

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	4
LISTE DES TABLEAUX .....	5
LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
INTRODUCTION.....	9
I. CONCEPT, DEFINITION ET HISTORIQUE DE LA PHARMACOGENETIQUE .....	11
A. Polymorphisme génétique et conséquences fonctionnelles .....	11
1. Les différents niveaux du polymorphisme génétique.....	11
a) <i>Variations de la séquence codante</i> .....	12
b) <i>Variations de la régulation transcriptionnelle</i> .....	14
c) <i>Variations de la régulation post-transcriptionnelle</i> .....	15
2. Rappels sur les médicaments et leur métabolisme .....	22
a) <i>Définition du médicament</i> .....	22
b) <i>Principes du métabolisme des médicaments</i> .....	22
c) <i>Les protéines de transport transmembranaire</i> .....	23
d) <i>Le métabolisme hépatique</i> .....	23
e) <i>Les voies d'élimination biliaire et fécale</i> .....	24
f) <i>La voie d'élimination rénale</i> .....	25
3. Conséquences fonctionnelles du polymorphisme des protéines impliquées dans le métabolisme des médicaments .....	25
a) <i>Modifications du fonctionnement des enzymes</i> .....	25
b) <i>Modifications du transport transmembranaire</i> .....	27
c) <i>Modifications du fonctionnement des récepteurs cibles</i> .....	27
B. Le concept de pharmacogénétique .....	28
1. Un sous-ensemble de la pharmacogénomique .....	28
a) <i>Problématique</i> .....	28
b) <i>La pharmacogénétique, une entité « simple »</i> .....	28
c) <i>L'apparition du terme de pharmacogénomique</i> .....	29
2. Une discipline englobant plusieurs domaines .....	30
a) <i>La pharmacocinétique</i> .....	30
b) <i>La pharmacodynamie</i> .....	31
3. Champs d'application et buts de la pharmacogénétique .....	32
a) <i>La situation actuelle</i> .....	32
b) <i>L'apport de la pharmacogénétique</i> .....	33
C. Historique de la pharmacogénétique .....	35
1. La naissance de cette discipline .....	35
2. Le développement de la pharmacogénétique .....	36
II. LA PHARMACOGENETIQUE EN MEDECINE HUMAINE.....	37
A. La pharmacogénétique : une aide aux choix d'un principe actif.....	37
1. Pré-sélection des patients éligibles au traitement.....	37
a) <i>Thérapie anticancéreuse : exemple du tamoxifène utilisé dans le traitement       contre le cancer du sein chez la femme</i> .....	37
b) <i>Traitement de la maladie de Fabry : stabilisation de l'Alpha-galactosidase-A</i> ..	40
2. Evaluation des taux de réussite d'un traitement : exemple du traitement de l'addiction à l'alcool par la naltrexone .....	42
a) <i>Mode d'action et métabolisme de l'alcool</i> .....	42
b) <i>Polymorphisme génétique et conséquences</i> .....	43

B.	La pharmacogénétique : un outil pour l'adaptation du dosage d'un principe actif.....	44
1.	Thérapie immunosuppressive : exemple de la TPMT et de l'azathioprine.....	44
a)	<i>Indication des médicaments thiopuriniques</i> .....	44
b)	<i>Mode d'action des médicaments thiopuriniques</i> .....	45
c)	<i>Polymorphisme génétique de TPMT et conséquences</i> .....	46
d)	<i>Modulation du dosage des médicaments thiopuriniques en fonction du génotype</i> 47	
2.	Utilisation des anticoagulants : exemple de la warfarine.....	48
a)	<i>Présentation et mode d'action de la warfarine</i> .....	48
b)	<i>Polymorphisme génétique des gènes impliqués dans le métabolisme de la warfarine</i> .....	49
c)	<i>Conséquences thérapeutiques</i> .....	50
3.	Thérapie des affections psychologiques.....	51
a)	<i>Présentation et métabolisme des neuroleptiques</i> .....	51
b)	<i>Polymorphisme génétique</i> .....	52
c)	<i>Conséquences thérapeutiques</i> .....	52
C.	Mise en œuvre concrète de la pharmacogénétique et limites en milieu hospitalier humain.....	54
1.	Chiffres et coûts engendrés par les erreurs de dosage imputables au polymorphisme de réponse des patients.....	54
a)	<i>Chiffres issus des données américaines</i> .....	54
b)	<i>Chiffres issus des données Européennes et Françaises</i> .....	55
2.	Structures médicales utilisant les outils de la pharmacogénétique et moyens mis à leur disposition.....	55
3.	Quelles limites et quel avenir pour cette discipline en milieu hospitalier humain ?	57
a)	<i>Problème de la rentabilité</i> .....	57
b)	<i>Problèmes d'ordre éthique</i> .....	58
c)	<i>Un manque de structuration se traduisant par une hétérogénéité marquée</i> .....	59
d)	<i>La prise de conscience du problème par les cliniciens</i> .....	59
e)	<i>Perspectives d'avenir pour la pharmacogénétique</i> .....	60
III.	ETAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES EN MEDECINE VETERINAIRE.....	63
A.	Le polymorphisme chez le chien, d'abord une affaire de race.....	63
1.	Histoire et définition des races canines.....	63
a)	<i>Origine et domestication du chien</i> .....	63
b)	<i>Les « variétés canines », précurseurs des races de chien</i> .....	64
c)	<i>L'apparition des races actuelles</i> .....	65
2.	Les races sont des isolats génétiques stratifiés.....	66
a)	<i>Les races représentent des isolats génétiques</i> .....	66
b)	<i>Des groupes stratifiés en constante évolution</i> .....	68
B.	Le polymorphisme interracial, support d'une diversité fonctionnelle.....	70
1.	Exemple d'un caractère mixte avec gène à effet majeur : la taille du chien.....	70
2.	Exemple d'un caractère oligogénique : la structure du poil.....	72
C.	Polymorphisme et pharmacogénétique en médecine vétérinaire.....	75
1.	Sensibilité à l'ivermectine, gène <i>Mdr1</i> et glycoprotéine P.....	75
a)	<i>Historique et mise en évidence</i> .....	75
b)	<i>Mode d'action</i> .....	76
c)	<i>Polymorphisme de ABCB1</i> .....	78
d)	<i>Conséquences du contact avec les lactones macrocyclics</i> .....	78
e)	<i>Conséquences du contact avec d'autres substrats de la glycoprotéine P</i> .....	79

2.	TPMT et azathioprine.....	81
a)	<i>Les médicaments thiopuriniques chez les animaux</i> .....	81
b)	<i>Polymorphisme de TPMT chez le chien</i> .....	82
c)	<i>Conséquences fonctionnelles sur l'activité TPMT</i> .....	82
d)	<i>Cas particulier de l'espèce féline</i> .....	83
3.	CYP2B11 et propofol.....	84
a)	<i>Nature et fonction du CYP2B11</i> .....	84
b)	<i>Le propofol chez le chien</i> .....	84
c)	<i>Polymorphisme fonctionnel de CYP2B11</i> .....	84
d)	<i>Polymorphisme génétique de CYP2B11</i> .....	85
4.	Dégénérescence rétinienne induite par les fluoroquinolones dans l'espèce féline ..	86
a)	<i>Présentation et mode d'action des fluoroquinolones</i> .....	86
b)	<i>Approche du problème</i> .....	86
c)	<i>Polymorphismes félins pour le gène ABCG2</i> .....	87
D.	Perspectives d'avenir.....	88
<b>CONCLUSION</b> .....		91
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		93
Liste des sites internet consultés .....		103

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** Polymorphisme de base (SNP) dans l'ADN nucléaire

**Figure 2 :** Régulation de la transcription par des protéines régulatrices

**Figure 3 :** L'épissage de l'ARN pré-messager dans le noyau

**Figure 4 :** Formation des micros ARN

**Figure 5 :** Schéma des différentes phases du métabolisme hépatique

**Figure 6 :** Les différents génotypes et phénotypes des enzymes du métabolisme des médicaments

**Figure 7 :** Rapport entre la pharmacogénétique et la pharmacogénomique

**Figure 8 :** Les différentes composantes de la pharmacogénétique

**Figure 9 :** Potentiel et champs d'application de la pharmacogénétique

**Figure 10 :** Mode d'action des médicaments thiopuriniques

**Figure 11 :** Mode d'action de la warfarine

**Figure 12 :** Arbre généalogique simplifié des races canines

**Figure 13 :** Fréquence de l'allèle SNP5 A en fonction de la taille des chiens chez différentes races canines

**Figure 14 :** Combinaison des allèles des 3 gènes intervenant dans la structure du poil chez le chien

**Figure 15 :** Mode d'action de la glycoprotéine P au niveau de l'épithélium intestinal

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Adaptation de la dose de warfarine en fonction du génotype de CYP2C9

**Tableau 2** : Liste des variants alléliques testés par le réseau français des laboratoires de pharmacogénétique

**Tableau 3** : Liste des principaux substrats de la glycoprotéine P

## LISTE DES ABREVIATIONS

**A** : Adénine

**ABC** : ATP binding cassette

**ACTH** : Hormone adrénocorticotrope

**ACVIM** : American College of Veterinary Internal Medicine

**ADN (=DNA)** : Acide désoxyribonucléique

**AKC** : American Kennel Club

**Alpha-Gal-A** : Alpha-galactosidase A

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**ARN (=RNA)** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**AST** : American Staffordshire Terrier

**ARSG** : Arylsulfatase G

**ATP** : Adénosine tri phosphate

**AZA** : Azathioprine

**C** : Cytosine

**CEP** : Chien d'eau Portugais

**cnm** : Centronuclear myopathy

**CYP**: Cytochrome P

**DRD2** : Dopamine receptor D2

**FDA** : Food and Drug Administration

**FGF5** : Fibroblast growth factor 5

**G** : Guanine

**GDF8** : Growth and differentiation factor 8

**g-P** : Glycoprotéine P

**IGF1** : Insuline-like growth factor 1

**j** : Jour

**kg** : Kilogramme

**KRT71** : Keratin-71

**LCR** : Liquide céphalorachidien

**Mdr1** : Multi drug resistance

**MeMPN** : Methyl mercaptopurine nucleotides

**mg** : Milligramme

**miARN** : Micro acide ribonucléique

**MP** : Mercaptopurine ; **6-MP** : 6-Mercaptopurine ; **Me-MP** : Méthyle-mercaptopurine

**NADPH** : Nicotinamide dinucleotide phosphate

**PA** : Principe actif

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PTPLA** : Tyrosine phosphatase like member A

**QTL** : Quantitative trait locus (= locus à caractère quantitatif)

**RISC** : RNA-induced silencing complex

**RSPO2** : R-spondin-2

**SINE** : Short interspersed repeat element

**SNP** : Single nucleotide polymorphism

**snRNP** : Small nuclear ribonucleoprotein

**T** : Thymine

**TG** : Thioguanine

**TGN** : Thioguanine nucleotides

**TIMP** : Thioinosine monophosphate

**TPMT** : Thiopurine methyl transferase

**TRBP** : TAR binding protein

**U** : Uracile

**UTR** : Untranslated region

**µg** : Microgramme

**VKORC1** : Vitamine K époxyde réductase sous unité 1



## INTRODUCTION

Au sein d'une population, une variation interindividuelle de réponse à un traitement pharmacologique est possible. Tandis que certains individus bénéficieront des effets escomptés en adoptant un schéma posologique standard, d'autres ne répondront pas au traitement ou présenteront des effets secondaires délétères, voire mortels.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis le décryptage et la cartographie des génomes. En particulier, les polymorphismes génétiques supports de cette variation de réponse sont peu à peu révélés. La pharmacogénétique une science qui permet d'établir, en fonction du polymorphisme génétique, la liste des médicaments et les règles d'utilisation qui leur sont associées, garantissant pour chaque individu une déclinaison optimale et non toxique de la pharmacopée. Le but de la pharmacogénétique est l'individualisation thérapeutique chez l'homme et l'animal.

Dans le premier volet d'une première partie, nous aborderons la notion de polymorphisme génétique et rappellerons comment, à partir de l'information génétique portée par l'ADN, notre machinerie cellulaire et métabolique produit *in fine* pour chacun d'entre nous des niveaux modulables de protéines, dont l'activité est elle-même variable. Le second volet de cette première partie rappellera les bases du métabolisme des médicaments et enfin, dans un troisième volet, nous reviendrons sur l'origine du concept de la pharmacogénétique.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation d'applications de la pharmacogénétique dans le domaine où elle est le plus développée, à savoir la médecine humaine. Nous essaierons de faire un point sur son développement actuel et énoncerons certaines perspectives envisagées pour cette discipline.

Enfin, après une analyse et une définition du polymorphisme inter-racial chez le Chien, nous montrerons comment la pharmacogénétique vétérinaire est, peu à peu, appelée à s'immiscer dans la pratique médicale.



# I. CONCEPT, DEFINITION ET HISTORIQUE DE LA PHARMACOGENETIQUE

Une première partie traitera des différents niveaux de polymorphisme chez les mammifères, ainsi que des conséquences fonctionnelles qui en résultent, y compris pour le métabolisme des médicaments. Dans un second temps, nous tenterons de définir, de décrire et de comprendre ce qu'englobe la pharmacogénétique. Un dernier volet retracera l'histoire de cette jeune discipline.

## A. Polymorphisme génétique et conséquences fonctionnelles

### 1. Les différents niveaux du polymorphisme génétique

L'acide désoxyribonucléique (ADN), support de l'information génétique, est organisé en chromatine et confiné dans le noyau de la cellule. Cette information est codée par un enchaînement de paire de bases dont la lecture permettra *in fine* la fabrication des protéines. Ces bases azotées, qui s'apparient deux à deux sont au nombre de quatre : la thymine (T), l'adénine (A), la cytosine (C) et la guanine (G) (Alberts *et al.*, 2007).

Les variations génétiques au sein du génome humain représentent un phénomène relativement commun. Une paire de bases toutes les 1000 varie entre deux individus donnés (Oscarson, 2003). Ces variations génétiques représentent une forte variabilité à l'échelle du génome tout entier qui comporte approximativement 30 000 gènes chez l'homme. De plus, la moitié de ces gènes étudiés codent pour des protéines dont les fonctions demeurent à ce jour encore méconnues (Gossard et Hamet, 2002). Ces données générales sont en grande partie transposables aux autres espèces de mammifères, en particulier au chien (Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

Le polymorphisme nucléotidique est à l'origine de possibles modifications fonctionnelles. Ainsi, il peut induire la modulation du nombre des transcrits produits (polymorphisme de régulation) ou il peut modifier la fonction des protéines (polymorphisme codant). En aval de ces modifications fréquemment documentées, le polymorphisme nucléotidique peut aussi

induire une variation dans l'ajout de groupements fonctionnels attachés aux protéines. Il peut enfin produire des changements structuraux qui modulent l'adressage des protéines aux différents compartiments cellulaires (polymorphisme de modifications post-traductionnelles).

Plusieurs classifications sont donc possibles. Celle que nous avons retenue suit l'ordre chronologique des expériences classiquement menées en laboratoire pour identifier des mutations causales de perturbations fonctionnelles.

a) *Variations de la séquence codante*

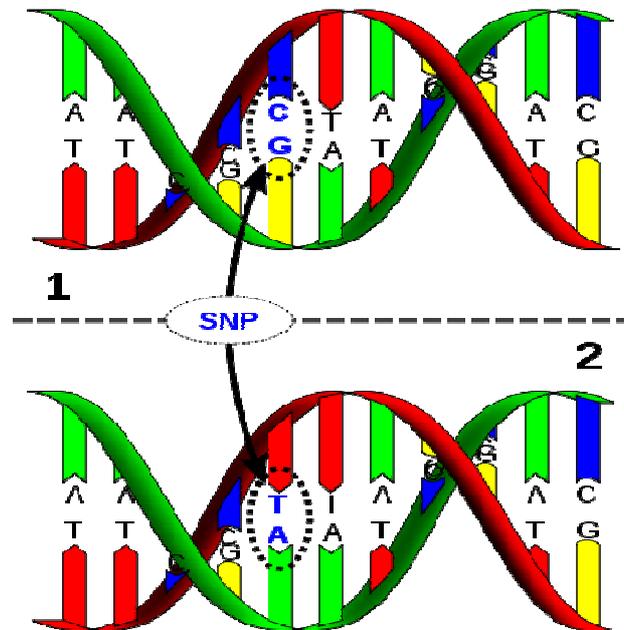
Les variations dans les séquences codantes sont les plus simples à appréhender et à mettre en évidence en recherche.

Il existe de l'ADN dit « codant » et de l'ADN dit « non codant ». L'ADN codant ne représente qu'un à cinq pourcent du génome, le reste étant de l'ADN non codant dont la fonction commence à être comprise. Cet ADN non codant intervient notamment dans la régulation de l'expression du génome. Les mutations peuvent donc intervenir dans ces deux portions de séquences d'ADN (Alberts *et al.*, 2007). Nous ne retiendrons ici que celles portant sur l'ADN codant.

Les mutations ponctuelles les plus fréquentes sont les SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphisms*. Ces mutations représentent près de 90% de l'ensemble des variations génétiques chez l'homme. Il s'agit simplement de la substitution d'un nucléotide en un autre (voir Figure 1 ; Alberts *et al.*, 2007).

### Figure 1 : Polymorphisme de base (SNP) dans l'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire est organisé en double hélice de polynucléotides. Lorsqu'une paire de base azotée est mutée (par exemple ici le C et le G de la double hélice du haut en T et A sur la double hélice du bas), on parle de polymorphisme de base (SNP).



Source : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dna-SNP.svg>

Il existe d'autres types de mutations ponctuelles regroupant les insertions, les délétions ou les duplications. Ces phénomènes peuvent parfois toucher des séquences de plusieurs nucléotides. Les duplications, peuvent être à l'origine d'une surexpression du gène et donc engendrer la production accrue d'une protéine (Roden *et al.*, 2006 ; Salmon Hillnertz *et al.*, 2007 ; Olson *et al.*, 2011).

Des modifications dans ces séquences nucléotidiques pourront ou non avoir des répercussions sur la structure des protéines. Ces dernières remplissent de très nombreuses fonctions dans l'organisme, parmi lesquelles celle d'enzymes des réactions du métabolisme des médicaments.

b) *Variations de la régulation transcriptionnelle*

La transcription correspond à l'étape qui permet de synthétiser l'acide ribonucléique (ARN) à partir d'un brin d'ADN servant de matrice. L'ARN représente donc l'intermédiaire entre l'ADN contenu dans le noyau de la cellule et le réticulum endoplasmique, siège de la traduction de l'ARN en protéine. L'ARN est donc à ce titre qualifié d'ARN « messenger » (ARNm). Il s'agit d'un enchaînement de nucléotides, comme l'ADN (sauf que T est remplacé par U, pour uracile), résultant d'un assemblage polarisé : de 5' vers 3' (correspondant au numéro des carbones du ribose du nucléotide). Il est en outre monobrin (Alberts *et al.*, 2007). Enfin, l'ARNm est également pourvu d'une coiffe qui permettra d'initier la traduction en protéine (côté 5') et d'une queue dite « poly-A », constituée de la répétition de base adénosine (côté 3').

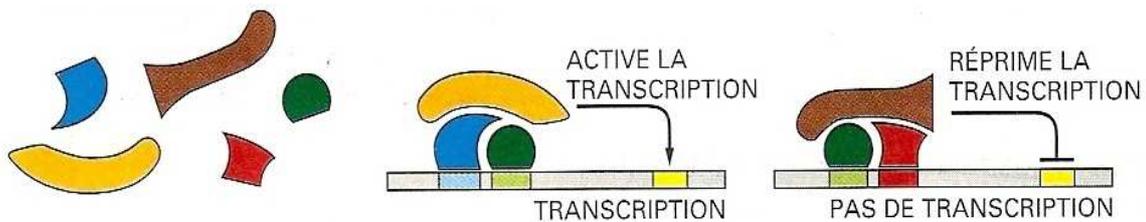
La transcription des ARNm fait intervenir l'ARN polymérase II, un complexe enzymatique nucléaire qui assemble les nucléotides à partir de la séquence d'ADN correspondante. Tout d'abord, des erreurs de l'ARN polymérase sont possibles, avec assemblage d'un « mauvais » nucléotide. On estime un taux d'erreur de l'ordre de  $1/10^5$  nucléotides. L'ARN polymérase ne corrige pas les mésappariements, mais cela n'a en réalité qu'un faible impact car les ARNm sont généralement transcrits en quantité importante (Namour, 2005).

Par ailleurs, cette transcription peut être régulée par différents mécanismes faisant intervenir des activateurs de la transcription, ou inversement, des répresseurs. Ces agents de régulation, appelés facteurs de transcription, sont également des protéines.

La plupart des protéines régulatrices agissent par l'intermédiaire de complexes, chaque polypeptide ayant une fonction propre. Le complexe protéique de régulation ne se forme généralement qu'en présence de la séquence d'ADN appropriée. En fonction de la combinaison des éléments qui composent le complexe, il y aura soit activation soit répression de la transcription (Figure 2). Il existe aussi une possibilité de régulation de la formation de ces protéines régulant directement la transcription (Derman *et al.*, 1981; Alberts *et al.*, 2007).

**Figure 2 : Régulation de la transcription par des protéines régulatrices (Alberts *et al.*, 2007)**

*En solution, ces protéines sont inactives. En contact avec la portion d'ADN appropriée, ces protéines s'associent différemment pour activer (schéma du milieu) ou réprimer (schéma de droite) la transcription*



Des variations dans la structure des facteurs de transcription auront donc un impact sur l'expression d'un gène pouvant coder pour des enzymes responsables du métabolisme des médicaments.

Il est à noter aussi que la conformation de l'ADN dans le noyau influence la transcription. Cela met en jeu les facteurs physico-chimique intervenant dans la structure de l'ADN. On peut citer les histones ou le pourcentage d'eau lié aux groupements phosphates. Cette structure joue directement sur l'accessibilité de la double hélice pour l'ARN polymérase II (Van Holde *et al.*, 1992).

*c) Variations de la régulation post-transcriptionnelle*

Bien que le contrôle de l'initiation de la transcription soit un levier majeur de la régulation de l'expression des gènes, d'autres mécanismes peuvent intervenir. Ces derniers englobent les étapes de la traduction de l'ARN et ont pour conséquence de régler la quantité et la qualité des protéines produites.

*i. Maturation de l'ARN*

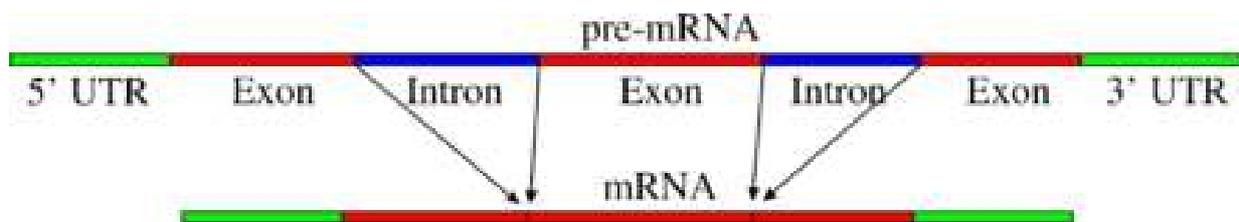
Chez les eucaryotes, les gènes sont d'abord transcrits comme de longs ARN nucléaires précurseurs et subissent par la suite une maturation leur permettant d'acquérir leur structure

fonctionnelle d'ARNm. Une des étapes clés de cette maturation est l'épissage dans le noyau de la cellule de l'ARN dit « pré-messenger ».

Au cours de cette étape, l'ARN pré-messenger est débarrassé de ses séquences non codantes : les introns. Les portions conservées sont appelées les exons (Figure 3). Ce processus fait intervenir des complexes protéiques comme les small nuclear ribonucleoproteins (snRNP). Cet épissage est initié par la reconnaissance de séquences non codantes : les segments 3' et 5' UTR (Untranslated Regions).

### Figure 3 : L'épissage de l'ARN pré-messenger dans le noyau

L'ARN pré-messenger est débarrassé de ses introns (en bleu, portions non codantes), pour ne conserver que les exons (en rouge, portions codantes). Les exons flanqués des séquences 5' et 3' UTR non traduites (en vert) sont les constituants de l'ARNm.



Source :

<http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Arn%2C+Sites+%C3%89pissage&lang=4&from=48>

Pour certains gènes, le mécanisme d'épissage est sujet à variation. Ainsi, en fonction du type cellulaire, du temps développemental ou de l'état de maturation d'une cellule, un même ARN pré-messenger peut subir un épissage dit « différentiel » et donner naissance à des ARNm incluant une large combinatoire d'exons. En fonction de cet élagage, plusieurs chaînes polypeptidiques pourront donc être créées à partir d'un seul gène. Ce phénomène est responsable d'une part importante du polymorphisme des protéines effectrices fabriquées lors de la traduction. A titre d'illustration, on pourra citer l'exemple de la drosophile chez laquelle la détermination du sexe dépend d'une série d'évènements d'épissage contrôlés (Alberts *et al.*, 2007).

En outre, des contrôles « positifs » et « négatifs » peuvent intervenir pour réguler cet épissage. On peut avoir, dans l'exemple d'un contrôle négatif, l'intervention d'un répresseur qui va empêcher la machinerie d'épissage d'accéder à la séquence intronique (Alberts *et al.*, 2007).

## ii. Stabilité de l'ARNm : importance des microARN

### Généralités sur les microARN

La traduction de l'ARNm en protéine peut être plus ou moins régulée par le biais d'entités dont l'existence a été révélée au début des années 1990 : les micros ARN (miARN). Ces miARN ont été découverts chez le vers nématode *Caenorhabditis elegans*, un organisme modèle (Lee *et al.*, 1993).

