

## Article original / Original article

# Détermination du polymorphisme d'acétylation de la N-acétyltransférase 2 dans la population sénégalaise par utilisation du test à la caféine

## *Determination of polymorphism of acetylation of the N-acetyltransferase 2 in the Senegalese population by using caffeine test*

Aminata Touré<sup>1,2,4,\*</sup>, Mathilde Cabral<sup>1</sup>, Cheikh Diop<sup>1</sup>, Nar Diéne<sup>4</sup>, Mamadou Fall<sup>1,4</sup>, Amadou Moctar Diéye<sup>4</sup>, Amadou Diouf<sup>1,4</sup>, Michel Lhermitte<sup>2,3</sup>, Luc Humbert<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Service de Toxicologie-hydrologie, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop, BP 5246 Fann, Dakar, Sénégal

<sup>2</sup> UDSL, Université Lille Nord-de-France, EA 4483, Faculté de Médecine de Lille, Pôle Recherche, 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

<sup>3</sup> Service « Toxicologie et Génopathies », CHRU, avenue du Professeur Jules Leclercq, 59037 Lille Cedex, France

<sup>4</sup> Centre antipoison du Sénégal, Ministère de la Santé et de la Prévention, Sénégal

**Résumé – Introduction :** L'isoniazide (INH) est métabolisée par une N-acétyltransférase (NAT), la NAT2. Il existe de nombreux polymorphismes de la NAT2 qui peuvent être associés à des toxicités ou à des échecs thérapeutiques au cours d'un traitement par INH. **Objectif :** L'objectif de ce travail est de déterminer l'indice d'acétylation de la NAT2 dans la population sénégalaise afin de les répartir en acétyleurs lents et rapides. **Méthodes :** L'étude du profil d'acétylation a été effectuée sur des urines de 247 sujets en utilisant la caféine comme marqueur. La proportion molaire du 5-acétamino-6-formylamine-3-méthyluracile (AFMU) sur le 1-méthylxanthine (1X) a été déterminée. La répartition de la population étudiée en phénotype lent ou rapide a été réalisée en se basant sur l'antimode = 0,55. Les sujets possédant un rapport ([AFMU]/[1X]) inférieur à 0,55 sont considérés comme des acétyleurs lents et ceux dont le rapport est >0,55 sont des acétyleurs rapides. **Résultats :** Les résultats obtenus ont montré une ségrégation en deux modes apparents de capacité d'acétylation dans la population sénégalaise testée avec 63,8 % et 36,2 % d'acétyleurs lents et rapides respectivement. **Conclusion :** La réponse au traitement de maladies comme la tuberculose dépend du polymorphisme d'acétylation de la NAT2, il est donc important de connaître le phénotype de la NAT2 chez les sujets atteints de tuberculose pour éviter des effets indésirables tels que l'hépatotoxicité ou la neurotoxicité.

**Mots clés :** N-acétyltransférase, polymorphisme, indice d'acétylation, test caféine

**Abstract – Introduction:** Isoniazid (INH) is metabolized by an N-acetyltransferase (NAT), the NAT2. There are many of NAT2 polymorphisms that may be associated to toxicity or therapeutic failure of INH. **Objective:** The objective of this study is to determine the index of acetylation of NAT2 in the Senegalese population. **Methods:** The study of the profile of acetylation was performed on urine from 247 subjects using caffeine as a marker. The molar ratio of 5-acetamino-6-formyl amine-3-methyluracil (AFMU) on the 1-methylxanthine (1X) was determined. The distribution of the population studied in slow or fast phenotype was performed based on the antimode = 0.55. Subjects who have ratio ([AFMU]/[1X]) less than 0.55 are considered slow acetylators and those, whose ratio is >0.55, are rapid acetylators. **Results:** The results showed segregation of two apparent modes of acetylation capacity in the Senegalese population tested with 63.8% and 36.2% of slow and fast acetylators respectively. **Conclusion:** Response to treatment of diseases such as tuberculosis depends on the polymorphism of NAT2 acetylation, it is significant to know the phenotype of NAT2 in patients with tuberculosis to avoid such side effects as hepatotoxicity or neurotoxicity.

**Key words:** N-acetyltransferase, polymorphism, acetylation index, phenotyping

Reçu le 23 mai 2012, accepté après modifications le 6 juillet 2012  
Publication en ligne le 26 septembre 2012

\* Correspondance : Aminata Touré, [amitoure@hotmail.com](mailto:amitoure@hotmail.com)

## 1 Introduction

Les arylamines N-acétyltransférases (NATs : EC.2.3.1.5) transfèrent un groupement acétyl sur des amines aliphatiques primaires ou aromatiques, des hydrazines, des hydrazides, des sulfonamides [1, 2]. L'acétylation des substances facilite leur élimination de l'organisme, car les métabolites acétylés sont plus hydrosolubles et participent généralement à la détoxification des composés [3, 4]. Les N-acétyltransférases sont des enzymes cytosoliques. Le gène NAT1 est exprimé dans de nombreux tissus, le gène NAT2 l'est essentiellement dans le foie et l'intestin [5, 6]. Chez l'Homme, les NATs font partie des exemples parmi les premiers décrits et les mieux connus des polymorphismes génétiques.

