



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

ANNEE: 2016



THESE N°: 09/16 CSVS

UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE-RABAT-

CENTRE D'ETUDES DOCTORALES DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

SPECIALITE: GENETIQUE

Présentée par : M^{lle} Soukaina GUAOUA

**Etude des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1*
dans la population marocaine : Intérêt pharmacogénétique
dans la prise en charge des patients tuberculeux**

Formation : Biologie Médicale, Pathologie Humaine, Expérimentale et Environnement.

Soutenue publiquement le : 16 Décembre 2016

devant le Jury :

Pr. Rachida SOULAYMANI BENCHEIKH

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat.

Pr. Youssef BAKRI

Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Rabat.

Pr. Abderrazak KHADMAOUI

Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail-Kénitra.

Pr. Karim OULDIM

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès.

Pr. Jamal Eddine BOURKADI

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat.

Pr. Abdelaziz SEFIANI

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat.

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Dédicaces

Je dédie ce travail à tous ceux qui, par leur soutien et leur compréhension ont permis sa réalisation...

A mes parents. Présents toujours à mes côtés. Sans votre amour et votre soutien, je ne serai jamais arrivé là où je suis aujourd'hui. Ce travail est le fruit de vos sacrifices consentis pour mon éducation et ma formation. Je vous aime.

A mes sœurs Hasnae, Meriem, Nouhaila, Wissam, Salma, mon beau-frère Simohamed et mon cher neveu Yahya, tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour, mon respect et ma reconnaissance. Qu'Allah nous garde toujours réunis.

A toute ma famille, Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mes chers amis. Merci d'être aussi formidables

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Au Professeur Abdelaziz SEFLANI,

J'ai eu la chance de travailler dans votre laboratoire de Génétique Médicale et les travaux présentés n'auraient pas existé sans votre aide. Vous avez su avec patience me guider dans mes travaux de recherche par votre grand savoir et votre disponibilité.

Je ne saurai pas les mots à exprimer mon admiration pour vos qualités humaines, votre compétence et votre rigueur scientifique. Veuillez trouver dans ce travail l'assurance de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Au Professeur Rachida SOULAYMANI BENCHEIKH,

Merci de me faire l'honneur et le plaisir de présider le jury de cette thèse qui clôture ces quatre années d'études. Veuillez agréer, madame, l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Au Professeur Abderrazak KHADMAOUI

Vous me faites l'honneur d'accepter avec une grande amabilité de siéger parmi mon jury de thèse. Veuillez accepter ce travail professeur, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance.

Au Professeur Karim OULDIM

Vous m'avez honorés d'accepter avec grande sympathie de siéger parmi mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon grand respect et mes vifs remerciements.

Au Professeur Youssef BAKRI

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail en acceptant d'être rapporteur de ma thèse, je vous remercie. Veuillez trouver, dans ce travail, l'expression de mon respect et de mon admiration.

Au Professeur Jamal Eddine BOURKADI

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Veuillez accepter, l'expression de mes respects les plus profonds.

Je tiens à remercier Professeur Ilham RATBI,

Votre disponibilité, votre soutien et vos conseils m'ont été d'une grande aide. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma plus grande estime.

Voyez dans ce travail, mes remerciements pour tout ce que je n'aurais pas pu réussir sans votre aide. Cette thèse est le témoignage de votre énergie et votre détermination.

Si ce travail existe, il doit énormément,

A professeur Jamal TAOUFIK, directeur du Centre d'études doctorales des sciences de la vie et de la santé à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et mon grand respect.

Je remercie également tous mes professeurs ayant participés de près ou de loin à ma formation.

A mes collègues et amis, membres du Laboratoire de Génétique Médicale-INH à Rabat, qui m'ont soutenue et encouragée.

Permettez-moi de vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

Sommaire

INTRODUCTION ET OBJECTIFS	13
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	17
Chapitre 1 : Généralités sur la maladie de la tuberculose	18
1. Définition / Historique.....	18
2. Epidémiologie de la tuberculose.....	19
3. Physiopathologie de la tuberculose	24
4. Etiologie, transmission et formes de la tuberculose.....	28
5. Diagnostic positif de la tuberculose	30
6. Evolution et pronostic.....	34
7. Prise en charge thérapeutique.....	35
8. Effets indésirables des médicaments antituberculeux.....	39
Chapitre 2 : Données pharmacogénétiques et bases moléculaires de l'hépatotoxicité due aux antituberculeux	44
1. Les enzymes impliqués dans le métabolisme des anti-tuberculeux.....	47
2. Généralités sur les N-Acetyltransferases (NAT).....	50
2.1. Localisation, expression et structure des NAT.....	50
2.2. Principales fonctions des N-Acétyletransférases.....	53
2.3. Déterminisme génétique de la N-Acétyletransférases de type 2 (NAT2).....	55
2.4. Méthodes de détermination du polymorphisme génétique de NAT2.....	59
2.5. Association du polymorphisme génétique de la NAT2 avec des pathologies.....	62
3. Généralités sur les cytochromes P450	64
3.1. Classification et nomenclature.....	66
3.2. Localisation et structure des CYP450.....	68
3.3. Principales fonctions des cytochromes P450.....	68
3.4. Expression et polymorphisme génétique du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1).....	69
4. Généralités sur les Gluthation -S-Transferases.....	73
4.1. Fonction, classification et nomenclature des GST.....	73
4.2. GSTM1, gène et enzyme.....	74
4.3. Polymorphisme de GSTM1.....	74
4.4. GSTT, gène et enzyme.....	78

4.5. Polymorphisme de GSTT1	80
MATERIELS & METHODES.....	82
1. Population contrôle et patients.....	83
1.1. Population contrôle.....	83
1.2. Patients étudiés.....	83
2. Méthodes expérimentales.....	85
2.1. Recherche bioinformatique.....	85
2.2. Prélèvements des échantillons biologiques.....	86
2.3. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique.....	86
2.4. Dosage et contrôle qualitatif de l'ADN.....	90
2.5. Réaction d'amplification en Chaîne par Polymérisation (PCR).....	91
2.6. Séquençage de l'ADN.....	97
2.7. PCR en temps réel.....	101
2.8. Calculs des fréquences et exploitation statistique des résultats.....	113
RESULTATS.....	114
1ère partie : Résultats de la population contrôle.....	115
2ème partie : Résultats des patients marocains ayant développé une hépatotoxicité sous traitement anti-tuberculeux.....	121
DISCUSSION.....	128
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	135
RESUME.....	138
ABSTRACT.....	140
ملخص.....	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	144
ANNEXE.....	165
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	187

Liste des Figures

Figure 1 : Estimation du nombre absolu de cas de tuberculose et de décès (en millions par an), 1990-2014.

Figure 2 : Taux d'incidence de la tuberculose pour 100000 habitants déclaré par pays, l'année 2014.

Figure 3 : Evolution du nombre de cas et de l'incidence de TB au Maroc, 2000-2015 (Nouveaux cas et cas de rechutes).

Figure 4 : Répartition des cas de TB selon le sexe et l'âge au Maroc, 2015.

Figure 5 : Incidence de la TB toute forme par région au Maroc, 2015.

Figure 6 : Physiopathologie de l'infection par *M. tuberculosis* et mécanismes immunitaires sous-jacents.

Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme INH. Les principales enzymes impliquées dans cette voie sont indiqués dans les cases.

Figure 8 : Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8.

Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la NAT2 Humaine.

Figure 10 : Réaction de *N*-acétylation des xénobiotiques par les NAT.

Figure 11 : Activation et inactivation des arylamines par *N*-acétylation, *O*-acétylation, et *N*-,*O*- acétylation catalysées par la NAT2.

Figure 12 : Les différentes voies de métabolisation de l'isoniazide chez l'Homme.

Figure 13 : Schéma des voies majeures de biotransformation de la caféine.

Figure 14 : Répartition des CYPs dans le foie Humain.

Figure 15 : Position et structure du gène *GSTM1*.

Figure 16 : Mécanisme d'apparition de la délétion *GSTM1*.

Figure 17 : Position et structure du gène *GSTT1*.

Figure 18 : Position et structure du gène *GSTT2*.

Figure 19 : Fiche de renseignements cliniques des patients atteints d'hépatotoxicité due aux antituberculeux.

Figure 20 : Différentes étapes de la réaction d'amplification de la PCR.

Figure 21 : Analyse du signal et élaboration de séquence.

Figure 22 : Exemple de séquence obtenue par électrophorégramme.

Figure 23: Courbe reflétant les différentes étapes de la PCR en temps réel.

Figure 24: Le cycle seuil (Ct).

Figure 25 : Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay).

Figure 26 : Sonde TaqMan®MGB associée à non fluorescent quencher (NFQ).

Figure 27 : Protocole d'amplification utilisé.

Figure 28 : La discrimination allélique (Allelic discrimination plot).

Figure 29 : Exemple du profil obtenu après génotypage par PCR en temps réel des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1*.

Figure 30 : Electrophorégrammes obtenus après séquençage des quatre variants du gène *NAT2*.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différents stades de la tuberculose.

Tableau 2 : Clinique et diagnostic des tuberculoses extra-pulmonaires de l'adulte.

Tableau 3 : Posologie des médicaments antituberculeux standard.

Tableau 4 : Approche symptomatique des mesures à prendre en cas d'apparition d'effets indésirables en cours de traitement antituberculeux.

Tableau 5 : Interactions médicamenteuses des principaux antituberculeux.

Tableau 6 : Principaux allèles du gène *NAT2* humain.

Tableau 7: Liste de quelques substrats des cytochromes P450s.

Tableau 8 : Fréquence (%) des allèles rares *c2 (RsaI)* et *C (DraI)* et *CYP2E1*1D* (répétition) en fonction de l'ethnie.

Tableau 9 : Différentes formes alléliques du gène *GSTM1* humain.

Tableau 10 : Différentes formes alléliques du gène *GSTT1* humain.

Tableau 11:Fréquence observée des génotypes *NAT2* codant pour les phénotypes d'acétylation rapide (RA), intermédiaire (IA) et lent (SA) dans la population marocaine contrôlée étudiée.

Tableau 12 : Les fréquences des allèles *NAT2* parmi la population marocaine et d'autres groupes ethniques.

Tableau 13: Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme rs2031920 chez les individus contrôlés marocains.

Tableau 14: Fréquences génotypiques de polymorphisme rs2031920 du gène *CYP2E1* dans différentes populations du monde.

Tableau 15: Fréquence observée des génotypes *NAT2* codant les phénotypes d'acétylation, intermédiaires (IA) et lents (SA) chez 42 patients marocains avec hépatotoxicité induite par des médicaments antituberculeux.

Tableau 16: les fréquences des allèles des quatre variants du gène *NAT2* parmi les 42 patients marocains avec hépatotoxicité due au traitement anti-tuberculeux.

Liste des abréviations

- AA** : Acide aminé
- AAMU** : 5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracil
- ABP** : Aminobiphényle
- AcétylCoA** : Acétylcoenzyme A
- AcINH** : N acétylisoniazide
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNc** : ADN complémentaire
- AFMU** : 5- acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracil
- AI** : acétyleurs intermédiaires
- AL** : Acétyleurs lents
- ALAT** : Alanine Amino Transférase
- AMI** : Amikacine
- AR** :Acétyleurs rapides
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ASAT** : Aspartate aminotransférase
- ATDH** : Hépatotoxicité due au traitement antituberculeux
- ATS** : Société thoracique américaine (American Thoracic Society)
- BAAR** : Bacilles acido-alcool-résistants
- BET** : Bromure d'éthidium
- CDTMR** : Centre de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires
- CLHPou HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance
- Ct** : Cycle seuil ou Threshold cycle
- CYP2E1** : Cytochrome P450 2E1
- DAC** : désacétylases
- db** : double-brin
- ddNTP** : didésoxy-nucléotide tri-phosphate
- dNTP** :désoxy-nucléotide tri-phosphate
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- EIM** : Effets ou réactions indésirables aux médicaments
- EMB** : Ethambutol

EMX : Enzymes de métabolisation des xénobiotiques
FAM : 6-carboxyfluorocein
FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux ou Food and Drug
GST : Glutathione S-transférase
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
IA : Intermediate acetylors
IC : Intervalle de confiance
IGRA : Interferon Gamma Release Assay ou test de libération d'interféron gamma
IL : Interleukine
INH : Isoniazide
INF- γ : Interféron γ
LSN : Limite supérieure de la normale
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1
MDR : Multirésistances aux médicaments
MDR-TB : Mutidrug resistant TB ou Tuberculose multirésistante
MGB : Minor groove binder
MNT ou NTM : Mycobactéries non-tuberculeuses
MPI-1: Monocyte Inflammatory Protein-1
MTB: Mycobacterium Tuberculosis
NAT1 : N-Acétyletransférase de type 1
NAT2 : N-acetyltransferase de type 2
NFQ : Non fluorescent quencher
NO : Oxyde nitrique
NOS : Nitrite oxyde synthase
NTC : No Template Control
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAS : Acide para-aminosalicylique
PCR : Polymerase chain reaction
PhIP : 2-amino-1-méthyl-6-phényl-imidazo-[4,5- β]pyridine
PZA : Pyrazinamide
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RMP : Rifampicine
RSAP : Phosphatase alcaline rShrimp

SA : Slow acetylors

sb : simple brin

SDS : Solution Dodécyl Sulfate

SIDA :Syndrome d'immunodéficience acquise

SLB : Solution de lyse des globules blancs

SNP: Single nucleotide polymorphism ou Position nucléotidique polymorphe

SSCP : Polymorphisme de conformation des simples brins

TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine

TB: Tuberculose

TEP : Tuberculose extra-pulmonaire

Tm : Température de fusion

TNF- α : Facteur nécrosant tumoral alpha

TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive

TTF : TB toutes formes

UV : Ultra violet

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

WT : Allèle sauvage (Wild Type)

XDR/TB: Extensively drug resistant TB

XO : Xanthine oxydase

INTRODUCTION

ET OBJECTIFS

Les médicaments représentent une part importante des substances chimiques étrangères à l'organisme, encore appelées xénobiotiques, auxquelles l'homme est exposé en permanence. Il existe une grande variabilité inter-individuelle dans la réponse aux médicaments, tant en terme d'efficacité que de toxicité. Cette variabilité est en partie expliquée par différents facteurs physiopathologiques comme l'âge, le sexe, la grossesse, les pathologies associées, les fonctions hépatique et rénale des patients, ainsi que par des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, la co-administration des médicaments, le tabagisme, etc. Cependant, il est désormais reconnu que des anomalies affectant les gènes codant pour des protéines impliquées dans la distribution des médicaments, leur métabolisme ou codant pour leur(s) cible(s) thérapeutique(s), comme des récepteurs par exemple, représentent une cause majeure des variations d'efficacité et de toxicité des molécules médicamenteuses.

La pharmacogénétique est la discipline qui étudie l'effet des gènes et de leurs variants sur la réponse aux médicaments. Il s'agit d'une thématique pluridisciplinaire, qui combine des éléments de pharmacologie, pharmacocinétique, biochimie, génétique et biologie moléculaire. Elle a pour but ultime le développement de tests simples permettant d'identifier les individus à risque d'anomalies de réponse aux médicaments, et ceci, avant leur administration si possible pour une adaptation personnalisée du protocole et des doses des médicaments administrés à chaque patient dans le but d'optimiser leur efficacité et éviter leurs effets indésirables.