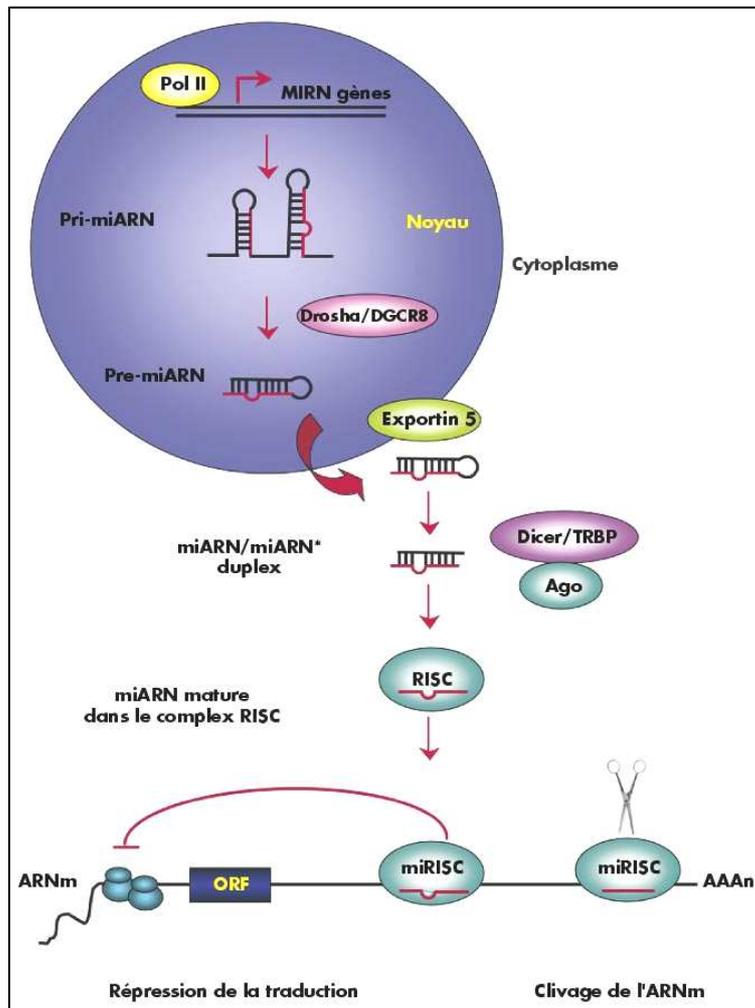
Il s'agit de molécules d'ARN simple brin non codant, longues d'environ 21 à 24 nucléotides qui, en s'appariant aux ARNm, guident leur dégradation ou entraînent la répression de leur traduction en protéine (Carlquist et Anderson, 2011).

Les miARN se lient aux ARNm au niveau de leurs séquences non codantes 3'UTR (pour *UnTranslated Region*). La première étape de leur synthèse a lieu dans le noyau à l'aide d'une ARN polymérase, pour aboutir à des miARN primaires (pri-miARN). Ces derniers subissent alors une seconde transformation, puis sont ensuite exportés selon un transport actif vers le cytoplasme, pour y subir leur maturation (Figure 4).

Dans le cytoplasme, le précurseur du miARN (70 nucléotides) est pris en charge et remanié par le complexe « Dicer » dont la protéine majeure appartient à la famille « Argonaute ». Dicer se lie au miARN, favorise sa maturation via une activité RNase III et forme un complexe fonctionnel capable d'interagir spécifiquement avec l'ARNm pour engendrer sa dégradation ou empêcher sa traduction (Bushati et Cohen, 2007).

**Figure 4 : La formation des miARN (Naguibneva, 2008)**

Elle débute dans le noyau, par la transcription des gènes codants pour ces miARN. Le début de leur maturation s'effectue dans le noyau et s'achève dans le cytoplasme par la combinaison avec le complexe protéique Dicer/Argonaute.



*Exemple du rôle des miARN : le mouton Texel, déficitaire en myostatine*

Le mouton Texel est une race ovine réputée pour la quantité et la qualité de sa viande. Il présente classiquement un phénotype dit « culard », avec des masses musculaires très développées, en particulier au niveau des cuisses (muscles semi membraneux et semi tendineux). L'équipe du Professeur Michel Georges (Liège) a réussi à mettre en évidence le support moléculaire de ce phénotype.

Il s'agit d'un déficit en myostatine, autrement appelée Growth and Differentiation Factor 8 (GDF8), préalablement identifiée comme facteur limitant l'expansion de la masse musculaire (Tobin et Celeste, 2005). La myostatine est exprimée dans les muscles striés squelettiques et inhibe à la fois l'hyperplasie et l'hypertrophie des myocytes.

La cartographie génétique du locus *hypermusclé* chez le mouton Texel par analyse de liaison a permis d'identifier une mutation dans la partie non codante 3'UTR du gène codant pour la myostatine. Chez le mouton Texel hypermusclé, une adénine est remplacée par une guanine, créant un motif octamérique ACATTCCA possiblement reconnu par des miARN. Dans le muscle squelettique, il a été montré que les deux miARN *mir1* et *mir206* sont exprimés et des expériences *in vitro* ont montré que ces miARN sont capables de se fixer sur le motif ainsi reconstitué. En conséquence, l'ARNm des moutons Texels mutés devient la cible de ces miRNA, ce qui conduit à une diminution miARN-dépendante de la traduction de la myostatine. Au final, les auteurs ont mesuré une baisse de 66% de la concentration sérique de myostatine, corrélée à la levée d'inhibition de la croissance musculaire et au phénotype d'hypermuscularité observé (Clop *et al.*, 2006).

Cet exemple permet également d'illustrer des variations dans la séquence non codante, portée par les molécules d'ADN.

### iii. Traduction de l'ARNm

La traduction correspond à la synthèse des polypeptides à partir de l'information portée par l'ARNm. Elle a lieu dans le cytoplasme et plus particulièrement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique qui porte les ribosomes. Ce sont des unités protéiques qui vont permettre d'assembler des acides aminés, présents dans le cytoplasme et acheminés via des ARN « transferts » spécifiques, suivant un code génétique universel. Chaque enchaînement de trois nucléotides de l'ARNm forme un codon, qui correspond à un acide aminé donné. Il existe un codon pour initier la synthèse polypeptidique et trois codons « STOP » pour l'interrompre.

Là encore, des variations dans la régulation pourront aboutir à une variabilité des protéines obtenues.

Il existe un contrôle négatif de la traduction. Ce mécanisme fait intervenir des répresseurs de la traduction, qui sont des protéines se liant spécifiquement près de l'extrémité 5' des ARNm, siège du démarrage de la traduction. Il en résulte ainsi une diminution de la synthèse polypeptidique.

De plus, la traduction peut être influencée par la localisation des ARNm dans le cytoplasme. En effet, dans certains cas, les ARNm peuvent être dirigés vers des endroits spécifiques du cytoplasme. L'information de cette destination est portée par la région 3'UTR non traduite (Alberts *et al.*, 2007).

Une variation dans l'expression des gènes codant pour ces protéines répressives aura donc un impact direct sur la fabrication de protéines effectrices (là encore, les enzymes impliquées dans le métabolisme des principes actifs par exemple).

Un autre niveau de contrôle de la traduction fait intervenir les queues poly-A des ARNm. En fonction de leur longueur, la traduction pourra ou non débiter à des endroits différents de l'ARNm, générant ainsi des protéines variables (Alberts *et al.*, 2007; Namour, 2005).

#### *iv. Modifications post-traductionnelles et adressage des protéines effectrices*

Dans la cellule, la localisation précise d'une protéine synthétisée est essentielle à son bon fonctionnement. Généralement, le lieu d'action de la protéine est différent de son lieu de production. C'est pour cela qu'un adressage est nécessaire. Il s'agit du processus permettant d'acheminer les protéines vers leur lieu d'utilisation, à l'extérieur ou dans un compartiment cellulaire.

Plusieurs facteurs peuvent conditionner cet adressage : des motifs d'adressage, des résidus glycosylés ou phosphates ajoutés aux protéines ou la conformation tridimensionnelle de la protéine. Certains de ces éléments sont donc déterminés par la séquence d'ADN (Alberts *et al.*, 2007). Une mutation de cette séquence pourra alors engendrer des anomalies dans l'adressage des protéines.

Une étude de Beggs *et al.* datant de 2010 permet d'illustrer chez le chien l'effet de telles mutations sur l'adressage d'une protéine, et donc une anomalie dans son fonctionnement.

Une mutation dans le gène codant pour la myotubularine a été mise en évidence chez le Labrador Retriever. Cette myotubularine joue un rôle dans le maintien et l'entretien de la

masse musculaire. L'équipe de chercheurs a observé une substitution d'une cytosine en adénine au niveau de la 465<sup>ème</sup> paire de base située sur l'exon 7 du gène *MTM1*, codant pour la myotubularine. Cela se traduit dans la protéine par la présence d'une lysine en lieu et place d'une asparagine au niveau du 155<sup>ème</sup> acide aminé.

La conséquence de cette mutation est un mauvais adressage intracellulaire de cette myotubularine. Tandis que la protéine sauvage est normalement dirigée vers le compartiment membranaire, la protéine mutée n'y est plus adressée et par voie de conséquence, se retrouve intégralement dans le protéasome (système intracellulaire d'élimination des protéines) qui la dégrade prématurément.

Les chiots atteints, totalement déficients en myotubularine, présentent des anomalies musculaires importantes (atrophie sévère, anomalie de position des noyaux et des mitochondries par exemple) conduisant à une myopathie sévère (Beggs *et al.*, 2010).

On imagine donc qu'une mutation conduisant à des défauts d'adressage des protéines effectrices du métabolisme des médicaments, aura là encore un impact direct sur la réponse à ces derniers.

## 2. Rappels sur les médicaments et leur métabolisme

### a) *Définition du médicament*

Un médicament est une substance qui possède des propriétés préventives, curatives, ou qui peut être administrée en vue d'établir un diagnostic. Un médicament est le plus souvent destiné à prévenir des maladies humaines ou animales, à guérir, à favoriser la guérison ou à soulager.

Les médicaments représentent une part importante des substances chimiques étrangères à l'organisme et produisant un effet sur lui, appelés pour cette raison des « xénobiotiques ». L'homme comme l'animal de compagnie ou de production y sont confrontés en permanence. Les médicaments peuvent prendre des formes pharmaceutiques très diverses (solutions injectables, comprimés, collyres...) et peuvent avoir de ce fait une grande variété de voies d'administration.

Il peut s'agir de composés hydrophobes dont l'élimination de l'organisme requiert une étape de conversion en métabolites hydrophiles, secondairement éliminés par voie hépatique via la bile ou par voie rénale via l'urine (Beaune et Loriot, 2000).

### b) *Principes du métabolisme des médicaments*

Le métabolisme d'un médicament correspond à sa transformation enzymatique en un ou plusieurs composés, appelés métabolites, qui peuvent être pharmacologiquement actifs, inactifs et parfois toxiques.

La très grande majorité des médicaments est métabolisée par le foie, plus particulièrement par les enzymes du réticulum endoplasmique hépatique. Cette fonction est soutenue par un débit sanguin hépatique élevé.

Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments, en particulier les réactions d'oxydoréduction, les hydroxylations ou la rupture oxydative des liaisons N-C et O-C. Après avoir agi, le médicament est éliminé de l'organisme et plusieurs voies sont alors possibles.

c) *Les protéines de transport transmembranaire*

Il y a plusieurs étapes dans le métabolisme d'un médicament. Tout d'abord, après administration par toutes les voies autres qu'intraveineuse, le principe actif doit pénétrer dans le compartiment central afin d'atteindre sa cible. Dans le cas d'un comprimé, par exemple, il est nécessaire que la molécule franchisse la barrière intestinale pour rejoindre sa cible. Cela représente la phase 0. Elle fait intervenir des phénomènes de compétition, avec notamment l'intervention de protéines de transport comme la glycoprotéine P, codée par le gène *ABCB1*. Les gènes *ABC*, pour « ATP-binding cassette », sont nombreux et codent une large famille de transporteurs (Ueda, 2011). La glycoprotéine P, située sur la membrane apicale des entérocytes, agit en expulsant les médicaments hors de l'entérocyte via un mécanisme actif consommant de l'ATP. La résultante de son action est une diminution de la biodisponibilité orale des médicaments ingérés (Allorge et Lorient, 2004).

Au pôle dit « biliaire » des hépatocytes, siège du métabolisme des médicaments, on retrouve des protéines de transport appartenant à cette large famille des protéines ABC, permettant ainsi une excrétion des métabolites par la bile. Enfin on retrouve également la glycoprotéine P au niveau de l'endothélium de la barrière hémato-méningée (Lechat, 2006).

Cette protéine intervient donc également dans la phase de distribution des médicaments.

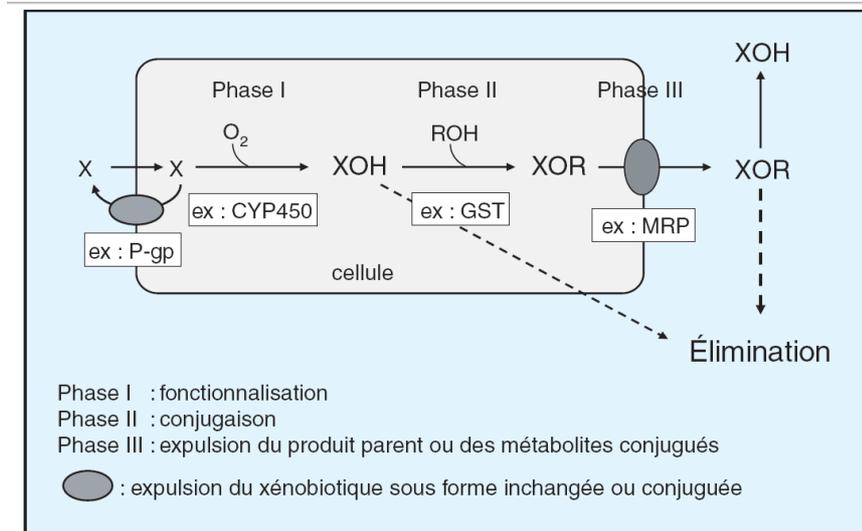
d) *Le métabolisme hépatique*

Le métabolisme des médicaments est donc essentiellement hépatique (Figure 5) et les enzymes qui interviennent dans la biotransformation des médicaments sont schématiquement divisées en deux groupes :

D'un côté les enzymes dites de « phase I », des enzymes de fonctionnalisation (oxygénases, réductases, hydrolases), qui rendent les molécules plus polaires, par exemple par hydroxylation. Ces réactions consomment du pouvoir réducteur NADPH. La grande majorité de ces enzymes de phase I est représentée par la superfamille des cytochromes P 450, qui comprend de nombreuses isoformes. Ces isoformes possèdent de nombreuses homologies dans leurs séquences en acides aminés (Lechat, 2006).

**Figure 5 : Les phases du métabolisme hépatique des médicaments (Allorge et Lorient, 2004)**

*Le principe actif pénètre dans la cellule via une glycoprotéine P (P-gp). Il va ensuite subir une série de transformations avant d'être éliminé dans les voies biliaires*



Il y a également les enzymes dites de « phase II », qui sont des transférases. Elles catalysent des réactions de conjugaison et rendent les métabolites plus hydrophiles, par greffage d'un radical acétyle, sulfate, méthyle ou encore un glutathion. L'enzyme thiopurine S-méthyltransférase, impliquée par exemple dans le métabolisme des médicaments thiopuriques, fait partie de cette famille d'enzymes de phase II.

La conjugaison avec l'acide glucuronique, encore appelée glucurononconjugaison, est la plus fréquente des conjugaisons. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé. Les glucuronides sont très hydrosolubles ce qui explique la facilité avec laquelle ils sont éliminés dans l'urine et la bile (Lechat, 2006; Allorge et Lorient, 2004).

*e) Les voies d'élimination biliaire et fécale*

La dernière étape, dite de « phase III », consiste en l'élimination de ces métabolites conjugués hors de la cellule par des protéines de la famille ABC (Ueda, 2011). Une élimination directe en post-phase II est parfois possible.

Après excrétion dans la bile, le médicament se retrouve dans la lumière intestinale où il peut être réabsorbé : c'est le cycle entéro-hépatique. La fraction non réabsorbée est quant à elle évacuée par voie fécale.

Toutes ces protéines, enzymatiques ou de transport, ont une spécificité de substrat relative et chevauchante (Allorge et Lorient, 2004).

f) *La voie d'élimination rénale*

La plupart des molécules sont éliminées dans les urines, soit sous forme inchangée, soit sous forme de produits de dégradation. Le plus souvent, les médicaments ou leurs métabolites ont une masse moléculaire bien inférieure à 5000 daltons et sont de ce fait filtrés par le glomérule. Cependant, seule la partie non fixée aux protéines plasmatiques est filtrée.

La réabsorption tubulaire intervient tout au long du néphron. Il s'agit le plus souvent d'un processus passif qui est influencé par le degré d'ionisation du médicament : seule la fraction non ionisée, à la valeur du pH urinaire, est réabsorbée. Cette propriété est utilisée dans certains surdosages pour accélérer l'élimination du médicament via une alcalinisation des urines en vue de bloquer le mécanisme de réabsorption.

Une sécrétion active est également observée pour quelques molécules, entre autres des cations ou anions qui sont sécrétés dans la lumière du tubule par des systèmes de transport spécifiques, consommant de l'énergie et à capacité saturable. On peut donc observer des phénomènes de compétition (Lechat, 2006).

3. Conséquences fonctionnelles du polymorphisme des protéines impliquées dans le métabolisme des médicaments

a) *Modifications du fonctionnement des enzymes*

Les variations qui affectent la séquence des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments peuvent être responsables de modifications importantes dans l'activité de ces protéines, aussi bien en « hyper » qu'en « hypo ».

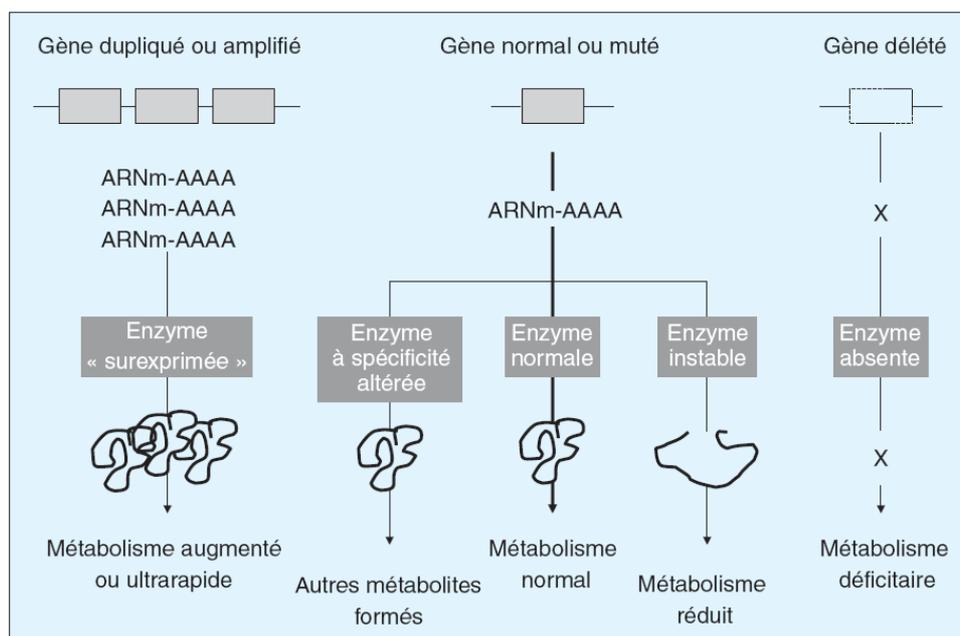
En cas de duplication (deux copies d'un gène sur le même locus) ou d'amplification du gène (plus de deux copies d'un gène sur un même locus), on va obtenir une enzyme surexprimée en raison de l'augmentation du nombre de transcrits. Cela va alors aboutir à la traduction d'un plus grand nombre d'enzymes fonctionnelles et donc à un métabolisme dit « augmenté » ou « ultra rapide » (Voir Figure 6).

En cas de mutation du gène (« faux sens » i.e. remplacement d'un acide aminé par un autre), la protéine produite peut être différemment active ou sujette à des modifications de sa stabilité. Dans le premier cas, cela aboutira par exemple à une altération de la spécificité du substrat de l'enzyme ou à la formation de métabolites alternatifs. Dans le cas d'une protéine plus instable, on aboutira à un métabolisme dit « réduit ».

Enfin, en cas de délétion ou de mutation non-sens du gène, la protéine ciblesera complètement absente et le métabolisme pour le médicament correspondant sera alors totalement déficitaire, pouvant générer d'importants effets secondaires dans l'organisme (Allorge et Lorient, 2004).

**Figure 6 : Les différents génotypes et phénotypes des enzymes du métabolisme des médicaments (Allorge et Lorient, 2004)**

*Un gène dupliqué ou amplifié engendre une protéine surexprimée, donnant des individus hypermétaboliseurs. Un gène muté ou délété pourra aboutir à des individus au métabolisme réduit, voire complètement déficitaire*



b) *Modifications du transport transmembranaire*

Ces transporteurs interviennent par exemple pour faire entrer ou sortir des molécules de la cellule. Une variation de la structure de ces protéines de transport va engendrer une perturbation des flux transmembranaires et donc jouer sur la réponse à un médicament.

L'exemple de la glycoprotéine P est un bon exemple de ce polymorphisme des transporteurs intervenant dans la réponse à un principe actif.

Au niveau intestinal, des variations dans la structure de cette protéine de transport va engendrer des variations sur l'absorption du médicament et donc sur ses effets.

La glycoprotéine P est également présente sur l'endothélium des capillaires cérébraux, situés au niveau de la barrière hémato-méningée. Elle reconnaît ses substrats (certains médicaments) et les expulse continuellement hors du liquide céphalo-rachidien (LCR). En cas de modification de la structure de la glycoprotéine P, cette dernière ne reconnaît plus ses substrats et les laisse passer dans le LCR, générant ainsi d'importants effets secondaires neurologiques (Roden *et al.*, 2006).

c) *Modifications du fonctionnement des récepteurs cibles*

Il s'agit de variations affectant la structure des protéines intervenant dans la réponse directe à un principe actif. Ces modifications auront pour conséquence une réponse différente, voire une absence de réponse dans le cas d'un remaniement complet de la structure du récepteur cible.

On peut citer le cas du récepteur  $\mu 1$  aux opioïdes. Une mutation dans le gène codant pour cette protéine est connue et induit le remplacement d'un acide aspartique par une asparagine au niveau de la 40<sup>ième</sup> position de la séquence polypeptidique. Cela a pour conséquence une suppression du site de N-glycosylation. De ce fait, le récepteur possède une plus forte affinité pour les opioïdes endogènes telle que la bêta-endorphine, altérant alors la réponse à un traitement aux opioïdes (Carlquist et Anderson, 2011).

## **B. Le concept de pharmacogénétique**

### 1. Un sous-ensemble de la pharmacogénomique

#### a) *Problématique*

Les deux termes « pharmacogénomique » et « pharmacogénétique » sont très souvent utilisés de la même manière ou pour caractériser la même idée (Johnson, 2003). Ainsi, de nombreuses publications scientifiques utilisent ces deux termes de façon équivalente. Cependant, certains auteurs établissent des définitions différentes et expliquent l'origine distincte de ces deux termes, tout en pointant les évidentes relations qui lient ces deux notions.

L'apparition et l'évolution de ces deux termes est à mettre en relation avec l'évolution des moyens et des techniques de biologie moléculaire employés par les chercheurs. Nous allons voir qu'au final, une distinction peut être faite entre ces deux termes.

#### b) *La pharmacogénétique, une entité « simple »*

A la base, le terme de pharmacogénétique est une compaction de deux termes qui mettent en relation deux notions simples, à savoir que la réponse de l'organisme à un médicament donné (*pharmaco-*) dépend de la variation de séquence d'un ou de quelques gènes (*-génétique*). Cette variation génétique peut en particulier cibler une protéine impliquée dans le transport, l'action ou le métabolisme dudit médicament (Johnson, 2003).

Cette définition de la pharmacogénétique est partagée à l'heure actuelle par plusieurs auteurs. Pour Gossard, il s'agit également « de l'effet d'un ou plusieurs gènes sur la réponse à un médicament » (Gossard et Hamet, 2002). Pour la Food and Drug Administration, la pharmacogénétique fait référence à « l'étude de l'effet de la variation de la séquence d'ADN sur la réponse à un principe actif » (FDA, 2008).

La définition est encore plus précise pour Roden *et al.* qui définissent la pharmacogénétique comme « l'étude de la relation entre la variation individuelle d'un seul gène et la variation des effets d'une drogue ». Cette variation allélique unique engendre de plus des effets cliniques très importants (Roden *et al.*, 2006).

c) *L'apparition du terme de pharmacogénomique*

L'apparition du terme « pharmacogénomique » a fait suite à l'évolution des techniques de biologie moléculaire. A défaut d'un seul ou de quelques gènes mis en cause dans la variation de la réponse à un médicament, il a été montré que le génome tout entier pouvait intervenir dans cette hétérogénéité de réponse. Cela implique donc l'intervention potentielle de plusieurs protéines agissant directement ou indirectement dans le métabolisme d'un médicament, mais conjointement et en réseau (Johnson, 2003).

Contrairement à la pharmacogénétique, la variation dans la réponse observée a des effets plus limités sur le plan clinique (Voir Figure 7) (Roden *et al.*, 2006).

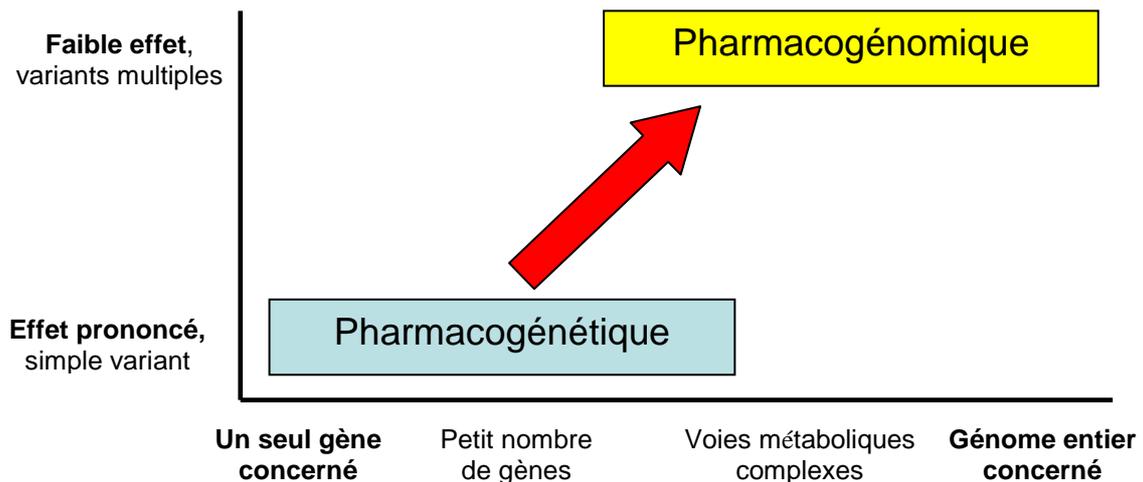
La notion de pharmacogénomique, mieux inscrite dans notre capacité croissante à appréhender le vivant par l'analyse des systèmes complexes, englobe alors celle de pharmacogénétique qui décrit l'action réductrice d'un nombre de gènes restreint. Dans un avenir proche, le terme de pharmacogénomique est appelé à remplacer celui de pharmacogénétique (Wang *et al.*, 2011).