Le polymorphisme de la NAT2 (36 variants alléliques) se traduit par l'expression de phénotypes dits « acétyleurs lents » et « acétyleurs rapides » [7–11]. De très grandes variations interethniques dans la fréquence des acétyleurs lents sont décrites. Les conséquences cliniques et pharmacologiques du polymorphisme de la NAT2 sont importantes. Il a été démontré que ce polymorphisme était à l'origine d'effets indésirables ou toxiques lors de l'administration de certains médicaments [12–17]. Le polymorphisme est également impliqué dans la variabilité interindividuelle de la bioactivation ou de la détoxification de mutagènes ou de procarcinogènes (4-aminobiphényl,  $\beta$ -naphtylamine, amines hétérocycliques, benzidine) [18–23]. Le phénotype lent a été corrélé aux réactions d'hypersensibilité aux sulfamides. Les acétyleurs lents traités par INH peuvent avoir un risque accru de neuropathies périphériques dues à la demi-vie prolongée de la molécule [24]. Chez les acétyleurs rapides, on peut craindre un risque accru d'échecs thérapeutiques mais surtout un risque plus important d'hépatotoxicité liée à la surproduction d'un métabolite hépatotoxique de l'isoniazide qui est l'acétylhydrazyl [25]. Il a également été décrit un phénotype d'acétyleurs intermédiaires de la NAT2 classant ainsi les sujets en trois populations différentes selon le profil d'acétylation [7, 26].

Pour déterminer le profil d'acétylation de la NAT2, la caféine (1,3,7-triméthylxanthine : 137X) peut être utilisée. C'est une substance ubiquitaire et relativement non toxique même à fortes doses, métabolisée par la voie de la N-acétylation et recommandée comme marqueur pour la détermination du phénotype d'acétylation par plusieurs auteurs [26–31]. Le métabolisme de la caféine a été étudié *in vivo* et *in vitro* chez l'Homme et plus d'une dizaine de métabolites urinaires ont été déterminés par CLHP [31–33]. Le 5-acetamino-6-formylamino-3-méthyluracine ou AFMU et le 1-méthylxanthine ou 1X ont été identifiés comme des métabolites majeurs de la caféine et leur rapport de concentration molaire a permis de phénotyper la NAT2 [12, 28, 31, 34].

L'isoniazide, médicament de référence utilisée par le programme national de lutte contre la tuberculose au Sénégal (PNT), parfois en monothérapie mais le plus souvent en association avec d'autres molécules antituberculeuses, est administrée aux patients atteints de tuberculose selon une seule et même dose standard (5 mg/kg/j).

Notre travail a consisté à déterminer le profil d'acétylation de la NAT2 dans une population sénégalaise. L'indice [AFMU]/[1X] a été utilisé comme marqueur pour classer

cette population en acétyleurs lents et rapides dans le but de permettre au PNT de disposer d'un outil indispensable dans le suivi thérapeutique optimal des patients affectés par la tuberculose.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Recueil des échantillons urinaires

Deux cent quarante-sept (247) échantillons urinaires ont été recueillis dans la population générale sénégalaise. Il s'agissait de volontaires sains, recrutés dans des écoles de formation, à l'Université de Dakar et parmi les personnels des structures de santé. Tous les échantillons urinaires étaient anonymisés. Les sujets fumeurs, les alcool-dépendants, les femmes enceintes ou sous contraception orale et les sujets atteints de pathologies sous-jacentes ont été exclus de l'étude. Un consentement écrit était signé lors du recueil de l'urine.

Il était demandé aux sujets de ne pas consommer d'aliments contenant des xanthines pendant une période de 24 h. Une dose de 300 mg de caféine était administrée sous forme de café soluble (Nescafé Spécial Filtre, 100 % arabica®) et les urines émises entre la 3<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> heure après ingestion de caféine ont été recueillies. Les urines étaient immédiatement placées à +4 °C et acheminées au laboratoire. Une aliquote de 10 mL de chaque échantillon était prélevée et acidifiée à pH 3,5 avec de l'acide chlorhydrique 6 N afin de maintenir la stabilité de l'AFMU. Les aliquotes étaient conservées à –80 °C jusqu'à la réalisation des analyses.

Des échantillons de 10 témoins ont été collectés chez des sujets en diète de xanthine sur une période de 5 jours (ne consommant pas d'aliments susceptibles de contenir de la caféine tels que le thé, le chocolat, le café, le cola) pour la préparation « d'urines témoins ».

### 2.2 Réactifs

Les métabolites de la caféine : la 1 méthylxanthine (1X), la 3-méthylxanthine (3X), la 7-méthylxanthine (7X), la 1,3 diméthylxanthine (13X), la 1,7 diméthylxanthine (17X), la 3,7 diméthylxanthine (37X), l'acide 1-méthylurique (1U), l'acide 3-méthylurique (3U), l'acide 7-méthylurique (7U), l'acide 1,3-diméthylurique (13U), l'acide 1,7-diméthylurique (17U), l'acide 3,7-diméthylurique (37U), l'acide 1,3,7-triméthylurique (137U) et le 5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU), proviennent tous de chez Sigma Aldrich (France). Le standard interne, la  $\beta$  hydroxy-éthylthéophylline, a été également obtenu chez Sigma Aldrich (France).

### 2.3 Instrumentation et conditions d'analyse

L'appareil utilisé est un chromatographe liquide haute performance. Les analyses ont été réalisées par CLHP (DAD Alliance®, Waters France), couplée à un détecteur à barrette

**Tableau I.** Temps de rétention de la caféine et de ses métabolites dans une urine surchargée à 100 mg/L.

Substances	3U	AFMU	7U	7X	1U	37X	1X	13U	3X	37U	17U	17X	13X	137U	EI	137X
Temps de rétention	3,73	4,19	4,95	5,27	5,69	5,90	7,14	8,5	9,96	11,32	13,6	14,56	16,27	19,46	20,72	31,32

de diodes. Le logiciel d'acquisition et d'exploitation des données est le logiciel Empower<sup>®</sup> 2 (Waters, France). La colonne chromatographique utilisée est une colonne Symmetry<sup>®</sup> C18 de dimension 250 × 4,6 mm et de granulométrie 5 µm (Waters, France). La température de la colonne est maintenue à 40 °C. La phase mobile est un mélange d'acide acétique 0,05 % et de méthanol (90 : 10, v/v), à un débit de 1,2 mL/min. La séparation est réalisée en mode isocratique et les composés sont détectés à 280 nm [33].