Les variations d'origine génétique font l'objet de la pharmacogénétique et de nombreux exemples montrent l'importance des facteurs génétiques dans la réponse aux médicaments [1]. Le déficit en thiopurine-méthyl-transférase explique les myélotoxicités observées lors du traitement par l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine [2]. Le déficit en UDG glucosyl transférase (UGT1A1), responsable de la maladie de Gilbert, augmente le risque de toxicité intestinale de l'irinotécan [3]. Les mutations du gène *p53* dans les tumeurs modifient la réponse au traitement et en particulier à la chimiothérapie [4]. Parmi les exemples importants les plus étudiés dans différentes populations du monde, on peut citer la N-acétyltransférase 2 (NAT2) impliquée dans le métabolisme de l'isoniazide (INH) [5-9].

Le choix d'étude de la tuberculose (TB) a été motivé par le fait que c'est une maladie infectieuse qui reste à ce jour l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde entier. D'après les services épidémiologiques du ministère marocain de la Santé, 28,955 nouveaux cas de tuberculose ont été signalés en 2015, avec une incidence de 89 nouveaux cas pour 100.000 habitants [10].

Les principaux médicaments pour traiter la tuberculose sont l'isoniazide (INH), la rifampicine (RMP) la pyrazinamide (PZA), et l'éthambutol (EMB) et / ou la streptomycine utilisées en combinaison pendant au moins 6 mois [11]. Le traitement de la tuberculose provoque des réactions indésirables aux médicaments (EIM), à type d'hépatite, l'intolérance gastro-intestinale, l'insuffisance rénale, des réactions cutanée et hématologique, ce qui peut conduire à l'arrêt de la thérapie ou à une morbidité et une mortalité plus graves [12]. Parmi les médicaments anti-tuberculeux de première ligne, l'INH est le plus efficace, mais aussi celui qui peut facilement causer une hépatotoxicité, qui est de loin l'effet indésirable le plus grave, responsable d'une morbidité importante. L'augmentation du taux d'Alanine AminoTransférase (ALAT) deux fois par rapport au niveau normal dans le sérum et son déclin après l'arrêt du traitement confirme le diagnostic d'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux [13]. L'incidence de l'hépatotoxicité induite par les médicaments antituberculeux (ATDH) varie de 1% à 36% [12, 14-16]. Habituellement, le temps de l'apparition de cette hépatotoxicité est à quelques mois de l'instauration du traitement [14].

Le risque d'hépatotoxicité a été attribuée à la variabilité génétique dans les gènes arylamine N-acetyltransférase 2 (*NAT2*), et le cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) [5-7, 17]. Le gène *NAT2* couvre 9,9 kb (Chromosome 8 positions dans 18,293,034-18,302,961 NCBI B35 assemblage) et se compose d'un exon non codant à l'extrémité 5', séparés par un intron de 9 kb provenant d'une région codante ininterrompue de 873 pb. *NAT2*, une enzyme cytosolique de phase II de conjugaison, métabolise l'INH en acétylisoniazide dans le foie. L'Acétylisoniazide est hydrolysé en acetylhydrazine, qui est oxydé par le cytochrome P450 2E1 pour former certains intermédiaires hépatotoxiques [13, 18]. L'élimination des acetylhydrazines dépend également plus de l'acétylation par *NAT2* pour former un métabolite non toxique, diacetylhydrazine [19, 20].

Des variants dans le gène *NAT2* affectent l'activité des médicaments antituberculeux et aboutissent à trois phénotypes différents, le phénotype d'acétylation rapide qui se compose de deux copies de l'allèle sauvage (WT), un phénotype intermédiaire composé d'un allèle sauvage et un allèle muté, et un phénotype acétyleur lent comprenant deux allèles mutés.

Parmi les sept SNP les plus courants, quatre entraînent des changements d'acides aminés conduisant à une diminution significative de la capacité d'acétylation et sont associés au phénotype acétyleur lent : rs1801280 (c.341T>C; *NAT2**5), rs1799930 (c.590G>A; *NAT2**6), rs1799931 (c.857G>A; *NAT2**7) et rs1801279 (c.191G>A; *NAT2**14) [19, 21]. Les trois autres SNP rs1041983 (c.282C>T; *NAT2**13A), rs1799929 (c.481C>T;

NAT2*11A), rs1208 (c.803A>G; NAT2*12A) sont des SNP synonymes ou ne modifient pas le phénotype [19, 21].

L'allèle NAT2*4 est considéré comme l'allèle de référence dans le cas d'absence de tous les SNP connus, et il est désigné comme un allèle rapide [22, 23].

La proportion des différents phénotypes acétyleurs varie entre les groupes ethniques [5-7, 17, 18, 24]. De plus, il a été démontré que le polymorphisme RsaI/PstI (rs2031920; -1053 C>T (Rsa 1 c1>c2)) dans la région flanquante 5' du gène *CYP2E1* localisé sur le chromosome 10q24.3qter peut affecter l'activité ou l'inductibilité de l'enzyme CYP2E1 et contribuer à aggraver l'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux [25-27].

Le premier but de cette étude était de déterminer la distribution des fréquences alléliques et génotypiques des variants des gènes *NAT2* et *CYP2E1* chez des individus contrôles marocains afin d'estimer la prévalence des acétyleurs lents parmi les marocains, qui sont confrontés au risque de développer une hépatotoxicité sous traitement antituberculeux. Le deuxième but était de vérifier le profil d'acétylation chez des patients marocains ayant développé une hépatotoxicité sous traitement antituberculeux.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre1 : Généralités sur la maladie de la tuberculose

1. Définition / Historique

La tuberculose (TB) est une maladie humaine persistante et ré-émergente causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* isolée par Koch en 1882. Plus de 2 milliards d'individus sont contaminés par le bacille, soit un tiers de la population mondiale. Après une primo-infection, la maladie évoluera vers une forme active chez une personne contaminée sur dix. La mortalité liée à cette pathologie reste élevée, près de 1,6 et 2 millions de décès par an, malgré l'introduction d'une thérapie efficace dans les années 1960 [28]. La maladie touche en priorité (75 %) les 15-45ans, le groupe économiquement le plus productif.

Les origines de la tuberculose semblent remonter aussi loin que l'histoire de l'humanité s'en souviennent. Dès la préhistoire et pour ne citer que l'une des civilisations les plus prestigieuses, on sait qu'elle n'a épargné ni le petit peuple de l'ancienne Egypte, ni leurs prêtres, ni même le grand pharaon Akhenaton [29]. Pendant les siècles suivants, la tuberculose sévira sans discontinuer, de la Grèce antique à la Renaissance où au milieu du 16^{ème} siècle un médecin italien, Girolamo Fracastoro, en soulignera la contagiosité[30]. Il faudra encore attendre le début du 19^{ème} siècle pour que Laennec en donne une description scientifique [31-33], et qu'à la suite des travaux de Pasteur, le bacille soit isolé par Robert Koch en 1882[34-36]. La tuberculose est la maladie emblématique du 19^{ème} siècle où elle est responsable d'une partie non négligeable des décès. D'abord associée au statut social des grands romantiques comme Musset, Chopin, Paganini ou encore « la Dame aux Camélias » de Dumas fils qui meurent tous de poumons tuberculeux, elle devient bientôt liée à la médiocrité de l'environnement des classes populaires. La découverte des antibiotiques en 1945, marque la fin de l'âge des sanatoriums qui représentent des établissements dont le but est de lutter contre la tuberculose. En 1859, Herman Brehmer a ouvert son Heilenstat sanatorium dans le village de Gomersdorf Montagne de Silésie où il a souligné un régime de repos, une alimentation riche, et un exercice surveillé soigneusement. Ce sanatorium est généralement considéré comme la première installation consacrée au traitement de la tuberculose, bien que Harriet Ryan Albee avait ouvert la Channing maison dans le sous-sol de l'église Boston deux ans plus tôt [34, 37, 38].

Alors que la maladie est considérée comme vaincue dans les pays industrialisés, elle resurgit au début des années 1990 sous une forme plus virulente. L'apparition du VIH/Sida et les migrations internationales de populations ont aggravé l'épidémie mondiale. Le VIH constitue le facteur de risque le plus important pour l'évolution de l'infection tuberculeuse latente vers la maladie active [39]. En plus des effets indésirables du VIH sur la tuberculose, les études ont montré que la réponse immunitaire à la tuberculose stimule la reproduction du VIH et pourrait accélérer la progression naturelle de l'infection à VIH [40]. Cent trente quatre ans après son identification, la tuberculose reste une maladie infectieuse préoccupante à l'échelle du monde, avec 9 millions de nouveaux cas tuberculeux survenant chaque année dans le monde, et pas moins de 2 millions de décès dus à cette maladie [41, 42].

2. Epidémiologie de la tuberculose

2.1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde

Les efforts déployés ces dernières années dans le monde en ce qui concerne la détection, la prise en charge et la prévention tuberculeuse nous permettent désormais d'appréhender le poids de la morbi-mortalité de cette maladie au niveau mondial.

L'incidence de la tuberculose a diminué en moyenne de 1,5% par an depuis 2000 et elle est maintenant de 18% inférieure par rapport au niveau de 2000 (Figure 1) [43]. En 2014, on estime 9.6 millions de nouveaux cas de tuberculose dans le monde, 5.4 millions d'hommes, 3.2 millions de femmes et 1 million d'enfants [43]. Globalement 12% de ces nouveaux cas sont VIH positif. En 2014 la tuberculose a tué 1.5 millions de personnes (1.1 million VIH négatif et 0.4 million de séropositifs) [43]. Le bilan comprend 890 000 hommes, 480 000 femmes et 140 000 enfants [43].

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que c'est dans les régions de l'Asie du Sud-est et du Pacifique occidental que les cas ont été les plus nombreux en 2014, avec 58% de l'incidence mondiale. La région africaine enregistre 28% des cas mondiaux, mais la charge la plus sévère par rapport à la population estimée à 281 cas pour 100 000 personnes, soit plus du double de la moyenne mondiale de 133 (Figure 2).

L'Inde, l'Indonésie et la Chine ont eu le plus grand nombre de cas: 23%, 10% et 10% du total mondial, respectivement. Globalement, la prévalence de la tuberculose en 2015 était de 42% inférieure à celle de 1990. L'objectif de réduire de moitié le taux de mortalité de la tuberculose en 2015 par rapport à 1990 a été atteint dans quatre régions de l'OMS - la région

d'Amérique, la région de la Méditerranée orientale, la région de l'Asie du Sud-Est et la région du Pacifique occidental - et dans 11 pays à forte charge (Brésil, Cambodge, Chine, Ethiopie, Inde, Myanmar, Pakistan, Philippines, Ouganda, Viet Nam et Zimbabwe). Les trois objectifs de 2015 (pour l'incidence, la prévalence et la mortalité) ont été atteints dans neuf pays à forte charge - le Brésil, le Cambodge, la Chine, l'Ethiopie, l'Inde, le Myanmar, la Philippines, l'Ouganda et le Viet Nam.

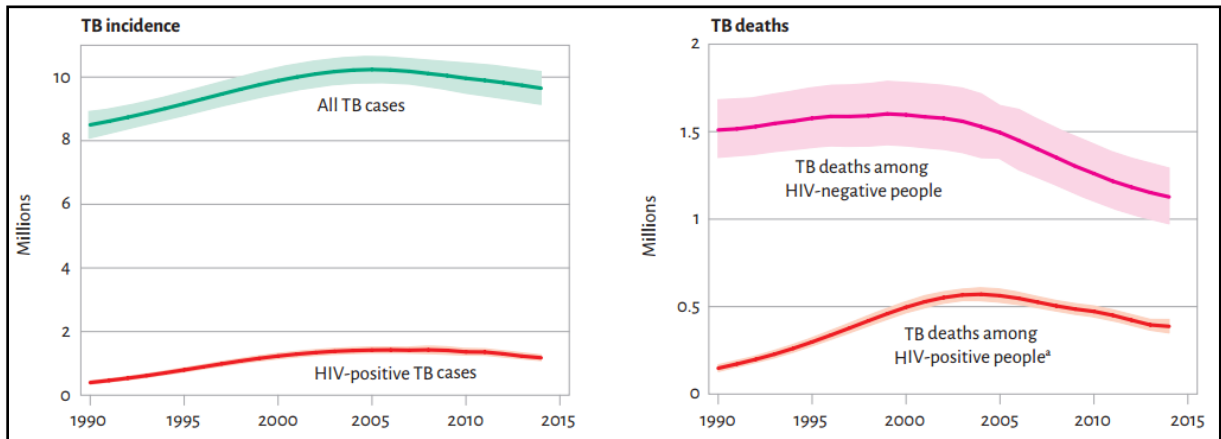


Figure 1 : Estimation du nombre absolu de cas de tuberculose et de décès (en millions par an), 1990-2014 [43].

Les décès associés au VIH sont classés comme décès dus au VIH selon la CIM-10.

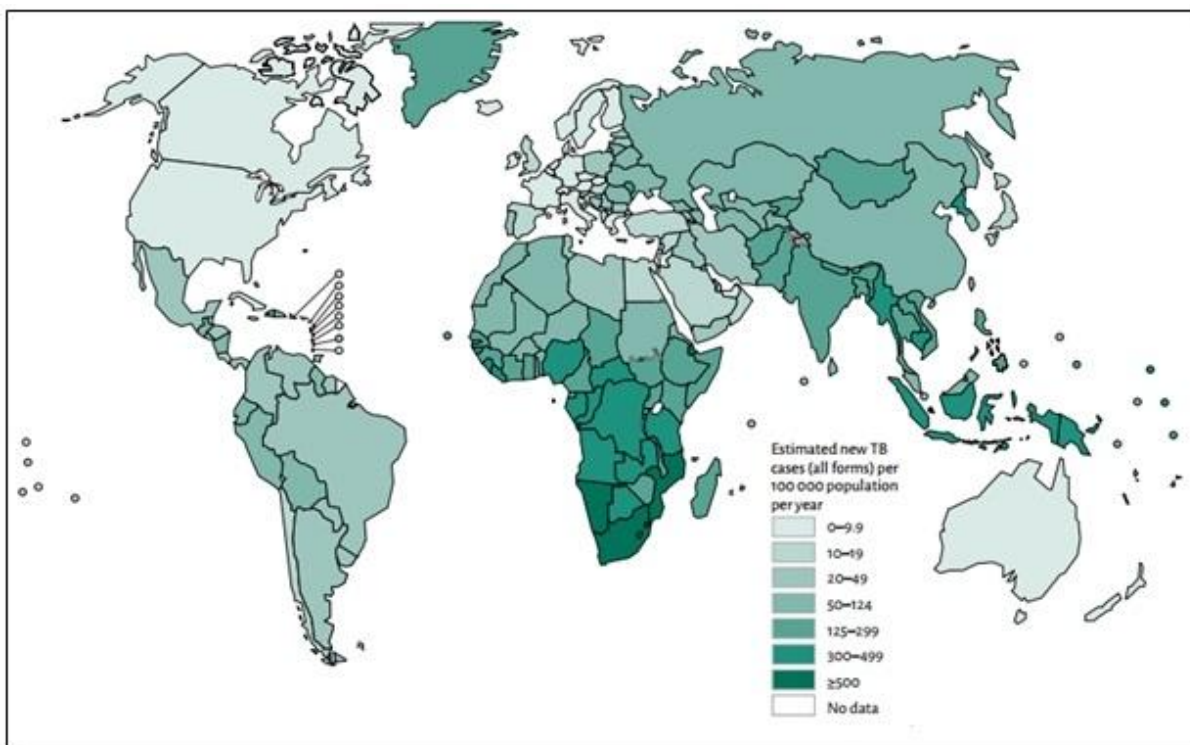


Figure2 : Taux d'incidence de la tuberculose pour 100000 habitants déclaré par pays, l'année 2014 [43].