Une autre notion importante est celle de la recherche et du développement des médicaments. Alors que la pharmacogénétique concerne plutôt le domaine concret de l'application à la clinique, le terme de pharmacogénomique concernerait les travaux de recherche situés « en amont » (Gossard et Hamet, 2002).

Dans la suite de ce travail, seul le terme de pharmacogénétique sera retenu, puisqu'il a accompagné l'essor des nombreux exemples cités et étudiés par la suite (variations mono ou bigéniques).

**Figure 7 : Rapport entre la pharmacogénétique et la pharmacogénomique (d'après Roden *et al.*, 2006)**

*La pharmacogénétique « évolue » en pharmacogénomique à mesure que le nombre de gènes concernés devient important, pour des effets de plus en plus atténués*



2. Une discipline englobant plusieurs domaines

Les variations génétiques peuvent induire une modulation fonctionnelle de protéines impliquées dans la biodisponibilité, le métabolisme ou l'action des médicaments. Ainsi, la pharmacogénétique est-elle indissociable des domaines d'étude qui regroupent l'ensemble de ces notions : la pharmacocinétique et la pharmacodynamie (Carlquist et Anderson, 2011).

a) *La pharmacocinétique*

Sa définition première est l'étude du devenir du médicament dans l'organisme et de la relation entre une dose de médicament administrée et la concentration de la même molécule dans le plasma ou dans un tissu, en fonction du temps (Roden *et al.*, 2006).

La pharmacocinétique permet ainsi de suivre les concentrations d'un principe actif et de ses métabolites dans l'organisme et fait intervenir les notions d'absorption, de distribution, de

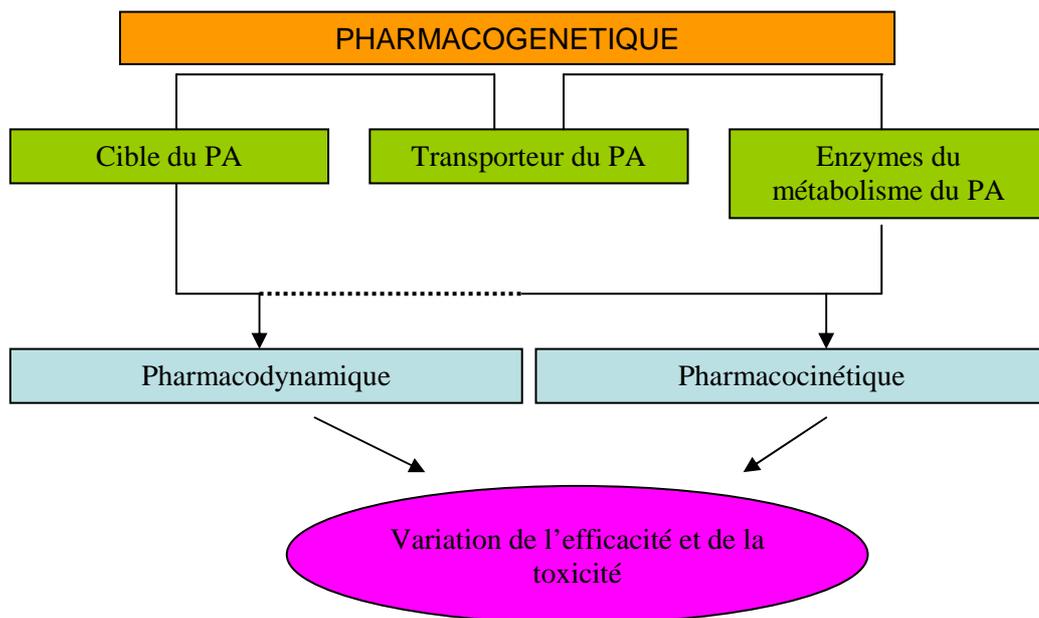
métabolisme et d'élimination d'une drogue. Schématiquement, la pharmacocinétique peut être vue comme « l'effet de l'organisme sur un médicament » (Johnson, 2003).

Elle fait intervenir les enzymes du métabolisme ainsi que les transporteurs des médicaments (Voir Figure 8).

La pharmacocinétique occupe donc une place importante dans l'étude de la pharmacogénétique, puisque des variations dans les gènes codant pour ces protéines se traduiront entre autres par des modifications des paramètres pharmacocinétiques. Les variations génétiques qui affectent les paramètres pharmacocinétiques sont par ailleurs plus nombreux, en comparaison avec ceux relatifs à la pharmacodynamie (FDA, 2008).

**Figure 8 : Les différentes composantes de la pharmacogénétique (d'après Johnson, 2003)**

*La pharmacogénétique repose sur deux disciplines importantes qui étudient tous les acteurs du métabolisme des médicaments: la pharmacocinétique et la pharmacodynamie*



*b) La pharmacodynamie*

Il s'agit avant tout de l'étude de la relation entre la concentration d'un médicament et ses effets sur l'organisme (Roden *et al.*, 2006). Là encore, il est possible de schématiser cette notion en énonçant la pharmacodynamie analyse « l'effet du médicament sur l'organisme ». La pharmacodynamie fait intervenir les récepteurs cibles d'un médicament ou de ses métabolites

actifs (Figure 8). Elle intègre également les voies de signalisation en aval de ces récepteurs. Occasionnellement, les transporteurs peuvent être la cible d'un médicament, se partageant ainsi entre pharmacocinétique et pharmacodynamie (Johnson, 2003).

Des variations génétiques qui engendrent des modifications structurales et fonctionnelles des récepteurs cibles auront donc un impact sur la réponse directe à un médicament.

### 3. Champs d'application et buts de la pharmacogénétique

#### a) *La situation actuelle*

Jusqu'à récemment, tous les patients qui présentaient le même diagnostic étaient globalement traités avec les mêmes molécules, les mêmes schémas posologiques et recevaient les mêmes conseils malgré le fait que la réponse à un médicament peut fortement varier d'un individu à l'autre.

Actuellement, plusieurs approches sont utilisées quant à la gestion des traitements médicamenteux :

Une première approche « essai/ajustement », qui consiste à adapter peu à peu les doses, en fonction du suivi clinique et ce jusqu'à obtention d'un couple « dose minimale/effets satisfaisants » optimal. Cette méthode est utilisée par exemple pour des maladies telles que le diabète ou encore l'hypertension chez l'homme. Son principal inconvénient est la durée importante qui peut être nécessaire pour obtenir la dose optimale.

Cette tâche peut être rendue encore plus difficile si un individu ne répond pas au médicament de façon satisfaisante, du fait de son statut génétique et donc, de ses capacités métaboliques (hypo- versus hyper-métaboliseurs).

Une seconde approche « globale », où le traitement est identique pour tous les patients. Cela vaut, par exemple, pour la thérapeutique des cancers, des insuffisances cardiaques et des traitements post-transplantation. Là encore, la diversité génétique interindividuelle peut poser d'importants problèmes dans la gestion des traitements, surtout en termes de toxicité.

Dans ces deux cas, un nombre non négligeable de patients ne tireront aucun bénéfice du traitement ou présenteront des effets secondaires de gravité variable (Johnson, 2003).

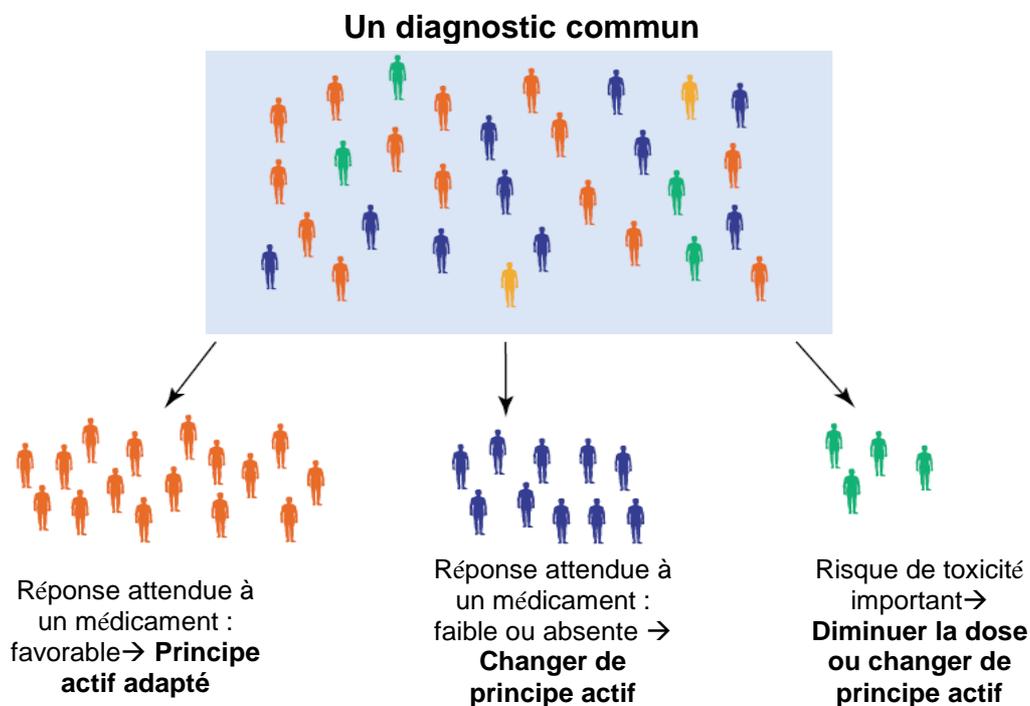
b) *L'apport de la pharmacogénétique*

La plupart du temps, une enzyme est nécessaire pour l'activation du médicament, tandis qu'une autre intervient pour son inactivation. Le rapport de ces deux activités enzymatiques détermine l'efficacité et la toxicité d'un médicament ; il est déterminé génétiquement. Le but de la pharmacogénétique sera d'appréhender ce rapport avant la mise en place d'un traitement médicamenteux (Gossard et Hamet, 2002).

La pharmacogénétique va ainsi permettre d'adapter le traitement en fonction du statut génétique du patient, c'est-à-dire en fonction de sa capacité intrinsèque à métaboliser le médicament prescrit et à y répondre par un effet en partie individuel. La figure 9, présentée ci-dessous, met en évidence la diversité de réponse à un médicament et les différentes options possibles en fonction de ces réponses (Johnson, 2003).

**Figure 9 : Potentiel et champs d'application de la pharmacogénétique (d'après Johnson, 2003)**

*La pharmacogénétique permet de considérer le traitement à l'échelle de l'individu, en fonction de son génotype et ainsi d'adapter la stratégie thérapeutique.*



La pharmacogénétique peut permettre d'éviter non seulement les problèmes éventuels d'effets secondaires et de toxicité liés à la prise médicamenteuse, mais elle permet aussi d'adapter au

mieux et au plus vite le schéma posologique d'un principe actif. Elle contribue ainsi à éviter la polymédication, dangereuse en raison des possibilités d'interactions médicamenteuses délétères (Gossard et Hamet, 2002).

L'investigation pharmacogénétique est fondée sur le génotypage des patients. Les mutations connues pour perturber la réponse au traitement seront particulièrement ciblées, mais à terme, il est possible d'envisager que des haplotypes à risque sans mutation identifiée soient également recherchés. En outre, ce génotypage réalisé sur plusieurs loci clés peut également permettre de mieux anticiper la manière dont chaque individu métabolise les médicaments (Allorge et Loriot, 2004 ; Johnson, 2003 ; Roden *et al.*, 2006)

Il s'agit d'une technique proactive, en contraste avec le monitoring de la réponse au traitement qui intervient a posteriori, une fois le médicament administré.

Enfin la pharmacogénétique intervient également en amont, dans les différentes étapes du développement d'un médicament.

## C. Historique de la pharmacogénétique

La pharmacogénétique est souvent perçue comme une discipline très récente. En réalité, les notions sous-jacentes qui la fondent sont utilisées depuis des siècles.

### 1. La naissance de cette discipline

Les variations interindividuelles dans la réponse à un xénobiotique (*i.e.* substance étrangère à l'organisme) auraient été observées pour la première fois par Pythagore en 510 avant JC. Il nota par exemple que certains individus de son entourage développaient une anémie hémolytique en réponse à l'ingestion de fèves.

C'est en 1902 que Gorrod et Oxon ont suggéré le fait que les variations interindividuelles face à un principe actif, ainsi que certains effets secondaires délétères, pouvaient être dûs à des déficits enzymatiques. Cette idée a été reprise à la fin des années 1950, avec plusieurs travaux, dont ceux de Kalow et Staron (revue dans Ingleman et Sim, 2010).

L'idée que l'hérédité peut influencer la réponse aux médicaments naît à la même époque, avec la démonstration du caractère héréditaire de divers accidents thérapeutiques. On peut citer par exemple l'apparition d'apnées prolongées lors de l'anesthésie à la succinylcholine chez des patients déficitaires en butyrylcholinestérase, ou encore rappeler la survenue d'anémies hémolytiques aiguës chez des sujets impaludés traités par des doses standards de primaquine et déficitaires en glucose-6-phosphate déshydrogénase. Ces observations répétées ont ainsi contribué à établir le lien causal du patrimoine génétique sur la réponse au traitement (Allorge *et al.*, 2007).

L'apnée suite à l'anesthésie à la succinylcholine a été la première découverte concrète de réponse à un traitement « génétiquement » déterminée. A cette époque (fin des années 1950), il a été montré qu'un individu sur 3500 manifestait une relaxation musculaire prolongée, engendrant une apnée de plusieurs heures tandis qu'elle ne durait que quelques minutes chez les autres patients.

C'est finalement en 1958 que fut inventé le terme de « pharmacogénétique » par Vogel. Ce terme est depuis utilisé pour désigner les différences héréditaires observées dans la réponse à un traitement donné (Oscarson, 2003).

## 2. Le développement de la pharmacogénétique

Depuis, on a ainsi pu identifier une centaine de gènes responsables de variations interindividuelles face à un traitement médicamenteux.

Cette connaissance a été permise par la mise en œuvre d'outils provenant de différents domaines, tels que celui de la génétique inverse, de la biologie moléculaire ou de l'immunochimie, qui ont peu à peu permis d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des phénomènes pharmacogénétiques. Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans la survenue d'effets anormaux de médicaments ont pu être localisés, clonés et les mutations causales identifiées.

Parallèlement, des techniques permettant de détecter ces anomalies génétiques chez les patients ont été développées, rendant le dépistage de plus en plus facile. Des unités de pharmacogénétique ont ainsi été créées au sein de certains hôpitaux et travaillent en collaboration avec les cliniciens des différents services de médecine humaine (Allorge *et al.*, 2007).

La recherche consacrée à la pharmacogénétique s'est aussi considérablement développée. Alors qu'on ne comptait qu'un très faible nombre de publications dédiées à cette discipline il y a une dizaine d'années, environ 100 articles relatifs à la pharmacogénétique sont publiés chaque mois dans la presse spécialisée internationale (Poppe et Roederer, 2011).

En conclusion, la pharmacogénétique est un concept ancien dont l'application demeure récente, en raison du développement de la génétique et des techniques de biologie moléculaire. Elle a pour but de déterminer les profils génétiques des individus afin de dépister ceux qui présentent un risque particulier d'inefficacité ou de toxicité vis-à-vis de certains médicaments. La pharmacogénétique permet ainsi une prescription individualisée dans la pratique médicale courante afin d'optimiser les traitements médicamenteux, tant en termes d'efficacité que de sécurité d'emploi.

## II. LA PHARMACOGENETIQUE EN MEDECINE HUMAINE

A travers des exemples concrets, nous allons décrire les différentes applications de la pharmacogénétique en médecine humaine. Cette spécialité peut avoir différents objectifs quant à la mise en place d'un traitement.

### A. La pharmacogénétique : une aide aux choix d'un principe actif

#### 1. Pré-selection des patients éligibles au traitement

##### a) *Thérapie anticancéreuse : exemple du tamoxifène utilisé dans le traitement contre le cancer du sein chez la femme*

###### *i. Indication et mode d'action du tamoxifène*

Le cancer du sein est la néoplasie maligne la plus représentée chez la femme dans les sociétés occidentales. En effet, on diagnostique chaque année près de 1,2 million de nouveaux cas de cancer du sein à travers le monde (Lammers *et al.*, 2010).

Près de 70% des cancers du sein sont dépistés avec le statut de cancer hormono-dépendant et sur la base de tests immunohistochimiques, il a pu être montré que les récepteurs aux œstrogènes sont impliqués dans le processus tumoral (Higgins et Vered, 2011 ; Wang *et al.*, 2011).

Le tamoxifène administré par voie orale est la molécule la plus utilisée dans le cadre du traitement et de la prévention de ces cancers du sein hormono-dépendants. Il s'agit d'un modulateur sélectif des récepteurs nucléaires aux œstrogènes (Lim *et al.*, 2011). Cette molécule est plutôt utilisée chez les femmes pré-ménopausées ; on lui préférera le raloxifène chez les patientes ménopausées (Higgins et Vered, 2011). Le tamoxifène, en bloquant les récepteurs aux œstrogènes, diminue la progression tumorale et permet de réduire de moitié le risque de récurrence (Wang *et al.*, 2011).

## ii. Métabolisme du tamoxifène

A l'état brut, le tamoxifène présente une affinité relativement faible pour les récepteurs aux œstrogènes et peut être considéré comme une « pro-drogue ». De nombreuses enzymes appartenant à la famille du cytochrome P450 (CYP) sont impliqués dans le métabolisme du tamoxifène, parmi lesquelles CYP2D6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5 et CYP3A6. Ces enzymes vont permettre de transformer la molécule en métabolites dits actifs et en métabolites inactifs (Higgins et Vered, 2011).

Une étude portant sur une population asiatique a cependant démontrée que CYP3A5, CYP2C9 et CYP2C19 semblent avoir un rôle relativement mineur dans le métabolisme du tamoxifène. CYP2D6 semble en revanche en être l'acteur principal (Lim *et al.*, 2011).

En effet, après absorption, CYP2D6 va permettre la formation de deux métabolites actifs : le 4-hydroxitamoxifène et l'endoxifène. Selon les études, il a été montré que ces deux métabolites présentent une affinité pour les récepteurs aux œstrogènes 10 à 100 fois supérieure à celle du tamoxifène (Lim *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont par ailleurs montré que les concentrations sériques en endoxifène étaient 6 à 12 fois plus élevées que celles en 4-hydroxitamoxifène chez des individus prenant du tamoxifène de façon chronique. L'endoxifène semble donc être le métabolite principal impliqué dans les effets du tamoxifène (Higgins et Vered, 2011).

Logiquement, le polymorphisme du gène *CYP2D6* peut donc influencer la réponse d'un groupe de patientes traitées par le tamoxifène.

## iii. Polymorphisme génétique de *CYP2D6*

Plusieurs polymorphismes ont été isolés concernant cette enzyme. Dans les populations caucasiennes, le génotype sauvage (homozygote) est le suivant : *CYP2D6* \*1/\*1. Ces individus présentent une activité enzymatique normale. Les porteurs d'au moins un allèle \*4 présenteront en revanche une activité enzymatique diminuée se traduisant par une inefficacité du traitement. Il s'agit de l'allèle défectueux le plus représenté dans ces populations caucasiennes. En revanche, la fréquence de cet allèle est estimée à seulement 1 à 3 % dans les populations asiatiques.

Dans les populations asiatiques, les allèles défectueux les plus rencontrés sont les versions \*5 et \*10, avec des fréquences respectives de 5 à 10% et plus de 40%. Ces formes d'allèles sont à l'inverse très peu représentées dans les populations du continent américain (Borges *et al.*, 2006).

Une étude portant sur une population asiatique de près de 400 personnes a permis d'établir des relations entre ces différents génotypes et la réponse au tamoxifène. Les individus porteurs des génotypes CYP2D6 \*5/\*10 et CYP2D6 \*10/\*10 présentaient des concentrations plasmatiques en endoxifène significativement plus faibles que les individus hétérozygotes porteurs d'au moins un allèle sauvage (génotype \*1/\*5 ou \*1/\*10) (Lim *et al.*, 2011).

#### *iv. Conséquences thérapeutiques*

Cette étude suggère donc que dans le cadre du cancer du sein, il est important d'identifier des patients hypométaboliseurs avant d'entamer un traitement à base de tamoxifène. Cela permet d'une part d'éviter de mettre en place un traitement inefficace et d'autre part, empêche la survenue d'effets secondaires indésirables liés à l'accumulation de la forme non active du tamoxifène.

Une étude complémentaire a par ailleurs mis en évidence un délai de récurrence plus court chez les patientes porteuses des allèles défectueux (Goetz *et al.*, 2007).

Le génotypage systématique avant d'entreprendre une thérapie par le tamoxifène reste néanmoins encore controversé à l'heure actuelle.

En effet, certains auteurs recommandent que le génotypage préalable des patientes pour le CYP2D6 soit limité à des cas particuliers. Ils estiment en effet que les données ne sont pas encore suffisantes pour justifier de telles pratiques en routine. Un exemple de cas de figure pour lequel ces auteurs préconisent éventuellement le génotypage est celui des patientes pour lesquelles il existe des signes d'une contre-indication à l'emploi des inhibiteurs de l'aromatase. Cette classe de molécule, comprenant entre autres le formestane et l'anastrozole, est également utilisée dans le cadre du traitement contre le cancer du sein. Ces molécules agissent en inhibant la formation d'œstrogènes, notamment dans les tissus cancéreux. De tels médicaments peuvent engendrer plusieurs effets secondaires : une ostéopénie (35-47% des

cas), des arthralgies (jusqu'à 61% dans certaines populations), des bouffées de chaleur ou des symptômes gynécologiques (Offit et Robson, 2010).

Chez des patientes qui présentent déjà un ou plusieurs de ces effets indésirables et qui ne sont donc pas éligibles à l'emploi des inhibiteurs de l'aromatase, le génotypage de *CYP2D6* serait indiqué. En effet, si elles possèdent une forme fonctionnelle de *CYP2D6*, un traitement exclusif à base de tamoxifène pourra alors être mis en place (Higgins et Vered, 2011).

Enfin d'autres solutions de traitement sont actuellement à l'étude, comme la suppression de certains *miARN*. En effet, il a été démontré que *miR-21* est surexprimé dans certains cancers, notamment celui du sein chez la femme. Ainsi, une diminution de l'expression de *miR-21* par certaines protéines, pourraient réduire la progression tumorale (Frankel *et al.*, 2007).

b) *Traitement de la maladie de Fabry : stabilisation de l'Alpha-galactosidase-A*

i. *Présentation de la maladie de Fabry*

La maladie de Fabry est une maladie de surcharge liée au chromosome X. Son origine provient d'une mutation dans le gène codant pour l'alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A), une enzyme lysosomiale qui intervient dans le catabolisme des glycosphingolipides. Ces molécules présentent un résidu alpha-galactosyl terminal. On retrouve par exemple ces glycosphingolipides dans certaines membranes plasmiques. Il en résulte une accumulation de ces glycosphingolipides dans les cellules de tout l'organisme, en particulier un ganglioside appelé le globotriaosylcéramide (références dans Benjamin *et al.*, 2009).

Les symptômes présentés par les patients dépendent du niveau d'inactivité de l'alpha-galactosidase A (Branton *et al.*, 2002).

La plupart des patients présentent une activité faible d' $\alpha$ -Gal A et sont sévèrement atteints. Ce sont en majorité des hommes. Ils manifestent en général des signes cliniques qui apparaissent à l'adolescence, tels qu'une acroparesthésie caractéristique (paresthésie affectant l'extrémité des doigts et des orteils), des angiokératomes, une hypohydrose (diminution de la production de sueur) et une dystrophie cornéenne (Desnick *et al.*, 2001).

En cas d'absence de traitement, la mort peut survenir aux alentours de quarante à cinquante ans. Le patient décède alors d'insuffisance rénale ou d'insuffisance cardiaque, consécutives à des dépôts de globotriaosylcéramide dans les glomérules rénaux ou les coronaires.

Les femmes atteintes manifestent généralement des symptômes moins importants, en relation avec une activité de l' $\alpha$ -Gal A plus élevée (Benjamin *et al.*, 2009).

#### *ii. Mutations de l' $\alpha$ -Gal A et conséquences fonctionnelles*

On dénombre plus de 400 mutations dans la maladie de Fabry, 60% d'entre elles étant des mutations « faux-sens ». Ces mutations entraînent une modification du site catalytique de l'enzyme ainsi qu'une diminution de sa stabilité. On observe également une modification de son adressage, normalement dirigée vers les lysosomes. Tous ces éléments convergent vers une diminution de l'activité de l'enzyme, ce qui engendre les dépôts observés dans les cellules de l'organisme (Bishop *et al.*, 1991).

#### *iii. L'AT1001, une molécule chaperonne stabilisant l' $\alpha$ -galactosidase A*

L'AT1001 (1-déoxygalactonojirimycine, développée par Amicus Therapeutics, New Jersey, USA) est une molécule chaperonne qui se lie spécifiquement à l' $\alpha$ -galactosidase A et en augmente la stabilité. Il en résulte alors une augmentation de l'activité catalytique de cette enzyme.

La reconnaissance spécifique entre l'AT1001 et l' $\alpha$ -Gal A ne se produit que chez certains mutants pour l' $\alpha$ -Gal A ; ces individus sont à ce titre qualifiés de « réceptifs ». Cela fût d'abord démontré chez des souris dans lesquelles des gènes mutant humains avaient été transférés ainsi que sur des cellules humaines cultivées *in vitro* (Fan *et al.*, 1999 ; Yam *et al.*, 2006).

#### *iv. Identification des mutants réceptifs à l'AT1001*

Une étude à paraître en 2011 par Wu *et al.* a permis de développer une technique permettant de détecter les mutants réceptifs, éligibles pour le traitement à base d'AT1001. L'étude a été conduite sur 81 mutants « faux-sens » de l'enzyme  $\alpha$ -Gal A. Sur les 81 protéines mutantes, 49 (60%) présentaient une amélioration significative de l'activité  $\alpha$ -Gal A.

