183

Sinclair JC, Sandy J, Delgoda R, Sim E, Noble MEM. Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nat Struct Biol*. 2000; 7: 560-564

Singh N, Dubey S, Chinnaraj S, Golani A, Maitra A. Study of **NAT2** gene polymorphisms in an Indian population: association with plasma isoniazid concentration in a cohort of tuberculosis patients. *Mol Diagn Ther*. 2009; 13(1): 49-58

Slattery ML, Wolff RK, Curtin K, Fitzpatrick F, Herrick J, Potter JD, Caan BJ, Samowitz WS. Colon tumour mutations and epigenetic changes associated with genetic polymorphism: Insight into disease pathways. *Mutat Res*. 2009; 660: 12-21

Smith CA, Wadelius M, Gough AC, Harrison DJ, Wolf CR, Rane A. A simplified assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J Med Genet*. 1997; 34(9):758-760

Sotsuka T, Sasaki Y, Hirai S, Yamagishi F and Ueno K. Association of Isoniazid-metabolizing Enzyme Genotypes and Isoniazid-induced Hepatotoxicity in Tuberculosis Patients. *In Vivo*. 2011; 25 (5): 803-812

Spielberg SP. N-acetyltransferases: Pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1996; 24: 509-519

Stillwell WG, Kidd LC, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R. Urinary excretion of unmetabolized and Phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase activity. *Cancer Res*. 1997; 15: 3457-3464

Stone EM, Williams JA, Grover PL, Gusterson BA, Phillips DH. Interindividual variation in the metabolic activation of heterocyclic amines and their N-hydroxy derivatives in primary cultures of human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis (Lond)*. 1998; 19: 873-879

Straka RJ, Hansen SR, Benson SR, Walker PF. Predominance of slow acetylators of N-acetyltransferase in a Hmong population residing in the United States. *J Clin Pharmacol*. 1996; 36: 740-747

Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Sortica VA, Hutz MH. Accuracy of NAT2 SNP genotyping panels to infer acetylator phenotypes in African, Asian, Amerindian and admixed populations. *Pharmacogenetics*. 2012; 13: 851-854

Sugiura T, Kato Y and Tsuji A. Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition. *J Control Release*. 2006; 116: 238-246

Svensson CK and Hein DW. Drug Metabolism and Transport: Molecular Methods and Mechanisms. Lash LH, editor. Humana Press; Totowa, NJ: 2005. p. 173-195

Talbot J., Magno L. A. V, Santana C. VN., Sousa S. MB., Melo P. RS., Correa R. X., Pietro G. D., Rios-Santos F. Interethnic diversity of NAT2 polymorphisms in Brazilian admixed populations. *BMC Genetics*. 2010; 11(87): 7p

Tang BK, Zubovits T, Kalow W. Determination of acetylated caffeine metabolites by high-performance exclusion chromatography. *J Chromatogr*. 1986; 375:170-173

Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W. Caffeine as a metabolic probe: Validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther*. 1991; 49(6): 648-657

Tanigawara Y, Kita T, Aoyama N, Gobara M, Komada F, Sakai T, Kasuga M, Hatanaka H, Sakafda T, Okumura K. N-acetyltransferase 2 genotype related sulfapyridine acetylation and its adverse events. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25: 1058-1062

Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *Cancer Res*. 1998; 58: 3603-3610

Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQP, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FCQ, Suffys PN, Santos AR. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res*. 2007; 624: 31-40

Teixeira RLF, Silva Junior FP, Silveira AR, Cabello PH, Mendonca-Lima L, Rabahi MF, Kritski AL, Mello FCQ, Suffys PN, Miranda AB, Santos AR. Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: Identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res*. 2010; 683: 43-49

The consensus gene nomenclature of human NAT2 alleles [<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>]

Timbrell JA. Studies on the role of acetylhydrazine in isoniazid hepatotoxicity. *Arch Toxicol Suppl*. 1979; 2: 1-8

Tsukino H, Kuroda Y, Nakao H, Imai H, Inatomi H, Osada Y, Katoh T. Cytochrome P450 (CYP) 1A2, sulfotransferase (SULT) 1A1 and N-acetyltransferase (NAT) 2 polymorphisms and susceptibility to urothelial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004; 130: 99-106

Tuberculosis Chemotherapy Centre, Madras. The prevention and treatment of isoniazid toxicity in the therapy of pulmonary tuberculosis. *Bull Wld Hlth Org*. 1963; 38: 455-475

Upton A, Johnson N, Sandy J, Sim E. Arylamine N-acetyltransferases -of mice, men and microorganisms. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 140-146

Van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Kromhout D, Bueno de Mesquita HB. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. *Pharmacogenetics*. 2003; 13: 399-407

Van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Grobbee MA, Ocke DE, Bueno de Mesquita M. GSTM1 null genotype, red meat consumption and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control*. 2004; 15: 295-303