## 2.4 Préparation des solutions étalons

Une solution contenant l'ensemble des métabolites de la caféine (1X, 3X, 7X, 13X, 17X, 37X, 137U, 3U, 7U, 13U, 17U, 37U, 1U) est préparée en les dissolvant dans de l'eau purifiée sur Milli-QPlus 185 (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France) à une concentration de 100 mg/L (solution mère). À partir de cette solution, des solutions à des concentrations de 5, 10, 20, 40 et 80 mg/L sont préparées dans de l'eau purifiée milli-Q. L'AFMU est dissout dans de l'acide acétique 0,05 % à une concentration de 100 mg/L afin d'éviter sa dégradation. Toutes les solutions ont été conservées à +4 °C durant les tests.

La β hydroxy-éthyl-théophylline en solution méthanolique est utilisée comme standard interne (SI) à une concentration de 50 mg/L.

## 2.5 Extraction des échantillons urinaires : méthode de Grant [33]

Des échantillons urinaires témoins sont surchargés avec la solution de mélange des métabolites à 100 mg/L pour obtenir des solutions urinaires à 5, 10, 20, 40 et 80 mg/L, afin d'obtenir les temps de rétention de chaque métabolite et celui du standard interne. Les urines témoins et les urines recueillies chez les sujets ayant absorbé de la caféine sont ensuite extraites selon le protocole décrit par Grant *et al.* en 1983 [33]. La méthode a été validée pour les deux métabolites, le 1X et l'AFMU, dont le rapport a permis d'établir le profil d'acétylation de la NAT2.

### 2.5.1 Extraction

Des aliquotes de 200 µL d'urines surchargées et de témoins sont extraites par 6 mL d'un mélange dichlorométhane/isopropanol (95 : 5, v/v) après ajout de 100 µL de SI.

Les tubes sont ensuite agités au Vortex<sup>®</sup> pendant 30 s et centrifugés pendant 5 min à 4500 tpm. La phase organique est prélevée puis évaporée à sec sous azote. Le résidu sec est repris par 100 µL de phase mobile (acide acétique à 0,05 %) et 50 µL sont injectés dans la colonne.

## 2.6 Validation de la méthode

La méthode a été validée pour les deux principaux métabolites permettant le calcul de l'indice d'acétylation, le 1X et l'AFMU. Les critères de validité retenus sont la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude et la limite de détection et de quantification.

## 2.7 Phénotypage d'acétylation de la NAT2 par mesure du rapport [AFMU]/[1X]

Le phénotypage d'acétylation de la NAT2 est déterminé par l'indice d'acétylation qui correspond au rapport [AFMU]/[1X]. La répartition des sujets s'est faite selon un mode bimodal avec un antimode = 0,55 en se basant sur les études antérieures qui ont permis le calcul de cet antimode de façon statistique à partir de larges populations d'individus [28, 30, 31, 35, 36]. Les sujets ayant un rapport [AFMU]/[1X] > 0,55 ont été classés acétyleurs rapides et ceux dont le rapport est < 0,55 ont été classés acétyleurs lents.

## 3 Résultats

Les sujets (135 femmes et 112 hommes) étaient âgés de 15 à 65 ans (moyenne 29,2 ± 2 ans). Ils étaient tous des sujets sains, sans pathologie sous-jacentes qui pourraient perturber ou influencer le métabolisme de la NAT2.

Les temps de rétention de la caféine et de chacun de ses métabolites ont été obtenus en chromatographiant les composés individuellement (tableau I). La chromatographie d'une urine surchargée avec 100 mg/L par la caféine et ses métabolites ne montre pas de co-élution (figure 1). Le chromatogramme d'une urine témoin ne montre pas de pic chromatographique.

La droite d'ajustement obtenue à partir de 5 points de gamme, a pour équation  $y = 0,0075x + 0,0026$  pour l'AFMU avec un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,9994 (figure 2a). Pour le 1X, la droite d'ajustement a pour équation  $y = 0,0069x + 0,0046$  avec un  $R^2$  de 0,9984 (figure 2b).

L'étude de la répétabilité a permis de montrer que la méthode est répétable avec un coefficient de variation (CV) de 1,93 % pour l'AFMU et de 2,09 % pour le 1X (tableau II). La fidélité intermédiaire, estimée par analyses de cinq séries de concentration intermédiaires aux standards (10, 15, 30, 50 et 75 mg/L), a permis d'apprécier la reproductibilité de la méthode (tableau III). L'essai évaluant l'exactitude de la méthode (tableau IV) a permis de vérifier l'étroitesse entre la valeur vraie et le résultat obtenu. Les limites de détection sont de 0,3 mg/L pour l'AFMU et de 0,5 mg/L pour le 1X. Les limites de quantification sont de 1,23 mg/L pour l'AFMU et de 1,71 mg/L pour le 1X.