L'augmentation maximale d'activité de l' $\alpha$ -Gal A suite à l'administration orale d'AT1001 est observée chez les mutants p.L300P (c.899T>C) et p.G328A (c.982G>C), avec une augmentation d'activité de l'ordre de 132%. Chez ces individus mutants dits « éligibles », une nette diminution des signes cliniques est également constatée avec une réduction de près de 50% des dépôts de globotriaosylcéramide au niveau des capillaires rénaux interstitiels.

L'identification de ces mutants « réceptifs » fait intervenir une mesure d'activité de l' $\alpha$ -Gal A sur des cellules en culture HEK-293 dans lesquelles les plasmides codant pour les protéines mutées sont transfectés (Wu *et al.*, 2011, sous presse. Communication personnelle).

L'identification des mutants « réceptifs » à l'AT1001 permet donc de sélectionner directement les individus éligibles pouvant favorablement répondre à l'AT1001, un traitement montrant une bonne efficacité chez ces patients (Wu *et al.*, 2011, sous presse).

2. Evaluation des taux de réussite d'un traitement : exemple du traitement de l'addiction à l'alcool par la naltrexone

a) *Mode d'action et métabolisme de l'alcool*

Parmi les affections addictives, la prise d'alcool et le tabagisme sont celles dont la prévalence est la plus élevée à travers le monde. Dans le monde, on recense près de 2 millions de décès annuels engendrés par l'addiction à l'alcool (Thome *et al.*, 2009).

L'éthanol, une fois dans le cerveau, agit sur le système dopaminergique et active le système de récompense, à l'instar d'autres drogues. A des doses faibles, l'éthanol facilite le cheminement du signal des systèmes dopaminergiques et GABAergiques, avec pour conséquence les effets comportementaux de l'alcool. Des neurotransmetteurs supplémentaires, tels que le glutamate et certains opioïdes, interviennent quant à eux dans le renforcement des effets de l'absorption d'alcool. L'alcool est ensuite métabolisé dans le foie par l'alcool déshydrogénase qui génère un métabolite toxique : l'acétaldéhyde. Enfin, l'acétaldéhyde est converti en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase, puis éliminé (Heinz *et al.*, 2003).

L'une des molécules la plus utilisée dans le traitement contre l'addiction à l'alcool est la naltrexone. Il s'agit d'un antagoniste des récepteurs aux opioïdes, avec une forte affinité pour le récepteur  $\mu$  (Heinz *et al.*, 2003).

b) *Polymorphisme génétique et conséquences*

Des études ont mis en évidence une relation entre des variations du gène codant pour le récepteur  $\mu$  (*OPRM1*) et les taux de réussite du traitement à base de naltrexone. La mutation porte sur la 118<sup>ème</sup> paire de base du gène codant pour ce récepteur.

Plusieurs études ont montré une meilleure efficacité du traitement chez les individus porteurs de l'allèle G par rapport à ceux porteur de l'allèle A. Une diminution de la prise d'alcool ou une durée d'abstinence plus importante a été constatée chez les patients porteurs de l'allèle G. Un autre polymorphisme génétique impliqué dans le traitement de l'alcoolisme a été également mis en évidence. Il s'agit d'un récepteur à la dopamine : le récepteur DRD2. La molécule impliquée est le tiapride, antagoniste de la dopamine (Sturgess *et al.*, 2010).

Une étude par Lucht *et al.* en 2001 a montré que les patients possédant le génotype AA pour le gène codant le récepteur DRD2 nécessitent une dose plus importante de tiapride. Une augmentation de l'anxiété et de l'état dépressif a par ailleurs été noté, en comparaison avec les patients porteurs de l'allèle G (Lucht *et al.*, 2001).

Le génotypage peut donc permettre, dans ces cas de figure, de prédire l'évolution du traitement chez des individus alcooliques sous naltrexone et tiapride.

**B. La pharmacogénétique : un outil pour l'adaptation du dosage d'un principe actif**

1. Thérapie immunosuppressive : exemple de la TPMT et de l'azathioprine

a) *Indication des médicaments thiopuriniques*

La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), fait partie d'une cascade enzymatique responsable du métabolisme des médicaments dits thiopuriniques tel que l'azathioprine (AZA). Le gène codant pour cette enzyme cytoplasmique est exprimé dans de nombreuses cellules de l'organisme, à un niveau très élevé dans le foie et un à niveau plus faible dans les poumons et l'encéphale (Pacifi *et al.*, 1991).

Les médicaments thiopuriniques sont souvent utilisés en association avec les corticostéroïdes dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Ils sont également utilisés pour lutter contre les leucémies ou pour prévenir les rejets de greffes post-transplantation.

Il existe trois molécules principales utilisées couramment dans la famille des médicaments thiopuriniques : l'AZA, utilisée surtout pour les désordres immunologiques non malins, la mercaptopurine (MP) pour les affections lymphoïdes malignes et la thioguanine (TG) pour les leucémies myéloïdes (Relling *et al.*, 2011).

En marge d'une efficacité reconnue, les médicaments thiopuriniques peuvent engendrer des effets secondaires importants dans 10 à 28% des cas. Ces effets secondaires comprennent entre autres une intolérance gastro-intestinale, des pancréatites ou des phénomènes d'hypersensibilité. L'effet le plus grave est une hémato-toxicité sévère et précoce, pouvant aboutir à une aplasie médullaire (Hawthorne *et al.*, 1992).

Actuellement, même chez 90% des individus possédant des versions fonctionnelles des allèles codant pour TPMT, les doses standards des médicaments thiopuriniques pourraient être en réalité non optimales et ainsi ne pas avoir un effet anti leucémique maximum (Roden *et al.*, 2006).

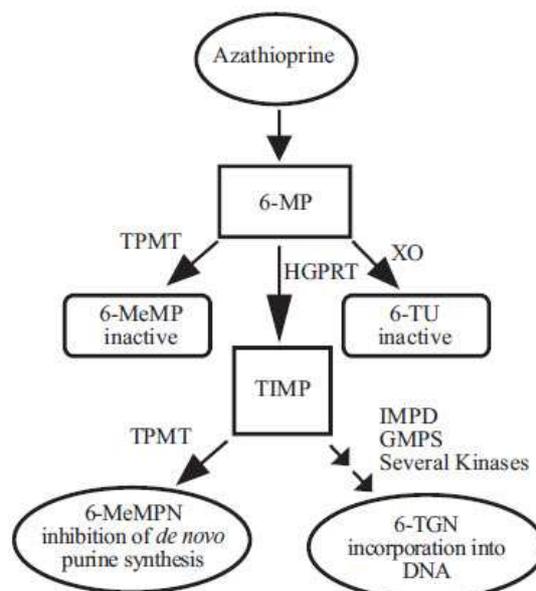
b) *Mode d'action des médicaments thiopuriniques*

Les médicaments thiopuriniques administrés (comme par exemple l'azathioprine, IMUREL N.D.) sont des pro-drogues et doivent être convertis *in fine* dans le milieu intracellulaire en 6-ThioGuanidine nucléotides (TGN), les substances actives. La première étape du processus est la transformation de l'AZA en 6-mercaptopurine (6-MP), par un processus non enzymatique (Figure 10).

La TPMT va ensuite intervenir pour dégrader une certaine partie du stock de 6-MP formé, en méthylMP (MeMP), tandis que le reste va emprunter la voie aboutissant à la formation des thioinosine monophosphates (TIMP). Là encore, TPMT va intervenir dans le sens inverse de la formation des substances actives, les TGN, en formant des composés appelés méthylmercaptopurine nucléotides (meMPN) (Relling *et al.*, 2011).

**Figure 10 : Mode d'action des médicaments thiopuriniques**

*Une fois absorbée, l'azathioprine est d'abord transformée en 6-MP, par un processus non enzymatique. Ensuite une cascade de transformations permet la fabrication des TGNs, qui produisent l'effet du médicament. La TPMT intervient dans la dégradation de 6-MP*



Source : <http://www.afa.asso.fr/ancien-site/presse/801mcrFo.htm>

Il va donc exister une relation inverse entre l'activité de TPMT et la concentration en métabolites terminaux actifs : les TGN (Relling *et al.*, 2011).

Une fois formés, les TGN s'insèrent dans l'ADN des lymphocytes T et induisent leur apoptose, ce qui a pour conséquence une immunosuppression (Tiede *et al.*, 2003).

c) *Polymorphisme génétique de TPMT et conséquences*

Il existe plusieurs variations alléliques du gène codant pour la TPMT, dont la transmission suit un mode autosomique co-dominant. L'allèle qui code pour une activité normale de TPMT (phénotype sauvage) est désignée sous la forme TPMT\*1. On dénombre 16 allèles responsables d'une déficience de l'activité de TPMT : TPMT\*2, \*3A, \*3B, \*3C, \*3D, \*4, \*5, \*6, \*11-16, \*21 et \*25 (Garat *et al.*, 2008).

La plupart de ces allèles sont rares et certains d'entre eux n'ont été identifiés chez quelques individus uniquement. Seulement 3 allèles sont responsables de 80 à 95% du déficit de l'activité de TPMT au sein des populations Caucasiennes, Asiatiques et Afro-américaines. Il s'agit de TPMT \*3A, \*3C et \*2 (Krynetsky *et al.*, 1995).

Ainsi, la population peut être divisée en trois grands groupes : un groupe dont l'activité TPMT est « élevée », un groupe dont l'activité est partiellement déficitaire et un groupe dont l'activité est nulle.

En Europe et en Amérique du Nord par exemple, 89% des sujets ont une activité enzymatique élevée, 11% ont une activité déficitaire et seulement un individu sur 300 présente un déficit total d'activité (Allorge *et al.*, 2007).

Les individus souffrant d'une déficience de l'activité de TPMT sont des patients à risque, pouvant développer les effets secondaires cités précédemment même en cas d'exposition à des doses standards de médicaments thiopuriniques. En effet, les patients qui possèdent une forme peu active, voire inactive, de TPMT vont orienter le métabolisme des médicaments thiopuriniques vers une production accrue de TGN, ce qui aboutira à une destruction excessive des cellules immunitaires et de leurs précurseurs. Des cas de décès ont d'ailleurs été rapportés en Grande Bretagne avec un total de 138 morts au cours des 40 dernières années (Ford et Berg, 2011)

A l'inverse, des individus qui possèdent une activité accrue de TPMT ne répondront pas à des doses standards d'AZA et présenteront des risques plus importants d'hépatotoxicité. Ceci est dû à une accumulation de 6-méthylmercaptopurine (6-MeMP) dans le parenchyme hépatique (Ford et Berg, 2011).

L'identification des individus aussi bien hypo- qu'hyper-métaboliseurs permettra donc d'une part d'éviter les effets indésirables et d'autre part d'optimiser les doses. Cela représente l'indication majeure du génotypage du *TPMT*, qui est un test très efficace permettant d'identifier plus de 90% des individus porteurs d'un déficit partiel ou total (Allorge *et al.*, 2007).

d) *Modulation du dosage des médicaments thiopuriniques en fonction du génotype*

Le génotypage du gène *TPMT* a été le premier test mis à disposition des praticiens. Ce test est de plus en plus utilisé à mesure que le concept de pharmacogénétique leur devient plus familier. Dans ce sens, on peut noter que la *Food and Drug Administration* américaine a décidé de faire apparaître sur l'emballage de l'IMURAN N.D. (azathioprine) la mention qu'il est préférable de réaliser le génotypage de TPMT avant le traitement pour identifier les patients à risque (Johnson, 2003).

Les patients qui présentent une faible activité de TPMT peuvent être traités avec des doses correspondant à environ 50-67% de la dose standard (généralement entre 1 et 3 mg/kg/j). Cette précaution a pour effet de réduire l'accumulation du médicament thiopurinique et d'en diminuer les effets secondaires. Le traitement des individus qui ne possèdent pas de version fonctionnelle de TPMT, *i.e.* une activité enzymatique nulle, est déconseillé. Cependant, certains médecins ont traité avec succès de tels patients en abaissant la dose prescrite d'AZA à 20% de la dose normale (Sanderson *et al.*, 2004).

Une étude de Relling *et al.* datant de mars 2011 propose le schéma posologique suivant pour l'AZA. Pour les homozygotes sauvages (activité enzymatique de TPMT normale à élevée), il est conseillé de démarrer le traitement avec une dose standard de 2-3 mg/kg/j, à adapter en fonction de la maladie. Pour les hétérozygotes (activité enzymatique intermédiaire), si le traitement de la maladie en question requière une dose d'emblée maximale, il est préférable de commencer avec 30 à 70 % de la dose cible (1-1,5 mg/kg/j). Enfin pour les homozygotes

mutants (activité enzymatique nulle), il est souhaitable de choisir un autre principe actif que l'AZA.

Néanmoins, s'il n'existe pas d'alternative à l'AZA, il faut commencer le traitement à des doses 10 fois inférieures aux doses standards. De plus, il est conseillé de passer à trois administrations par semaine, au lieu d'une fois par jour (Relling *et al.*, 2011).

Enfin tous les auteurs s'accordent pour dire qu'en plus du génotypage avant le début du traitement, une surveillance importante dans le suivi thérapeutique doit être mise en place (dosage de TGN, numération-formule sanguine, suivi de la fonction hépatique...).

## 2. Utilisation des anticoagulants : exemple de la warfarine

### a) *Présentation et mode d'action de la warfarine*

La warfarine est une molécule faisant partie de la famille des antagonistes de la vitamine K. La vitamine K intervient dans la formation des facteurs de la coagulation de la voie extrinsèque de l'hémostase secondaire dont la conséquence est la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble.

La warfarine est de ce fait utilisée dans le traitement des cardiopathies afin de diminuer le risque de thromboembolie et des complications qui lui sont associées, telles que la fibrillation atriale (Carlquist et Anderson, 2011). Ce risque est en effet majoré en cas d'insuffisance cardiaque, avec notamment des phénomènes de stase ou de reflux sanguins dans les compartiments vasculaires.

La warfarine est l'anticoagulant oral le plus prescrit en médecine humaine. Les accidents hémorragiques liés aux antagonistes de la vitamine K constituent d'ailleurs la première cause d'hospitalisation suite à des accidents d'origine iatrogène. Cela est dû à la fenêtre thérapeutique étroite de cette classe de molécules (Allorge et Lorient, 2004).

La warfarine est un mélange racémique de deux énantiomères actifs, les formes (R)-warfarine et (S)-warfarine. Cette dernière est cinq fois plus active dans l'inhibition sélective que ce composé exerce sur la Vitamine K époxyde réductase, une enzyme clé du recyclage fonctionnel de la vitamine K.

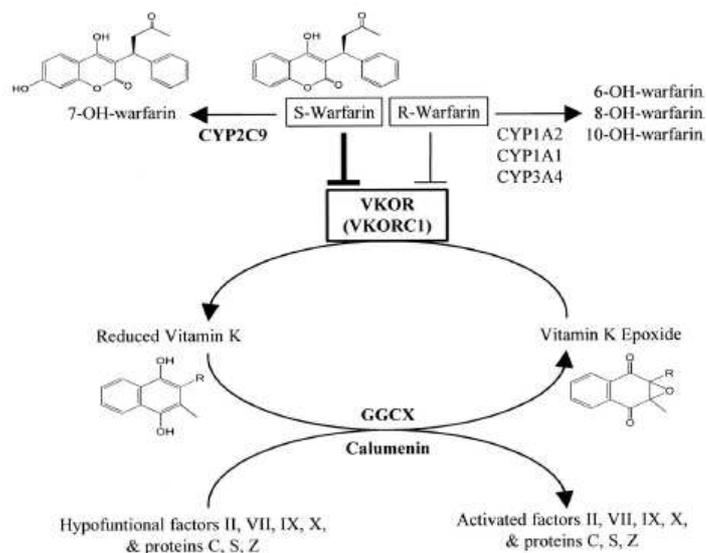
Dans cet exemple, le polymorphisme fonctionnel d'origine génétique peut intervenir à deux niveaux. D'une part, par un volet cinétique en modulant la dégradation hépatique de la (S)-

warfarine par la CYP2C9 ; d'autre part par un volet de pharmacodynamie en modifiant la structure de la sous-unité 1 de l'époxyde reductase (VKORC1). Les deux gènes codant pour ces deux protéines sont responsables de près de 40% des variations de dosage de la warfarine. D'autres gènes sont actuellement en cours d'étude (Ma et Lu, 2011).

Comme nous l'avons vu, la (S)-warfarine agit en inhibant la sous-unité 1 de l'époxyde réductase, codée par le gène *VKORC1*, ce qui empêchera la formation des facteurs de la coagulation (Figure 11) (Ma et Lu, 2011).

### Figure 11 : Mode d'action de la warfarine (Ma et Lu, 2011)

La (S)-warfarine inhibe *VKORC1*, empêchant ainsi le recyclage de la vitamine K réduite et donc la synthèse des facteurs de coagulation. CYP2C9 dégrade la (S)-warfarine, ce qui en limite les effets



### b) Polymorphisme génétique des gènes impliqués dans le métabolisme de la warfarine

La mutation la plus rencontrée dans ce gène est celle portant sur la paire de base en position -1639, dans le promoteur du gène. La mutation g.-1639G>A abolit un site consensus E-Box conduisant à une absence de fixation de facteurs de transcription et une diminution concomitante de l'expression de *VKORC1*. Les individus porteurs de cette mutation sont donc plus à risque pour les hémorragies et également très sensibles à des faibles doses de

warfarine. Des variations sont observées chez les patients portant le génotype 1639 GA (hétérozygotes) ou 1639 AA (homozygotes mutants). Il conviendra donc de diminuer les doses administrées chez ces patients, en comparaison avec les doses administrées aux patients porteurs du génotype sauvage 1639 GG. Les homozygotes AA sont relativement fréquents dans différentes populations humaines : 5% des Afro-américains, 14 à 17 % des Caucasiens et jusqu'à environ 75% dans les populations asiatiques (FDA, 2011).

Par ailleurs, les individus qui possèdent les allèles sauvages CYP2C9\*1 auront une enzyme fonctionnelle qui pourra ainsi dégrader le métabolite actif de la warfarine. En revanche, les individus porteurs des allèles mutants CYP2C9\*2 et/ou \*3 posséderont une enzyme non fonctionnelle et présenteront des concentrations plasmatiques plus élevées de (S)-warfarine.

L'allèle CYP2C9\*2 est présent chez 8 à 13 % des Caucasiens, 1% des Africains et Afro-américains et quasiment absente dans les populations asiatiques.

L'allèle CYP2C9\*3 est présent chez 6 à 9 % des Caucasiens, 2 à 3 % des asiatiques, 1 à 2 % des Africains et Afro-américains (Oscarson, 2003).

Ces individus manifesteront des risques plus élevés d'hémorragies et nécessiteront des doses de warfarine plus faibles (Ma et Lu, 2011).

### c) *Conséquences thérapeutiques*

Des tests génétiques sont disponibles pour génotyper et identifier les patients à risque avant d'entamer le traitement à base de warfarine. Il s'agit de déterminer les versions alléliques des 2 gènes responsables du métabolisme de la warfarine : *CYP2C9* et *VKORC1*.

Des équipes de chercheurs ont mis au point des algorithmes permettant d'évaluer les doses nécessaires de warfarine, en tenant compte du génotype individuel pour CYP2C9 :

**Tableau 1 : Adaptation de la dose de warfarine en fonction du génotype de CYP2C9**

Génotype de CYP2C9	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Dose moyenne de warfarine en mg/jour	5,7	4,8	3,7	3,5	2,8	1,5

Les doses indiquées dans le tableau 1 ci-dessus correspondent à une moyenne des doses fournies par les résultats de plusieurs études différentes (Oscarson, 2003).

On remarque que les individus possédant les allèles \*2 nécessitent des doses plus faibles que les individus possédant le génotype sauvage (homozygote \*1/\*1). Les doses sont encore plus petites pour les patients qui ont l'allèle \*3, codant pour une enzyme encore moins active.

Ces découvertes ont par ailleurs eu un impact sur le développement et la commercialisation de la warfarine, dans le sens où les laboratoires conseillent aux cliniciens de tester leurs patients avant de débiter un traitement à base de warfarine (Takeuchi *et al.*, 2010).

Des études prospectives complémentaires sont nécessaires afin d'affiner ces adaptations de doses de warfarine en fonction du génotype des patients, notamment vis-à-vis du génotype de *VKORC1*.

### 3. Thérapie des affections psychologiques

#### a) *Présentation et métabolisme des neuroleptiques*

Les antipsychotiques ou neuroleptiques sont des médicaments à effet neurobiologique. Ils sont principalement utilisés dans le traitement des affections du système nerveux central, telles que la schizophrénie, les hallucinations ou certaines formes de délire. Parmi ces neuroleptiques, on retrouve communément les phénothiazines (chlorpromazine) ou l'halopéridol, dits « neuroleptiques typiques », mais aussi la rispéridone et la clozapine, dits « neuroleptiques atypiques » en raison de la faible prévalence d'effet secondaire neurologique de cette classe. La réponse à ces principes actifs varie en fonction de plusieurs facteurs : cliniques, environnementaux et génétiques (Mihaljevic *et al.*, 2010).

Ces neuroleptiques agissent sur le système des monoamines neurotransmettrices (dopamine, sérotonine, histamine...). Les neuroleptiques sont dégradés par les enzymes faisant partie du cytochrome P450. Des variations dans l'expression des gènes codant pour ces protéines pourront entraîner des problèmes de surdosage ou bien d'inefficacité. Parmi ces protéines, l'enzyme CYP2D6 est la plus représentée dans la voie métabolique des neuroleptiques typiques. Elle métabolise près de 80% des neuroleptiques et antidépresseurs même si,

paradoxalement, elle n'est présente qu'en faible quantité dans le foie, comparé à d'autres enzymes de la famille des cytochromes P 450 (Maier et Zobel, 2008).

Cette enzyme hépatique transforme le principe actif absorbé en des composés principalement inactifs. La vitesse de cette réaction de dégradation influence donc directement la concentration plasmatique en métabolites actifs.

#### b) *Polymorphisme génétique*

Les individus dits « métaboliseurs lents » sont ceux qui sont homozygotes, avec deux allèles inactifs de *CYP2D6*. Ainsi, ils vont dégrader le principe actif plus lentement et auront de ce fait une aire sous la courbe de concentration plasmatique du composé actif supérieure (plus élevée pendant plus longtemps).

Inversement, les « métaboliseurs rapides », sont les individus possédant au moins une duplication d'un allèle fonctionnel de *CYP2D6*. Ils dégraderont beaucoup plus vite la molécule absorbée et sa concentration plasmatique sera faible, pour une efficacité fortement diminuée.

Les individus possédant des versions alléliques normales sont dits « métaboliseurs intermédiaires » et les concentrations plasmatiques des principes actifs sont moins soumises à variations. A titre d'exemple, environ 7% des individus européens sont considérés comme « métaboliseurs lents », tandis que 5% sont « métaboliseurs rapides ». Ces pourcentages sont nettement plus faibles dans certaines populations asiatiques, par exemple (0,22 % et 1,25% respectivement, dans un panel coréen) (Porcelli *et al.*, 2011).

#### c) *Conséquences thérapeutiques*

Ainsi, certains auteurs préconisent-ils une adaptation de la dose de certains neuroleptiques et antidépresseurs en fonction du génotype des patients. Une réduction des doses de 30 à 70% est préconisée chez les « métaboliseurs lents », tandis qu'une augmentation de 135 à 180% est suggérée chez les « métaboliseurs rapides » (Maier et Zobel, 2008).

Une identification des patients « métaboliseurs lents » pourra aussi permettre de mettre en place chez eux un autre traitement, avec des molécules qui ne sont pas prises en charge par le

complexe du cytochrome P450. C'est le cas, par exemple, pour la reboxétine (un antidépresseur), l'amisulpiride ou le sulpiride (neuroleptiques atypiques) (Maier et Zobel, 2008).

D'autres enzymes du cytochrome P450 sont impliquées dans le métabolisme des neuroleptiques. L'enzyme CYP1A2 est impliquée dans le métabolisme de la clozapine. Aucun des polymorphismes détectés de *CYP1A2* n'est connu pour engendrer à lui seul une variation fonctionnelle. En revanche, certaines isoformes ont été décrites pour augmenter la dégradation de la clozapine en association avec le tabagisme. Une augmentation des doses peut alors être nécessaire chez les fumeurs (Porcelli *et al.*, 2011).

C. **Mise en œuvre concrète de la pharmacogénétique et limites en milieu hospitalier humain**

1. Chiffres et coûts engendrés par les erreurs de dosage imputables au polymorphisme de réponse des patients

a) *Chiffres issus des données américaines*

Comme le montre la partie précédente, il existe une variabilité interindividuelle importante pour ce qui concerne la réponse à un traitement médicamenteux. Seulement 30 à 60% des patients répondent « normalement » à des traitements tels que des antidépresseurs, des bêta-bloquants ou encore des neuroleptiques (Ingleman et Sim, 2010).

Des données américaines récentes estiment que les effets nocifs des médicaments sont responsables de plus de 2 millions d'hospitalisations par an (avec une moyenne de 2 jours d'hospitalisation), ce qui représente 7% des admissions totales dans les hôpitaux (Broly, 2008).

Ce chiffre peut même atteindre 30% chez les individus de plus de 70 ans (Ingleman et Sim, 2010).

Toujours aux Etats-Unis, 100 000 décès par an seraient directement liés à des anomalies de réponse aux médicaments, ce qui les classe au quatrième rang des causes de mortalité, devant le diabète ou les pneumonies. Ceci représenterait un coût annuel global estimé à 350 milliards de dollars en raison des hospitalisations et des arrêts de travail (Allorge *et al.*, 2007).

Ces effets indésirables auraient augmenté de 200% sur la période 1998-2005 tandis que les prescriptions n'ont augmentées que de 20% (Ingleman et Sim, 2010).