Au cours des vingt dernières années depuis que l'OMS a établi un système de déclaration mondial en 1995, il a reçu des rapports de 78 millions de cas de tuberculose, dont 66 millions ont été traités avec succès. En 2014, ce système a mesuré une augmentation marquée des déclarations de TB mondiales pour la première fois depuis 2007. Le total annuel de nouveaux cas de tuberculose, qui avait été d'environ 5.7 millions jusqu'en 2013, est passé à un peu plus de 6 millions en 2014 (soit une augmentation de 6%). Cela est principalement dû à une augmentation de 29% des notifications en Inde, qui a suivi la mise en place d'une politique de notification obligatoire en mai 2012, la création d'un système d'information national sur le Web en Juin 2012 et l'intensification de ses efforts pour engager le secteur privé de la santé. L'Inde a représenté 27% des notifications mondiales de la tuberculose en 2014.

Globalement, le taux de succès du traitement pour les personnes nouvellement diagnostiquées avec la tuberculose était de 86% en 2013, un niveau qui a été soutenue depuis 2005. Les taux de succès du traitement exigent une amélioration dans la région d'Amérique et la région Européenne (75% dans les deux régions en 2013).

À l'échelle mondiale, on estime que 3,3% des nouveaux cas de tuberculose et 20% des cas traités antérieurement ont une tuberculose résistant aux traitements MDR-TB (multi drug resistant TB), un niveau qui a peu changé au cours des dernières années. En 2014, on estime que 190 000 personnes sont mortes de la tuberculose multirésistante.

2.2. Epidémiologie de la tuberculose au Maroc

Selon les estimations de l'OMS pour l'année 2014, le nombre annuel de cas incidents de la tuberculose au Maroc était d'environ 36.000. En 2015, un total de 30.636 cas de tuberculose, toutes formes confondues (28.955 nouveaux cas et 1.681 cas de rechutes), a été notifié, soit une incidence de 89 cas pour 100 000 habitants. Le nombre de décès par TB était de 656 cas. En 2015, 160 patients ont développé une tuberculose multirésistante (MDR-TB). Entre 2000 et 2015, l'incidence globale a régressé de 17% et celle de la forme pulmonaire à frottis positif a régressé de 20% (Figure 3) [10].

La proportion de la forme extra-pulmonaire (TEP) était la plus élevée en 2015, avec 52% des cas (dont 3% étaient des cas de primo-infection tuberculeuse), contre 48% des cas de tuberculose pulmonaire. Les cas de TB confirmés bactériologiquement en 2015 ont représenté 44% des cas notifiés, contre 56% des cas diagnostiqués selon des critères cliniques. La distribution selon l'âge révèle que près des 2/3 des cas étaient des adultes jeunes, d'âge compris entre 15 et 44 ans. 60% des cas enregistrés concernaient des hommes (Figure 4) [10].

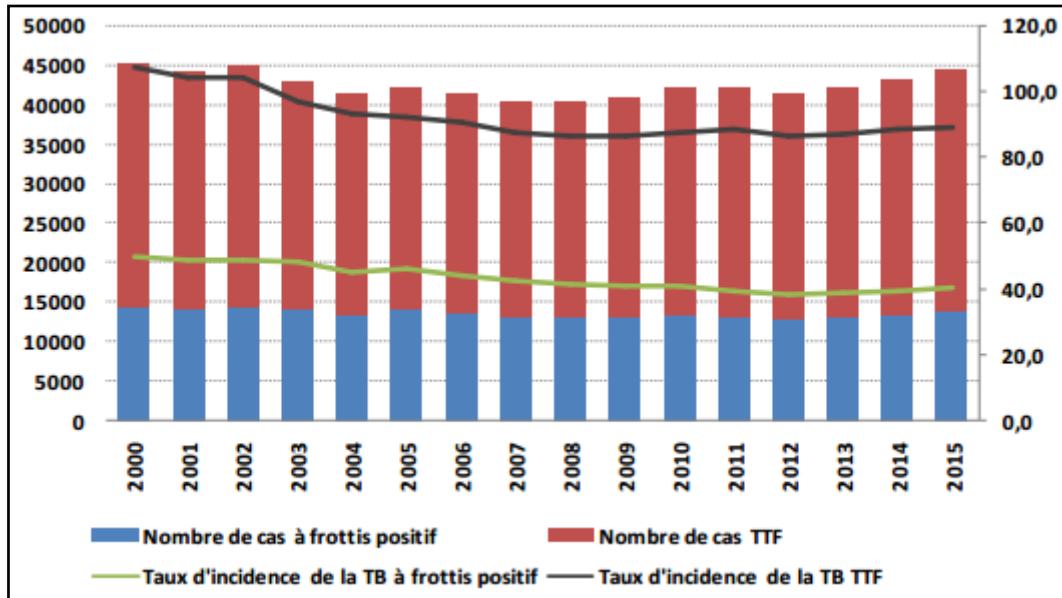


Figure 3 : Evolution du nombre de cas et de l'incidence de TB au Maroc, 2000-2015 (Nouveaux cas et cas de rechutes)[10].
TTF :TB toutes formes

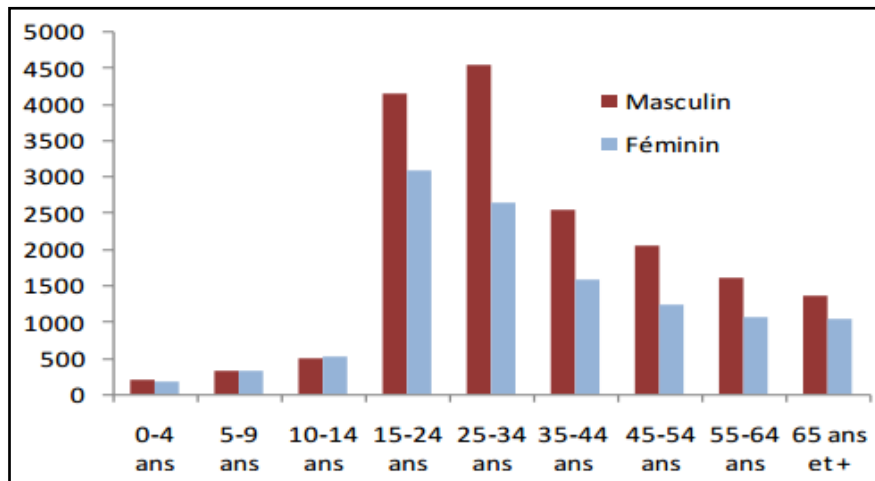


Figure 4 : Répartition des cas de TB selon le sexe et l'âge au Maroc, 2015[10].

La distribution géographique révèle que 5 régions ont totalisé, à elles seules, 58 % des cas de tuberculose notifiés, avec une incidence dépassant la moyenne nationale. Ces régions étaient représentées par le Grand Casablanca, Tanger-Tétouan, Rabat-Salé-Zemmour-Zaër, Gharb-Chrarda-Beni-Hssen et Fès Boulemane (Figure 5). La maladie s'est concentrée en milieu urbain et a affecté plus particulièrement les quartiers défavorisés des grandes villes[10].

3. Physiopathologie de la tuberculose

Bien que la tuberculose pulmonaire soit l'infection la plus connue et la plus courante, les pathologies humaines causées par *M. tuberculosis* peuvent prendre d'autres formes tel que les inflammations ganglionnaires, les formes cutanées et disséminées.

3.1. Physiopathologie de l'infection de la tuberculose pulmonaire

La tuberculose est une maladie pulmonaire dans plus de 85 % des cas. La voie principale de transmission interhumaine de la tuberculose est l'inhalation d'aérosols infectés par *M.tuberculosis*. D'un point de vue chronologique on distingue la primo-infection, la phase de latence et la phase d'infection secondaire selon les patients (Tableau 1). La phase de latence et l'infection secondaire sont des événements dont la durée et la survenue dépendent de l'état du système immunitaire du patient en question. Si le facteur âge, la co-infection avec le virus du SIDA, les traitements faisant usage d'immunosuppresseurs et la malnutrition sont connus pour provoquer un déséquilibre de la balance immunologique vers une réactivation, ce passage de la tuberculose latente à une infection secondaire reste sujet à controverse.

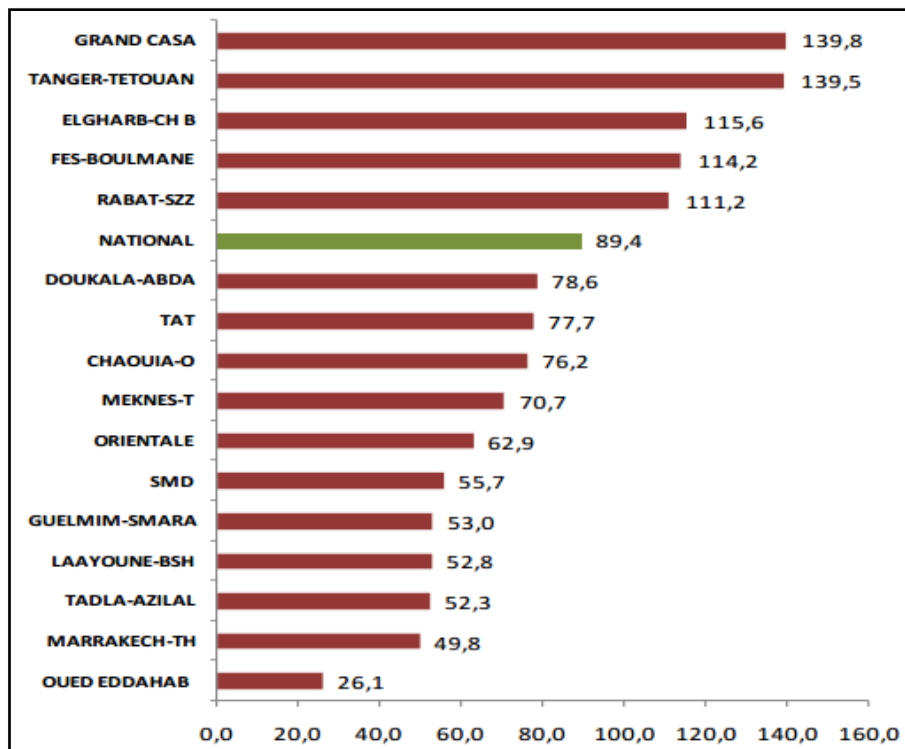


Figure 5 : Incidence de la TB toute forme par région au Maroc, 2015[10].

Exposition à la tuberculose		Contact avec un patient tuberculeux contagieux
Primo-infection		Symptômes généraux, éventuellement toux épisodique peu frappante. Eventuellement signes radiologiques avec augmentation du hile pulmonaire et infiltrat
Infection tuberculeuse latente		Aucun signe manifeste de maladie. Sensibilisation des lymphocytes T (mise en évidence par test à la tuberculine ou test IGRA)
Apparition de la tuberculose	Tuberculose primaire	Apparition de la maladie peu après la contamination (souvent chez les personnes immunodéficientes et les personnes en bas âge), fièvre, toux, grossissement des ganglions lymphatiques, épanchement pleural
	Réactivation	Atteinte pulmonaire et/ou extrapulmonaire avec signes cliniques et/ou radiologiques
	Séquelles de tuberculose	Lésions fibreuses, bronchectasies, calcifications, cicatrices, pas d'activité bactérienne, le plus souvent aucun symptôme sauf les bronchectasies

Tableau 1 : Les différents stades de la tuberculose[44].

***La primo-infection**

Sur le plan clinique, la primo-infection tuberculeuse est en règle générale asymptomatique. Les mycobactéries inhalées vont être transportées à travers la cavité pulmonaire jusqu'aux alvéoles où elles sont phagocytées par un certain nombre de cellules phagocytaires dont les macrophages (Figure 6). Il est aussi possible que les bacilles soient initialement ingérés par les pneumocytes de type II (cellules épithéliales alvéolaires). Après une courte période d'un état asymptomatique, le devenir de l'infection va dépendre de la capacité du système immunitaire du sujet à contrôler ou pas la prolifération du bacille. Dans des circonstances normales, pour environ 90% personnes infectées, l'infection ne conduira pas à la maladie [45, 46].

L'internalisation du bacille dans le macrophage va induire une réponse proinflammatoire locale qui va permettre le recrutement de cellules mononuclées pour contenir l'infection [46]. Les macrophages sont dotés, en plus de leur fonction phagocytaire, de fonctions bactéricide et sécrétoire qui sont essentielles dans la réponse immunitaire et inflammatoire anti-infectieuse. L'activation du phagosome résulte normalement en une série d'évènements devant conduire à la mort du microorganisme englouti. Ces événements incluent (i) une acidification progressive du phagosome due à l'activité de la pompe à proton ATPase, (ii) la fusion phagosome-lysosome devant conduire à l'activation d'enzymes protéolytiques, (iii) l'induction d'espèces réactives de l'oxygène et d'intermédiaires azotés et (iv) le « processing » des antigènes qui consiste en un processus immunologique qui prépare des antigènes par des transformations physicochimiques pour la présentation à des cellules particulières du système immunitaire appelées lymphocytes T. De façon paradoxale, les mycobactéries sont capables de survivre et de se multiplier dans le macrophage. Une fois le macrophage lysé, les bacilles sont libérés dans le milieu et vont infecter d'autres macrophages[47].

Cette infection cyclique est sous le contrôle du système immunitaire. En effet, le macrophage en réponse à ces différentes rencontres va produire de nombreux médiateurs qui vont signaler l'infection [48, 49]. Grâce aux chimiokines MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), MPI-1 (Monocyte Inflammatory Protein-1) et les RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), ils vont alerter et recruter les autres cellules du système immunitaire.