Les résultats des dosages d'AFMU et de 1X chez les 247 sujets étudiés ont permis de calculer le rapport

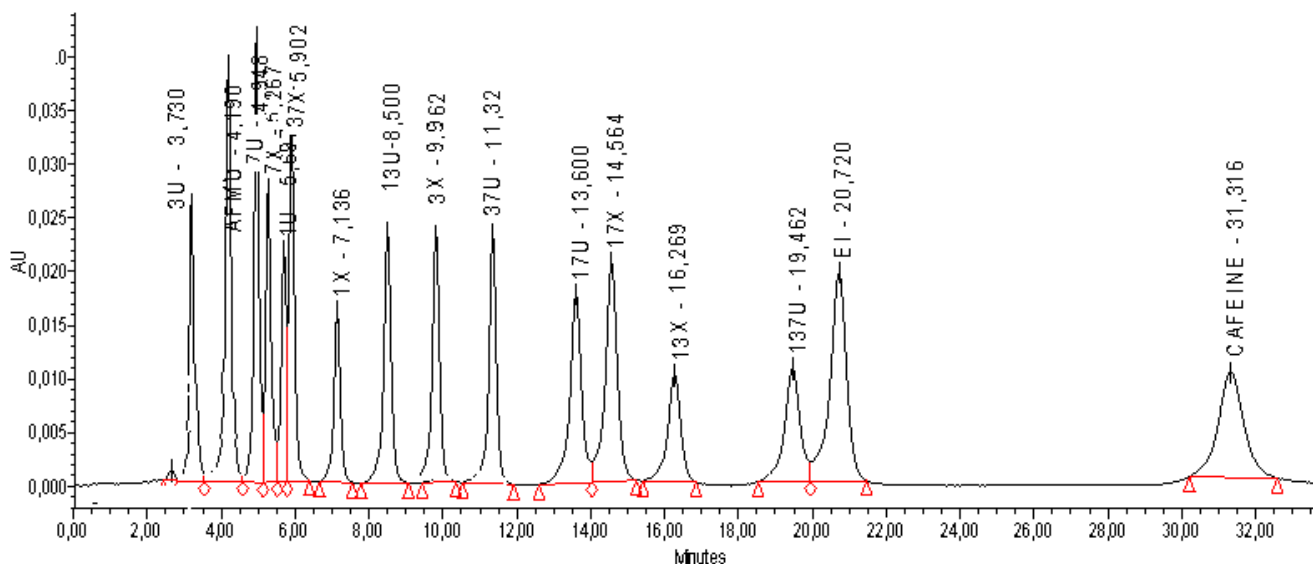


Fig. 1. Chromatogramme d'un extrait urinaire surchargé avec la caféine et ses métabolites (100 mg/L).

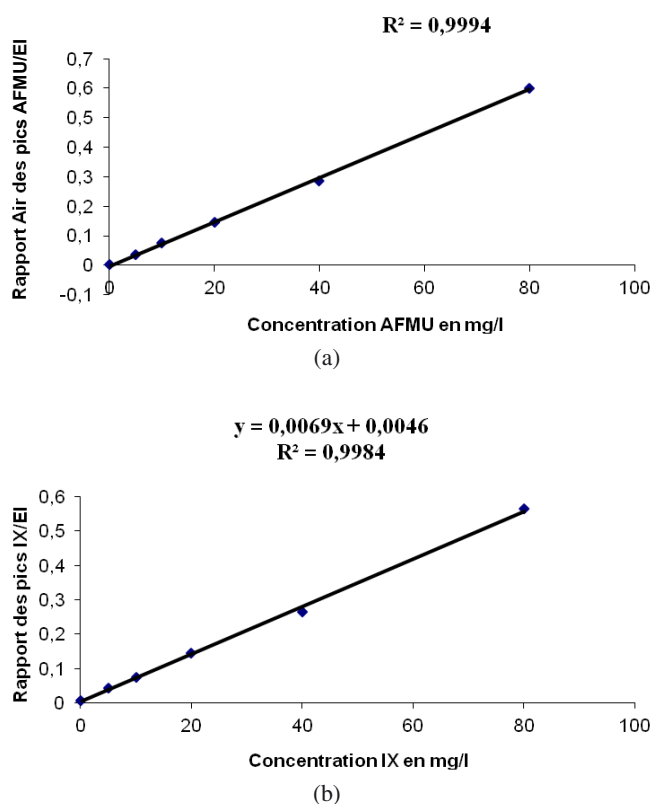


Fig. 2. (a) Courbe d'étalonnage de l'AFMU et (b) courbe d'étalonnage du 1X.

[AFMU]/[1X]. La figure 3 rapporte les résultats pour les 247 sujets ; ces résultats sont exprimés en log pour une meilleure représentation : 63,8 % de la population testée sont des acétyleurs lents et 36,2 % sont des acétyleurs rapides.

#### 4 Discussion

La population étudiée est composée de 54,66 % de femmes et 45,34 % d'hommes. Cette répartition est proche de celle de la population générale du Sénégal avec 51,1 % versus 48,9 % (odds ratio de 1,105 en faveur des femmes) [37].

Le test à la caféine a été utilisé pour effectuer le phénotypage de la NAT2 en se basant sur les concentrations en AFMU et 1X. Ces deux substances sont des métabolites de la caféine, obtenus après ingestion de café correspondant à une dose de 300 mg de caféine. Le café est un produit qui s'avère être non toxique même à dose élevée, il n'a pas de contre-indication et l'expression du phénotype de la caféine n'est pas influencée par l'âge, ni par le sexe [38–40]. Le choix de ce test est basé sur son utilisation simple, sa sécurité relative [33,41–43]. D'autant plus que les autres substances médicamenteuses tests (INH, dapsonne, sulfaméthazine, procaïnamide) dans les premières études [44–48] ont ensuite été exclues à cause des effets indésirables liés à leur ingestion [24].

Déjà, en 1983, Grant *et al.* ont utilisé le test à la caféine pour répartir une population caucasienne saine en acétyleurs lents et rapides selon une distribution bimodale avec un antimode de 0,55 [33]. Les populations ayant un rapport [AFMU]/[1X] > 0,55 ont été classées acétyleurs rapides et celles qui ont un rapport < 0,55 étaient considérées comme acétyleurs lents.

Rasmussen et Kim ont aussi déterminé les métabolites urinaires de la caféine pour étudier l'activité des enzymes de métabolisation de phase I et de phase II (CYP4501A2, xanthine oxydase et NAT2 [49]). Ils ont confirmé que la NAT2 métabolisait la caféine avec formation de métabolites urinaires AFMU et 1X dont les rapports de concentration urinaire reflétaient l'activité enzymatique de la NAT2.