Une étude datant de 1998 et compilant les données de plusieurs hôpitaux américains (n=39) confirme d'ailleurs ces chiffres importants. L'incidence des effets indésirables sérieux relatifs aux médicaments était de l'ordre de 6,7%, tandis que celle des effets indésirables fatals était de 0,32%. Les effets indésirables sérieux étaient définis comme ceux nécessitant une hospitalisation du patient. Ces résultats faisaient des effets indésirables la quatrième cause de décès parmi les patients hospitalisés. On notera que les auteurs avaient pris le soin d'exclure de cette étude les erreurs de dosage, les overdoses et les échecs thérapeutiques. Le seul

paramètre restant était donc la variabilité interindividuelle face aux traitements prescrits (Lazaru *et al.*, 1998).

b) *Chiffres issus des données Européennes et Françaises*

Au sein de l'Union Européenne, la proportion de malades hospitalisés à la suite d'un accident d'origine médicamenteuse est encore supérieure, avec un chiffre avancé de 10% (Allorge et Lorient, 2004).

En 2006, au Royaume Uni, 6,5% des 16 millions d'hospitalisations étaient dues aux effets secondaires de médicaments, pour un coût total de 2 milliard de livres sterling (Ford et Berg, 2011).

Chaque année en France, l'iatrogenèse médicamenteuse serait responsable d'environ 128 000 hospitalisations, pour un coût global estimé à 320 millions d'euros. Une enquête a par ailleurs été réalisée par le réseau des Centres régionaux de pharmacovigilance en 1998. Cela a permis de montrer que l'incidence des hospitalisations liée à un effet indésirable d'un médicament était de l'ordre de 3,2% en France. Cette étude a mis en évidence que l'âge était également un facteur de risque important, tout comme le sexe, les femmes étant plus représentées dans les admissions à l'hôpital suite à des effets indésirables (Pouyanne *et al.*, 2000).

2. Structures médicales utilisant les outils de la pharmacogénétique et moyens mis à leur disposition

En France, depuis quelques années, des unités de pharmacogénétique moléculaire se sont progressivement mises en place au sein de laboratoires hospitaliers français. Leur activité consiste à rechercher et à identifier chez les malades des polymorphismes génétiques responsables de la survenue d'effets anormaux des médicaments. Parfois, la recherche de ces polymorphismes est étendue aux membres de leur famille. Ces unités traitent environ 50 000 dossiers par an (Allorge *et al.*, 2007).

On dénombre 18 laboratoires homologués pour la pratique des actes de pharmacogénétique. Ils sont situés dans des grandes villes françaises, trois de ces laboratoires se trouvent en région parisienne ([www.pharmacogenetics.fr/2.html](http://www.pharmacogenetics.fr/2.html), consulté en juillet 2011).

Ces structures sont en plein essor et tentent de se faire entendre auprès des pouvoirs publics afin de débloquent un maximum de fonds pour poursuivre leurs recherches et trouver des solutions adaptées. Leur souhait est à terme de bénéficier d'une structuration en un réseau national, comme c'est le cas pour la mucoviscidose, les maladies neurogénétiques ou encore l'oncogénétique (Allorge *et al.*, 2007).

Sur le territoire Français, les unités de pharmacogénétique moléculaire hospitalière se sont intéressées en premier lieu sur les traitements à base de médicaments thiopuriques il y a déjà plusieurs années (Broly, 2008).

Il y a plusieurs années, aux Etats-Unis, la *Food and Drug Administration* a lancé une campagne d'étude pour évaluer les bénéfices que pouvaient apporter la pharmacogénétique, notamment à travers le développement pratique de tests pour génotyper les patients. Avant cela, rappelons que la FDA était déjà intervenue pour inscrire sur les étiquettes de certains médicaments une mention relative à la pharmacogénétique (Roden *et al.*, 2006). Actuellement, plus de 120 médicaments sont concernés aux USA et leurs étiquettes mentionnent clairement qu'un test génétique est nécessaire. Dans d'autres cas, un test est simplement recommandé (Maggo *et al.*, 2011).

La FDA a récemment approuvé six tests pharmacogénétiques *in vitro* pour 6 molécules. Les tests permettant de génotyper les gènes codant pour le cytochrome P450 sont commercialisés sous le nom d' « AmpliChip CYP450 Test ». Parmi ces tests, on retrouve le génotypage pour *CYP2C9* et *VKORC1* associé au traitement à base de warfarine ; ainsi que *CYP2D6* pour le tamoxifène dans le cadre du cancer du sein chez la femme (Maggo *et al.*, 2011).

En ce qui concerne la warfarine, une mise à jour de la notice a été adoptée aux USA en janvier 2010. Désormais, une table de dosage en fonction du génotype des patients pour *CYP2C9* et *VKORC1* est fournie avec le médicament (FDA, 2011).

En France, une liste de tests réalisables par le réseau des laboratoires de pharmacogénétique est disponible. Elle concerne la détection de variants alléliques d'intérêt pour une dizaine de gènes en appui à l'activité médicale de routine, mais également pour une vingtaine de gènes supplémentaires en lien avec la recherche hospitalière (Tableau 2).

**Tableau 2 : Liste des variants alléliques testés par le réseau français des laboratoires de pharmacogénétique (version Juillet 2011, d'après [www.pharmacogenetics.fr/2.html](http://www.pharmacogenetics.fr/2.html))**

	Gène	Allèle(s)
Tests effectués en routine	<i>CYP2B6</i> <i>CYP3A5</i> <i>CYP2C9</i> <i>CYP2C19</i> <i>CYP2D6</i> <i>VKORC1</i> <i>SLC01B1</i> <i>UGT1A1</i> <i>ABCB1</i> <i>TPMT</i> <i>TS</i> <i>DYPD</i>	*6 *5 *2 et *3 *2 et *3 *3, *4 et *5 *2 *5 *28
Tests effectués en relation avec des activités de recherche	<i>CYP1A2, CYP2C8, GNB3, ABCB1, ABCC2, SLC6A4, SLC01B3, MOR1, TNFalpha, IL6, IL10, IL17, COX1, CCR5, UGT1A9, UGT2B7, FXR, PXR, IMPDH</i>	

3. Quelles limites et quel avenir pour cette discipline en milieu hospitalier humain ?

a) *Problème de la rentabilité*

Un des problèmes posés par la pharmacogénétique est sa rentabilité. Une étude américaine menée dans années 2000 a permis de mettre en évidence plusieurs paramètres qui pouvaient influencer la rentabilité de la mise en application concrète de la pharmacogénétique.

Parmi ces paramètres, nous pouvons citer la fenêtre thérapeutique d'un médicament, mais aussi le monitoring de la réponse à un traitement donné, ou encore la fréquence des différents allèles. Ainsi, la rentabilité et les bénéfices apportés par la pharmacogénétique seront meilleurs dans les cas suivants : fenêtre thérapeutique étroite, suivi difficile de la réponse à un traitement et fréquence d'une variation allélique élevée (Veenstra *et al.*, 2000).

La mise en place de la pharmacogénétique a également été jugée rentable pour des traitements voués à être longs et généralement coûteux. Cette étude soulignait ainsi l'importance du développement de la pharmacogénétique dans le domaine de l'oncologie.

Toutefois, un recours à la pharmacogénétique peut également être possible dans le cadre de traitement contre des maladies aiguës dont les effets secondaires sont très graves (Veenstra *et al.*, 2000).

A l'inverse, pour des maladies, même handicapantes, mais ne rentrant pas dans ces critères, la mise en place de la pharmacogénétique pourrait être ralentie car jugée non rentable sur le plan économique.

#### b) *Problèmes d'ordre éthique*

Des problèmes d'éthique sont également soulevés par l'arrivée de la pharmacogénétique. En effet, des discriminations pourraient apparaître, notamment envers les populations qui possèdent une fréquence élevée d'allèles « à risque ». Cela pourrait se répercuter sur les systèmes d'assurance ou de couverture mutualiste qui seraient moins enclins à prendre en charge les soins et les traitements de ces catégories de patients (Roden *et al.*, 2006).

La confidentialité de l'information pharmacogénétique, la gestion de cette information et de celle des éventuelles informations génétiques qui en sont issues (révélation d'une affection génétique par exemple) sont aussi des questions fréquemment soulevées. Il convient de protéger le patient d'une diffusion excessive de ces informations personnelles. Par ailleurs, le patient nécessite aussi des garanties quant à une éventuelle utilisation abusive des données issues de son génome.

Des lois et des directives sont donc indispensables pour encadrer l'expansion et l'application de la pharmacogénétique afin d'éviter certaines dérives. Depuis ces dernières années, des débats sont instaurés par les autorités de la santé pour statuer précisément autour des données génétiques engendrées par la pharmacogénétique (Allorge *et al.*, 2007 ; Gossard et Hamet, 2002 ; Johnson, 2003).

c) *Un manque de structuration se traduisant par une hétérogénéité marquée*

Actuellement, la pharmacogénétique moléculaire hospitalière en France n'est que trop peu structurée. Elle est dispersée, fractionnée, manque de lisibilité et de coordination. Il existe donc des hétérogénéités importantes de moyens d'une région à une autre par exemple. Ceci s'explique par la façon dont s'est développée la pharmacogénétique en France. Elle résulte principalement d'initiatives individuelles de biologistes aux statuts divers et provenant de divers horizons (Allorge *et al.*, 2007).

Parallèlement, des hospitalo-universitaires et des praticiens hospitaliers, souvent concernés par les travaux de recherche dans le domaine, se sont peu à peu impliqués, organisant leur activité de diagnostic autour de leurs travaux de recherche. La mise en place de la pharmacogénétique s'est également effectuée au sein de services de spécialités très variées telles que la biochimie, l'hématologie, la pharmacologie ou l'immunologie. Cela s'est fait la plupart du temps à partir du redéploiement de moyens existants et sans investissement significatif.

Par manque de ressources supplémentaires, de nombreux laboratoires ont ainsi été contraints à réorienter leur activité vers le développement de cette nouvelle discipline, aux dépens des autres recherches menées. D'autres sont contraints à se limiter à des procédures moins fiables, ou ne peuvent pas se tourner vers de nouvelles techniques. Certains laboratoires vont pouvoir proposer tous les tests disponibles, tandis que d'autres ne se borneront qu'à deux ou trois tests (Allorge *et al.*, 2007).

Une coordination et un développement homogène à l'échelle nationale semble donc nécessaire pour renforcer et encourager les nombreuses initiatives des dernières années dans ce domaine de la pharmacogénétique.

d) *La prise de conscience du problème par les cliniciens*

La question de l'acceptation de la pharmacogénétique par les praticiens mérite aussi d'être évaluée. Une étude a été menée sur 1121 médecins américains pour savoir ce qu'ils pensaient de l'application de la pharmacogénétique dans le cas pratique du traitement contre l'addiction à la nicotine. Une large majorité de 73,5% se dit prête à envisager un traitement individualisé,

après des tests génétiques. Cependant, certains médecins généralistes se disent encore non suffisamment préparés pour conseiller les patients sur ce point et réclament des formations ou des lignes de conduite avant de se lancer dans le domaine de la pharmacogénétique appliquée (Sturgess *et al.*, 2010).

Des efforts sont faits pour sensibiliser les étudiants des diverses professions de santé à cette nouvelle discipline. En effet, les cours et les formations sont de plus en plus nombreux afin de former les nouvelles générations.

Par exemple, l'université de Paris Sud propose pour l'année universitaire 2011-2012 un diplôme inter-universitaire de « Médecine personnalisée et pharmacogénétique ». Il est proposé aux étudiants en médecine ou en pharmacie, mais également aux praticiens souhaitant s'informer sur cette nouvelle discipline. Cette formation comporte 15 journées pleines de cours ([www.pharmacogenetics.fr/11.html](http://www.pharmacogenetics.fr/11.html), consulté en juillet 2011).

Des logiciels sont par ailleurs en cours de développement dans le but de faciliter l'intégration de la pharmacogénétique à la formation des étudiants et des praticiens. Ainsi, grâce à un logiciel, il est possible de rentrer le nom d'une molécule ainsi que le génotype du patient ; il en ressort une liste de commentaires et de directives en relation avec le traitement envisagé (Springer *et al.*, 2011).

Des problèmes de disponibilité, de coût, d'éthique, de connaissances des personnels de santé sur le sujet mais surtout de structuration efficace, représentent les derniers freins à la démocratisation et à l'expansion de la pharmacogénétique clinique.

#### e) *Perspectives d'avenir pour la pharmacogénétique*

Le développement et l'expansion de la pharmacogénétique en France passent donc par la mise en place d'une structuration solide. Des experts dans le domaine ont proposé différentes mesures et solutions afin de réorganiser la pratique de cette discipline dans les structures médicales Françaises.

Selon eux, il conviendrait de se baser sur le modèle des réseaux impliqués dans le dépistage et le traitement de maladies génétiques comme la mucoviscidose, les maladies neurogénétiques ou neuromusculaires. Ces institutions, récemment évaluées, ont apporté de très bons résultats

dans leurs domaines respectifs. Ainsi, la pharmacogénétique moléculaire ne pourrait que tirer parti de la mise en place d'une structure similaire en réseau, sous la tutelle du Ministère de la Santé. Des sous-réseaux, s'intéressant plus particulièrement à un domaine précis, pourront également être développés (par exemple un sous-réseau « CYP450 » ou un sous-réseau « immunosuppresseurs » ...).

Des contrôles extérieurs devront aussi être instaurés au sein de chaque structure, afin de garantir une certaine qualité et l'homogénéité des prestations, qui devront d'être labellisées et standardisées à l'échelle nationale (Allorge *et al.*, 2007).

Toutes ces mesures devraient permettre à terme d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de nombreux médicaments, d'améliorer la prise en charge des malades et devrait contribuer à limiter le problème de santé publique que posent actuellement les variations interindividuelles de réponse aux médicaments.



### III. ETAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES EN MEDECINE VETERINAIRE

Dans le domaine de la médecine vétérinaire et plus particulièrement chez les animaux de compagnie, la pharmacogénétique est nettement moins développée. Bien que dans certains exemples, une variation de réponse à certains principes actifs soit connue depuis longtemps et récemment attribuée à du polymorphisme génétique, son exploration est globalement plus lente qu'en médecine humaine. Pourtant, la structure génétique des populations d'animaux domestiques, éclatées en isolats génétiques que sont les races, est très favorable à ce développement. En effet, la variabilité interindividuelle de réponse aux médicaments qui, chez l'homme, contraint à génotyper chaque personne, peut être réduite chez l'animal à une variabilité interrassiale. Ainsi, l'analyse de la variabilité de réponse aux médicaments pourrait-elle se limiter à une analyse génotypique de quelques centaines de races, l'individualisation du traitement devenant une « racialisation » du traitement, tout aussi efficace.

#### A. Le polymorphisme chez le chien, d'abord une affaire de race

##### 1. Histoire et définition des races canines

###### a) *Origine et domestication du chien*

Il est aujourd'hui acquis que le chien domestique (*Canis lupus familiaris*) a pour ancêtre le loup gris (*Canis lupus lupus*). Cette origine a d'abord été avancée en raison de leur ressemblance morphologique et la preuve de leur proximité phylogénétique a été définitivement apportée par la comparaison moléculaire de leur ADN mitochondrial et nucléaire (Lindblad-Toh *et al.*, 2005 ; Pang *et al.*, 2009 ; Eizirik *et al.*, 2010 ; Parker *et al.*, 2010). Il s'agit d'un génome dont la fréquence de recombinaison permet une lecture directe de l'histoire évolutive à l'échelle d'une famille (Vila *et al.*, 1997).

La domestication du chien est un processus à long terme, qui n'a sans doute pas été continu mais plutôt entrecoupé de retours ponctuels à l'état sauvage ou d'impasses évolutives. Ce processus de vie symbiotique a probablement été guidé par de nouveaux besoins d'une humanité sédentarisée. Cette transformation de mode de vie s'est ainsi accompagnée de

nouveaux outils, de ressources alimentaires renouvelées, de nouveaux rapports aux espèces animales environnantes (Digard, 1990).

La date concernant la première domestication des ancêtres du chien, tel que nous le connaissons aujourd'hui, est toujours sujette à controverse. Les données archéologiques et génétiques ne sont pas toujours convergentes, encore en attente de consensus. Les plus anciens fossiles désignés comme pouvant être ceux de chiens vivants à proximité de l'homme dateraient de 31000 à 33000 ans et constitueraient des preuves d'une première domestication interrompue par la période glaciaire (Germonpré *et al.*, 2009 ; Ovodov *et al.*, 2011). Une seconde vague aurait été reprise entre 9 000 et 14 000 ans avant J-C, prolongée jusqu'aux chiens que nous connaissons aujourd'hui, dans une filiation ininterrompue (Pang *et al.*, 2009).

Les analyses génétiques étudiant une séquence entière d'ADN mitochondrial des chiens et loups actuels ont estimé plus précisément que les prémisses de cette « seconde » domestication remonteraient à 15 000 ans. Dans un premier temps, on a estimé à partir de l'analyse du génome mitochondrial de chiens domestiques et de loups que la domestication aurait été un événement de domestication unique, ayant impliqué une centaine de louve de l'Est Asiatique (Savolainen *et al.*, 2002). Puis, les données analyses conduites sur des chiens de village du monde entier ont plutôt suggéré que des foyers multiples auraient existé (Boyko *et al.*, 2009), une hypothèse récemment confirmée par la comparaison d'haplotypes du génome nucléaire de 225 loups et de 912 chiens domestiques provenant de 85 races (Vonholdt *et al.*, 2010).

b) *Les « variétés canines », précurseurs des races de chien*

Dès l'Antiquité, avant même que la notion de race n'apparaisse, les chiens étaient regroupés nominativement selon quatre appellations fonction de leurs utilités ou de leurs morphotypes. Il s'agit du chien de garde et de ferme, puissant (*Canis villaticus*), le chien de berger (*Canis pastoralis*), du chien de chasse ou encore du « petit chien de compagnie » (Petered, 1994).

Ce phénomène s'est accentué au Moyen Age, avec le développement de l'art de la chasse et de la vènerie en Europe Occidentale. Les variétés de chien se sont alors étoffées et complexifiées, essentiellement dans le domaine de la chasse. C'est à cette époque qu'apparaissent les manuels, notamment celui de Febus, intitulé « *Livre de chasse* » et paru en 1387. Cet ouvrage évoque assez précisément les caractères phénotypiques de chaque variété,

permettant ainsi de classer les individus. Les chiens de garde et de troupeau sont quant à eux moins considérés à l'époque. Une politique de sélection et d'isolement reproductif destinée à maintenir les caractères des variétés fait son apparition : peu à peu le concept de races canines prend naissance. Ces variétés représentent d'une certaine façon, des « races primitives », ou proto-races (Bouvresse, 2010).

c) *L'apparition des races actuelles*

A l'heure actuelle, le terme de « races » reste encore relativement controversé. Schématiquement, la zoologie et la zootechnie traditionnelles retiennent un découpage que nous rappelons ci-dessous.

L'espèce est susceptible de se diviser en sous-espèces, lesquelles chez les animaux domestiques se subdivisent en une multitude de races. Celles-ci peuvent éventuellement comprendre un certain nombre de variétés. Au sein de ce dernier groupe taxinomique, on peut même retrouver des souches, voire des lignées consanguines. Le passage du niveau « espèce » à « lignée consanguine » implique logiquement que les unités taxinomiques considérées soient de plus en plus homogènes sur le plan génétique (Denis et Courreau, 2006).

Historiquement, la race canine dans sa définition actuelle apparaît à la fin du XIX<sup>ième</sup> siècle avec le Bouledogue Anglais. Jusqu'au début du XIX<sup>ième</sup> siècle, cette variété de chien était très appréciée dans les combats contre des taureaux, en vertu de ses caractéristiques physiques. Une loi parlementaire de 1835 aurait condamné ces chiens de combats à disparaître si, motivés par le désir de maintenir cette variété de chien considérée comme un symbole national, un groupe d'amateurs n'avait préservé ces caractéristiques et créé en 1875 le « Bulldog Club ». La notion de race canine et de cynophilie est donc née de la passion d'éleveurs pour une variété en voie de disparition. Ils ont ainsi cherché à préserver et fixer cette race en favorisant une reproduction exclusive et en l'améliorant pour faire du chien de combat une race plus docile. Le premier standard du Bouledogue est publié en 1876 (Bouvresse, 2010).

La création de « races » canines modernes est donc l'aboutissement de milliers d'années d'évolution et de centaines d'années de sélection de caractères de travail, jusqu'au XVIII<sup>ième</sup> siècle, puis de caractères morphologiques ou esthétiques, comme cela est le cas de nos jours.

Il en résulte donc des groupes très homogènes sur le plan génétique. Cela se répercute sur le plan morphologique et comportemental, justifiant ainsi cette sélection.

2. Les races sont des isolats génétiques stratifiés

a) *Les races représentent des isolats génétiques*

i. *Les races : des unités génétiques homogènes*

Une race peut être définie comme un groupe d'individus développé par une sélection artificielle et maintenu par une propagation contrôlée, ayant un ancêtre commun et certaines caractéristiques qui lui sont propres (Fleischer *et al.*, 2008).

Le cas particulier des races canines est très intéressant sur le plan génétique. En effet aucune autre espèce animale de mammifère n'a été autant modelée et façonnée à ce point par l'Homme. Depuis l'émergence des clubs de races et de la reproduction sélective au XIX<sup>ème</sup> siècle, le terme de « barrière de race » a pris tout son sens, avec la création de groupes génétiques très homogènes fondé par quelques individus « champions », fruit d'une sélection très stringente. L'association de la barrière de race et de l'effet fondateur explique le maintien des caractères de races (Parker *et al.*, 2004).

A l'heure actuelle, environ 400 races canines sont décrites, parmi lesquelles 152 sont reconnues officiellement par l'American Kennel Club (Crowley et Adelman, 1998).

Des analyses fondées sur la distribution et la fréquence allélique de séquences microsatellites ont confirmé l'homogénéité élevée au sein des races de chien. Les marqueurs microsatellites sont des séquences d'ADN formées de répétitions continues de 2 à 10 nucléotides. Présents sur l'ensemble du génome, plus particulièrement au niveau des introns, ils sont soumis à une fréquence de mutation relativement élevée, générant ainsi un polymorphisme important pour chaque locus. Au bilan, la transmission Mendélienne de ces séquences facilement identifiables par PCR permet de suivre les liens de parenté des animaux entre eux (Weissenbach, 1993).

Une étude princeps menée sur un total de 414 chiens issus de 85 races différentes a montré qu'il était possible d'assigner 99% des chiens à une race en particulier, uniquement grâce aux

données génétiques issues de l'exploitation de quelques microsatellites seulement (Parker *et al.*, 2004). L'existence d'une signature génétique unique pour chacune des races de chiens a par la suite été confirmée dans une étude Finlandaise similaire (Koskinen, 2003), puis à partir d'un échantillonnage élargi (Parker *et al.*, 2007). Ainsi, il est possible d'assigner avec un indice de confiance très élevé un chien à un groupe de races, voire à une race, par la seule étude de son ADN (revue dans Parker *et al.*, 2010).

La majorité de la variation génétique observée dans les populations canines réside dans la différenciation entre les races. Cette variation génétique interraciale compte pour plus de 27% de la variation génétique totale. A titre de comparaison, ce degré de différenciation tombe à 5-10% quand on compare différentes populations humaines (Lindblad-Toh *et al.*, 2005 ; Parker et Ostrander, 2005).

Ces observations confirment le fait que la création des races a abouti à un isolement génétique interracial contraint, avec une forte homogénéité génétique et phénotypique propice à l'analyse du support génétique des caractères (Maurer et Turet, 2010).

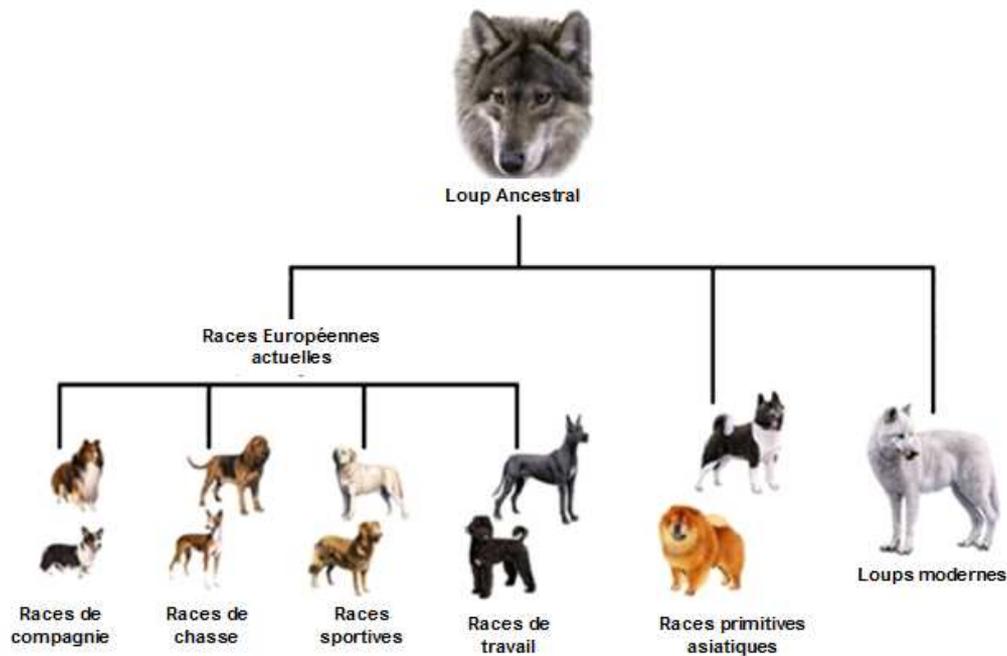
#### *ii. Relations entre les races*

La biologie moléculaire a démontré que tous les chiens vivant aujourd'hui appartenaient à une seule et même espèce, mais les différences de phénotypes entre les races (ou plus anciennement les variétés de chiens) sont telles qu'on s'est longtemps demandé si elles ne provenaient pas de plusieurs genres (loup, chacal, coyote) de la famille des canidés (Gilgenkrantz, 2007).

La grande majorité des races canines d'aujourd'hui semble dériver de chiens européens (Figure 12). Cette émergence semble être relativement récente. Bien que les différentes races soient différentes au plan génétique, elles semblent avoir presque toutes divergé au même moment. Cette différenciation s'est faite à partir d'un « pool » commun, peu différencié génétiquement, après l'introduction du concept de race et la création des différents clubs en Europe.

La majorité des races « modernes » européennes présentent moins de différences entre elles qu'avec les races primitives comme le Chow Chow, l'Akita Inu ou le Basenji (Parker *et al.*, 2007 ; Vonholdt *et al.*, 2010).