Ces mêmes cellules assurent également une fonction de cellules présentatrices d'antigènes mycobactériens et déclenchent une expansion clonale de cellules lymphocytaires capables de reconnaître les mycobactéries [50]. Les phagocytes mononucléaires sont surtout capables de sécréter des cytokines, IL-12 (Interleukine-12), IL-10 et aussi IL-18 qui vont influencer la

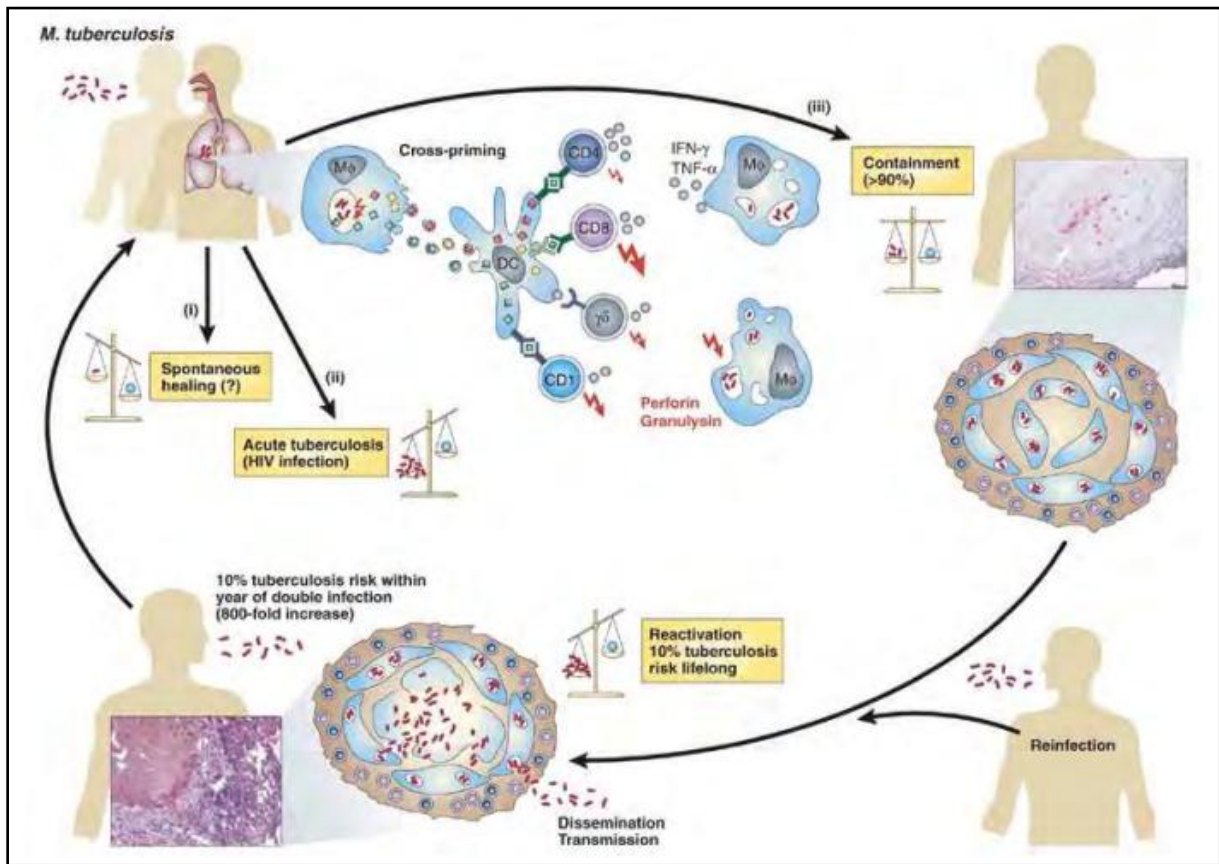


Figure 6 : Physiopathologie de l'infection par *M. tuberculosis* et mécanismes immunitaires sous-jacents [51].

Le bacille de la tuberculose *M. tuberculosis* infecte l'homme par inhalation de gouttelettes contenant des bacilles. Trois cas de figure peuvent se présenter: (i) soit le bacille est éradiqué immédiatement par le système immunitaire pulmonaire (cas rare voire inexistant), (ii) soit l'infection est transformée en tuberculose (cas des sujets immunodéprimés, coinfection avec le VIH...). (iii) soit l'infection ne se transforme pas immédiatement en maladie et le bacille est confiné dans le granulome. Après inhalation, les bacilles sont phagocytés par les macrophages et cellules dendritiques. Ces cellules présentent les antigènes mycobactériens à différentes populations de lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques drainants. Les lymphocytes T CD4+, CD8+, les cellules T $\gamma\delta$, les cellules T restreints par le CD1, jouent un rôle dans la protection contre la tuberculose. Les cytokines sécrétées activent les macrophages et la lyse des cellules infectées se fait grâce à la perforine et la granulysine sécrétées par les cellules T.

réponse des cellules T. L'IL-12 seule et/ou en synergie avec IL-18 polarisent les cellules T vers une réponse de type TH-1[49]. Ces résultats ont été confirmés par des études comparatives de la production et d'expression de cytokines dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les tissus entre patients tuberculeux et sujets sains [52, 53].

En réponse à cette activation, les cellules T produisent l'interféron γ (INF- γ), essentiel dans la défense immunitaire contre *M. tuberculosis* et le facteur nécrosant tumoral alpha (TNF- α). En effet l'INF- γ , principalement sécrété par les cellules T mais aussi par les macrophages, est le facteur majeur d'activation des macrophages souvent associé à la production de l'oxide nitrique (NO) par la nitrite oxide synthase (NOS) [54, 55]. Sa sécrétion va stimuler le macrophage à produire d'avantage d'IL-12. Le TNF- α agit en synergie avec l'INF- γ dans l'activation mais assure un rôle dans la structuration du granulome. Ils peuvent également exercer une activité cytotoxique grâce à leur capacité à sécréter de la granulisine et de la perforine [56].

L'activation du macrophage, en plus du recrutement de différentes cellules immunitaires (monocytes circulants et neutrophiles qui vont se différencier en macrophages et cellules dendritiques et des lymphocytes T), va aboutir à la formation du granulome. Le granulome est une structure organisée caractérisée par la présence de macrophages activés, de cellules épithélioïdes, de « foamy » macrophages avec des cellules lymphocytaires à la périphérie [57]. Une autre caractéristique remarquable du granulome est la présence de nécroses caséuses dans les cas d'infection de l'homme, du lapin et du cochon d'Inde alors que dans les cas d'infection expérimentale de souris, elle n'a jamais été observée [58, 59]. C'est à ce stade que la transmission interindividuelle peut se produire par voie orale suite à la libération de gouttelettes liquéfiées contenant des bacilles. Bien qu'étant la première ligne de défense cellulaire, le macrophage est également le premier site de réplication du bacille et pourrait favoriser la dissémination. En effet, les travaux de divers auteurs ont mis clairement en évidence le rôle des macrophages dans la dissémination du bacille vers d'autres organes [60-62].

4. Etiologie, transmission et formes de la tuberculose

4.1. Etiologie

La tuberculose est causée par un micro-organisme aérobie à croissance lente de la famille des mycobactériacées. Chez l'homme comme chez l'animal, on distingue des formes pathogènes,

occasionnellement pathogènes et des formes non pathogènes. Chez l'être humain, le *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) est la mycobactérie qui est le plus souvent à l'origine de la tuberculose. Parmi les mycobactéries du complexe *tuberculosis* figurent, outre le *M. tuberculosis*, les espèces *M. bovis*, *M. africanum*, ainsi que les très rares espèces que sont *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* et *M. pinnipedii* [63, 64].

4.2. Transmission

La tuberculose est transmise par voie aérogène, d'une personne atteinte de tuberculose pulmonaire à une personne non infectée. L'infection se transmet par un aérosol de micro-gouttelettes de sécrétions bronchiques («droplet nuclei»), qui sont projetées dans l'air ambiant par la toux et sont inhalées par une personne saine entrant en contact avec les gouttelettes. Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries dans l'air ambiant, de la virulence des micro-organismes, de la durée d'exposition, de la prédisposition de la personne en contact et en particulier de l'état de son système immunitaire.

4.3. Formes de la tuberculose extrapulmonaire

Lymphadénite tuberculeuse

La lymphadénite tuberculeuse est la manifestation extrapulmonaire la plus fréquente des atteintes extrapulmonaires. Il existe généralement peu de symptômes généraux. Classiquement, on assiste à une augmentation progressive et peu douloureuse des ganglions cervicaux et sous-mandibulaires. Certains sujets présentent une atteinte des ganglions médiastinaux et rétropéritonéaux.

Tuberculose pleurale

La tuberculose pleurale, due en général à l'extension directe d'un foyer pulmonaire et plus rarement à une dissémination par voie sanguine, se déclare normalement unilatéralement. Le diagnostic bactériologique est difficile à poser et repose le plus souvent sur l'examen de biopsies pleurales [65], sur les marqueurs de la tuberculose dans le liquide pleural [66] ou sur l'examen des expectorations induites en cas d'atteinte pulmonaire simultanée [67]. La mise en évidence d'adénosine désaminase ou d'interféron gamma dans le liquide pleural peut faire suspecter une origine pleurale de la tuberculose [68].

Tuberculose génito-urinaire

La tuberculose génito-urinaire s'accompagne d'une pyurie stérile à l'examen bactériologique de routine ou d'une hématurie asymptomatique.

Tuberculose osseuse

La tuberculose osseuse s'observe plutôt chez les malades âgés et touche surtout la colonne vertébrale thoracique.

Méningite tuberculeuse

La méningite tuberculeuse se manifeste par de la fièvre, des céphalées (maux de tête), des troubles de la conscience et le plus souvent par une altération rapidement progressive de l'état général [69, 70].

Tuberculose miliaire

La tuberculose miliaire (du latin *milium*, signifiant millet), qui fait suite à une dissémination hématogène de mycobactéries, reste l'une des formes les plus graves de tuberculose et, même si elle est traitée de manière appropriée, son pronostic est sombre [71, 72]. Elle se caractérise par une image radiologique typique comportant des centaines de granulations de quelques millimètres. Elle touche en priorité les enfants en bas âge, les personnes âgées et les sujets immunodéficients.

5. Diagnostic positif de la tuberculose

Le diagnostic de la tuberculose active repose sur la mise en évidence de mycobactéries du complexe *tuberculosis* («complexe MTB») dans des prélèvements (expectorations ou autres) et donc d'un cas de tuberculose confirmée. Ni l'examen clinique ni la radiologie ne permettent d'apporter la preuve formelle de la présence d'une tuberculose active (on parle alors de cas suspect ou de cas non confirmé). Le test à la tuberculine ou les nouveaux tests IGRA (Interferon Gamma Release Assay ou test de libération d'interféron gamma) fournissent des indices d'une infection à MTB mais ne permettent pas de poser un diagnostic d'une tuberculose active.

5.1. Les manifestations cliniques de la tuberculose

Le tableau 2 montre la diversité des manifestations cliniques en fonction de la localisation de la tuberculose. Il détaille également les examens de diagnostic à envisager.

5.2. Examens paracliniques

Recherche passive et active de la maladie

Par recherche passive, on entend la recherche de la maladie chez des individus qui ont spontanément recours au médecin en raison de leurs symptômes. C'est ce qui se passe en règle générale. Par opposition, on entend par recherche active une série d'examens effectués indépendamment des symptômes. Dans les pays industrialisés, ils effectuent en premier lieu une radiographie thoracique qui, si elle est pathologique, est suivie d'analyses bactériologiques.

Radiologie

Les anomalies visibles sur le cliché thoracique constituent le signe le plus probant de la présence d'une tuberculose et, s'il s'agit d'une tuberculose, leur extension est corrélée au résultat des examens bactériologiques des expectorations [73].

De nouvelles analyses ont cependant montré que les constats radiologiques étaient fiables et permettaient la détection de la tuberculose avec un degré élevé de certitude. Toutefois, l'aspect radiologique ne permet pas de distinguer les cas de tuberculose en activité bactériologique des cas anciens, inactifs ou déjà traités [74, 75].

Prélèvement d'échantillons

Pour le diagnostic de la tuberculose, il est très important d'effectuer des prélèvements d'un organe atteint. Pour ce qui est de la tuberculose pulmonaire, le prélèvement d'expectorations – de préférence le matin à jeun, au lever – est indispensable, car il fournit une indication sur le caractère infectieux du cas.

Microbiologie

Le diagnostic d'une tuberculose active est posé en apportant la preuve de la présence de mycobactéries du complexe *tuberculosis* («complexe MTB») dans un prélèvement. Cette mise en évidence peut être apportée par une méthode génético-moléculaire et/ou par les cultures.

Localisation de la maladie	Manifestations cliniques	Examens de diagnostic à envisager
Colonne vertébrale	Douleurs dorsales Tassements vertébraux Abcès paravertébraux Douleur radriculaire Signes neurologiques	Radiographie CT scan ou RMN Biopsie*
Os	Ostéomyélite chronique	Radiographie CT scan ou RMN Biopsie*
Articulations périphériques	En général, monoarthrite notamment de la hanche ou du genou	Radiographie CT scan Biopsie synoviale*
Tube digestif	Masse abdominale Diarrhée	Radiographie Ponction de masse sous CT scan ou échographie Endoscopie + biopsie*
Foie	Douleur et masse dans le quadrant supérieur droit de l'abdomen	Echographie Biopsie*
Reins et voies urinaires	Mictions fréquentes Dysurie Hématurie et pyurie stérile Douleurs lombaires Masse lombaire	Culture sur urines matinales Pyélographie Echographie ou CT scan Biopsie*
Surrénales	Signes d'insuffisance surrénalienne : hypotension, natrémie basse, kaliémie normale à élevée, urémie élevée, hypoglycémie	Radiographie (calcifications) Echographie ou CT scan Biopsie*
Appareil génital féminin	Stérilité Salpingite aiguë Grossesse extra-utérine	Examen du pelvis Echographie ou CT scan Biopsie*
Appareil génital masculin	Epididymite Orchite	Biopsie*
Voies respiratoires supérieures (complication fréquente de la tuberculose pulmonaire)	Raucité de la voix Otalgie Douleur à la déglutition	Laryngoscopie Biopsie* (si pas de diagnostic via les expectorations)
Plèvre (le plus souvent complication d'un foyer parenchymateux juxtapleural)	Douleur Dyspnée	Radiographie du thorax Examen bactériologique des expectorations Ponction pleurale Biopsie*
Péricarde	Peut rester asymptomatique sauf en cas de tamponnade	Radiographie Echographie/ CT scan Ponction
Péritoine	Ascite	Echographie/CT scan Ponction
Ganglions intra-thoraciques (médiastinaux)	Compression bronchique uniquement chez l'enfant	CT scan Ponction transcarinaire + biopsie* Médiastinoscopie Ponction transcarinaire
Ganglions extra-thoraciques (plus fréquents chez les enfants, les patients originaires de pays à haute prévalence et les sujets VIH positifs)	Gonflement d'un ou de plusieurs ganglions parfois douloureux Souvent cervical Le plus souvent unilatéral Fistulisation possible en l'absence de traitement	RX thorax Examen direct et une culture du liquide d'écoulement Echographie suivie d'une ponction en cas d'adénopathie à contenu liquidien Biopsie-exérèse CT scan
Méninges	Céphalées, raideur de nuque, confusion	Ponction lombaire et soumettre systématiquement le LCR Résonance magnétique nucléaire (RMN) Rechercher des BK dans d'autres prélèvements (expectorations, tubages gastriques chez les enfants, hémocultures...)

Tableau 2 : Clinique et diagnostic des tuberculoses extra-pulmonaires de l'adulte [76].

La présence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) ne suffit pas à elle seule à apporter la preuve que l'on est en présence d'une tuberculose.

Bactériologie

Le genre *Mycobacterium* englobe actuellement plus de 130 espèces connues. Font partie des mycobactéries du complexe MTB: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG (souche vaccinale), *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti* et *M. pinnipedii*. Les autres espèces du genre *Mycobacterium* font partie des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT ou NTM).