À côté du phénotypage, des techniques de génotypage sont utilisées de nos jours, comme une technique applicable à l'analyse de l'ensemble des polymorphismes affectant non

**Tableau II.** Répétabilité de la méthode<sup>a</sup>.

Substances	Conc. (mg/L)	1	2	3	4	5	Moy.	Écart type	CV
AFMU	40	39,85	40,95	42,05	40,65	40,88	40,9	0,79	1,9
1X	40	40,55	41,25	39,95	41,57	39,55	40,6	0,85	2,09

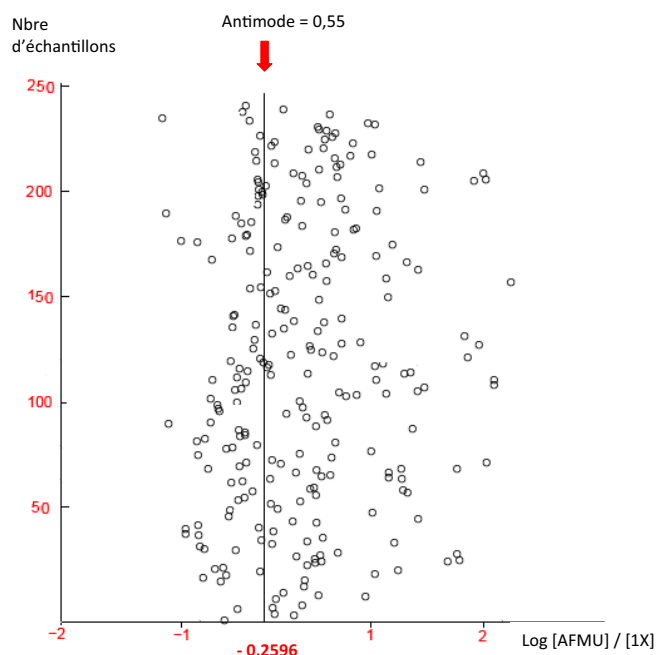
<sup>a</sup> Un échantillon d'urine chargée a été analysé 5 fois le même jour. Le tableau II montre les moyennes, les coefficients de variation (CV) et les écarts type.

**Tableau III.** Fidélité intermédiaire (N = 5).

Substances	Concentrations introduites en mg/L									
	10		15		30		50		75	
	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)	Moy (mg/L) ± SD	CV (%)
AFMU	10,97 +/- 0,59	4,86	15,51 +/- 0,81	4,88	30,06 +/- 1,17	3,48	50,04 +/- 1,63	2,92	75,16 +/- 2,52	3
1X	10,93 +/- 0,56	5,17	15,92 +/- 0,66	4,19	30,99 +/- 1,07	3,45	51,43 +/- 0,97	1,88	75,5 +/- 0,69	0,92

**Tableau IV.** Justesse ou exactitude de la méthode.

[AFMU] introduites (mg/L)	Moy des [AFMU] calculées mg/L +/- SD	CV (%)	[1X] introduites (mg/L)	Moy des [1X] calculées (mg/L) +/- SD	CV (%)
5	5,4 +/- 0,36	7,57	5	5,5 +/- 0,43	8,72
10	10,48 +/- 0,57	6,05	10	10,47 +/- 0,51	5,49
20	20,78 +/- 0,87	4,66	20	20,57 +/- 0,46	2,47
40	40,94 +/- 0,88	2,39	40	40,15 +/- 0,82	2,28
80	80,29 +/- 1,18	1,65	80	80,13 +/- 0,8	1,103



**Fig. 3.** Indice d'acétylation de la NAT2 en fonction de log [AFMU]/[1X] (antimode = 0,55).

seulement la pharmacocinétique des médicaments, mais également leurs effets (récepteurs, cibles protéiques) [50].

Les résultats de notre étude montrent une distribution bimodale dans la population sénégalaise avec respectivement 63,8 % et 36,2 % d'acétyleurs lents et rapides.

Cette distribution bimodale a été constatée dans différentes populations avec des taux de répartition variés. La proportion des phénotypes rapides et lents varie dans les différents groupes ethniques et est rapportée dans le tableau V.

Le profil d'acétyleurs lents a été trouvé à des fréquences faibles chez les Asiatiques (10–30 %) [1, 51, 52]. Dans une population iranienne, Bakayev *et al.* ont cependant trouvé un pourcentage d'acétyleurs lents de 32,9 % [51]. Les Japonais ne comptent que 14 % d'acétyleurs lents d'après l'étude de Yu *et al.* en 1994 [52].

Chez les Caucasiens, la fréquence est estimée entre 40 et 70 % [10, 53, 54]. Dans une population française d'origine caucasienne, la prévalence des acétyleurs lents est de 38,7 % par le test à la caféine [55].

En 2000, O'Neil *et al.* avaient déterminé le profil d'acétylation de la NAT2 chez des Américains d'origine canadienne HIV+ par le test à la caféine avec 70 % d'acétyleurs lents et 30 % d'acétyleurs rapides [56].

Chez les Africains, Khelil *et al.* avaient trouvé une fréquence d'acétyleurs lents plus faible dans une population algérienne (55 %) en utilisant ce test à la caféine [57]. De même, au Zimbabwe, Nhachi *et al.* ont aussi trouvé une répartition bimodale avec 58 % d'acétyleurs lents et 42 % d'acétyleurs rapides [58]. Dans une population égyptienne, la fréquence d'acétyleurs lents est supérieure à 90 % [59]. Par contre, chez les Esquimaux, près de 99 % des sujets sont des acétyleurs rapides.

À côté de la répartition bimodale, il a été démontré, dans une population canadienne d'origine caucasienne, par Grant *et al.*, une répartition trimodale en utilisant le test à la caféine [31].

