

données récentes indiquent que le polymorphisme des gènes des transporteurs membranaires de médicaments peut également avoir une importance. Il paraît donc souhaitable de déterminer les conséquences cliniques des 2 à 3 millions de polymorphismes d'un seul nucléotide (single nucleotide polymorphism : SNP) que contient le génome humain. Cependant le faible nombre d'individus (cependant la proportion peut varier grandement selon les ethnies) concernés par la majorité des SNPs conduit à s'interroger sur l'opportunité d'implanter la pharmacogénétique en pratique médicale courante.

Le polymorphisme d'expression des enzymes de biotransformation des xénobiotiques a également été associé à une plus grande susceptibilité de certains individus à des cancers d'origine chimique. Plusieurs études ont abouti à cette conclusion et mettent en cause différentes enzymes. Cependant il est souvent difficile d'associer au seul polymorphisme de ces enzymes la fréquence parfois seulement légèrement accrue de certains cancers. Ici, s'agissant du métabolisme de composés toxiques, il serait plus approprié d'employer le terme de toxicogénétique.

Influence de l'enzyme cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) sur le métabolisme de la TFMP [1-(3-trifluorométhylphényl)pipérazine]. Recherches à l'aide de modèles *in vitro* et animaux

R.F. STAACK, T. KRAEMER, H.H. MAURER

Department of experimental and clinical toxicology, University of Saarland, 66421 Homburg/Saar, Germany

Objectif : La connaissance du polymorphisme génétique des isoenzymes du cytochrome P450, responsables du métabolisme des xénobiotiques, est indispensable pour prédire la toxicocinétique et l'évaluation de risques toxicologiques. Dans le développement préclinique des médicaments, la détermination de ces isoenzymes est faite à l'aide de modèles *in vitro* ou testée chez des animaux choisis pour ces investigations. Ces modèles peuvent également être utiles à l'étude de la toxicocinétique des nouvelles drogues synthétiques, dans le domaine de la toxicologie clinique et médico-légale. Les résultats obtenus sur la TFMPP (drogue synthétique) sont présentés, en utilisant comme modèles, d'une part, des microsomes hépatiques humains et d'autre part, des enzymes humaines recombinantes, ainsi que différentes lignées de rats (possédant l'isoenzyme CYP2D1, homologue du CYP2D humain): Dark Agouti (DA) pour le phénotype CYP2D6 métaboliseur lent ou Wistar (WI) pour le phénotype CYP2D6 métaboliseur rapide.

Matériel et méthodes : Les études *in vitro*, ont été réalisées avec des préparations de microsomes de cellules

d'insectes transgéniques et des microsomes hépatiques humains pour étudier le métabolisme de la TFMPP, en les incubant avec ou sans quinidine (un inhibiteur du CYP2D6). La quantification du TFMPP et de ses métabolites a ensuite été réalisée par CLHP-SM, sans préparation préliminaire. Les études *in vivo* ont été faites avec des rats DA, mâles et femelles, et des rats mâles WI, avec ou sans traitement préalable par la quinine. Après administration de la TFMPP, des prélèvements sanguins ont été effectués à 1, 3, 5, 7 et 9 h. et des échantillons urinaires ont été recueillis pendant 24 h. La TFMPP et ses métabolites ont ensuite été dosés dans les liquides biologiques, après extraction en phase solide et dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique. Les analyses ont été réalisées par CPG-SM, en mode SIM. Dans les échantillons urinaires, le rapport TFMPP/hydroxyTFMPP a été calculé. La TFMPP a été dosée dans les échantillons plasmatiques, en utilisant la m-chlorophénylpipérazine (mCPP) comme étalon interne.

Résultats : Seules les enzymes CYP1A2, CYP2D6 et CYP3A4 sont impliquées dans l'hydroxylation de la drogue TFMPP. La CYP2D6 est l'enzyme la plus importante, comme l'ont confirmé les études d'inhibition. Les expériences faites sur les animaux ont montré que les concentrations du métabolite hydroxy-TFMPP étaient significativement plus basses dans les urines des rats DA, mâles et femelles, comparées aux concentrations trouvées dans les urines des rats WI. Par contre, la concentration plasmatique de la drogue TFMPP a toujours été plus élevée dans le plasma des rats DA comparée à celle des rats WI. De plus, les traitements prélabiles des rats WI (modèle de métaboliseur rapide) avec la quinine, inhibiteur du CYP2D1 des rats, ont donné des concentrations plasmatiques significativement plus élevées, par rapport à celles des rats non traités.

Conclusion : L'utilisation de tels modèles, *in vitro* et animaux, permet de prédire chez l'homme, un comportement pharmacocinétique différent de la drogue TFMPP selon qu'il s'agit d'un sujet métaboliseur limité ou d'un sujet métaboliseur rapide.

Intérêt du génotypage du cytochrome P450 2D6 pour l'optimisation des thérapeutiques par fluoxétine et paroxétine

C. CHARLIER⁽¹⁾, F. BROLY⁽²⁾, M. LHERMITTE⁽²⁾, M. ANSSEAU⁽¹⁾, G. PLOMTEUX⁽¹⁾,

(1) CHU Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique

(2) CHRU, Hôpital Calmette, F-59045 Lille

Objectif : L'existence d'un polymorphisme génétique de monooxygénases à cytochromes P450 - largement impliqués dans le métabolisme de certains médicaments, et notamment des antidépresseurs - peut expliquer des différences importantes dans la biotransformation de ces molécules, entraînant une variabilité de

leurs concentrations sanguines selon les individus recevant des doses standards. Des échecs thérapeutiques liés à une mauvaise tolérance du produit (surdosage) ou à une activité insuffisante (sous dosage) pourraient être évités en déterminant le profil génétique des sujets traités par antidépresseurs, médicaments pour lesquels il est par ailleurs bien établi que la compliance est faible (1).