D'une manière générale, il existe deux NTM importants, bien que très rarement observés, à savoir le *Mycobacterium leprae*, agent pathogène de la lèpre [77], et le *Mycobacterium ulcerans*, agent pathogène de l'ulcère de Buruli [78].

Mise en évidence de l'agent pathogène par microscopie

La mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) intervient par le biais d'un colorant fluorescent (auramine) ou par une coloration de Ziehl-Nielsen. La limite de détection microscopique se situe à environ 10⁴ germes par millilitre de prélèvement [79]; par conséquent, une microscopie négative n'exclut aucunement l'existence d'une tuberculose ou d'autres mycobactéries. Les patients chez qui une tuberculose vient d'être découverte et chez qui on a démontré la présence de BAAR dans les expectorations (autrefois, on appelait ce stade «tuberculose ouverte») sont contagieux pour leur environnement et doivent être placés en isolement [80].

Mise en évidence génético-moléculaire d'agents pathogènes et de résistances

La mise en évidence génético-moléculaire rapide d'acides nucléiques de MTB fait aujourd'hui partie intégrante de l'élucidation microbiologique lors d'une suspicion clinique de tuberculose active; il convient alors d'analyser au moins un prélèvement respiratoire par la méthode génético-moléculaire [81]. Il existe aussi aujourd'hui, en plus des méthodes dites in-house, divers systèmes commerciaux, dont les caractéristiques de performances peuvent être directement demandées aux laboratoires qui les proposent [82]. De manière générale cependant, la méthode génético-moléculaire montre une sensibilité quelque peu inférieure à celle de la culture, qui continue d'être l'examen de choix.

Pour les MTB, le phénotype résistant est, en règle générale, associé à des mutations qui peuvent être mises en évidence par séquençage des gènes mycobactériens respectifs ou par sonde ADN. Les tests disponibles sur le marché présentent des performances variées (que l'on

doit alors demander aux laboratoires en question) et répondent en gros simultanément aux deux questions suivantes: le MTB peut-il être mis en évidence dans le prélèvement? Et, dans l'affirmative, existe-t-il une résistance, par exemple à la rifampicine?[78].

Depuis peu, ces tests sont complétés par la PCR aux caractéristiques de performances remarquables en temps réel, intégré, flexible et rapide, développé pour l'analyse des expectorations [83]. L'analyse demande deux heures et donc un peu moins qu'une analyse microscopique effectuée dans les règles de l'art, mais elle donne des résultats notablement plus concrets.

6. Evolution et pronostic

Avant l'ère du traitement antibiotique, l'évolution de la tuberculose pulmonaire se faisait quelquefois vers une stabilisation spontanée. Des rechutes étaient fréquentes, les séquelles liées à la maladie, et à des interventions mutilantes pesaient sur le pronostic. Quelques formes avaient une évolution mortelle rapide (miliaire, broncho-pneumonie, atteinte cérébro-méningée associée). Dans la plupart des cas, l'évolution entrecoupée de rémissions s'étalait sur plusieurs années ou décennies, se faisant vers l'insuffisance respiratoire émaillée de complications (hémoptysies).

L'évolution ne se conçoit aujourd'hui que traitée. La stricte observance du traitement garantit la guérison dans pratiquement la totalité des cas. C'est à dire que le facteur pronostique le plus important est la capacité du malade à observer avec une rigoureuse discipline les contraintes d'un traitement de plusieurs mois. Le pronostic est par ailleurs conditionné par un ensemble de facteurs de gravité :

La forme anatomo-clinique :

* Les formes limitées (primo-infection, pleurésie, tuberculose pulmonaire nodulaire isolée) guérissent généralement sans ou avec peu de séquelles.

* Les formes étendues sont de plus mauvais pronostic. Dans l'immédiat, en raison de la sévérité des signes cliniques (détresse respiratoire ou hémoptysie grave) ; de la dissémination extra-pulmonaire des lésions (en particulier cérébro-méningée) ; et/ou de graves désordres biologiques associés. A plus long terme, par suite des séquelles : insuffisance respiratoire progressive, dilatation des bronches, hémoptysies sur cicatrices, cavités résiduelles exposant à une surinfection en particulier par *Aspergillus fumigatus* (aspergillome).

Des facteurs liés à l'hôte : la cachexie, l'âge avancé, l'éthylisme, une maladie générale évolutive (cancer, cirrhose, hémopathie, diabète) ou pulmonaire (emphysème), sont des facteurs péjoratifs.

La rechute : elle est quelquefois de moins bon pronostic, soit en raison des remaniements cicatriciels dans les poumons qui peuvent entraver la diffusion des antibiotiques, soit en raison d'une résistance acquise aux médicaments anti-tuberculeux.

La résistance aux médicaments anti-tuberculeux. Elle peut être acquise (résistance secondaire après des traitements anti-tuberculeux antérieurs mal conduits) ou primaire. Elle peut concerner un ou plusieurs médicaments anti-tuberculeux. La multirésistance est particulièrement redoutable lorsqu'elle inclut les principaux médicaments de la tuberculose (rifampicine et isoniazide).

7. Prise en charge thérapeutique

Avant de commencer son traitement dans la formation sanitaire la plus proche, le malade doit être pris en charge de façon effective par le médecin responsable. Cette prise en charge est constituée par les étapes suivantes :

- 1- L'inscription du cas sur le registre de déclaration des malades tuberculeux.
- 2- Un entretien avec le malade.
- 3- L'examen.
- 4- L'ouverture d'un dossier médical.
- 5- Puis orientation du malade vers sa formation sanitaire de rattachement où il recevra son traitement.

Du point de vue de la santé publique, le traitement de patients contagieux est donc la mesure la plus efficace et la meilleure prévention de la tuberculose. Il est du devoir de la santé publique de s'assurer que les sujets tuberculeux sont traités. Les principes de traitement font d'ailleurs partie d'une stratégie recommandée par l'OMS pour lutter contre la tuberculose [84]. L'objectif de cette stratégie est de guérir, dans le monde entier, 85% des cas de tuberculose avec expectorations positives. En cas de traitement non approprié (par exemple dosage insuffisant des médicaments ou association médicamenteuse inappropriée), les agents pathogènes naturellement résistants aux médicaments antituberculeux peuvent se multiplier, muter et devenir résistants à plusieurs antibiotiques. Ce risque justifie les principes fondamentaux de traitement de la tuberculose [84, 85].

Les quatre médicaments antituberculeux majeurs sont :

- isoniazide = INH ou H
- rifampicine = RMP ou R
- pyrazinamide = PZA ou Z
- éthambutol = EMB ou E

L'isoniazide (H) et la rifampicine (R) sont de puissants bactéricides actifs contre tous les types de mycobactéries tuberculeuses (complexe *M. tuberculosis*). L'éthambutol (E) est un bactériostatique. Le pyrazinamide (Z) est actif en milieu acide et agit efficacement contre les bacilles intracellulaires. Associé à trois autres antituberculeux majeurs, Z permet d'abréger la durée du traitement. La pénétration des antituberculeux dans les méninges et le liquide céphalorachidien est limitée. Cette pénétration est bonne pour H et Z, moins bonne pour R et E, qui pénètrent surtout lorsque les méninges sont enflammées ou lors des stades précoces de la maladie. Ces propriétés pharmacocinétiques ont été déterminantes pour définir les schémas thérapeutiques actuellement standardisés par catégories de cas [86-88].

Le traitement standardisé de la tuberculose, d'une durée de 6 mois, est préconisé depuis longtemps et recommandé au niveau international [20, 89-91].

Il comprend deux phases :

- la phase intensive de 2 mois avec rifampicine (R), isoniazide (H), pyrazinamide (Z) et éthambutol (E) ;
- la phase de continuation de 4 mois associant rifampicine et isoniazide. Ce régime thérapeutique s'applique quelle que soit la forme de tuberculose (pulmonaire ou extra-pulmonaire).

Plusieurs modes d'administration des médicaments sont possibles [20, 90, 91]: quotidiennement pendant les 6 mois [92], ou quotidiennement pendant la première phase et 2 ou 3 fois par semaine en phase de continuation [93], ou 3 fois par semaine tout au long du traitement. Les posologies par produit en fonction du poids et du rythme d'administration sont données dans le tableau 3.

Les antituberculeux peuvent être associés dans un même comprimé et on trouve actuellement sur le marché les associations RH, RHZ et ERHZ dont chaque composante a un poids proportionné aux autres. Ces associations sont recommandées lorsque le traitement quotidien est auto-administré pour faciliter l'adhésion au traitement et prévenir la monothérapie, cela afin d'éviter le développement des résistances.

Ce n'est que récemment que le consensus a été établi sur l'intérêt d'utiliser systématiquement l'éthambutol comme quatrième antituberculeux en première phase. En l'absence de résistance

	Administration quotidienne en mg/kg (doses minimale et maximale)		Administration intermittente 3fois/semaine, en mg/kg (doses minimale et maximale)
	Enfants	Adultes	Adultes
Isoniazide (H)	10 (10-15) max. 300	5(4-6) max. 300	10 (8-12) max. 900
Rifampicine (R)	15 (10-20) max. 600	10 (8-12) max. 600	10 (8-12) max. 600
Pyrazinamide (Z)	35 (30-40)	25 (20-30)	35 (30-40)
Ethambutol (E)	20 (15-25)	15 (15-20)	30 (20-35)

Tableau 3 : Posologie des médicaments antituberculeux standard [94, 95].

à l'isoniazide, cet avantage est discutable [93, 96], mais tout le problème est de prédire cette absence de résistance lors de la décision de mise au traitement.

Si la pyrazinamide ne peut pas être prescrite ou est mal tolérée, la phase de continuation devra être prolongée de 3 mois supplémentaires et le régime complet durera 9 mois.

Chez l'enfant, la crainte des effets indésirables dus à l'éthambutol paraît exagérée. S'il faut toujours se méfier d'un trouble de la vision que l'enfant ne pourra pas exprimer, ce phénomène semble rare et, chez les plus de 5 ans, le même régime standardisé est recommandé sans prendre plus de précautions que pour l'adulte [97].

L'atteinte des méninges est pratiquement la seule forme extra-pulmonaire pour laquelle on recommande en général un traitement de 9 à 12 mois [20, 98], toutefois quelques auteurs recommandent seulement 6 mois [99]. L'éthionamide est souvent proposé (20 mg/kg) à la place de l'éthambutol durant les deux mois de la phase initiale de traitement.

Les traitements adjuvants sont parfois recommandés. Les corticoïdes sont prescrits dans les péricardites constrictives ou non [100, 101] et les méningites tuberculeuses [102].

Un supplément en pyridoxine n'est pas nécessaire, sauf chez les enfants nourris au sein ou malnutris [103].

Dans le cas de tuberculose avec infection par le VIH, le traitement recommandé de la tuberculose est identique chez les personnes séropositives ou atteintes du sida. Cependant, le taux de rechute est parfois plus élevé, sans que l'on puisse toujours dire s'il s'agit d'une véritable rechute ou d'une réinfection [104].

Au Maroc les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+) sont pris en charge par le médecin généraliste de la circonscription sanitaire doté d'un laboratoire de bacilloscopie. Toutes les autres formes sont du ressort du médecin spécialiste. Le traitement de la tuberculose est gratuit et principalement ambulatoire et se déroule pour la plupart des patients dans une formation sanitaire extrahospitalière, centre de santé, dispensaire, Centre de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires (CDTMR). L'hospitalisation reste cependant indiquée en cas :

- De forme grave ou compliquée ;
- De forme associée à une maladie chronique décompensée ;
- D'échec, de pharmacorésistances, TB/MDR (multidrug-resistant TB), TB/XDR (extensively drug-resistant TB);
- De toxicité médicamenteuse sévère ;

Et chaque fois que des problèmes d'accessibilité entravent la supervision du traitement, particulièrement durant la phase initiale [105].

8. Effets indésirables des médicaments antituberculeux

Les antituberculeux peuvent provoquer des effets indésirables de gravité variable. On peut traiter symptomatiquement par des médicaments les effets indésirables légers qui ne présentent pas de danger pour le patient. En revanche, en présence d'effets indésirables graves, il convient d'interrompre le traitement ou d'opter (momentanément ou durablement) pour une autre association de médicaments antituberculeux (Tableau 4) [16, 106].

Une publication de Global Alliance for TB Drug Development répertorie une liste complète de tous les antituberculeux, de leur pharmacologie et de leurs effets indésirables possibles. (www.sciencedirect.com ou <http://elsevierhealth.com/journals/tube>) [86].

8.1. Hépatotoxicité

Une hépatotoxicité induite par INH, RMP et PZA constitue l'effet indésirable le plus fréquent [107]. D'ailleurs, l'hépatotoxicité liée à INH augmente avec la dose, l'âge du sujet (très rare chez le sujet jeune, mais environ 2% dès 50 ans), l'abus d'alcool ainsi que la malnutrition. Elle est plus fréquemment présente chez les femmes africaines en post-partum et chez les patients acétyleurs lents de la N-acétyltransférase 2 [16, 108-111]. RMP potentialise l'hépatotoxicité de INH mais n'est que peu hépatotoxique par elle-même (occasionnellement inductrice de cholestase). PZA peut causer de rares hépatites fulminantes de nature immuno-allergique. Voilà pourquoi il ne convient pas de recourir à nouveau à ce traitement médicamenteux lorsqu'il a été suspecté d'être à l'origine de graves troubles de la fonction hépatique lors d'un traitement antérieur. Globalement, la fréquence des élévations sévères des transaminases est évaluée à 6,9% chez les sujets porteurs de l'un des facteurs de risque mentionnés ci-dessus contre 0,4% chez les sujets sans facteur de risque [110].

Les patients doivent être informés de la nature des symptômes de l'hépatite médicamenteuse et de la nécessité d'arrêter leur médication et de prendre contact immédiatement avec leur médecin si ces symptômes surviennent. Il est recommandé de contrôler les transaminases (ALAT) lors de chaque examen du patient en cas de maladie hépatique chronique sous-jacente (hépatite B ou C) ou de séropositivité VIH en raison des risques accrus d'effets

Effets secondaires	Médicament(s) probablement responsable(s)	Mesures
Sévères		Arrêt de l'administration du ou des médicament(s) probablement responsable(s) et hospitalisation en urgence
Eruption cutanée avec ou sans prurit	Isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, streptomycine	Arrêter l'administration des médicaments antituberculeux
Ictère (autres causes exclues), hépatite	Isoniazide, rifampicine, pyrazinamide	Arrêter l'administration des médicaments antituberculeux
Etat confusionnel (en cas d'ictère, songer à une insuffisance hépatique aiguë induite par un médicament)	La plupart des médicaments antituberculeux	Arrêter l'administration des médicaments antituberculeux
Troubles de la vision (autres causes exclues)	Ethambutol	Arrêter l'éthambutol
Choc, purpura, insuffisance rénale aiguë	Rifampicine	Arrêter la rifampicine
Réduction du volume urinaire	Streptomycine	Arrêter la streptomycine
Surdité	Streptomycine	Arrêter la streptomycine
Vertiges (vertiges rotatoires et nystagmus)	Streptomycine	Arrêter la streptomycine
Faibles		Continuer à administrer des médicaments antituberculeux, mais vérifier la posologie
Anorexie, nausées, douleurs abdominales	Pyrazinamide, rifampicine, isoniazide	Administrer les médicaments avec de l'eau ou avec de petits repas ou juste avant le coucher. Si les symptômes persistent ou s'aggravent ou en cas de nausées à répétition ou d'hématémèse: hospitalisation immédiate
Douleurs articulaires	Pyrazinamide	Aspirine ou autre anti-inflammatoire non-stéroïdien ou paracétamol
Sensation de brûlures, de surdité, fourmillement dans les mains ou dans les pieds	Isoniazide	Pyridoxine 50 à 75 mg/jour
Hébétéude, vertiges	Isoniazide	Calmer. Prise des antituberculeux au coucher.
Urine de couleur orangée ou rouge	Rifampicine	Calmer. Informer le patient que ce phénomène est normal et qu'il n'est pas inquiétant.
Syndrome grippal (fièvre, frissons, céphalées, douleurs osseuses)	Posologie intermittente de rifampicine	Passer d'une posologie intermittente de rifampicine à une posologie quotidienne.