**Tableau V.** Résumé de différentes études sur la détermination de l'acétylation de la NAT2 par différentes techniques et dans différentes populations.

Population étudiée		Nombre de participants	Méthodes utilisées	Résultats (%)	Références
Canadienne d'origine caucasienne		29	Test à l'INH	AR : 34,4 AL : 10,35 AI : 55,17	[60]
		31	Test à la sulphaméthazine	AUR : 48,4 AR : 22,6 AL : 29	[61]
		90	Test à la caféine	AR : 30 AL : 70	[56]
Américaine d'origine caucasienne		255	Test à la caféine	AR : 41,9 AL : 58,1	[54]
Française d'origine caucasienne		150	Test à la caféine	AR : 61,3 AL : 38,7	[55]
Iranienne		88	PCR-RFLP	AR : 18,2 AL : 32,9 AI : 48,9	[51]
Japonaise		110	PCR-RFLP	AR : 86 AL : 14	[52]
Africaine	Algérienne	18	Test à la caféine	AR : 45 AL : 55	[57]
	Égyptienne	50	Test à l'INH	AR : 08 AL : 92	[59]
	Zimbabwéenne	100	Test à la sulphaméthazine	AR : 58 AL : 42	[58]
	Tazanienne	120	PCR-RFLP	AR : 52 AL : 48	[64]

AUR : Acétyleur ultra rapide ; AR : Acétyleur rapide ; AL : Acétyleur lent ; AI : Acétyleur intermédiaire ; PCR-RFLP : *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*.

Bien que l'impact du polymorphisme d'acétylation sur la pharmacocinétique de l'INH ait été largement étudié en modèle de distribution bimodale, il a été démontré que l'élimination de l'INH est en fait trimodale. Dans la répartition trimodale, les acétyleurs rapides de la distribution bimodale étaient subdivisés en acétyleurs rapides et intermédiaires. Pour étudier cette distribution trimodale, certains auteurs ont étudié la cinétique de l'isoniazide par administration de deux doses différentes d'INH de 5 mg/kg et de 10 mg/kg, les caractéristiques d'élimination des différents sous-groupes phénotypiques étant influencées par la concentration du médicament [7,60]. Deguchi *et al.* ont ainsi déterminé une distribution trimodale du phénotype de la NAT2 dans une population canadienne avec 34,48 % d'acétyleurs rapides, 55,17 % d'acétyleurs intermédiaires et 10,35 % d'acétyleurs lents [60].

Des études ont utilisé d'autres substrats pour la détermination de l'indice d'acétylation de la NAT2. Le principe est le même que celui du test à la caféine : une dose de substrat est administrée au sujet et les urines sont recueillies pour le dosage des métabolites urinaires majeurs. Ce sont en général des médicaments métabolisés par la voie de la NAT2 (par exemple, le dosage de l'isoniazide et de son métabolite, l'acé-

tylisoniazide AcINH pour étudier le rapport INH/acINH pour une optimisation du traitement de la tuberculose en fonction du profil d'acétylation).

Ainsi, Abzalov *et al.* ont utilisé la sulfaméthazine pour répartir une population colombienne d'origine canadienne en deux groupes dans la population générale et en trois groupes chez des sportifs. Chez ces derniers, le profil ultra rapide a été mis en évidence et il a été démontré lors de cette étude que le profil d'acétylation ultra rapide observé après un exercice physique reflète l'adaptation de l'organisme à l'activité enzymatique par un phénomène d'induction de la N-acétyltransférase suite à une augmentation de l'absorption sanguine du substrat lors de l'exercice physique [61].

Plusieurs études ont été réalisées dans des populations canadiennes afin de rechercher l'origine ethnique, sachant que les Esquimaux sont des acétyleurs rapides (pourcentage supérieur à 99 %) [31,60,61].

D'autres études ont montré la corrélation entre le profil d'acétylation et le mode de vie des sujets testés [62] ; la fréquence du phénotype lent est deux à trois fois plus élevée dans la population agro-pastorale que dans les populations dont la subsistance repose traditionnellement sur la chasse

et/ou la collecte. Selon Sabbagh, les activités agro-pastorales déclenchent de profonds changements dans l'alimentation et l'exposition aux xénobiotiques, ce qui affecterait l'activité de plusieurs voies métaboliques dont celle de la NAT2 [62].

Notre étude a été réalisée sur des sujets sénégalais sains non fumeurs avec 63,8 % d'acétyleurs lents et 36,2 % d'acétyleurs rapides. Mais le tabagisme n'a pas d'influence directe sur le profil d'acétylation; et nos résultats corroborent ceux de Muscat qui a trouvé une répartition bimodale chez des Noirs américains mais fumeurs mais avec une prévalence d'acétyleurs rapides plus importante (64 %) [63]. De plus, cet auteur met en relation le profil d'acétylation et la survenue de certaines pathologies telles que le cancer de la vessie et le cancer colorectal. Selon Muscat, la NAT2 est une voie importante de toxification des contaminants comme le 4-aminobiphényl qui forme des adduits à l'hémoglobine chez les fumeurs et la survenue de cancer de la vessie serait plus importante chez les sujets fumeurs acétyleurs lents. Les résultats des autres pays africains montrent aussi une prévalence d'acétyleurs rapides plus importante au Zimbabwe et en Tanzanie [59, 64].