**Figure 12 : Arbre généalogique simplifié des races canines (d'après Fleischer *et al.*, 2008)**  
*Le loup est l'ancêtre commun aux chiens actuels. Les races primitives asiatiques constituent un groupe différent de celui des races européennes actuelles.*



b) *Des groupes stratifiés en constante évolution*

On comprend donc que les races sont des groupes génétiques homogènes avec des signatures bien individualisées, fruit d'un travail de sélection marqué par l'effet de barrière et la dissémination large de quelques allèles issus de chiens « champions ». Il est donc tentant de postuler que la variation individuelle, telle que nous la connaissons chez l'homme, se résoudrait à une variation strictement interraciale chez le chien ou, d'une façon générale, chez les espèces animales domestiquées et sélectionnées. La forte similitude des phénotypes individuels au sein d'un même race plaide pour cette hypothèse. Ces phénotypes peuvent être morphologiques, comportementaux ou des prédispositions raciales à certaines maladies génétiques (Wayne et Ostrander, 2007 ; Parker *et al.*, 2010).

La vérité sur la structure génétique du chien n'est pas éloignée de ce constat et guidera en particulier la stratégie pharmacogénétique, comme nous le verrons ultérieurement dans ce manuscrit. Cependant, nous devons pondérer cette assertion en ajoutant que les races ne peuvent être totalement réduites à des groupes parfaitement homogènes. En effet, de nombreuses preuves se sont accumulées qui attestent qu'au sein d'une même race, il existe

des sous-groupes d'animaux partageant des signatures moléculaires uniques, non partagées au sein de la race. En particulier, cette évidence est très bien illustrée par l'apparition, plus ou moins récente, de maladies génétiques caractéristiques de sous-populations raciales. Nous pouvons ainsi donner l'exemple de la myopathie centronucléaire, qui ségrège exclusivement dans la sous-population des Labradors de travail, constituant ainsi une preuve de stratification à l'intérieur des races de chiens.

Le Labrador retriever est une race dont le standard fut défini en 1916. Il a été créé pour la chasse au gibier d'eau, du fait de ses caractéristiques d'excellent nageur et rapporteur (Grandjean, 2003).

Des cas spontanés de Labradors souffrant de myopathie congénitale ont été rapportés pour la première fois aux Etats-Unis en 1976, puis un peu plus tard par d'autres groupes à travers le monde (Kramer *et al.*, 1976). Cette myopathie est un modèle de myopathie centronucléaire également observée chez l'Homme. Les chiots Labradors concernés présentent une hypotonie, une faiblesse musculaire généralisée, une posture anormale ainsi qu'une intolérance à l'effort. Ils manifestent en outre une aréflexie tendineuse à l'examen neurologique. L'examen histologique révèle quant à lui une diminution et une atrophie des fibres musculaires de type II (Tiret *et al.*, 2003).

L'analyse de pedigrees correspondant ont permis de mettre en évidence le mode autosomique récessif pour la transmission de cette pathologie (Gordel *et al.*, 1996) et une analyse de liaison a permis de localiser le locus responsable de cette pathologie en région centromérique du chromosome 2 (Tiret *et al.*, 2003). Le support moléculaire de cette affection a été précisé et l'allèle muté correspond à l'insertion d'un Short Interspersed Nuclear Element (SINE) dans l'exon 2 du gène codant pour la *protein tyrosine phosphatase like, member A* (PTPLA). L'insertion du SINE produit des anomalies d'épissage des ARN pré-messagers, ce qui conduit à une perte de fonction du gène (Pelé *et al.*, 2005).

Une étude menée sur plus de 7 000 Labradors échantillonnés dans 18 pays différents ([www.labradorcnm.com](http://www.labradorcnm.com)) a permis de montrer qu'environ 17% des chiens prélevés sont porteurs de l'allèle muté. Ces chiens appartiennent pour leur immense majorité au groupe des Labradors dits « de travail », spécifiquement entraînés pour des compétitions sportives (Maurer *et al.*, données personnelles). Cet allèle n'est retrouvé dans aucune autre race. Ce résultat illustre parfaitement les notions d'effet de barrière entre les races et d'effet fondateur

à l'intérieur d'une race, générateur d'une stratification invisible et pourtant caractéristique de certaines races. Cette stratification peut avoir pour fondement l'origine géographique (Quignon *et al.*, 2007) ou un caractère morphologique particulier, comme la couleur de la robe par exemple (Bjornerfeldt *et al.*, 2008).

Il va de soi que les différents croisements, parfois consanguins, ont contribué à l'entretien de ces phénomènes de stratification.

## **B. Le polymorphisme interracial, support d'une diversité fonctionnelle**

Pour bien comprendre comment le polymorphisme interracial, attesté par les signatures génétiques que nous avons rappelées plus haut, peut expliquer une variation de réponse des chiens aux médicaments, nous allons citer deux exemples qui illustrent comment une ou quelques mutations génétiques simples peuvent produire des variations morphologiques majeures. Ainsi, il ne sera pas difficile de comprendre qu'une mutation simple peut produire des variations physiologiques tout aussi importantes, en particulier sur le métabolisme des médicaments ou sur la réponse d'un organisme à des xénobiotiques.

### **1. Exemple d'un caractère mixte avec gène à effet majeur : la taille du chien**

Dans l'histoire des races canines, certaines régions du génome ont été soumises à une pression sélective importante résultant de la sélection de certains caractères. C'est par exemple le cas de la taille des chiens. Aucun autre vertébré terrestre ne présente une si grande diversité en termes de taille. Du Chihuahua (à peine 1kg) au Saint Bernard (près de 100kg), la divergence est impressionnante et pourtant, il s'agit bien de la même espèce, d'un même génome, mais avec une sélection d'allèles différents (Gilgenkrantz, 2007 ; Sutter *et al.*, 2007).

Il a été prouvé que le gène *IGF1* (Insuline like Growth Factor 1) est un déterminant important de la taille des mammifères. L'un des rôles de l'IGF1 est de stimuler la prolifération des chondrocytes et de ce fait, de participer à l'allongement des os longs à partir des cartilages de croissance. Par exemple, les souris déficientes en IGF1 ont un poids de naissance correspondant à 60% du poids normal. Des observations similaires ont été faites chez l'homme (Woods *et al.*, 1996).

Des études ont d'abord tenté d'identifier, au sein de la population canine, le support génétique de cette variation de taille.

Dans un premier temps, un QTL (Quantitative Trait Locus ou Locus à Effet Quantitatif) a pu être identifié. Un QTL est un locus au sein duquel la variation allélique d'un ou plusieurs gènes est associée à la variation d'un caractère quantitatif, comme la taille des individus ou la valeur de leur pression artérielle (Bert, 2002).

Une étude a porté sur un lot de Chiens d'eau Portugais (CEP), une race au sein de laquelle il existe une forte variation de la taille des individus (acceptée par l'AKC).

Un QTL a été mis en évidence sur le chromosome 15, dans lequel se trouve le gène *IGF1*.

Ensuite, plusieurs centaines de SNP ont été observés, puis classés. Au final, un seul pic a pu être isolé, correspondant à la région de l'*IGF1* (Sutter *et al.*, 2004).

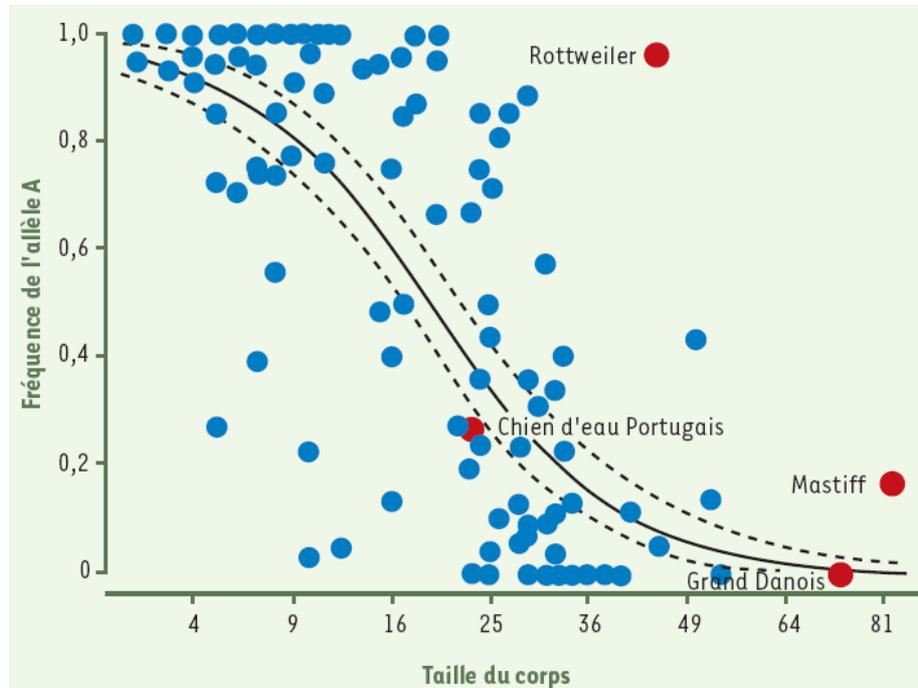
Une analyse plus poussée a permis de montrer que 96% des CEP partagent deux versions haplotypiques (nommées B et I) d'une combinaison de 20 SNP autour du gène *IGF1*. Les chiens BB étaient plus petits et présentaient des concentrations plasmatiques en IGF1 plus basses que les homozygotes II (Sutter *et al.*, 2004).

Puis, une analyse étendue à une population de 526 chiens, allant du Chihuahua au Grand Danois, a permis de retrouver dans les grandes races l'haplotype I ainsi qu'un autre haplotype F. A l'inverse, l'haplotype A était très fréquent chez les petites races et exceptionnel chez les grandes races. Finalement le SNP 5 A a été retenu, car il a été retrouvé chez le coyote, le loup gris et le chacal, ce qui prouve qu'il provient bien des races originelles de canidés. De plus il a peu recombinaison. Cela en a donc fait un très bon outil de comparaison entre les différentes races (Sutter *et al.*, 2007).

L'association entre l'allèle SNP5 A et la taille est très probante : les petits chiens l'expriment très fortement tandis qu'il est quasi absent chez les chiens de grand format (Voir Figure 13). On notera cependant deux exceptions parmi les animaux de grande taille : les Rottweiler et les Mastiffs. Ces derniers ont une origine très ancienne, pouvant expliquer cette exception (Sutter *et al.*, 2007).

**Figure 13 : Fréquence de l'allèle SNP5 A en fonction de la taille des chiens chez différentes races canines (Gilgenkrantz, 2007)**

*Les chiens de grand format (Grand Danois), présentent une fréquence quasi nulle de cet allèle, contrairement aux petites races. A noter l'exception du Rottweiler*



Bien que la présence ou non des différents allèles du gène *IGF1* joue un rôle important dans la variabilité de la taille des chiens, d'autres facteurs génétiques entrent également en compte. Ils restent pour l'instant méconnus.

2. Exemple d'un caractère oligogénique : la structure du poil

Dans l'espèce canine, il existe une très grande variabilité du pelage. Ainsi, il existe des races à poils longs, courts, frisés, durs, ondulés. Cette diversité de structure de poil existe aussi parfois à l'intérieur des races et se double d'une grande variabilité de couleur (Karlsson *et al.*, 2007).

Une étude menée par Cadieu *et al.* en 2009 a permis de mettre en évidence le support génétique de la variation de structure du poil chez le chien. Dans cette étude, trois paramètres de la composition de la robe ont été pris en comptes. Le premier est le phénotype « moustachu », ou « *furnishings* » en anglais, facilement observé chez les chiens à poils durs

et marqué par la présence de touffes de poils au niveau du museau, des sourcils et de l'arrière des pattes. Le second est le phénotype « longueur du poil ». Le troisième est le phénotype relié et l'aspect bouclé du poil, « *curly* » en anglais, rencontré par exemple chez les caniches. Une série d'analyses d'association a été conduite pour révéler les mutations impliquées dans ces trois phénotypes complexes. Trois mutations ont été identifiées, chacune responsable d'un aspect du phénotype de structure du poil.

Ainsi, il a été montré qu'une insertion dans le gène codant pour la R-spondine-2 (*RSPO2*) est responsable du phénotype *furnishings*. Cette insertion est dans la région 3'UTR de *RSPO2*. Des RT-PCR réalisées à partir de biopsies de peau réalisées au niveau des sourcils de ces chiens ont révélé un nombre de transcrits de *RSPO2* trois fois plus élevé que chez des chiens contrôles. Ainsi, la mutation dans le 3'UTR interfère avec la dégradation de l'ARNm et il est donc très probable que cette mutation dominante détruit le site de reconnaissance d'un *miRNA* (Cadieu *et al.* 2009).

Par la même stratégie, un SNP au niveau de l'exon 1 du gène *FGF5*, induisant la mutation p.Cys95Phe dans le Fibroblast Growth Factor 5, a été associé au phénotype « poil long ». Ce SNP a été retrouvé à l'état homozygote chez 91 % des chiens présentant des poils longs, et chez 3.9% pour les chiens à poils courts. Des études antérieures chez le chat avaient permis de révéler des mutations dans *FGF5* en relation avec ce phénotype, confirmant le rôle conservé de *FGF5* dans la croissance du poil (Kelher *et al.*, 2007 ; Drogemuller *et al.*, 2007).

Enfin, les chercheurs se sont penchés sur l'aspect bouclé ou non du poil à l'aide d'un lot de Chien d'eau Portugais. Ces chiens peuvent présenter un pelage lisse ou bouclé. Un SNP non synonyme dans le gène *KRT71* a été associé au phénotype *curly*. Il entraîne la mutation récessive p.Arg151Trp dans la kératine 71, responsable de l'aspect bouclé du pelage chez le chien. Ainsi, les chiens au pelage bouclé présentent le génotype *T/T* pour *KRT71*, tandis que les individus non bouclés affichent un génotype *C/C* (Cadieu *et al.* 2009). Le rôle de cette kératine dans ce phénotype n'est pas une surprise car les souris mutées dans *Krt71* présentent un pelage bouclé (Runkel *et al.*, 2006).

De façon surprenante, les auteurs de cette étude ont décrypté que la structure du pelage de 95% des 160 races analysées et reconnues par l'AKC pouvait être expliquée par sept combinaisons alléliques de ces 3 gènes (*RSPO2*, *FGF5* et *KRT71*) (voir figure 14). Pour la

première fois, il a donc été démontré que chez le chien, un phénotype complexe peut se résoudre avec une combinaison de trois mutations autosomiques simples (Cadieu *et al.* 2009).

**Figure 14: Combinaison des allèles des 3 gènes intervenant dans la structure du poil chez le chien (Cadieu *et al.*, 2009).**

Les signes + et - indiquent la présence ou l'absence du génotype variant (non ancestral). Le terme « furnishings » correspond à ces touffes de poils sur le museau, les sourcils et l'arrière des pattes. Le terme « curly » signifie bouclé et le terme « wire » se réfère aux animaux à poils durs. A droite du tableau, des exemple variés de structures de pelage de chien.

PHENOTYPE	FGF5	RSPO2	KRT71	A Basset Hound	B Australian Terrier	C Airedale Terrier
A Short	-	-	-			
B Wire	-	+	-			
C Wire and Curly	-	+	+			
D Long	+	-	-			
E Long with Furnishings	+	+	-			
F Curly	+	-	+			
G Curly with Furnishings	+	+	+			

## C. Polymorphisme et pharmacogénétique en médecine vétérinaire

L'ensemble des données présentées plus haut permet de dresser le bilan suivant. Du fait du mode de sélection opéré, la population canine contemporaine est organisée en races, identifiées par des signatures spécifiques. En fonction de son effectif, de sa répartition géographique ou de caractères particuliers, chaque race peut elle-même être décomposée en sous-groupes, sans distinction de signature mais avec des polymorphismes attestant d'un certain niveau de stratification. Enfin, nous avons compris qu'une unique mutation, qu'elle soit récente et ségrège au sein d'une race, ou plus ancienne et commune à un groupe de races, peut avoir des conséquences phénotypiques importantes, d'autant plus qu'elle se combine avec d'autres mutations.

Ainsi, il découle de ces données qu'un faible nombre de mutations simples peut être suffisant pour perturber, à des degrés divers, la réponse d'un organisme à un xénobiotique. On comprend alors que la survenue d'un polymorphisme intra- ou interracial dans un gène impliqué dans l'absorption, le métabolisme, la réponse ou la toxicité aux médicaments peut induire chez les individus porteurs de cette mutation une variation importante de réponse au traitement initié. D'une façon générale, on peut estimer que l'analyse des polymorphismes fonctionnels sera pertinente à l'échelle de la race ou du groupe des races apparentées, sans aller jusqu'à la résolution individuelle. Eventuellement, nous devons anticiper que dans des cas, sans doute minoritaires, il faudra explorer les mutations à l'échelle de la strate raciale, voire de l'individu.

Nous allons maintenant développer des exemples de pharmacogénétique chez les carnivores domestiques, qui relatent tous des polymorphismes à l'échelle d'une ou de plusieurs races.

### 1. Sensibilité à l'ivermectine, gène *Mdr1* et glycoprotéine P

#### a) *Historique et mise en évidence*

L'origine de la relation entre la sensibilité à l'ivermectine et le gène *Mdr1* (*Multi Drug Resistance*) codant la glycoprotéine P1 remonte au début des années 1990. Cela a débuté de manière fortuite avec l'analyse des souris rendues déficientes pour le gène *Mdr1* (*Mdr1-KO*).

En comparaison avec les souris de génotype sauvage, les souris mutées ne présentaient pas d'anomalies morphologiques ou physiologiques. Elles étaient parfaitement fécondes et présentaient une espérance de vie normale. Les chercheurs ne s'y sont plus intéressés jusqu'au jour où toutes ces souris sont mortes suite à une désinfestation contre des mites présentes dans le laboratoire. Le lien entre cette mort brutale et massive et le produit employé, l'ivermectine, a été supposé. L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) des souris *Mdr1*-KO a mis en évidence que l'ivermectine s'y était accumulée au point d'être détectée à des concentrations 100 fois plus élevées que dans le LCR des souris sauvages (Schinkel *et al.*, 1994).

Cette expérience princeps a permis d'initier chez certaines races de chiens sensibles à l'ivermectine une recherche de mutation par une approche gène candidat. Une délétion de quatre paires de bases dans le gène *MDR1*, produisant une perte de fonction de la protéine, a été initialement trouvée chez le Colley (Mealey *et al.*, 2001), puis dans l'ensemble des races apparentées (Neff *et al.*, 2004). Le gène *MDR1* a fait l'objet d'une modification de nomenclature et s'appelle aujourd'hui *ABCBI*. Une synthèse sur la pharmacogénétique de cette mutation chez le chien est disponible (Mosher et Court, 2010).

#### b) *Mode d'action*

La glycoprotéine P est une protéine transmembranaire de haut poids moléculaire qui fonctionne comme une pompe à efflux transmembranaire, transportant des molécules de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. On la retrouve à la bordure apicale des cellules épithéliales de l'intestin, des cellules endothéliales des capillaires du cerveau, des cellules des canalicules biliaires, des cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux, des cellules placentaires et des cellules myoïdes et de Leydig dans le testicule (références dans Mealey, 2008).

L'hydrolyse de l'adénosine tri-phosphate (ATP) permet de fournir l'énergie nécessaire au transport actif des molécules, permettant ainsi au transporteur de fonctionner contre le gradient établi. Cette glycoprotéine P permet ainsi le transport de nombreux agents tels que des agents de chimiothérapie (doxorubicine, vincristine), des immunosuppresseurs (cyclosporine, tacrolimus), des antiparasitaires (ivermectine, moxidectine, milbémycine oxime), des inhibiteurs de protéase du HIV-1 ou encore des corticostéroïdes. On ignore comment cette glycoprotéine peut reconnaître et transporter une telle diversité de produits

dont la structure chimique est très différente. La seule structure d'un composé ne permet pas de prédire s'il sera ou non un substrat de la glycoprotéine P (Mealey 2004).

La glycoprotéine P ne possède pas de fonction métabolique intrinsèque. Elle est en revanche une composante essentielle du métabolisme des médicaments au niveau du tube digestif. Elle agit en association avec la CYP3A (Martinez *et al.*, 2008).

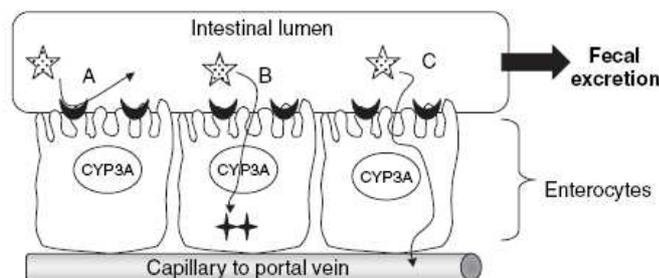
Lorsqu'une molécule se retrouve dans le tractus intestinal, elle est absorbée dans les entérocytes via un transport actif consommant de l'ATP. (Figure 14). La glycoprotéine P et la CYP3A vont alors agir conjointement : les drogues n'étant pas des substrats de la glycoprotéine P ne passent qu'une seule fois dans les entérocytes et sont alors prises en charge par CYP3A. Au contraire, les drogues qui sont des substrats de la glycoprotéine P vont être continuellement expulsés vers la lumière intestinale (Mealey *et al.*, 2007).

En conclusion, selon qu'une drogue est substrat ou non de la glycoprotéine P, elle est soit éliminée par voie fécale, soit métabolisée par la CYP3A.

**Figure 15 : Mode d'action de la glycoprotéine P au niveau de l'épithélium intestinal (Mealey, 2004)**

*L'action de la glycoprotéine P (g-P) permet un efflux continu de ses substrats vers la portion distale du tube digestif. Certaines drogues peuvent franchir cette barrière et sont ainsi métabolisées en partie par le complexe enzymatique CYP3A*

- ☆ = P-gp and CYP 3A substrate drug
- †† = metabolites of ☆
- ☾ = P-gp



Au niveau de la barrière hémato-méningée, la glycoprotéine P intervient pour assurer l'imperméabilité de cette dernière aux xénobiotiques, l'efflux continu assuré par son activité permettant de chasser les molécules du LCR.

Certains auteurs pensent que la glycoprotéine P agirait donc comme un mécanisme de protection de l'organisme pour réduire le risque d'exposition à d'éventuels xénobiotiques (Dowling, 2006).

c) *Polymorphisme de ABCB1*

La mutation responsable chez le chien de la sensibilité aux drogues est une délétion de quatre paires de base dans l'exon 4 du gène *ABCB1* (*ABCB1-Δ*). Cette mutation engendre l'apparition de multiples codons stop prématurés. Cela se traduit par la production d'une protéine fortement tronquée et non fonctionnelle, qui n'a plus que 10% de séquence d'acides aminés en commun avec la protéine sauvage (Mealey *et al.*, 2001).

Cette mutation touche en premier lieu les chiens de race, particulièrement les races apparentées aux Colleys. On peut citer le Colley, le Border Collie, Berger Australien, le Berger Australien miniature, le Berger Anglais, le Whippet à poils longs, le MacNab, le Berger Anglais ancestral, le Berger de Shetland, le Silken Windhound et le Berger blanc Suisse entre autres (Neff *et al.*, 2004). En France, en Australie et aux Etats-Unis, près de 75% des Colleys portent au moins un allèle mutant pour *ABCB1* (Mosher et Court, 2010).

Au sein de cette sous-population sensible, 35% sont homozygotes mutants et plus de 42% sont hétérozygotes (Dowling, 2006).

d) *Conséquences du contact avec les lactones macrocycliques*

Chez les chiens homozygotes pour la mutation *ABCB1-Δ*, des effets neurologiques importants sont constatés après une administration d'ivermectine à une dose de l'ordre de 120 µg/kg. Ces effets secondaires sont une ataxie, un ptyalisme ou encore des crises convulsives. En revanche, l'ivermectine peut quand même être employée aux doses recommandées pour la prévention de la dirofilariose, c'est-à-dire 6µg/kg *per os*, renouvelée chaque mois (Mealey, 2008).

Ce protocole de traitement chez les homozygotes mutants est même approuvé par la *Food and Drug Administration* aux Etats-Unis. Généralement, les accidents ont lieu après emploi de très fortes doses chez ces chiens, en particulier dans le traitement contre la démodécie qui préconise des doses atteignant 500µg/kg/jour. Ces accidents sont également très souvent rencontrés dans les cas où le propriétaire utilise une forme galénique *pour-on* destinée aux bovins et non adaptée à l'espèce canine (IVOMEC N.D.) (Mealey, 2008).

Les chiens hétérozygotes peuvent aussi présenter des effets secondaires neurologiques, mais à des doses supérieures à 600 µg/kg/jour et sur une période plus importante. Ces effets apparaissent également au contact d'autres lactones macrocycliques, tels que la sélamectine, la moxidectine et dans certains cas la milbémycine (Paul *et al.*, 2000).

Cependant, ces molécules présentent moins de risques que l'ivermectine. Enfin, les individus homozygotes sauvages ne présentent pas de signes cliniques neurologiques, même à des doses de l'ordre de 2500 µg/kg (Mealey, 2008).

e) *Conséquences du contact avec d'autres substrats de la glycoprotéine P*

Des cas de neurotoxicité ressemblant à ceux engendrés par les molécules de la famille de l'ivermectine ont été mis en évidence chez des chiens homozygotes mutants, par exemple après administration de l'opéramide. Il s'agit d'un opioïde, utilisé fréquemment dans le traitement des diarrhées (Sakaeda *et al.*, 2003).

Une dépression sévère et prolongée du système nerveux central suite à un contact avec de l'acépromazine et du butorphanol a également été rapportée chez des chiens homozygotes mutants (Mealey 2006b).

Des effets secondaires importants suite à un traitement à base de doxorubicine et de vincristine ont été rapportés chez un Colley hétérozygote. Il s'agissait d'une toxicité gastro-intestinale sévère, associée à une myélosuppression, pouvant être expliquée par un défaut d'excrétion rénale et/ou biliaire en raison d'une glycoprotéine P insuffisamment produite. Cet exemple illustre une possible haplo-insuffisance dans certains cas (référence dans Martinez *et al.*, 2008).

Des perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire ont aussi été mises en évidence chez des chiens homozygotes pour la mutation *ABCBI-Δ*. Chez ces chiens, les concentrations de

base et après stimulation à l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) de cortisol plasmatique étaient plus faibles en comparaison à celles détectées chez les chiens possédant le génotype sauvage. Ces résultats laissent apparaître un rôle de la glycoprotéine P dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Mealey *et al.*, 2007).