Tableau 4 : Approche symptomatique des mesures à prendre en cas d'apparition d'effets secondaires en cours de traitement antituberculeux [44].

indésirables et d'interactions médicamenteuses. Il en va de même en cas de symptômes gastro-intestinaux, de malnutrition, de diabète, d'alcoolisme et de grossesse [14, 109].

Une augmentation asymptomatique des transaminases allant jusqu'à trois à cinq fois la limite supérieure de la norme – à l'exclusion de toute autre cause – ne nécessite généralement pas l'interruption du traitement. Néanmoins, si l'élévation est supérieure à cinq fois la limite supérieure de la norme, le traitement devrait être interrompu jusqu'à normalisation des tests hépatiques. On pourra ensuite en règle générale réintroduire le même schéma thérapeutique en excluant toutefois le pyrazinamide. En cas d'hépatite médicamenteuse sévère symptomatique, l'interruption doit être définitive. Dans ce cas, il est recommandé d'instaurer un traitement quotidien empirique de la tuberculose comprenant trois médicaments sans toxicité hépatique (AMI ou amikacine, une quinolone et EMB) pendant deux mois, suivi d'une bithérapie *per os* pendant dix mois, complété si possible par l'administration prudente de RMP au cours des deux premiers mois.

8.2. Neurotoxicité

L'isoniazide peut provoquer une neuropathie périphérique. Les facteurs suivants augmentent ce risque: grossesse, éthylisme, malnutrition, infection VIH et pathologie hépatique chronique. La neuropathie périphérique liée à l'isoniazide peut être prévenue par l'administration quotidienne de vitamine B6 (40 mg par jour). C'est pourquoi, dans de telles situations, on conseille l'administration systématique de vitamine B6. L'éthambutol est toxique pour le nerf optique en cas de traitement sur le long terme ou en cas de doses égales ou supérieures à 25 mg/kg. Dans ces cas, il convient de procéder à un électrorétinogramme ou à une évaluation de la vision en début de traitement, puis mensuellement pour détecter précocement une névrite optique débutante, bien que les symptômes puissent se manifester en dehors des contrôles [112]. Il faut sensibiliser les patients traités pendant deux mois seulement avec une dose moindre (15 à 20 mg/kg) sur les effets indésirables possibles du médicament (en particulier sur la perte de la vision des couleurs) et d'effectuer chez eux des contrôles cliniques. Chez les patients sous aminoglycosides (streptomycine, amikacine), il convient d'effectuer un audiogramme mensuel (et plus fréquemment s'ils présentent des pathologies concomitantes) et de contrôler la fonction rénale [44].

8.3. Arthrite

L'administration de pyrazinamide s'accompagne habituellement d'une élévation de l'acide urique, mais en général sans conséquences cliniques. Un contrôle du taux sérique n'est indiqué qu'en cas d'apparition de symptômes articulaires, bien qu'il n'existe pas de corrélation entre le taux sérique et l'intensité des symptômes. L'administration d'un uricosurique est inefficace pour le traitement des symptômes articulaires, qui répondent aux anti-inflammatoires non stéroïdiens [44].

8.4. Réactions cutanées

Le risque de tels effets indésirables diffère d'un cas à l'autre. Si un patient se plaint de prurit sans lésions cutanées visibles, nous recommandons un traitement symptomatique par antihistaminique mais sans toutefois modifier le traitement antituberculeux. Si, par contre, l'on est en présence de lésions cutanées visibles, le traitement par antituberculeux devrait être interrompu et les médicaments n'être réintroduits progressivement un par un qu'après la disparition des lésions cutanées [106].

8.5. Interactions médicamenteuses

La rifampicine et l'isoniazide sont les médicaments antituberculeux qui présentent le plus d'interactions avec d'autres médicaments. Le tableau 5 récapitule ces interactions médicamenteuses. Chez les patients séropositifs qui sont par ailleurs traités au moyen d'une association de plusieurs médicaments antiviraux, ces interactions médicamenteuses sont difficiles à juguler.

Médicament	Taux sanguin augmenté par	Taux sanguin réduit par	Augmente le taux sanguin de	Réduit le taux sanguin de
Isoniazide	Prednisolone Ethionamide	–	Phénytoïne Carbamazépine Coumarine Diazépam Probénécide	Enflurane Azoles
Pyrazinamide	–	–	Probénécide	–
Ethambutol	–	Hydralumine	–	–
Rifampicine	Inhibiteurs des protéases	PAS Kétoconazole	–	Coumarine Sulfonylurée Contraceptifs oraux Glucocorticoïdes Phénytoïne Diazépam Théophyllines Vitamine D Digitoxine Méthadone Inhibiteurs des protéases Cyclosporine

Tableau 5 : Interactions médicamenteuses des principaux antituberculeux [94].

Chapitre 2 : Données pharmacogénétiques et bases moléculaires de l'hépatotoxicité due aux antituberculeux

La variabilité interindividuelle dans le métabolisme des xénobiotiques et la réponse aux médicaments est vaste et de nombreux facteurs sont impliqués dans cette variation, y compris la composition génétique, le sexe, l'âge, la co-administration de médicaments, la physiologie individuelle, la physiopathologie et la présence d'autres facteurs environnementaux (consommation d'alcool, tabagisme, habitudes alimentaires).

Pour produire ses effets thérapeutiques, le médicament doit être présent dans des concentrations appropriées à son site d'action. Bien que les concentrations thérapeutiques dépendent de la dose administrée, ils dépendent aussi de l'ampleur et de la vitesse d'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion. La pharmacocinétique étudie le cours et la distribution du médicament et de ses métabolites dans les différents tissus, couvrant les mécanismes d'absorption, le transport, le métabolisme et l'excrétion. En outre, la pharmacodynamique se concentre sur les effets biochimiques et physiologiques des médicaments et leur mécanisme d'action. Les protéines impliquées dans les effets des médicaments sont définies comme des molécules cibles et comprennent non seulement les récepteurs (directs), mais aussi des protéines associées avec mécanisme d'action, comme par exemple les protéines de transduction de signal [113].

Après son administration, le médicament est absorbé et ensuite distribué à travers le corps, exigeant le fonctionnement coordonné de diverses protéines, y compris des enzymes métaboliques, des protéines de trafic, des protéines récepteurs, et autres. Les médicaments peuvent pénétrer dans le corps comme médicaments actifs ou prodrogues (inactifs). La plupart des médicaments sont métabolisés dans le foie pour les rendre plus solubles pour l'élimination ultérieure par les reins ou les intestins.

Les promédicaments nécessitent une conversion métabolique, également appelé biotransformation, pour libérer le composé actif. La biotransformation complète de tout un médicament nécessite généralement plusieurs enzymes différentes [114]. La variabilité génétique a été décrite pour avoir un effet sur l'absorption du médicament et le métabolisme et ses interactions avec les récepteurs. Cela constitue la base pour l'absorption lente et rapide du médicament, le métabolisme pauvre, efficace ou ultrarapide des médicaments et les

interactions pauvres ou efficaces des récepteurs [115]. Les conséquences de ces variations peuvent conduire à des réactions indésirables aux médicaments et / ou l'échec thérapeutique.

Dans ce contexte, la pharmacogénétique est l'étude des variations génétiques associées à la variabilité individuelle dans la réponse aux médicaments, y compris les différences d'efficacité, les interactions médicamenteuses, et le risque relatif d'une réponse négative à la drogue. Il comprend l'étude des polymorphismes génétiques qui pourraient influencer sur l'expression ou l'activité des transporteurs de médicaments, les enzymes métabolisant les médicaments et les récepteurs de la drogue (des médicaments) [114-116].

On estime que 99,9% de la séquence du génome humain est identique entre les individus et les différences génétiques dans les populations sont appelées des mutations si elles sont présentes dans moins de 1%, et de polymorphismes lorsqu'ils sont présents dans au moins 1% de la population. Un polymorphisme de nucléotide unique (Single Nucleotide Polymorphism SNP) implique un remplacement d'une base nucléotidique avec l'une des trois autres et se produisant à environ une base sur 1000 bases dans le génome humain [117].

Une mutation ou un polymorphisme dans les gènes qui codent pour des enzymes métaboliques, des transporteurs ou des récepteurs peuvent affecter la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des médicaments conduisant à des effets thérapeutiques indésirables. L'identification de ces marqueurs génétiques qui prédit si une personne répond bien ou non à un médicament spécifique pourrait aider à choisir le bon médicament dans le bon dosage, en maximisant l'efficacité et prévenir ou réduire les effets indésirables des médicaments.

L'Isoniazide (INH) est un médicament important dans le traitement de la tuberculose, il a été introduit dans le schéma de chimiothérapie depuis 1952. Il est le hidrazine d'acide isonicotinique et il a montré une activité cytotoxique pour *Mycobacterium tuberculosis* à la fois dans le repos (pendant la latence) et les phases de prolifération. Ce médicament pénètre facilement dans les cellules macrophages pour tuer les bacilles en multiplication et il est spécifique pour les mycobactéries [113].

Les réactions indésirables induites par l'INH comprennent la fièvre, des nausées, des vomissements, une hépatotoxicité, des réactions cutanées, des troubles gastro-intestinaux et neurologiques. Seulement au début des années 1970, l'apparition de lésions hépatiques graves comme un effet indésirable de ce médicament a été reconnu, pouvant entraîner le décès de certains patients [118]. Parmi les médicaments anti-tuberculeux de première ligne, l'INH est le principal médicament associé à une hépatotoxicité avec une fréquence allant de 1 à 30% dans différentes populations [14]. D'autres médicaments causant des lésions hépatiques sont

principalement rapportés en association avec l'INH [16, 119]. L'hépatotoxicité d'origine médicamenteuse est définie comme i) un niveau deux fois supérieur à la limite supérieure de la normale (LSN) du taux sérique d'alanine aminotransférase (ALAT) ou de la bilirubine conjuguée, ou (ii) une augmentation combinée des niveaux d'aspartate aminotransférase (ASAT), la phosphatase alcaline, et la bilirubine totale, à condition que l'un d'entre eux était plus de deux fois la limite normale supérieure avec des symptômes cliniques ou (iii) un taux sérique d'ALAT cinq fois supérieur à la limite supérieure de la normale (LSN) sans symptômes [13]. Dans tous ces cas, le traitement doit être interrompu et, en général, un régime de modification ou de remplacement est introduit [14]. Parce que ces effets indésirables ne concernent pas seulement la morbidité et la mortalité, mais aussi conduisent à des interruptions de traitement, l'échec et la rechute, les effets indésirables contribuent à la propagation de la maladie et l'apparition de multirésistances aux médicaments (MDR).

Les réactions ou effets indésirables aux médicaments (EIM/ADR) sont des causes fréquentes d'hospitalisation et conduisent à des coûts importants pour la société. Il existe deux principales charges financières dues à des maladies causées par des EIM: celui du traitement et celui pour les éviter [120]. La survenue d'effets indésirables graves et mortels a été largement étudiée chez les patients hospitalisés et une méta-analyse des études prospectives dans environ quarante hôpitaux aux États-Unis (USA) suggère que 6-7% des patients hospitalisés souffrent d'effets indésirables graves et 0,32 % des patients développent des effets indésirables mortels [121].

Cela se traduit par environ 100 000 décès par an dans les États-Unis et un coût annuel de plus de cent milliards de dollars à la société en raison d'une hospitalisation prolongée et une productivité réduite [115, 121]. En outre, il a été estimé que les EIM sont responsables de jusqu'à 7% de toutes les admissions dans les hôpitaux aux Royaume-Uni (UK) et 13% dans les cliniques médicales en Suède [115]. En France, une étude de 10 ans dans l'unité du foie de l'Hôpital Beaujon à Paris a montré que, parmi tous les patients hospitalisés avec une hépatite aiguë, 10% étaient dus à des réactions indésirables aux médicaments et la prévalence de l'hépatotoxicité due aux médicaments chez les patients âgés de plus de cinquante ans a dépassé 40%. Au Japon et d'autres pays de l'Est, les médicaments sont responsables d'environ 10-20% des cas d'hépatite fulminante [122]. Au Maroc une étude rétrospective étalée sur une durée de 15 ans, et menée sur 1152 patients ayant tous bénéficié d'un suivi thérapeutique pharmacologique des antituberculeux de première ligne (INH, RMP, et PZA) et dont 135 patients avaient développé une hépatotoxicité, soit un pourcentage de 11.7%. Parmi les patients de cette étude, 18% avaient développé des effets indésirables dont 65,2% avaient une

hépatotoxicité, 11,1% une intolérance digestive aux antituberculeux, 9,2% des effets neurologiques, 7,2% des effets cutanés, 3,9% des troubles métaboliques, 2,9% des troubles psychiatriques et 0,5% des troubles hématologiques [123].

1. Les enzymes impliqués dans le métabolisme des anti-tuberculeux

Les systèmes responsables de la biotransformation de nombreux médicaments enzymatiques sont situés dans le réticulum endoplasmique du foie (fraction microsomale). De telles enzymes sont également présentes dans les reins, les poumons et l'épithélium gastro-intestinal, mais à une concentration plus faible [113]. La modification métabolique dans la biotransformation se déroule généralement en deux étapes consécutives et entraîne la perte de l'activité biologique. Les réactions de phase I convertissent les xénobiotiques en un métabolite ayant une polarité plus élevée par oxydation, réduction ou hydrolyse et génère une molécule inactive ou moins active sur le plan pharmacologique, ou plus actif dans le cas d'une pro-drogue. Ce métabolite sera éliminée ou va passer par la phase II de réactions (appelées synthèse ou réactions de conjugaison), impliquant la liaison à un métabolite primaire ou d'un substrat endogène tel que le glucuronate, le sulfate, l'acétate, les acides aminés ou le glutathion (tripeptide). Ces réactions enzymatiques comprennent la glucuronidation, la méthylation, la sulfatation, l'acétylation, la conjugaison avec le glutathion et la conjugaison avec la glycine [113].

Les variations génétiques dans les isoenzymes impliquées dans la biotransformation des médicaments peuvent entraîner des réactions anormales entraînant des effets toxiques [122, 124]. Dans le cas de l'INH, en particulier, la carence dans la capacité de N-acétylation représente un facteur de risque d'hépatotoxicité.