D'autre part, il est possible de déterminer le profil d'acétylation de la NAT2 par la technique de génotypage. Le génotypage n'est pas soumis à l'influence de facteurs confondants (co-administration de médicaments, pathologies associées). Cependant, la technique de génotypage souffre encore de la nécessité d'appliquer un grand nombre de tests, au vu du nombre parfois élevé de mutations à détecter. Néanmoins, il permet de remédier aux problèmes du phénotypage qui est soumis aux facteurs de variation ayant un effet sur l'expression du génome et en particulier les facteurs environnementaux [65]. Des résultats de génotypage de la NAT2 ont ainsi permis de classer d'autres populations africaines en acétyleurs lents ou rapides. Par cette méthode de génotypage, la fréquence d'acétyleurs lents chez les Tanzaniens est de 49 %, chez les Sud-Africains de 38 %, chez les Zimbabwéens de 52 % [64].

Plusieurs pathologies sont associées au profil polymorphe de la NAT2, en particulier à la cancérogène de certains organes. Les N-acétyltransférases 2 sont capables de participer à la formation d'ions dits arylazoniums très réactifs et peuvent jouer un rôle important dans la survenue de certains cancers tels que le cancer de la vessie [66]. Les précurseurs ainsi activés sont des amines cycliques et hétérocycliques provenant de sources environnementales telles que la fumée de cigarette, certains résidus de cuisson des aliments, ou encore des polluants industriels. Mais d'autres activités enzymatiques, telles que celles des cytochromes P450, pourraient également intervenir dans ce phénomène.

L'utilisation de l'INH dans le traitement de la tuberculose pourrait avoir des effets indésirables à type de neuropathie chez les acétyleurs lents ou d'hépatotoxicité. En effet, la diminution ou la perturbation de l'activité de la NAT2 pourrait entraîner l'accumulation des précurseurs, tels que l'hydrazine et l'acétylhydrazine dans le foie, conduisant à l'hépatotoxicité de ce médicament [67, 68].

## 5 Conclusion

Il a été démontré un polymorphisme génétique de la NAT2 dans une population sénégalaise avec respectivement 63,8 %

et 36,2 % d'acétyleurs lents et rapides. Ceci est important pour mettre en place un traitement de la tuberculose avec l'INH et pour adapter la posologie. Ce polymorphisme peut également être pris en compte pour expliquer certaines pathologies.

## Références

1. Evans DAP. N-acetyltransferase. In: Kalow W (editor) *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992: 95–178.
2. Kawamura AK, Graham J, Mushtaq A, Tsiftoglou SA, Vath GM, Hanna PE, Wagner CR, Sim E. Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69(2): 347–359.
3. Nebert DW, Roe AL. Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *Sci Total Environ*. 2001; 274(1–3): 93–102.
4. Boukouvala S, Sim E. Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterization of alternative transcripts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96(5): 343–351.
5. Grant DM, Blum M, Beer M, Myer UA. Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol Pharmacol*. 1991; 39(2): 184–191.
6. Hickman D, Pope J, Patil SD, Fakis G, Smelt V, Stanley LA, Payton M, Unadkat JD, Sim E. Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine. *Gut*. 1998; 42(3): 402–409.
7. Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HI, van Helden PD, van der Walt BJ, Donald PR, van Jaarsveld PP. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155(5): 1717–1722.
8. Smith CA, Wadelius M, Gough AC, Harrison DJ, Wolf CR, Rane A. A simplified assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J Med Genet*. 1997; 34(9): 758–760.
9. Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, Yu VL, Grewal R. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res*. 1997; 376(1-2): 61–70.
10. Cascorbi I, Brockmöller J, Mrozikiewicz PM, Müller A, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev*. 1999; 31(2): 489–502.
11. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res*. 2002; 506-507: 65–77.
12. Evans DAP. Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. *J Med Genet*. 1984; 21: 243–253.
13. Clark DW. Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*. 1985; 29: 342–375.
14. Evans DAP. N-acetyltransferase. In: *Genetic Factors in Drug Therapy*. Cambridge University Press: Cambridge, 1993: 211–302.
15. Weber WW. *Pharmacogenetics*. Oxford Monographs on Medical Genetics. Oxford University Press: New York, 1997, Vol 15.
16. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Niangju NA, Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2000; 9: 29–42.