Van Eyken E, Van Camp G, Fransen E, Topsakal V, Hendrickx JJ, Demeester K, Van de Heyning P, Maki-Torkko E, Hannula S, Sorri M, Jensen M, Parving A, Bille M, Baur M, Pfister M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Orzan E, Espeso A, Stephens D, Verbruggen K, Huyghe J, Dhooge I, Huygen P, Kremer H, Cremers, CW, Kunst S, Manninen M, Pyykko I, Lacava A, Steffens M, Wienker TF, and Van Laer L. Contribution of the *N*-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2\*6A to age-related hearing impairment. *J Med Genet*. 2007; 44: 570-578

Vatsis KP, Weber WW. Structural heterogeneity of Caucasian *N*-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 301: 71-76

Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DAP, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Yamazoe Y. Nomenclature for *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*. 1995; 5: 1-17

Vatsis KP, Martell K, Weber W. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic NAT. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 88: 6333- 6337

Vaziri SAJ, Hughes NC, Sampson H, Darling G, Jewett MAS, and Grant DM. Variation in enzymes of arylamine procarcinogen biotransformation among bladder cancer patients and control subjects. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 7-20

Vineis P, Bartsch H, Caporaso N, Harrington AM, Kadlubar FF, Landi MT, Malaveille C, Shields PG, Skipper P, Talaska G, Tannenbaum SR. Genetically based *N*-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature*. 1994; 369: 154-156

Vineis P and McMichael A. Interplay between heterocyclic amines in cooked meat and metabolic phenotype in the etiology of colon cancer. *Cancer Causes Control*. 1996; 7(4): 479-486

Vineis P, Marinelli D, Autrup, H, Brockmüller J, Cascorbi I, Daly AK, Golka K, Okkels H, Risch A, Rothman N, Sim E, Taioli E. Current smoking, occupation, *N*-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2001; 10: 1249-1252

Vivien JN, Thibier R, Grosset J, Lepeuple A. Resultats précoces de l'isoniazidothérapie en fonction du taux d'isoniazide actif dans le sérum. *Rev Tuberc*. 1958; 22: 208-222

Vivien JN, Thibier R, Lepeuple A. La pharmacocinétique de l'isoniazide dans la race blanche. *Rev Fr Mal Respiratoire*. 1973; 1: 753-773

Walraven JM, Trent JO, Hein DW. Structure-function analyses of single nucleotide polymorphisms in human *N*-acetyltransferase 1. *Drug Metab Rev* 2008; 40: 169-184

Weber WW and Hein DW. *N*-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev*. 1985; 37: 25-79.

Weber WW. Pharmacogenetics. Oxford Monographs on Medical Genetics. New York Oxford University Press. 1997; vol 15.

Weiner M, Burman W, Vernon A, Benator D, Peloquin CA, Khan A, Weis S, King B, Shah N, Hodge T; Tuberculosis Trials Consortium. Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 1341-1347

Weiner M, Benator D, Burman W, Peloquin CA, Khan A, Vernon A, Jones B, Silva-Trigo C, Zhao Z, Hodge T, and, Tuberculosis Trials Consortium. Association between acquired rifamycin resistance and the pharmacokinetics of rifabutin and isoniazid among patients with HIV and tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 1481-1491

Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med.* 2003; 348: 529-537

Weisburger JH. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. *Mutat Res.* 1997; 376: 261-266

Weistenhofer W, Blaszkewicz M, Bolt HM, Golka K. N-Acetyltransferase 2 and medical history in bladder cancer cases with a suspected occupational disease (BK 1301) in Germany. *J Toxicol Environ Health A.* 2008; 71: 906-910

Westwood IM, Holton SJ, Rodriguez-Lima F, Dupret JM, Bhakta S, Noble ME, Sim E. Expression, purification, characterization and structure of *Pseudomonas aeruginosa* arylamine N-acetyltransferase. *Biochem J.* 2005; 385: 605-612

Westwood IM, Kawamura A, Fullam E, Russell AJ, Davies SG, Sim E. Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Curr Top Med Chem.* 2006; 6: 1641-1654

WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report no. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva: WHO, 2011. Available from URL: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/pdf/fullreport.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/pdf/fullreport.pdf). 258p

Wikman H, Thiel S, Jäger B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Edler L, Dienemann H, Kayser H, Schulz V, Drings P, Bartsch H, Risch A. Relevance of N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1, NAT2) genetic polymorphisms in non-small cell lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:157-168.