L'INH est administré par voie orale et rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal en passant par le foie par la porte du système veineux avant d'atteindre la circulation générale où il est métabolisé par un procédé connu sous le nom d'effet de premier passage avec une réduction de sa biodisponibilité. Environ 75% à 95% de l'INH est excrétée par les reins dans les 24 premières heures, principalement sous les formes métaboliques acétyl-isoniazide et acide isonicotinique [113].

Dans le foie, l'INH est métabolisé en acétylisoniazide par N-acétyltransférase 2 (NAT2), suivie par une hydrolyse en acetylhydrazine et ensuite oxydé par le cytochrome P4502E1 (CYP2E1) à des intermédiaires hépatotoxiques [125, 126].

Ces métabolites peuvent détruire les hépatocytes soit en interférant avec l'homéostasie cellulaire ou en déclenchant des réactions immunologiques dans lequel des métabolites réactifs qui sont liés aux protéines plasmatiques hépatocytes peuvent agir en tant que haptènes [124]. L'autre voie métabolique pour générer des métabolites toxiques est l'hydrolyse directe de INH à l'hydrazine, un hépatotoxine puissant. NAT2 est également responsable de la conversion acétylhydrazine à diacétylhydrazine, un composant non toxique (Figure 7) [125, 127, 128]. Glutathione S-transférase (GST), une importante enzyme de la phase II de désintoxication, semble jouer un rôle protecteur comme capteur de radicaux libres intracellulaires, qui conjugue le glutathion avec des métabolites toxiques générés à partir de CYP2E1 [129]. La conjugaison sulfhydryl facilite l'élimination des métabolites du corps et réduit l'effet toxique (Figure7) [130]. Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont suggéré que les polymorphismes génétiques dans les gènes *NAT2*, *CYP2E1* et *GST* sont associés à l'hépatotoxicité induite par les médicaments au cours du traitement de la tuberculose. Le présent travail porte sur le rôle de ces polymorphismes dans l'apparition d'hépatotoxicité induite par des médicaments anti-tuberculeux en particulier l'INH, chez des patients marocains.

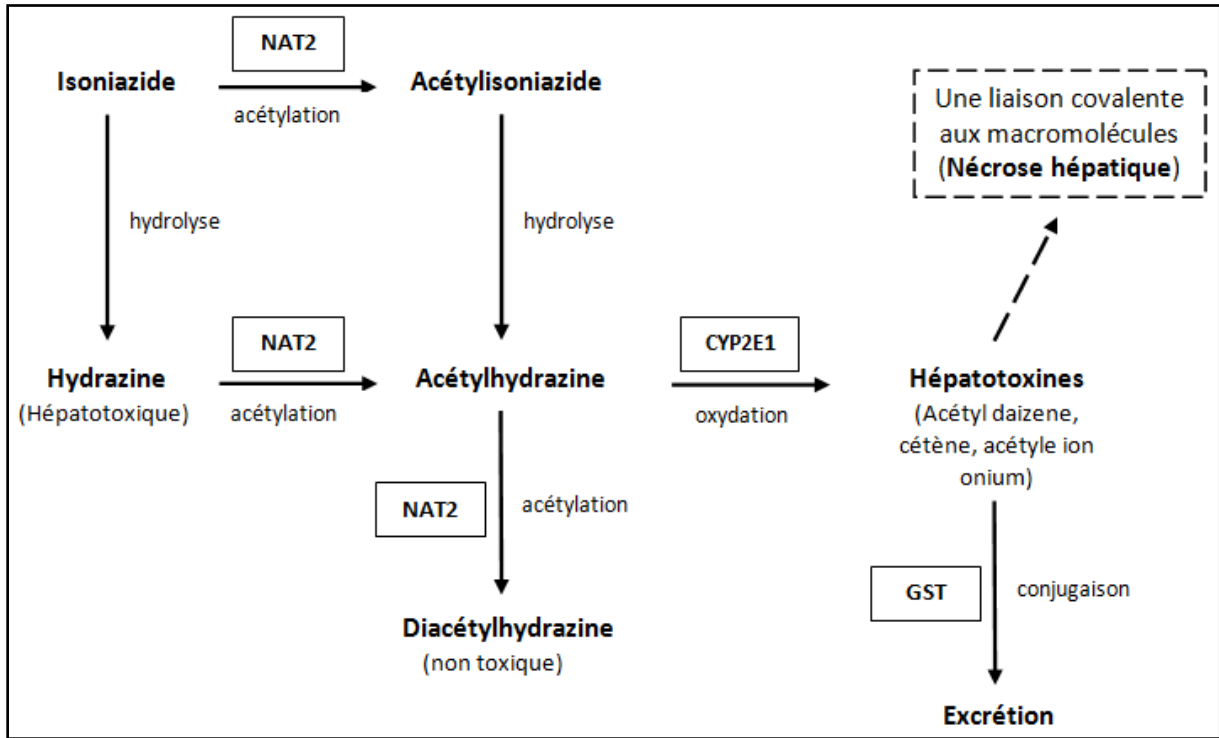


Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme INH. Les principales enzymes impliquées dans cette voie sont indiqués dans les cases [127, 131].

2. Généralités sur les N-Acétyltransférases

Les arylamine-N-acétyltransférases (NAT) sont une famille unique d'enzymes de la phase II de biotransformation des xénobiotiques, qui acétylent les composés arylamines, arylhydrazines et arylhydroxylamines, en utilisant l'acétylcoenzyme A (acétylCoA) comme cofacteur [5]. Deux isoenzymes des NATs, NAT1 et NAT2, ont été identifiées chez l'homme. Elles agissent comme des enzymes importantes dans la voie métabolique des amines primaires, des hydrazides et hydrazines. A côté de certains médicaments tels que l'isoniazide, la dapsonne, l'acide para-aminosalicylique (PAS) et l'hydralazine. Les *N*-acétyltransférases métabolisent également les xénobiotiques contenant des amines aromatiques par *N*- et/ou *O*-acétylation [132].

Il a été démontré que les gènes codant les NAT1 et NAT2 sont polymorphes. Le polymorphisme génétique des NATs a été identifié pour la première fois chez des patients atteints de tuberculose traités par de l'isoniazide. L'étude de ce polymorphisme génétique a permis de mieux comprendre l'intérêt et le rôle du profil d'acétylation dans la genèse et l'évolution de certaines maladies, mais aussi les risques d'effets indésirables de certains médicaments [133].

La littérature explore de plus en plus les différences génétiques des *NAT* sur les risques de survenue de cancer dans plusieurs tissus ou organes tels que la vessie, le sein, les poumons, le colon, le rectum [134-136].

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

2.1. Localisation, expression et structure des *NAT*

Les deux formes enzymatiques des *N*-Acétyltransférases sont codées par deux gènes différents, la *NAT1* et la *NAT2*, décrits chez l'homme pour la première fois par Grant et collaborateurs en 1981 [137]. Ces deux gènes sont séparés par 25 kb et localisés sur le bras

court du chromosome 8 plus précisément dans la région 8p22 [138-145]. Un troisième gène, la *NATP1*, a été identifié sur le même chromosome et constitue probablement un pseudogène. Il présente 79 et 80 % d'identité nucléotidique avec les *NAT1* et *NAT2* respectivement [145].

Ce pseudogène renferme plusieurs mutations, expliquant son défaut d'expression.

L'expression des gènes *NAT1* et *NAT2* donne naissance à deux protéines fonctionnelles de 290 acides aminés (aa) qui ne diffèrent que par 55 acides aminés au niveau de la région C terminale. Le gène *NAT1* a une taille de 33 kDa et le *NAT2*, une taille de 31 kDa. Ces deux gènes partagent 87 % d'homologie nucléotidique dans la région codante qui se traduit par 81 % d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés (Figure 8)[137, 146, 147].

La protéine NAT2 est sujette à un polymorphisme génétique. En effet, la NAT2 présente une expression bimodale ou trimodale en fonction de la vitesse de dégradation des substances qui lui sont soumises, avec l'existence d'acétylateurs lents, rapides ou intermédiaires [148-150].

Chez les individus de type acétyleur rapide, la NAT2 est exprimée dans le foie en quantité supérieure à celle de la NAT1 (12 fois environ), alors que le rapport des deux activités serait en faveur de NAT1 dans le cytosol colo-rectal et l'uroépithélium. Chez les acétyleurs lents, les contenus hépatiques en enzymes NAT1 et NAT2 seraient par contre comparables (activité NAT2 jusqu'à deux fois plus forte seulement) [151].

Le phénotype acétyleur lent est dû à un taux hépatique diminué en enzyme NAT2 fonctionnellement active, atteignant un niveau résiduel.

Les études ont montré que le tissu hépatique avait toujours les mêmes taux d'ARNm que pour l'allèle de référence. Le phénotype acétyleur lent a dès lors été attribué à des défauts d'ordre traductionnel (efficacité de traduction diminuée) ou post traductionnel (dégradation accélérée de la protéine) [146, 150].

La première structure tridimensionnelle d'une *N*-Acétyltransférase a été publiée en 2000[152-154]. En dépit du fait que les *N*-acétyltransférases, sont d'origine bactérienne, elles ont fourni de nouvelles informations structurales et fonctionnelles sur l'enzyme humaine. Ces études ont, en effet, montré que chez l'Homme, l'enzyme présente une triade catalytique située au niveau de la partie N-Terminale. Elle est composée de la cystéine 68, de l'histidine et de l'aspartate (Cys-His-Asp). Des analyses structurales ont permis de distinguer trois domaines au niveau de la protéine NAT (Figure 9) [155, 156].

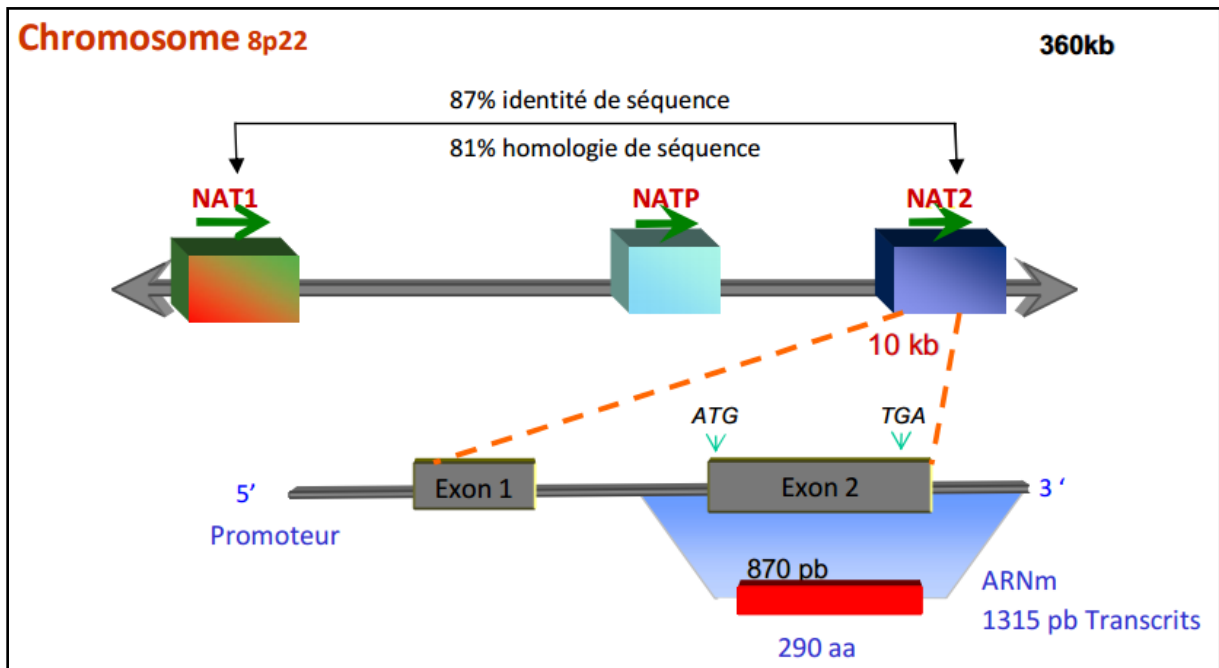


Figure 8: Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8 [137, 146].

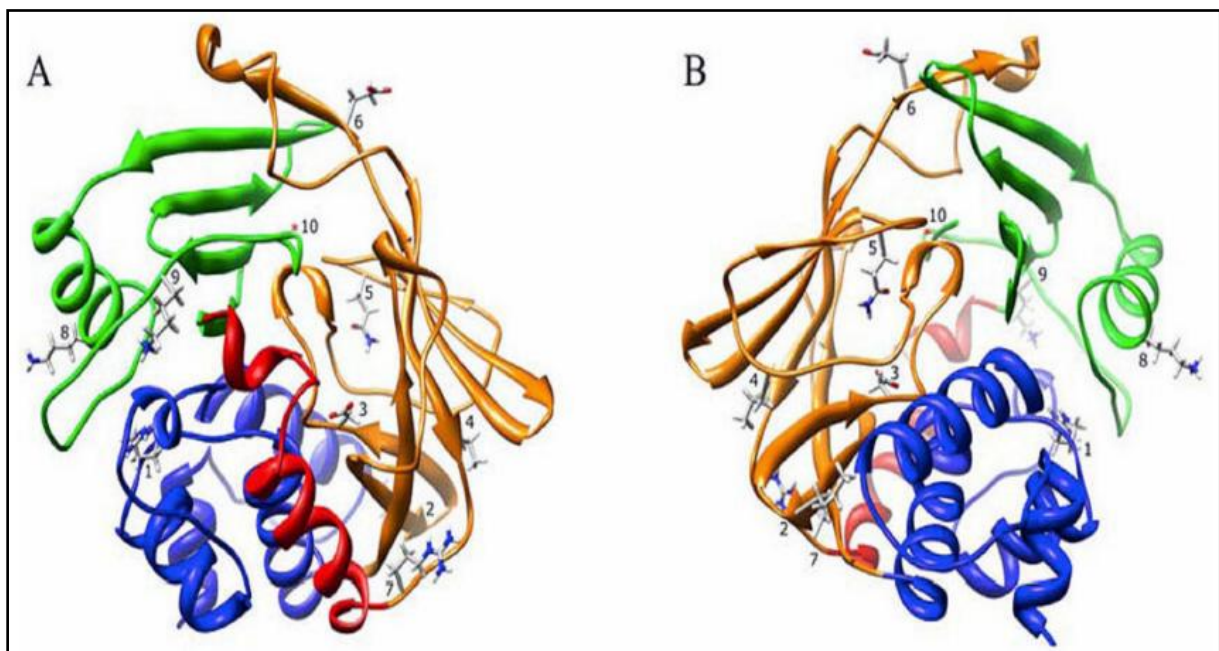


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la NAT2 Humaine : diagramme en ruban.

La couleur du ruban indique les domaines protéiques de la NAT2 : domaine I (bleu), la région interdomaine (rouge), domaine II (orange), et le domaine III (vert). L'emplacement des résidus R64 (1), I114 (2), D122 (3), L137 (4), Q145 (5), E167 (6), R197 (7), K268 (8), K282(9), et G286 (10) sont affichées et correspondent aux amino-acides des différents allèles. Deux orientations sont représentés, un sur le site d'entrée de substrat dans le site actif (A) et l'autre sur la face arrière de la structure (B) [156].