17. Agundez JAG, Golka K, Martinez C, Selinski S, Blaszkewicz M, Garcia-Martin E. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. *Clin Chem*. 2008; 54(8): 1390–1394.
18. Kato R. Metabolic activation of mutagenic heterocyclic aromatic amines from protein pyrolysates. *Crit Rev Toxicol*. 1986; 16(4): 307–348.
19. Hein DW. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 948(1): 37–66.
20. Minchin RF, Reeves PT, Teitel CH, McManus ME, Mojarrabi B, Ilett KF, Kadlubar FF. N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 185(3): 839–844.
21. Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ, Grant DM. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 1633–1638.
22. Zenser TV, Lakshmi VM, Rustan TD, Doll MA, Deitz AC, Davis BB, Hein DW. Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Res*. 1996; 56: 3941–3947.
23. Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. 1984. *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 58(7): S788–S793; discussion S794–S795.
24. Sabbagh N, Delaporte E, Marex D, Lo-Guidice J, Piette F, Broly F. NAT2 genotyping and efficacy of sulfasalazine in patients with chronic discoid lupus erythematosus. *Pharmacogenetics*. 1997; 7(2): 131–135.
25. Spielberg SP. N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1996; 24: 509–519.
26. Kilbane AJ, Silbart LK, Manis M, Beitins IZ, Weber WW. Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin Pharmacol Ther*. 1990; 47: 470–477.
27. Evans DAP. N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther*. 1989; 42: 157–234.
28. Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lawsen MF, Kadlubar FF. Determination of CYP1A2 and NAT 2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics*. 1992; 2(3): 116–127.
29. Hildebrand M, Seifert W. Determination of acetylator phenotype in Caucasians with caffeine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989; 37: 525–526.
30. Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W. Caffeine as a metabolic probe: Validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther*. 1991; 49(6): 648–657.
31. Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 1984; 17: 459–464.
32. Tang BK, Zubovits T and Kalow W. Determination of acetylated caffeine metabolites by high-performance exclusion chromatography. *J Chromatogr*. 1986; 375: 170–173.
33. Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 33: 591–601.
34. Miners JO, Birkett JD. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *Gen Pharmacol*. 1996; 27(2): 245–249.
35. Pariante-Khayat A, Rey E, Gendrel D, Vauzelle-Kervrotlan F, Crémier O, Athis P, Badoual J, Olive G, Pons G. Isoniazid acetylation metabolic ratio during maturation in children. *Clin Pharmacol Ther*. 1997; 62(4): 377–384.
36. Kaufmann GR, Wenk M, Taeschner W, Peterli B, Gyr K, Meyer UA, Haefeli WE. N-acetyltransferase 2 polymorphism in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther*. 1996; 60: 62–67.
37. Agence nationale de la statistique et de la démographie du Sénégal. Juin 2008. Résultats définitifs du troisième recensement général de la population et de l'habitat, 2002: 163 p.
38. Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekblom A, Rane A, Cnattingius S. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. *Obstet Gynecol*. 2001; 98(6): 1059–1066.
39. Cnattingius S, Signorello LB, Annerén G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 2000; 43(25): 1839–1845.
40. Fernandes O, Sabharwal M, Smiley T, Pastuszak A, Koren G, Einarson T. Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reprod Toxicol*. 1998; 12(4): 435–444.
41. Evans DAP, Manley KA, Mc Kusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J*. 1960; 13: 485–491.
42. Farah F, Taylor W, Rawlins MD, James O. Hepatic drug acetylation and oxidation: effects of aging in man. *Br Med J*. 1977; 2: 155–156.
43. Philip PA, Gayed SL, Rogers HJ, Crome P. Influence of age, sex and body weight on the dapsone acetylation phenotype. *Br J Clin Pharmacol*. 1987; 23: 709–713.
44. Evans DA, White TA. Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med*. 1964; 63: 394–403.
45. Gelber R, Peters J, Gordon G, Glazko A, Levy L. The polymorphic acetylation of dapsone in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1971; 12: 225–238.
46. Schroder H. Simplified method for determining acetylator phenotype. *Br Med J*. 1972; 3: 506–507.
47. Reidenberg MM, Drayer DE, Levy M, Warner H. Polymorphic acetylation procainamide in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1975; 17: 722–730.
48. Rao KVN, Mitchison DA, Nair NGK, Prema K, Tripathy SP. Sulphadimidine acetylation test for classification of patients as slow and rapid inactivators of isoniazid. *Br Med J*. 1970; 3: 495–497.
49. Rasmussen BB, Kim B. Determination of urinary metabolites of caffeine for the assessment of cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activity in humans. *Ther Drug Monit*. 1996; 18(3): 254–262.
50. Allorge D, Lorient MA. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. *Ann Biol Clin*. 2004; 62(5): 499–511.
51. Bakayev VV, Mohammadi F, Bahadori M, Sheikholeslami M, Javeri A, Masjedi MR, Velayati AA. Arylamine N-acetyltransferase 2 slow acetylator polymorphisms in unrelated Iranian individuals. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004; 60: 467–471.
52. Yu MC, Skipper PL, Taghizadeh K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson BE, Ross RK. Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 712–716.
53. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37: 269–296.



54. Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R, Kadlubar F. Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8: 683–692.
55. Braz Vieira da Silva Fontes Z, Vincent-Viry M, Gueguen R, Galteau MM, Siest G. Acetylation phenotypes and biological variation in a french Caucasian population. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1993; 31(2): 59–68.
56. O'Neil WM, Drobitch RK, MacArthur RD, Farrough MJ, Doll MA, Fretland J, Hein DW, Crane LR, Svensson CK. Acetylator phenotype and genotype in patients infected with HIV: discordance between methods for phenotype determination and genotype. *Pharmacogenetics.* 2000; 10: 171–182.
57. Khelil M, Tayebi B, Djerdjouri B. Polymorphisme d'acétylation de la caféine chez une population algérienne. *J Soc Alger Chim.* 2007; 17(1): 65–76.
58. Nhachi CFB. Polymorphic acetylation of sulphamethazine in a Zimbabwe population. *J Med Genet.* 1988; 25: 29–31.
59. Hashem N, Khalifa S, Nour A. The frequency of isoniazid acetylase enzyme deficiency among Egyptians. *Am J Phys Anthropol.* 1969; 31: 97–102.
60. Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem.* 1990; 265(22): 12757–12760.
61. Abzalov RA, Nigmatullina RR, Khairullina GN, Garmonov SY, Shakirova LS, Evgenev MI. Effect of physical training on Sulphamethazine acetylation rate. *Bull Exp Biol Med.* 2000; 130(12):1141–1143.
62. Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B, Poloni ES. Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: A Worldwide Population Survey. *PLoS ONE.* 2011; 6(4): 10.
63. Muscat JE, Pittman B, Kleinman W, Lazarus P, Stellman SD, Richie Jr JP. Comparison of CYP1A2 and NAT2 Phenotypes between Black and White Smokers. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(7): 929–937.
64. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimbab A, Kaayab S, Sayib J, Sommersb DK, Snymanc JR, Hasler JA. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C>T and 590G>A. *Pharmacogenetics.* 2003; 13: 55–58.
65. Loriot MA, Beaune P. La pharmacogénétique : le lien entre gènes et réponse aux médicaments. *Méd Sci.* 2004; 20: 634–636.
66. Guengerich FP. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther.* 1992; 54: 17–61.
67. Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL, Mitchell JR. Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin Pharmacol Ther.* 1985; 38: 566–571.
68. Noda A, Hsu KY, Noda H, Yamamoto Y, Kurozumi T. Is isoniazid-hepatotoxicity induced by the metabolite, hydrazine? *J Uoeh.* 1983; 5: 183–190.