Matériel et méthodes : L'étude porte sur 49 patients traités pour dépression majeure (critères d'inclusion basés sur le DSM IV et l'échelle MADRS). Les patients étaient tous d'origine caucasienne et ont reçu de la fluoxétine (20 mg/jour ; 12 patients) ou de la paroxétine (20 mg/jour ; 37 patients). La concentration sérique en antidépresseur a été mesurée à l'état d'équilibre par CPG-SM (2). Le génotypage du Cyt P450 2D6 a été réalisé par analyse des tailles des fragments de restriction du locus 2D6 (RFLP, avec les endonucléases XbaI et Eco RI) et par étude du polymorphisme de conformation de fragments d'ADN simples brins générés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR-SSCP) pour étudier les neuf exons du gène CYP2D6 (3).

Résultats : Parmi les 12 patients traités à la fluoxétine, deux étaient des métaboliseurs lents, les 10 autres étaient des métaboliseurs rapides ((fluoxétine(: $178,5 \pm 68,6$ µg/L et $49,4 \pm 40,7$ µg/L, respectivement). En ce qui concerne les sujets recevant de la paroxétine, le génotypage a permis d'identifier 6 métaboliseurs lents ((paroxétine(: $72,5 \pm 29,65$ µg/L), 1 métaboliseur ultrarapide ((paroxétine(indétectable), et 5 métaboliseurs rapides. ((paroxétine(: $20,97 \pm 21,17$ µg/L). Les concentrations sériques en antidépresseurs étaient strictement corrélées au statut génétique des patients.

Conclusion : Le traitement de la dépression reste difficile, avec un grand nombre d'échecs thérapeutiques parfois dus à la mauvaise compliance du patient - qui tolère mal le médicament ou qui ne ressent aucune amélioration de son état - mais aussi à la méconnaissance du statut génétique des enzymes de biotransformation, pouvant expliquer que pour des doses standards de médicaments administrés, les concentrations plasmatiques sont inadaptées à l'intervalle thérapeutique. La détermination du profil métaboliseur du patient pourrait aider le clinicien à ajuster la posologie médicamenteuse dès la mise en place du traitement.

Références :

1. Charlier C. et coll. Manifestations indésirables des antidépresseurs, Toxicorama 1997 ; 9 : 310-4
2. Charlier C. et al. Relationship between clinical effects, serum drug concentration and concurrent drug interactions in depressed patients treated with citalopram, fluoxetine, clomipramine, paroxetine or venlafaxine, Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp., 2000 ; 15 : 453-9.
3. Broly F et al. An efficient strategy for detection of known and new mutations of the CYP2D6 gene using

single strand conformation polymorphism analysis, Pharmacogenetics, 1995 ; 5 : 373-84.

Mise en évidence et caractérisation du polymorphisme génétique de la thromboxane synthase (CYP5A1) et de la prostacycline synthase (CYP8A1)

D. CHEVALIER, D. ALLORGE, J.-M. LO-GUIDICE, C. CAUFFIEZ, M. LHERMITTE, F. BROLY

Equipe d'accueil EA 2679, Variabilité génétique des défenses de la muqueuse respiratoire face à son environnement, Faculté de Médecine de Lille, Pôle Recherche, place de Verdun, 59045 Lille.

Objectif : Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de polymorphismes génétiques d'activité d'enzymes de la superfamille des CYP450 et de l'étude de leur rôle dans la susceptibilité aux pathologies bronchopulmonaires. A l'origine de ces affections, on invoque classiquement l'effet de facteurs environnementaux et en particulier le tabac. Il n'est cependant pas déraisonnable de penser que des facteurs génétiques puissent également jouer un rôle dans la maladie. Les enzymes de la superfamille CYP450 jouent un rôle fondamental à la fois dans la défense de l'organisme face à son environnement chimique et dans des processus physiologiques essentiels, dont des anomalies pourraient conditionner la susceptibilité des individus aux pathologies bronchopulmonaires. A ce titre, la thromboxane synthase (CYP5A1) et la prostacycline synthase (CYP8A1), codant des enzymes impliquées dans la cascade d'activation de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase, et dans la synthèse respectivement d'un médiateur vasopressif et bronchoconstricteur (TXA2) et vasodépresseur et bronchodilatateur (PGI2) sont de bons gènes candidats (1).

Matériel et méthode : La première partie de cette recherche a consisté à développer une stratégie PCR-SSCP de recherche et d'identification de mutations pour les gènes CYP5A1 et CYP8A1. Cette méthode d'analyse a été appliquée à une population de volontaires sains, puis, lors d'une étude pilote, à une population de patients atteints d'asthme. Dans une deuxième partie, l'analyse fonctionnelle des mutations identifiées au niveau des régions codantes du CYP5A1 et du CYP8A1 a été effectuée. Les conséquences des mutations sur l'activité enzymatique spécifique ont été étudiées, grâce à un système cellulaire d'expression hétérologue, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Résultats et discussion : L'analyse PCR-SSCP du CYP5A1 et du CYP8A1 a permis la détection d'un grand nombre de variants alléliques. Au total, pour le CYP5A1, 12 allèles ont été caractérisés, dont 8 sont porteurs de mutations faux-sens, ainsi que 9 allèles pour le CYP8A1, dont 3 sont porteurs de mutations faux-sens. La comparaison des fréquences des allèles