Williams JA, Phillips DH. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 4667-4677

Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: Functional and localization studies. *Mutat Res.* 1997; 376: 153-160

Yalin S, Hatungil R, Tamer L, Ates N, Dogruer N, Karakas S. NAT2 polymorphism in diabetes. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25 (4): 407-411

Yu MC, Skipper PL, Taghizadeh K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson BE and Ross RK. Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86:712-716

Yu MW, Pai CI, Yang SY, Hsiao TJ, Chang HC, Lin SM, Liaw YF, Chen PJ, Chen CJ. Role of N-acetyltransferase polymorphisms in hepatitis B related hepatocellular carcinoma: impact of smoking on risk. *Gut.* 2000; 47(5): 703-9

Yuliwulandari R, Sachrowardi Q, Nishida N, Takasu M, Batubara L, Susmiarsih TP, Rochani JT, Wikaningrum R, Miyashita R, Miyagawa T, Sofro AS, Tokunaga K. Polymorphisms of promoter and coding regions of the arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene in the Indonesian population: proposal for a new nomenclature. *J Hum Genet* 2008; 53: 201-209

Zang Y, Zhao S, Doll MA, States JC, Hein DW. The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation. *Pharmacogenetics*. 2004; 14(11): 717-723

Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*. 2007; 28(8): 1665-1671

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *N-S Arch Pharmacol*. 2004; 369: 23-37

Zenser TV, Lakshmi VM, Rustan TD, Doll MA, Deitz AC, Davies BB, Hein DW. Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Res*. 1996; 56: 3941-3947

Zhou Z, Chen L, Liu P, Shen M and Zou F. Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin and Acetylisoniazid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J Soc Analyt Chem*. 2010 ; 26 : 1133-1138

Zscheschang P, Hiepe F, Gromnica-Ihle E, Roots I, Cascorbi I. Lack of association between arylamine N-Acetyltransferases 2 (NAT2) polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Pharmacogenetics*. 2002; 12: 559–563

**Nom et prénoms du Candidat : Mme Aminata TOURE Ep TOURE**

**Titre de la thèse** Etude du polymorphisme génétique de la N-Acétyltransférase de type 2 dans la population sénégalaise : prévention de la toxicité et de l'échec thérapeutique de l'isoniazide dans la prise en charge de la tuberculose

**Date et lieu de soutenance** 10 Décembre 2012 à l'amphi 8 de la faculté de médecine de Dakar

**Jury :** Président : Pr Michel Lhermitte  
Membres : Pr Amadou DIOUF  
Pr Aynina CISSE  
Pr Jean Pierre GOULLE

**Résumé :** Un xénobiotique subit plusieurs étapes de biotransformations simultanées ou successives dont les principaux sites sont les tissus situés à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur, à savoir : le tube digestif, l'appareil respiratoire, le rein et le foie. Ce dernier étant fonctionnellement le plus important. Les phases réactionnelles principales constituant les étapes de détoxification, phase I, phase II et phase III, ne sont possibles que par l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques. Etant donné la grande diversité des xénobiotiques auxquels l'organisme est exposé, il existe une multitude d'enzymes présentant des spécificités variées. Les réactions de biotransformation des xénobiotiques s'enchaînent rarement de façon linéaire, car deux voies ou plus prennent souvent naissance à partir d'un métabolite donné. On comprend dès lors que l'existence d'un variant enzymatique défectif pour l'une de ces voies réactionnelles pourra orienter le métabolisme d'une substance donnée vers une autre voie. Cette dernière, généralement mineure, prendra donc une grande importance et les polymorphismes qui la concernent pourront orienter le devenir des métabolites ainsi formés. La famille des N-acétyltransférases (NATs) fait partie des enzymes assurant principalement la réaction de conjugaison de la phase II de détoxification des xénobiotiques. Le polymorphisme des NATs représente l'un des exemples de variation pharmacogénétique décrit, et de l'un des plus documentés, depuis sa découverte au début des années 50, en même temps que la découverte de la grande efficacité de l'isoniazide (INH) dans le traitement de la tuberculose. Les travaux de cette thèse avaient pour objectif d'étudier le profil d'acétylation de la NAT2 dans la population sénégalaise afin de les répartir en acétyleurs lents et en acétyleurs rapides, et de déterminer la cinétique de l'isoniazide chez des sujets tuberculeux en corrélation avec les résultats de génotypage. L'étude des mutations du gène *NAT2* a été effectuée par PCR-séquençage directe et a permis d'identifier 11 variants alléliques du gène *NAT2* ; l'activité enzymatique de la NAT2 a été déterminée sur des urines par utilisation du test à la caféine. La cinétique de l'isoniazide a été étudiée chez des patients tuberculeux et a utilisé la chromatographie LC-MS/MS. Ce travail présente les premiers résultats de l'étude de la NAT2 dans la population sénégalaise et les résultats pourront être utilisés pour une meilleure optimisation de l'utilisation de l'INH dans la prise en charge de la tuberculose, maladie à forte prévalence en Afrique.

**MOTS-CLES :** N-acétyltransférase (NAT2), Polymorphisme génétique, Toxicité, indice d'acétylation, hépatotoxicité, Isoniazide.

---

**LABORATOIRES DE RATTACHEMENT :** Laboratoire de toxicologie-hydrologie de la faculté de médecine, pharmacie et d'odontostomatologie de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar, chef de service : Pr Amadou DIOUF. EA4487, Faculté de Médecine/ Pôle recherche, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, Prs M. Lhermitte et F. Broly, laboratoire de Toxicologie et génopathies du Centre de Biologie-Pathologie, CHRU de Lille2.