En résumé, les principaux substrats de la glycoprotéine P sont présentés dans le tableau 3, illustrant la pléiotropie fonctionnelle de cette protéine, acteur majeur en pharmacocinétique.

**Tableau 3 : Liste des principaux substrats de la glycoprotéine P**

<b>Agents de chimiothérapie</b>	<b>Hormones stéroïdiennes</b>	<b>Antibiotiques Antifongiques</b>	<b>Opioides</b>
Doxorubicine Vincristine Vinblastine Mitoxanthrone	Aldostérone Cortisol Dexaméthasone Méthylprednisolone Estradiol	Erythromycine Tétracycline Doxycycline Lévofloxacine Kétoconazole Itraconazole	Lopéramide Morphine Butorphanol
<b>Médicaments cardiaques</b>	<b>Immunosuppresseurs</b>	<b>Divers</b>	<b>Anti-H2</b>
Digoxine Diltiazem Vérapamil	Cyclosporine Tacrolimus	Ivermectine Moxidectine Amitriptyline Dompéridone	Cimétidine Ranitidine

*f) Le génotypage des chiens avant la mise en place d'un traitement*

La description du rôle de la glycoprotéine P et la mise en évidence de sa pléiotropie permet de comprendre l'importance que revêt son évaluation fonctionnelle lors de mise en place de traitement chez des chiens appartenant à des races prédisposées à une perte de sa fonction, même partielle.

Ainsi, le génotypage d'un chien à risque pour la mutation *ABCBI-Δ* est-il préconisé avant de commencer un traitement avec l'un des médicaments cité précédemment.

A cette condition, il sera possible d'utiliser dans les races prédisposées certains médicaments jusque là délaissés par les vétérinaires praticiens, sous condition de s'assurer que le chien

n'est pas porteur de la mutation. En revanche, il n'existe pas à ce jour de recommandations particulières concernant une adaptation des doses des molécules substrats de la glycoprotéine P chez les individus possédant une mutation d'*ABCB1*, comme cela est le cas en médecine humaine dans différents domaines.

Plusieurs tests pour génotyper *ABCB1* sont disponibles sur le marché. La plupart d'entre eux utilisent des méthodes faisant intervenir la Polymerase Chain Reaction (PCR). D'autres, plus récents, sont fondés sur la PCR dite en temps réelle, avec utilisation de marqueurs fluorescents et une nucléase « méthode TaqMan » (Klitzsch *et al.*, 2010).

Les vétérinaires praticiens peuvent ainsi adresser un écouvillonnage de la muqueuse buccale de leurs chiens et reçoivent en retour le génotype de ce dernier pour le gène *ABCB1*.

Aux Etats-Unis, il existe un laboratoire de pharmacogénétique vétérinaire, localisé au Washington State University College of Veterinary Medicine ([www.vetmed.wsu.edu/vcpl](http://www.vetmed.wsu.edu/vcpl)). Ce laboratoire assure le génotypage de *ABCB1* pour les vétérinaires praticiens, mais aussi pour les éleveurs de chiens ou encore les propriétaires. Ce test est disponible du fait de la fréquence importante de la mutation d'*ABCB1* dans la population canine, justifiant ainsi une forte demande (Mealey, 2006a).

En France, il est possible pour les vétérinaires et les éleveurs canins de commander des kits pour effectuer des prélèvements. Les échantillons peuvent être envoyés et analysés, comme le propose par exemple le laboratoire ANTAGENE, basé près de Lyon. Il faut compter environ 70 euros pour le génotypage de *MDR1* auprès de ce laboratoire ([www.antagene.com](http://www.antagene.com)).

## 2. TPMT et azathioprine

### a) *Les médicaments thiopuriques chez les animaux*

Les médicaments thiopuriques comme l'azathioprine (AZA) sont également utilisés chez les animaux de compagnie, notamment chez le chien. Tout comme chez l'homme, le métabolisme de ces médicaments fait intervenir une enzyme de phase II : la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT). Des anomalies au niveau de l'expression de cette enzyme vont

aussi engendrer des effets secondaires indésirables et être responsables d'une toxicité à ces médicaments thiopuriniques.

En médecine humaine, rappelons qu'un génotypage avant le traitement permet de moduler les doses en fonction du phénotype métabolique du patient (Mosher et Court, 2010).

#### b) *Polymorphisme de TPMT chez le chien*

Une étude de Salavaggione *et al.* a étudié la nature et l'incidence des polymorphismes canins pour *TPMPT*. Tout d'abord l'enzyme TPMT est une protéine qui partage environ 81% de sa séquence en acides aminés avec celle codée par l'allèle humain le plus fréquent. Par ailleurs, la structure du gène codant pour TPMT est très similaire entre l'homme et le chien.

Les auteurs ont ensuite comparé l'activité TPMT dans les globules rouges des chiens, avec les génotypes mis en évidence par séquençage de l'ADN des leucocytes issus des mêmes échantillons.

Sur un total de 145 animaux, neuf polymorphismes ont ainsi pu être mis en évidence. Les neuf allèles ont été désignés comme suit : TPMT\*1A, \*1B, \*1C, \*1D, \*1E, \*1F, \*2A, \*2B, \*2C. Parmi ces neuf polymorphismes, ont été dénombrés 6 SNP responsables de près de 40% des variations phénotypiques de la totalité de la population étudiée et trois insertions/délétions (Salavaggione *et al.*, 2002).

#### c) *Conséquences fonctionnelles sur l'activité TPMT*

Les chiens qui présentent le niveau d'activité TPMT le plus élevé possèdent les allèles \*1B, \*1C et \*1D principalement. La majorité de ce lot de chiens est représentée par les Labradors Retrievers. A l'inverse, les animaux « hypométaboliseurs », *i.e.* avec une faible activité TPMT, présentent en grande majorité l'allèle \*2B. Il n'y a pas dans cette étude de différences significatives entre les autres races que le Labrador. De même, il n'a pas été observé de variations liées à l'âge, au sexe ou même à l'état de santé des animaux (Salavaggione *et al.*, 2002).

Un peu plus tard, une étude de Kidd *et al.*, portant sur 177 chiens, a mis en évidence des différences d'activités TPMT plus prononcées entre les races. Selon ces auteurs, le Schnauzer Géant présente une activité très faible de TPMT tandis que l'Alaskan Malamute et le

Labrador présentent des activités élevées pour cette enzyme. Un facteur neuf a pu être observé entre certaines races. En revanche, le génotypage n'a pas été effectué dans cette étude, ce qui n'a pas permis d'établir une corrélation éventuelle entre le génotype et le phénotype (Kidd *et al.*, 2004).

A l'heure actuelle il n'existe pas de tests disponibles en routine comme cela est le cas en médecine humaine. Cependant, compte tenu de l'effet de barrière et de l'effet fondateur largement exploités comme méthode de sélection des caractères raciaux, on peut poser l'hypothèse plausible que la relative homogénéité génétique intra-raciale a pour conséquence que l'activité TPMT élevée chez les Labradors et les Alaskan Malamute testés sera élevée chez tous les individus de ces deux races et qu'au contraire, tous les Schnauzer géants auront une activité faible. On peut donc espérer que même en l'absence de génotypage individuel, les oncologues vétérinaires seront attentifs et anticiperont la toxicité potentielle des thiopuriques dans cette dernière race et les races voisines en diminuant les doses d'attaque ou en choisissant d'emblée des molécules alternatives.

Dans un avenir proche, il serait bien sûr souhaitable d'établir le profil génotypique du gène *TPMT* de l'ensemble des races touchées par des cancers traités par ces drogues. Pour les races dont la combinaison allélique ne serait pas connue, il conviendrait alors de compléter l'étude par la corrélation entre ce génotype et l'activité TPMT qui en résulte.

#### d) *Cas particulier de l'espèce féline*

Une étude de Salavaggione *et al.*, similaire à celle effectuée sur le chien, a montré que dans l'espèce féline, la moyenne du niveau basal d'activité TPMT est plus faible que celle mesurée chez l'homme ou le chien. Le gène *TPMT* est également plus polymorphique que chez l'homme ou le chien. En effet, un total de 31 SNP a pu être mis en évidence, dont 12 sont responsables de près de 30% de la variation d'activité TPMT observée (Salavaggione *et al.*, 2004). A l'instar du chien, cette étude a permis de mieux comprendre les origines de la variation des phénotypes métaboliques pour TPMT et représente une étape vers la personnalisation du traitement chez le chat pour les médicaments thiopuriques.

### 3. CYP2B11 et propofol

#### a) *Nature et fonction du CYP2B11*

Le cytochrome 2B11 appartient à la superfamille des cytochromes. C'est une enzyme hépatique qui intervient dans le métabolisme de nombreux médicaments. Le gène orthologue chez l'homme est appelé *CYP2B6*.

Chez le chien, CYP2B11 fut d'abord découverte en tant que principale enzyme hépatique induite par les barbituriques, notamment le phénobarbital. Sa séquence en acides aminés a été découverte plus tardivement par Graves et ses collaborateurs, ce qui permis de la classer dans cette sous famille des CYP2B (Wenker, 2008). Toujours chez le chien, CYP2B11 catalyse également la bioactivation du cyclophosphamide (immunosuppresseur), la transformation du diazépam (conjointement avec CYP3A12), ou contribue à la clairance du propofol (Trepannier, 2006).

#### b) *Le propofol chez le chien*

Il s'agit d'un anesthésique très fréquemment employé pour l'anesthésie des carnivores domestiques en médecine vétérinaire. On l'utilise principalement pour induire l'anesthésie, un relais gazeux étant généralement mis en place par la suite. Son élimination est hépatique, via la CYP2B11.

Des variations dans le métabolisme du propofol sont observées depuis plus de 20 ans, notamment chez les chiens de race Greyhound. Les auteurs de l'époque constataient alors une élimination plus lente du propofol avec persistance prolongée de ses effets anesthésiques chez ces races. Cela était également le cas avec d'autres molécules (Zoran *et al.*, 1993).

#### c) *Polymorphisme fonctionnel de CYP2B11*

Une activité variable de CYP2B6, secondairement corrélée à un polymorphisme génétique du gène *CYP2B6*, a été identifiée chez l'homme (Bumpus *et al.*, 2005). La question de savoir si la sensibilité de certaines races de chiens à cet agent anesthésique pouvait résulter d'un métabolisme ralenti via une activité variable de la CYP2B11 s'est donc légitimement posée.

Une étude de Kraus *et al.* a permis de démontrer une variabilité raciale de l'hydroxylation et de la clairance du propofol. La clairance plasmatique du propofol est significativement plus élevée chez un lot de chien de race Greyhound que chez un lot de chien de races différentes. En effet, à 60 minutes post-injection, la concentration plasmatique de propofol était quasiment deux fois supérieure chez le lot de Greyhound.

Par ailleurs, cette étude a montré que le taux d'oxydation du propofol était 3 fois plus faible chez le Greyhound que chez le Beagle. A noter que le taux d'oxydation du propofol était intermédiaire dans un lot de chien issu de races différentes.

Ce déficit d'hydroxylation entraîne une élimination plus lente chez les Greyhound et donc une persistance plus longue des effets du propofol (Kraus *et al.*, 2000).

Ces résultats ont conduit à poser l'hypothèse que la variation de l'activité CYP2B11 chez le Greyhound pourrait résulter d'un polymorphisme du gène *CYP2B11*.

#### d) *Polymorphisme génétique de CYP2B11*

Le génotypage des animaux par PCR a permis de mettre en évidence différents allèles du gène codant pour CYP2B11.

Tous les exons de *CYP2B11* ont été explorés et un total de 3 allèles a été observé chez une population canine de 100 individus, issus de 11 races différentes. Cette population se voulait représentative de la population canine américaine. Il s'agit de 3 SNP, tous localisés dans des exons.

Le premier SNP [A/G] se situe sur l'exon 1 et définit l'allèle CYP2B11\*1, retrouvé chez un nombre très limité de chiens.

Le second SNP [T/C] se situe sur l'exon 2 et définit l'allèle CYP2B11\*2, présent dans 8% de la population étudiée et retrouvé en majorité chez les chiens de race Labrador retriever (Wenker, 2008).

Le troisième SNP [G/A] se situe sur l'exon 7 et définit l'allèle CYP2B11\*3, fortement représenté avec une fréquence proche de 65%.

De plus, 2 SNP introniques ont été identifiés.

Aucune corrélation fonctionnelle n'a été menée à l'issue de ce travail. Cependant, les auteurs posent l'hypothèse que le SNP de l'exon 2 pourrait moduler l'activité de la CYP2B11. De plus, des études menées sur une population de taille plus importante seront nécessaires pour confirmer l'existence de ces polymorphismes génétiques (Wenker, 2008).

#### 4. Dégénérescence rétinienne induite par les fluoroquinolones dans l'espèce féline

Suite à l'administration de fluoroquinolones, de nombreux cas de cécité qui semblent être spécifiques à l'espèce féline ont été rapportés (Crispin *et al.*, 2002). Des études ont alors été menées afin de mettre en évidence un support moléculaire responsable de ce phénomène.

##### a) *Présentation et mode d'action des fluoroquinolones*

Les fluoroquinolones sont des agents antimicrobiens utilisés en médecine vétérinaire depuis une vingtaine d'années. Les cas rapportés faisaient suite à l'administration d'enrofloxacin, une quinolone de 3<sup>ème</sup> génération et analogue structural de la ciprofloxacine chez l'homme (Crispin *et al.*, 2002).

L'enrofloxacin possède un spectre d'activité large et agit contre les bactéries GRAM<sup>-</sup>, mais aussi dans une certaine mesure contre les GRAM<sup>+</sup>. L'action de cette molécule est dépendante de sa concentration. Son action bactéricide réside dans l'inhibition de l'ADN-gyrase bactérienne, empêchant ainsi toute transcription.

En termes de pharmacocinétique, l'enrofloxacin est rapidement absorbée après administration par voie orale, les concentrations maximales étant atteintes dans le sérum et les tissus une à deux heures après l'administration. La molécule est essentiellement éliminée sous forme non métabolisée, par voie urinaire et biliaire. L'enrofloxacin possède une autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) chez le chat pour une posologie de 5mg/kg/j (Dictionnaire des médicaments vétérinaires, 2009).

##### b) *Approche du problème*

Une première étude prospective a permis de confirmer le problème de cécité chez le chat. Elle a été conduite sur un total de 24 chats : 12 chats ont reçu 50 mg/kg d'enrofloxacin (10 fois la

dose préconisée par l'A.M.M.), tandis que 12 chats, formant un lot contrôle, ont reçu du sérum physiologique. Trois jours après administration, tous les chats ayant reçu de l'enrofloxacin ont développé des lésions rétinienne, associant une vacuolisation et une nécrose des cellules de la couche photoréceptrice. Les chats du lot contrôle n'ont présenté aucune lésion (Ford *et al.*, 2007).

L'implication de la barrière hémato-rétinienne a alors été suspectée, avec l'intervention notamment des protéines de transport transmembranaire de la même famille que la glycoprotéine P. Il s'agit en effet de la protéine ABCG2, codée par le gène *ABCG2* (pour *ATP Binding Cassette G2*). ABCG2 est exprimée à la membrane interne des cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-rétinienne. Il a été démontré que les fluoroquinolones sont des substrats de cette protéine ABCG2, dont l'activité constante permet *in fine* d'empêcher la pénétration de ces molécules dans les cellules rétinienne (Alvarez *et al.*, 2008).

Un polymorphisme génétique générant une modification de la fonction de la protéine ABCG2 a alors été recherché dans l'espèce féline.

Chez l'homme, plus de 80 SNP ont été identifiés dans *ABCG2*. Néanmoins, le nombre de SNPs ayant des répercussions sur le fonctionnement de la protéine ABCG2 est limité (Maekawa *et al.*, 2006).

### c) *Polymorphismes félines pour le gène ABCG2*

Le gène *ABCG2* du chat a été séquencé. Il est composé de 1965 paires de bases, séparées en 16 exons. Le pourcentage de similitude de la séquence codante avec celle du chien et de l'homme est de 94% et 90% respectivement. Des mutations non synonymes de type SNP ont été révélées : elles sont au nombre de quatre et sont spécifiques de l'espèce féline (comparaison avec 10 autres espèces de mammifères). Traduites, ces mutations induisent des variations d'acides aminés ayant pour conséquence de modifier la charge électrique globale de la protéine. Ainsi, chez le chat, l'enrofloxacin pénétrerait dans l'endothélium capillaire dont elle ne serait plus exclue par ABCG2 aux propriétés altérées. Il en résulterait un accès de l'enrofloxacin aux cellules photoréceptrices, dé-protégées de cette molécule toxique (Ramirez *et al.*, 2011). Des études seront encore nécessaires pour comprendre précisément les mécanismes moléculaires impliqués. En particulier, il reste à confirmer que la modification de

charge est causale de la perte de reconnaissance de l'enrofloxacin par ABCG2 et il reste à identifier l'origine de la sensibilité des cellules photoréceptrices à cette drogue.

Chez l'homme, un polymorphisme du gène *ABCG2* altérant l'expression du gène et la localisation de la protéine a également été décrit. Il résulte en une myélosuppression (Cha *et al.*, 2009).

Il convient donc de prendre des précautions lorsqu'on administre les fluoroquinolones aux chats. Les lésions rétiniennees engendrées peuvent être importantes et irréversibles.

Par ailleurs d'autres substrats d'ABCG2 sont connus, comme des agents antinéoplasiques (les inhibiteurs des tyrosines kinase par exemple), certains antirétroviraux ou encore des porphyrines (utilisées pour la fabrication de certains médicaments). Cela représente donc d'autres agents potentiels pouvant générer des effets secondaires en cas d'anomalies d'ABCG2 (Cusatis et Sparreboom, 2008).

#### **D. Perspectives d'avenir**

La preuve que le concept de pharmacogénétique est pertinent chez l'animal a été apportée. Comme chez l'homme, les situations extrêmes conduisant à la mort des animaux, rendus intolérants du fait de leur génotype particulier, ont été observées et sont maintenant clairement imputées à un effet iatrogène non maîtrisé. Les vétérinaires disposent donc des éléments intellectuels permettant d'appréhender l'usage des médicaments par le prisme de la variabilité individuelle. Partant du principe qu'il incombe à ceux qui développent les médicaments et à ceux qui les délivrent d'en assurer l'efficacité et l'innocuité, il apparaît évident que les outils pharmacogénétiques doivent être développés en médecine vétérinaire.

Pour l'heure, mis à part le cas des médicaments substrats de la glycoprotéine P dans l'espèce canine, la pharmacogénétique vétérinaire reste encore à un stade embryonnaire. Mais les avancées rapides de la pharmacogénétique humaine pousseront à l'accélération du développement de cette discipline en médecine vétérinaire, à l'instar des outils d'imagerie, des méthodes chirurgicales, de l'ensemble des améliorations sanitaires en général (Salavaggione *et al.*, 2002).

Malgré un retard dans le domaine de la pharmacogénétique, de plus en plus d'auteurs du monde vétérinaire se penchent actuellement sur le sujet. Par exemple, lors du dernier congrès de l'A.C.V.I.M. (American College of Veterinary Internal Medicine) en juin 2011, une dizaine de conférences traitaient du sujet de la pharmacogénétique (ACVIM, 2011, site internet). Ce nombre est élevé pour un congrès international de cette ampleur, ce qui témoigne du développement actuel de la pharmacogénétique vétérinaire.

De plus le diplôme de pharmacogénétique, mentionné en fin de seconde partie, proposé aux médecins est également ouvert aux vétérinaires souhaitant s'informer et se former sur le sujet.

Certaines disciplines médicales sont pionnières, en particulier celles qui traitent des maladies difficiles à soigner, coûteuses et qui nécessitent l'usage de principes actifs ayant une fenêtre thérapeutique étroite (Moscher et Court, 2010).

La connaissance de plus en plus approfondie du génome des animaux domestiques est la clé de voûte du développement de la pharmacogénétique. Dans ce sens, la diminution du coût d'analyse de ces génomes apporte un espoir d'avancée rapide sur le chemin de l'individualisation des traitements. Il est fort probable que des algorithmes permettant d'ajuster concrètement les doses en fonction du génotype racial des animaux voient le jour, comme cela est le cas chez l'homme pour les traitements utilisant les anticoagulants.



## CONCLUSION

L'accès croissant et facilité aux informations génétiques individuelles permet d'identifier les bases du polymorphisme interindividuel de réponse et de toxicité aux médicaments. Il permet aussi de mieux comprendre la variabilité du métabolisme de ces médicaments. Ainsi, nous progressons vers une pharmacothérapie sur mesure permettant à chaque individu de bénéficier des bienfaits des médicaments en évitant des effets secondaires parfois très délétères.

En médecine humaine, des efforts et des progrès considérables ont été produits au cours des dernières années, avec des répercussions concrètes sur la mise en œuvre des traitements. Ainsi, une dizaine de dépistages génotypiques sont désormais effectués en routine. Le concept de pharmacogénétique imprègne donc peu à peu les mentalités et il est progressivement intégré aux phases de développement des principes actifs.

Les bénéfices de la pharmacogénétique sont réels, tant sur le plan de l'efficacité et de la sécurité, que sur celui de l'économie de la santé. Cela est surtout vrai pour des maladies chroniques pour lesquels les traitements possèdent en général une fenêtre thérapeutique étroite et ont un coût élevé.

En médecine vétérinaire, la preuve du concept de pharmacogénétique a été apportée mais cette discipline est intégrée avec du retard. Le coût du développement des outils pharmacogénétiques et le nombre réduit de laboratoires pouvant s'y consacrer permet peut-être d'expliquer ce constat. Pourtant, il est possible d'imaginer un essor rapide de l'individualisation des traitements car du fait de la structure génétique des populations d'animaux domestiques, la variabilité de réponse, de métabolisme ou de toxicité des médicaments se résoudra sans doute essentiellement à l'échelle de la race, ou dans de rares situations à l'échelle de la strate. Le nombre de combinaisons s'en trouve donc très réduit et limiterait les coûts de recherche. Avec le temps et le développement de la discipline en médecine humaine, il ne fait aucun doute que la demande des propriétaires d'animaux de compagnie augmentera. Ainsi, il nous semble opportun de sensibiliser les praticiens afin que l'administration d'un principe actif ne soit pas déconnectée du risque toujours possible d'une sensibilité raciale. Des tests de dépistage pour les animaux de compagnie seront peu à peu accessibles et deviendront un outil précieux pour le vétérinaire à l'avenir.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2007) La régulation de l'expression des gènes, chap. 9, dans *La cellule*, quatrième édition, éditions Médecine-sciences Flammarion, Paris, 2007.

ALLORGE D, LORIOT M-A. (2004) La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments, *Ann. Biol. Clin.*, **62**, 499-511.

ALLORGE D, BEAUNE P-H, BECQUEMONT L, BESSARD G, BEZIEAU S, BOISDRON-CELLE M. *et al.* (2007) La pharmacogénétique moléculaire hospitalière en France : données actuelles et perspectives, *Ann. Pharm. Fr.*, **65**, 271-381.

ALVAREZ AI, PEREZ M, PRIETO JG, MOLINA AJ, REAL R, MERINO G. (2008) Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 3483-3493.

BEAUNE P, LORIOT M. (2000) Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotique : aspects métaboliques, *Médecine/Sciences*, **16**, 1051-1056.

BEGGS AH, BOHM J, SNEAD E, KOZLOWSKY M, MAURER M, MINOR K. *et al.* (2010) *MTM1* mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers, *P.N.A.S. Early Edition*, **107**(33), 14697-14702

BENJAMIN ER, FLANAGAN JJ, SCHILLING A, CHANG HH, AGARWAL L, KATZ E *et al.* (2009) The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin increases alpha-galactosidase A levels in Fabry patient cell lines, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **32**, 424-440.

BERT P-F. Architecture génétique des caractères quantitatifs, cartographie génétique et détection de QTL, INRA Bordeaux, Cours de master SDVS, UE Analyse génomique et génétique chez les organismes eucaryotes [en ligne] [www.bordeaux.inra.fr/umr619/telechargement/cours3\(PFB\).ppt](http://www.bordeaux.inra.fr/umr619/telechargement/cours3(PFB).ppt) Consulté le 21 juin 2011.

BISHOP D, GRABOWSKY G, DESNICK R. (1991) Fabry disease: An asymptomatic hemizygote with significant residual alpha-galactosidase A activity, *Am. J. Hum. Genet.*, **33**, page 71A.

BJORNERFELDT, S, HAILER, F, NORD, M VILA, C. (2008) Assortative mating and fragmentation within dog breeds, *BMC Evol. Biol.*, **8**, 28.

BORGES S, DESTA Z, LI L, SKAAR TC, WARD BA, NGUYEN A, JIN Y. *et al.* (2006) Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism : implication for optimization of breast cancer treatment, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 61-74.

BOUVRESSE A. (2010) Les races canines : Histoire, génétique et tendances comportementales, dans : Comportement et Education du chien, Editions Educagri, Dijon.

- BOYKO, AR, BOYKO, RH, BOYKO, CM, PARKER, HG, CASTELHANO, M, COREY, L *et al.* (2009) Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**(33), 13903-13908.
- BRANTON M, SCHIFFMANN R, KOPP JB. (2002) Natural history and treatment of renal involvement in Fabry disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**(suppl. 2), 139-143.
- BROLY F (2008) Predictive medicine, pharmacogenetics and society : the presence and the future, *76ième Assemblée annuelle de la SSMI*, 21-23 mai à Lausanne, 2 pages.
- BUMPUS, NN, SRIDAR, C, KENT, UM HOLLENBERG, PF. (2005) The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation, *Drug Metab. Dispos.*, **33**(6), 795-802.
- BUSHATI N, COHEN SM. (2007) microRNA functions, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **23**, 175-205.
- CADIEU E, NEFF MW, QUIGNON P, WALSH K, CHASE K, PARKER HG. *et al.* (2009) Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes, *Science*, **326**(5949), 150-153.
- CARLQUIST JF, ANDERSON JL. (2011) Pharmacogenetic mechanisms underlying unanticipated drug responses, *Discov. Med.*, **11**(60), 469-478.
- CHA PC, MUSHIRODA T, ZEMBUTSU H, HARADA H, SHINODA N, KAWAMOTO S. *et al.* (2009) Single nucleotide polymorphism in ABCG2 is associated with irinotecan-induced severe myelosuppression, *J. Hum. Genet.*, **54**, 572-580
- CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, PIROTTIN D, TORDOIR X, BIBE B. *et al.* (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep, *Nat. Genet.*, **38**, 813-818.
- CRISPIN SM, GOULD DJ, CARTER WJ, LOWE RC. (2002) Idiosyncratic reaction to enrofloxacin in cats, *Vet. Rec.*, **150**, 555-556.
- CROWLEY J, ADELMAN B. (1998) The Complete Dog Book, Official Publication of the American Kennel Club, 19<sup>th</sup> edition, *Editions Howell Book House*, New York.
- CUSATIS G, SPARREBOOM A. (2008) Pharmacogenomic importance of ABCG2, *Pharmacogenomics*, **9**, 1005-1009.
- DENIS B, COURREAU JF. (2006) Regard scientifique sur le nombre de races chez le chien : Combien y a-t-il de véritables races ?, *Société d'Ethnozootechnie*, **78**, 105-110.
- DERMAN E, KRAUTER K, WALLING L, WEINBERGER C, RAY M, DARNELL JE. *et al.* (1981) Transcriptional control in the production of liver-specific mRNA's, *Cell*, **23**, 731-739.
- DICTIONNAIRE DES MEDICAMENTS VETERINAIRES (2009) 15ième édition, les Editions du Point Vétérinaire, page 378.

DIGARD JP. (1990) L'Homme et les animaux domestiques. Anthropologie d'une passion, Paris, *Fayard* (Le Temps des Sciences).

DESNICK R, IOANNOU Y, ENG C (2001) alpha-Galactosidase A deficiency; Fabry disease. In : The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8ième édition, SCRIVER C.R. *et al.*, *New York McGraw-Hill*, 3507-3534.

DOWLING P. (2006) Pharmacogenetics : It's not just about ivermectin in collies, *Can. Vet. J.*, **47**, 1165-1168.

DROGEMULLER C, RUFENACHT S, WICHERT, LEEB T. (2007) Mutations within the *FGF5* gene are associated with hair length in cats, *Anim. Genet.*, **38**, 218-221.

EIZIRIK, E, MURPHY, WJ, KOEPFLI, KP, JOHNSON, WE, DRAGOO, JW, WAYNE, RK *et al.* (2010) Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora inferred from multiple nuclear gene sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **56**(1), 49-63.

FAN J-Q, ISHII S, ASANO N, SUZUKI Y. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor, *Nature Med.*, **5**, 112-115.

FLEISCHER S, SHARKEY M, MEALEY K, OSTRANDER EO, MARTINEZ M. (2008) Pharmacogenetic and metabolic differences between dogs breeds: Their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical model, *The A.A.P.S. Journal*, **10**(1), 110-119.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2008) E15 definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories, 7 pages.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2011) Clinical pharmacogenomics : Premarketing evaluation in early phase, clinical studies.

FORD MM, DULBIELZIG RR, GIULIANO EA, MOORE CP, NARFSTROM KL. (2007) Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats, *Am. J. Vet. Res.*, **68**, 190-202.

FORD LT, BERG JD. (2011) Thiopurine S-methyltransferase (TMPT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come, *J. Clin. Pathol.*, **63**, 288-295.

FRANKEL LB, CHRISTOFFERSEN NR, JACOBSEN A, LINDOW M, KROGH A, LUND AH. (2007) Programmed cell death 4 (PCD4) is an important functional target of the microRNA *miR-21* in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **283**(2), 1026-1033.

GARAT A, CAUFFIEZ C, RENAULT N. (2008) Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants, *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 404-415.

GERMONPRÉ, M, SABLIN, MV, STEVENS, RE, HEDGES, REM, HOFREITER, M, STILLER, M *et al.* (2009) Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the

Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes, *J. Archaeol. Sci.*, **36**(2), 473-490.

GILGENKRANTZ S. (2007) Un allèle *IGF1* pour les petits chiens, *Médecine/Science*, **23**, 556-558.

GOETZ MP, KNOX SK, SUMAN VJ, RAE JM, SAFGREN SL, AMES MM *et al.* (2007) The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifène, *Breast Cancer Res.*, **101**, 113-121.

GORDEL K, HOUSTON DM, KUIKEN T, FRIES CL, BOISVERT B. (1996) Inherited myopathy in a litter of Labrador retrievers, *Can. Vet. J.*, **37**, 108-110.

GOSSARD F, HAMET P. (2002) Pour distinguer génétique, génomique, pharmacogénétique et pharmacogénomique dans les problèmes éthiques, *Editions Dalloz*, 105-111.

GRANDJEAN D. (2003) Encyclopédie Royal Canin du Chien, Editions *Aniwa Publishing*, Paris.

HAWTHORNE AB, LOGAN RF, HAWKEY CJ, FOSTER PN, AXON AT, SWARBRICK ET *et al.* (1992) Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis, *B.M.J.*, **69**, 577-579.

HEINZ A, SCHAFFER M, HIGLEY JD, KRYSTAL JH, GOLDMAN D. (2003) Neurobiological correlates of the disposition and maintenance of alcoholism, *Pharmacopsychiatry*, **36**, 255-258.

HIGGINS MJ, VERED S. (2011) Pharmacogenetics of endocrine therapy for breast cancer, *Annu. Rev. Med.*, **62**, 281-293.

INGELMAN M SIM SC. (2010) Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system, *B.B.R.C.*, **396**, 90-94.

JOHNSON JA. (2003) Pharmacogenetics : potential for individualized drug therapy through genetics, *TREND in genetics*, **19**(11), 660-666.

KARLSSON EK, BARANOWSKA I, WADE CM, SALMON HILLBERTZ NH, ZODY MC, ANDERSON N. *et al.* (2007) Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association, *Nat. Genet.*, **39**(11), 1321-1328.

KELHER JS, DAVID VA, SCHAFFER AA, BAJEMA K, EIZIRIK E, RYUGO DK. *et al.* (2007) Four independent mutations in the feline fibroblast growth factor 5 gene determine the long-haired phenotype in domestic cats, *J. Hered.*, **98**(6), 555-566.

KIDD LB, SALAVAGGIONE OE, SZUMLANSKI CL, MILLER JL, WEINSHILBOUM RM, TREPANIER L. (2004) Thiopurine methyltransferase activity in red blood cells of dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, **18**, 214-218 .

- KLINTZSCH S, MEERKAMP K, DORING B, GEYER J. (2010) Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method, *Vet. J.*, **185**, 272-277.
- KOSKINEN MT. (2003) Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog, *Anim. Genet.*, **34**, 297-301.
- KRAMER, JW, HEGREBERG, GA, BRYAN, GM, MEYERS, K OTT, RL. (1976) A muscle disorder of Labrador retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**(8), 817-820.
- KRAUS BL, GREENBLATT DJ, VENKATAKRISHNAN K, COURT MH. (2000) Evidence of propofol hydroxylation by cytochrome P450B11 in canine liver microsomes : breed and gender differences, *Xenobiotica*, **30**(6), 575-588.
- KRYNETSKI EY, SCHUETZ JD, GALPIN AJ, PUI CH, RELLING MV, EVANS WE (1995) A single point mutation leading to the loss of catalytic activity in thiopurine méthyltransférase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 949-953.
- LAMMERS LA, MATHIJSSSEN RHJ, VAN GELDER T, BIJL MJ, DE GRAAN AJM, SEYNAEVE C *et al.* (2010) The impact of CYP2D6-predicted phenotype on tamoxifène treatment outcome in patients with metastatic breast cancer, *Br. J. Cancer*, **103**, 765-771.
- LAZARU J, POMERANZ BH, COREY PN. (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients, a meta-analysis of prospective studies, *J.A.M.A.*, **279**(15), 1200-1205.
- LECHAT P. (2006) Pharmacologie, Polycopié, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Service de pharmacologie, 349 [en ligne]  
[www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/Pharmaco.pdf](http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/Pharmaco.pdf), consulté le 15/06/11.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, *Cell*, **75**, 843-854.
- LIM J, CHEN XA, SINGH O, YAP YS, NG RCH, WONG NS *et al.* (2011) Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **71**(5), 737-750.
- LINDBLAD-TOH, K WADE, CM MIKKELSEN, TS KARLSSON, EK JAFFE, DB KAMAL, M *et al.* (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, *Nature*, **438**(7069), 803-819.
- LUCHE MJ, KUEHN KU, SCHROEDER W, ARMBRUSTER J, ABRAHAM G, SCHATTEBERG A *et al.* (2001) Influence of the dopamine D2 receptor (DRD2) exon 8 genotype on efficacy of tiapride and clinical outcome of alcohol withdrawal, *Pharmacogenetics*, **11**, 647-653.
- MA Q, LU AYH. (2011) Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and individualized medicine, *Pharmacol. Rev.*, **63**, 437-459.

- MAEKAWA K, IDOTA M, SAI K, SAITO Y, KANIWA N, SHIRAO K *et al.* (2006) Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population, *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 109-121 .
- MAGGO S, KENNEDY MA, CLARK D. (2011) Clinical Implications of Pharmacogenetic Variation on the effects of Statins, *Drug Saf.*, **34**(1), 1-19.
- MAIER W, ZOBEL A. (2008) Contribution of allelic variations to the phenotype of response to antidepressants and antipsychotics, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **258**(1), 12-20.
- MAURER M, TIRET L. (2010) Historique évolutive du Chien et des races revisitée par la génomique, dans Comportement et Education du chien, *Editions Educagri*, Dijon.
- MARTINEZ M, MODRIC S, SHARKEY M, TROUTMAN L, WALKER L, MEALEY K *et al.* (2008) The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **31**, 285-300.
- MEALEY, KL, BENTJEN, SA, GAY, JM CANTOR, GH. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene, *Pharmacogenetics*, **11**(8), 727-733.
- MEALEY KL. (2006a) Pharmacogenetics, *Vet. Clin. Small Anim. Pract.*, **36**, 961-973.
- MEALEY KL (2006b) Adverse Drug Reactions in Herding-Breed Dogs: The Role of P-Glycoprotein, *Compendium*, **28**, 23-33
- MEALEY KL, GAY JM, MARTIN LG, WAITING DK. (2007) Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1delta and MDR1 wildtype dogs, *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, **17**, 61-66.
- MEALEY KL. (2008) Canine *ABCB1* and macrocyclic lactones : Heartworm prevention and Pharmacogenetics, *Vet. Parasitol.*, **158**, 215-222.
- MIHALJEVIC A, SAGUD M, BOZINA N, ZIKOVIC M, JOVANOVIC N. (2010) Pharmacogenetics and antipsychotics in the light of personalized pharmacotherapy, *Psychiatra Danubina*, **22**(2), 335-337.
- MOSHER CM, COURT MH. (2010) Comparative and veterinary pharmacogenomics, *Handbook of experimental pharmacology* **199**, 49-77.
- NAGUIBNEVA I. (2008) Micro-ARN et hématopoïèse, *Hématologie*, **14**(6), 422-431.
- NAMOUR (2005), *Les ARN*, Faculté de Médecine de Nancy, année 2005-2006 [en ligne] <http://aup1perdu.nancy.free.fr/bioch/lesarns.pdf>, consulté le 23 Juin 2011.
- NEFF MW, ROBERTSON KR, WONG AK, SAFRA N, BROMAN KW, SLATKIN M *et al.* (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1 delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage, *P.N.A.S.*, **101**(32), 11725-11730.

OFFIT K, ROBSON ME. (2010) New pharmacogenomic paradigm in breast cancer treatment, *J. Clin. Oncol.*, **28**(31), 4665-4673.

OLSSON, M, MEADOWS, JR, TRUVE, K, ROSENGREN PIELBERG, G, PUPPO, F, MAUCELI, E *et al.* (2011) A novel unstable duplication upstream of HAS2 predisposes to a breed-defining skin phenotype and a periodic fever syndrome in Chinese Shar-Pei dogs, *PLoS Genet.*, **7**(3), e1001332.

OSCARSON M. (2003) Pharmacogenetics of drug metabolism enzymes : importance for personalized medicine, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**(4), 573-580.

OVODOV, ND, CROCKFORD, SJ, KUZMIN, YV, HIGHAM, TF, HODGINS, GW VAN DER PLICHT, J. (2011) A 33,000-year-old incipient dog from the altai mountains of siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum, *PLoS ONE*, **6**(7), e22821.

PACIFICI GM, ROMITI P, GIULIANI L, RANE A. (1991) Thiopurine méthyltransférase in humans : development and tissue distribution, *Dev. Pharmacol. Ther.*, **17**, 16-23.

PANG JF, KLUETSCH C, ZOU XJ, ZHANG AB, LUO LY, ANGLEBY H *et al.* (2009) mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16 300 years ago, from numerous wolves, *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 2849-2864.

PARKER HG, KIM LV, SUTTER NB, CARLSON S, LORENTZEN TD, MALEK TB *et al.* (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog, *Science*, **304**, 1160-1164.

PARKER HG, OSTRANDER EA. (2005) Canine genomics and genetics : Running with the pack, *P.L.O.S. Genetics*, **1**(5), 507-513.

PARKER, HG, KUKEKOVA, AV, AKEY, DT, GOLDSTEIN, O, KIRKNESS, EF, BAYSAC, KC *et al.* (2007) Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds, *Genome Res.*, **17**(11), 1562-1571.

PARKER, HG, SHEARIN, AL OSTRANDER, EA. (2010) Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog, *Annu. Rev. Genet.*, **44**, 309-336.

PAUL AJ, TRANQUILLI WJ, HUTCHENS DE. (2000) Safety of moxidectin in avermectin-sensitive Collies, *Am. J. Vet. Res.*, **61**, 482-483

PELE M, TIRET L, KESSLER JL, BLOT S, PANTHIER JJ. (2005) SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs, *Hum. Mol. Genet.*, **14**(11), 1417-1427.

PERTERD J. (1994) Le Chien dans l'Antiquité, dans : Histoire et Evolution du chien, *Société francophone de cynotechnie*, Toulouse, 25-26 mats 1994.

POPPE L, ROEDERER MW. (2011) Global formulary review: How do we integrate pharmacogenomic information?, *Ann. Pharmacother.*, **45**, 532-538.

- PORCELLI S, DRAGO A, FABBRI C, GIBIINO S, CALATI R, SERRETTI A. (2011) Pharmacogenetics of antidepressant response, *J. Psychiatry Neurosci.*, **32**(2), 87-113.
- POUYANNE P, HARAMBURU F, IMBS JL, BEGAUD B (2000) Admissions to hospital caused by adverse drug reactions : cross sectional incidence study, *B.M.J.*, **320**, page 1036.
- QUIGNON, P, HERBIN, L, CADIEU, E, KIRKNESS, EF, HEDAN, B, MOSHER, DS *et al.* (2007) Canine population structure: assessment and impact of intra-breed stratification on SNP-based association studies, *PLoS ONE*, **2**(12), e1324.
- RAMIREZ CJ, MINCH JD, GAY JM, LAHMERS SM, GUERRA DJ, HALDORSON GJ *et al.* (2011) Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats, *Pharmacogenetics and Genomics*, **21**, 66-75.
- RELLING MV, GARDNER EE, SANDBORN WJ, SCHMIEGELOW K, PUI CH, YEE SW *et al.* (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine méthyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **89**(3), 387-391.
- RODEN DM, ALTMAN RB, BENOWITZ NL, FLOCKHART DA, GIACOMINI KM, JOHNSON J.A. *et al.* (2006) Pharmacogenomics : Challenges and Opportunities, *Ann. Intern. Med.*, **145**, 749-757.
- RUNKEL F, KLAFTEN M, KOCH K, BOHNERT V, BUSSOW H, FUCHS H *et al.* (2006) Morphologic and molecular characterization of two novel Krt71 (Krt2-6g) mutations: Krt71rco12 and Krt71rco13, *Mamm. Genome*, **17**(12), 1172-1182.
- SAKAEDA T, NAKAMURA T, OKUMURA K. (2003) Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, *Pharmacogenomics*, **4**, 397-410
- SALAVAGGIONE OE, KIDD L, PRONDZINSKI JL, SZUMLANSKI CL, PANKRATZ VS, WANG L *et al.* (2002) Canine red blood cell thiopurine S-méthyltransferase : Companion animal pharmacogenetics, *Pharmacogenetics*, **12**, 713-724.
- SALAVAGGIONE OE, YANG C, KIDD LB, THOMAE BA, PANKRATZ VS, TREPANIER LA *et al.* (2004) Cat red blood cell thiopurine S-méthyltransferase : Companion animal Pharmacogenetics, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**(2), 617-626.
- SALMON HILLBERTZ, NH, ISAKSSON, M, KARLSSON, EK, HELLMEN, E, PIELBERG, GR, SAVOLAINEN, P *et al.* (2007) Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs, *Nat. Genet.*, **39**(11), 1318-1320.
- SANDERSON J, ANSARI A, MARINAKI T, DULEY J. (2004) Thiopurine méthyltransférase : should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? , *Ann. Clin. Biochem.*, **41**, 294-302.
- SAVOLAINEN, P, ZHANG, YP, LUO, J, LUNDEBERG, J LEITNER, T. (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs, *Science*, **298**(5598), 1610-1613.

SCHINKEL, AH, SMIT, JJ, VAN TELLINGEN, O, BEIJNEN, JH, WAGENAAR, E, VAN DEEMTER, L *et al.* (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs, *Cell*, **77**(4), 491-502.

SPRINGER JA, IANOTTI NV, KANE MD, HAYNES K, SPRAGUE JE. (2011) Pharmacogenomics training using an instructional software system, *Am. J. Pharm. Educ.*, **75**, article 32, 8 pages.

STURGESS JE, GEORGE TP, KENNEDY JL, HEINZ A, MULLER DJ. (2010) Pharmacogenetics of alcohol, nicotine and drug addiction treatments, *Addiction Biology*, Review, 1-20.

SUTTER NB, EBERLE MA, PARKER HG, PULLAR BJ, KIRKNESS EF, KRUGLYAK L *et al.* (2004) Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*, *Genome Res.*, **14**, 2388-2396.

SUTTER NB, BUSTAMANTE CD, CHASE K, GRAY MM, ZHAO K, ZHU L *et al.* (2007) A single *IGF1* allele is a major determinant of small size in dogs, *Science*, **316**, 112-115

TAKEUCHI F, KASHIDA M, OKAZAKI O, TANAKA Y, FUKUDA S, KASHIMA T *et al.* (2010) Evaluation of pharmacogenetics algorithm for warfarine dose requirements in Japanese patients, *Circ. J.*, **74**, 977-982.

THOME SL, MALARCHER A, MAURICE E, CARBALLO R. (2009) Cigarette smoking among adults-United States, 2007, *J.A.M.A.*, **301**, 373-375.

TIEDE I, FRITZ G, STRAND S. (2003) CD28-dependant Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, **111**, 1135-1145.

TIRET L, BLOT S, KESSLER JL, GAILLOT H, BREEN M, PANTHIER JJ. (2003) The *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2, *Hum. Genet.*, **113**, 297-306.

TOBIN JF, CELESTE AJ. (2005) Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 328-332.

TREPANIER LA. (2006) Cytochrome P450 and its role in Veterinary Drug Interactions, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **36**, 975-985.

UEDA, K. (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(3), 401-409.

VAN HOLDE KE, LOHR DE, ROBERT C. (1992) What happen to nucleosome during transcription?, *J. Biol. Chem.*, **267**, 2837-2840.

VEENSTRA DL, HIGASHI MK, PHILIPS KA. (2000) Assessing the cost-Effectiveness of Pharmacogenomics, *A.A.P.S. Pharmsci.*, **2**(3), article 29, 11 pages.

- VILA C, SAVOLAINEN P, MALDONADO JE, AMORIM IR, RICE JE, HONEYCUTT RL *et al.* (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog, *Science*, **276**, 1687-1689.
- VONHOLDT, BM, POLLINGER, JP, LOHMUELLER, KE, HAN, E, PARKER, HG, QUIGNON, P *et al.* (2010) Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication, *Nature*, **464**(7290), 898-902.
- WANG L, MCLEOD HL, WEINSHILBOUM RM. (2011) Genomics and drug response, *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1144-1153.
- WAYNE, RK OSTRANDER, EA. (2007) Lessons learned from the dog genome, *Trends Genet.*, **23**(11), 557-567.
- WEISSENBACH J. (1993) Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**, 414-417.
- WENKER A. (2008) Genetic variation in the coding regions of the canine CYP2B11 gene - Implications for Veterinary Medicine?, *Faculty of Veterinary Medicine Theses, Doctoral thesis*, 19 pages.
- WOODS KA, CAMACHO-HUBNER C, SAVAGE MO, CLARK AJL. (1996) Intrauterine growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene, *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1363-1367.
- WU X, KATZ E, DELLA VALLE C, MASCIOLI K, FLANAGAN J, CASTELLI JP *et al.* (2011), A pharmacogenetic approach to identify mutant forms of  $\alpha$ -Galactosidase A that respond to a pharmacological chaperone for Fabry disease, *Hum. Mutation* [sous presse].
- YAM GH, BOSSHARD N, ZUBER C, STEINMANN B, ROTH J. (2006) Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, 1076-1082.
- ZORAN DL, RIEDESEL DH, DYER DC. (1993) Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds, *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 755-760.

## **LISTE DES SITES INTERNET CONSULTES**

A.C.V.I.M. (2011) Programme des conférences du congrès de l'ACVIM, 15 juin 2011, Denver, Colorado [en ligne], consulté le 20 juin 2011  
[www.acvim.org/websites/forum2011/File/ACVIM2011\\_eRBrochure.PDF](http://www.acvim.org/websites/forum2011/File/ACVIM2011_eRBrochure.PDF)

ANTAGENE, site internet du laboratoire Antagene [en ligne] mise à jour 2007, consulté le 26 juin 2011  
[www.antagene.com/index.php?langue=L1](http://www.antagene.com/index.php?langue=L1)

FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD, site internet [en ligne] mise à jour du 20 juillet 2011  
[www.pharmacogenetics.fr/11.html](http://www.pharmacogenetics.fr/11.html)

WASHINGTON STATE UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, site internet [en ligne] mise à jour du 21 juin 2011  
[www.vetmed.wsu.edu/vcpl](http://www.vetmed.wsu.edu/vcpl)

# PHARMACOGÉNÉTIQUE ET INDIVIDUALISATION THÉRAPEUTIQUE : CONCEPT ET PROSPECTIVES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

**NOM et Prénom** : MAYOUSSE Vincent

## **Résumé** :

Depuis le tout début du XX<sup>ème</sup> siècle, il est admis que le phénotype d'un individu dépend de son génotype. La combinatoire unique des allèles portés par l'ADN influe sur l'expression globale des gènes, la quantité et la fonction des protéines produites. Ces variations transmises de l'ADN ont permis de comprendre l'unicité et la diversité des caractères morphologiques, physiologiques ou comportementaux des êtres vivants. Plus récemment, la cartographie et le séquençage des génomes ont conduit à l'identification de l'origine moléculaire de milliers de caractères morbides chez l'homme, ainsi qu'à l'élucidation de nombreux mécanismes pathologiques sous-jacents. Il est donc établi que chacun de nous est unique, y compris dans sa prédisposition ou sa résistance aux maladies.

Chacun de nous est également unique dans sa capacité de réponse aux médicaments. Cela tient à ce que la variabilité de notre patrimoine génétique peut induire une modulation du fonctionnement des protéines impliquées dans la cinétique ou l'action des molécules thérapeutiques. Ainsi, pour un patient donné, le choix d'un principe actif ou la détermination de la posologie optimale dépendront-ils de notre génotype. La pharmacogénétique, pivot de l'individualisation thérapeutique, est cette discipline médicale naissante qui vise à édicter les règles d'usage de certains médicaments en fonction du génotype du patient. Couramment utilisée en médecine hospitalière chez l'homme, elle est peu à peu introduite en médecine vétérinaire.

La première partie de ce manuscrit décrit les différents niveaux du polymorphisme génétique, support de la pharmacogénétique. La deuxième partie détaille, à partir d'exemples, l'usage des outils pharmacogénétiques en médecine humaine. Enfin, la dernière partie illustre l'utilisation actuelle de la pharmacogénétique en médecine vétérinaire et conclue sur son développement probable chez l'animal dans les prochaines années.

## **Mots clés** :

PHARMACOGENETIQUE, PHARMACOGENOMIQUE, GENETIQUE,  
POLYMORPHISME, PHARMACODYNAMIE, PHARMACOCINETIQUE, MEDECINE  
VETERINAIRE, MEDECINE HUMAINE

## **Jury** :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Laurent TIRET

Assesseur : Dr. Renaud TISSIER

# **PHARMACOGENETICS AND THERAPEUTIC INDIVIDUALIZATION: CONCEPT AND PROSPECTIVE IN VETERINARY MEDICINE**

**SURNAME:** MAYOUSSE

**Given name:** Vincent

## **Summary:**

For a century, it has been recognized that the phenotype of an individual depends upon its genotype. Unique combinations of alleles influence gene expression, as well as the amount and function of the translated proteins. These variations, transmitted through the DNA molecule, support unicity and diversity of morphological, physiological and behavioral traits in living organisms. More recently, mapping and genome sequencing projects have led to the identification of the molecular etiology of thousands of morbidity traits in humans and to the elucidation of many underlying pathological mechanisms. As a consequence, it is now well established that each of us is unique. This statement stands for our susceptibility or resistance to disease.

Each of us is also unique regarding drugs' response. This is due to the variability of our genetic background that may induce a functional modulation of proteins involved in kinetics and effect of therapeutic molecules. Thus, for a given patient, the choice of an active substance or the evaluation of the optimal dosage depends on his genotype. Pharmacogenetics is the emerging branch of medicine that aims at establishing rules regarding the use of some medications based on patients' genotype. Commonly used in human medicine, it is slowly introduced in veterinary medicine.

The first section of this manuscript describes the different levels of genetic polymorphism, which supports pharmacogenetics. Through examples, the second section describes the use of pharmacogenetic tools in human medicine. The final section illustrates the current use of pharmacogenetics in veterinary medicine and concludes on its likely development in the very next years.

## **Keywords:**

PHARMACOGENETICS, PHARMACOGENOMICS, GENETIQUE, POLYMORPHISM,  
PHARMACODYNAMICS, PHARMACOKINETICS, VETERINARY MEDICINE,  
MEDICINE

## **Jury:**

President: Pr.

Director: Dr. Laurent TIRET

Assessor: Dr. Renaud TISSIER