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

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

* Le dernier domaine intéresse particulièrement le groupement carboxyle. Il est formé d'une combinaison entre des hélices α et des bâtonnets β . C'est le domaine le plus diversifié entre les espèces. La réaction d'acétylation se produit en deux étapes distinctes [157] :

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

2.2. Principales fonctions des N-Acétyltransférases

Les *N*-acétyltransférases (NATs) constituent une famille d'enzymes, qui comme leur nom l'indique, catalysent le transfert d'un groupement acétyle issu de l'acétylcoenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire ($-NH_2$) ou hydrazine ($-NH-NH_2$) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse (Figure10). Le produit formé est une arylamide [158, 159].

En plus des réactions de *N*-acétylation, les NATs peuvent catalyser la *O*-acétylation de substrats aromatiques *N*-hydroxylés, ainsi que la *N*-, *O*-transacétylation intramoléculaire de composés *N*-hydroxylés et *N*-acétylés. La *N*-acétylation est considérée de façon générale comme exerçant une détoxification relative des arylamines puisque cette réaction les rend en effet moins actives, alors que la *O*-acétylation serait plutôt activatrice (Figure11).

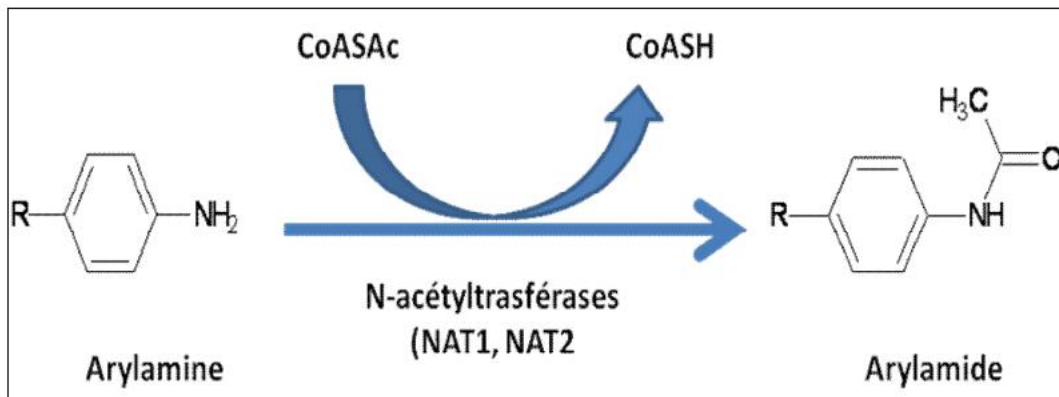


Figure 10: Réaction de *N*-acétylation des xénobiotiques par les NAT.

Les arylamines pouvant être des médicaments tels que la caféine, la dapsonne, l'isoniazide ou la sulfaméthoxazole ou des polluants tels que le 4-aminobiphényle, le β -naphtylamine, les amines hétérocycliques ou la benzidine, la 3,4- dichloroaniline [159].

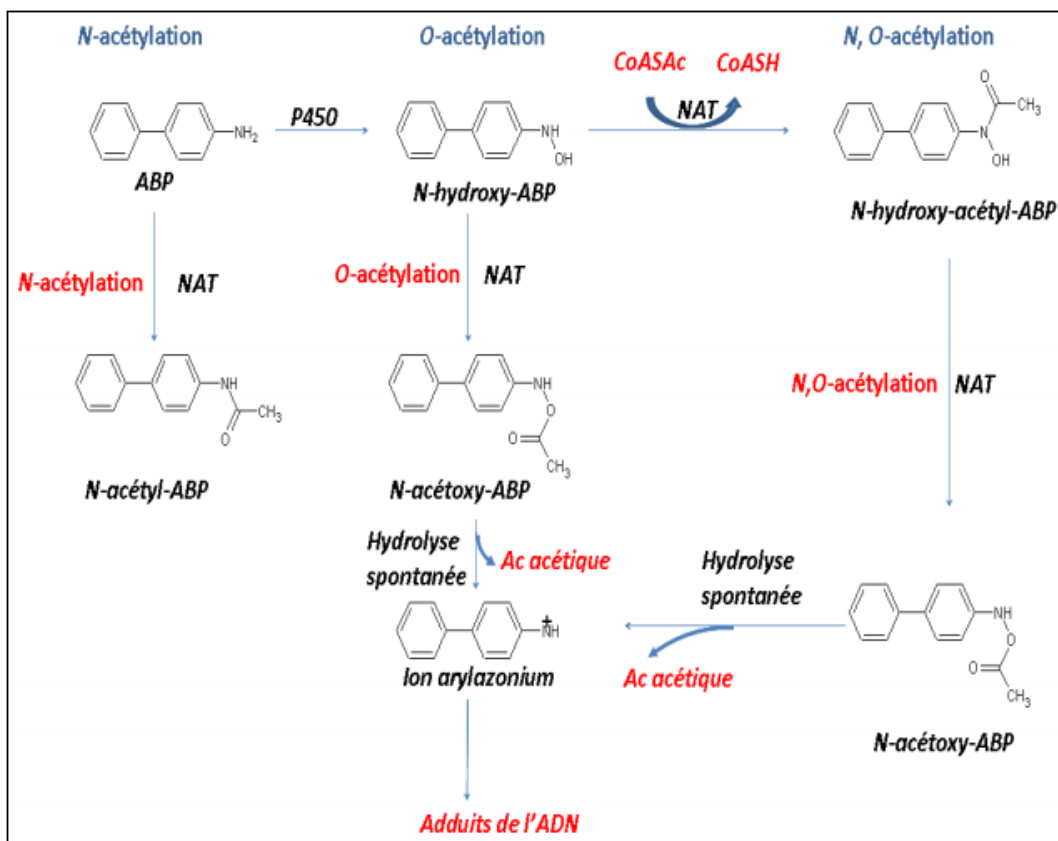


Figure 11 : Activation et inactivation des arylamines par *N*-acétylation, *O*-acétylation, et *N*-, *O*-acétylation catalysées par la NAT2.

Ces réactions sont représentées pour la cancérogène arylamine 4-aminobiphényle (ABP), conduisant finalement à la formation d'électrophiles hautement réactifs qui se lient à l'ADN et pouvant conduire à des phénomènes de mutagenèse et de cancérogénèse[160].

La métabolisation des amines aromatiques et des carcinogènes hétérocycliques par les NATs correspond à une activation ou une détoxification de ces xénobiotiques. Ainsi, la NAT2 catalyse la biodégradation de l'isoniazide pour donner naissance à la *N* acétylisoniazide (AcINH) qui, à son tour va se métaboliser en acide nicotinique et acétylhydrazine. Ce dernier produit va à son tour subir une série d'acétylations pour entraîner la formation de métabolites réactifs, toxiques pour les cellules hépatiques avec fixation sur les protéines pour donner des adduits aux protéines et des phénomènes d'hépatotoxicité (Figure 12).

De même, la caféine est dégradée par la NAT2 pour donner principalement le 5- acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracil (AFMU), principal métabolite de la caféine utilisé dans le phénotypage de la NAT2 (Figure 13).

2.3. Déterminisme génétique de la N-Acetyltransférases de type 2 (NAT2)

Les récentes avancées acquises dans la connaissance de la génétique des NATs ont permis d'élucider certaines bases moléculaires des différences phénotypiques de la *N* acétylation observées chez l'homme. Il est maintenant bien connu que les gènes codant pour les NAT1 et NAT2 sont polymorphes et que ce polymorphisme génétique des NATs est bien identifié chez l'homme, le hamster, le lapin et la souris [135, 136, 161-163].

Les bases moléculaires du polymorphisme d'acétylation de la NAT2 sont devenues évidentes seulement après le clonage des gènes humains *NATs* et l'introduction des méthodes de génotypage telles que la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction PCR-RFLP [164-168], la technique du polymorphisme de conformation des simples brins générée par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR-SSCP [169], les essais de ligature des oligonucléotides [170], l'analyse des hétéroduplexes en temps réel basée sur la capillarité [171], ou le test de génotypage par TaqMande Applied Biosystems [172, 173].

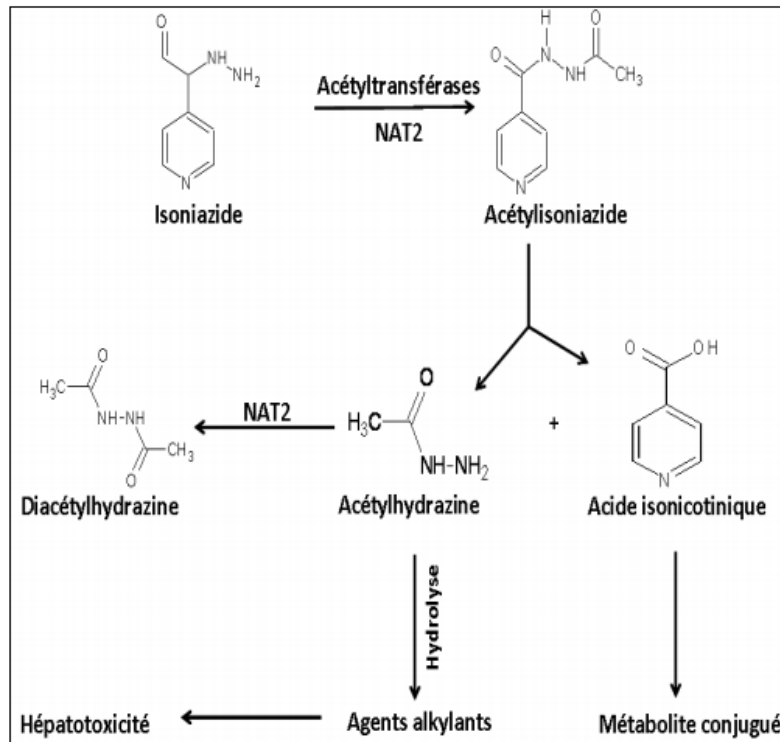


Figure 12: Les différentes voies de métabolisation de l'isoniazide chez l'Homme [174].

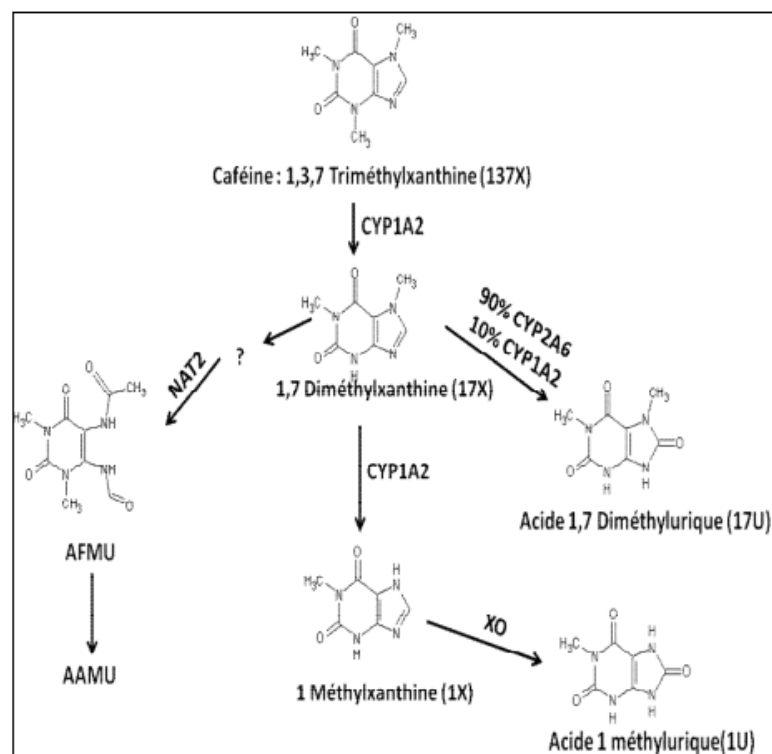


Figure 13: Schéma des voies majeures de biotransformation de la caféine [175].

Métabolite : **AFMU** = 5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracil ; **AAMU** = 5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracil.
Enzymes : **NAT2** = N-acétyltransférase 2 ; **CYP** = Cytochrome P450 ; **XO** = Xanthine oxydase.

Treize substitutions nucléotidiques ou SNP ponctuelles ont été identifiées dans la séquence codante du gène humain *NAT2* dans différentes populations (c.191G>A, c.341T>C, c.590G>A, c.857G>A, c.803A>G, c.282C>T, c.481C>T, c.345C>T, c.403C>G, c.434A>C, c.481C>T, c.638G>A, c.838G>A). D'autres SNP ont été retrouvés mais à des fréquences faibles selon les groupes ethniques. Selon le consensus sur la nomenclature du gène *NAT2* humain, les variants alléliques sont caractérisés par la combinaison d'un ou de quatre SNP présents dans le même allèle. Ainsi, 36 variants alléliques du gène *NAT2* existent selon la base de données sur la nomenclature des NATs.

Parmi ceux-ci, la *NAT2*4* est considérée comme l'allèle sauvage, responsable du phénotype acétyleur rapide (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>).

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

Les allèles *NAT2*11A*, **12A*, **12B*, **12C* et **13*, sont considérés comme des allèles codant pour un phénotype rapide, car ils portent des mutations silencieuses (pas de changement de la séquence de la protéine) ou ils conduisent à des changements non conservatifs d'acides aminés sans impact sur l'activité de la protéine (par exemple, la Lys268 substituée en Arg. dans la protéine *NAT2*12*) [23, 166, 176]. Les allèles *NAT2*10*, **11B*, **12D*, **17*, **18* et **19* sont porteurs de mutations faux-sens avec un changement d'acides aminés ayant pour conséquence une diminution de l'activité enzymatique. Ainsi, ils sont classés allèles « lents » [168, 177, 178]. Des études ont aussi démontré que les 24 autres allèles de *NAT2* codent pour des enzymes instables, d'activité réduite et par conséquent, sont considérés comme des phénotypes acétyleurs lents [19, 176, 179-181].

Il est intéressant de souligner que l'ensemble des allèles de la *NAT2* connus sont issus de la combinaison d'une vingtaine de SNP seulement, situés aux positions 111, 190, 191, 282, 341, 345, 364, 403, 411, 434, 481, 499, 590, 638, 759, 803, 838, 845, 857 et 859 de la région codante de la *NAT2*. Parmi ces allèles, treize sont considérés comme majeurs, c'est-à-dire rencontrés à des fréquences significatives dans plusieurs populations (Tableau 6) [182].

	Position nucléotidique polymorphe (SNP)																		Acides aminés changés	Activité enzymatique	
	70	190	191	282	341	403	434	458	481	589	590	600	609	665	803	809	845	857			
NAT2*4	T	C	G	C	T	C	A	C	C	C	G	A	G	T	A	T	A	G		Accélérée	
NAT2*5A					C				T											Ile114Thr	Diminuée
NAT2*5B					C				T						G						Diminuée
NAT2*5C					C										G						Diminuée
NAT2*6A				T							A									Arg197Gln	Diminuée
NAT2*6B											A										Diminuée
NAT2*6C				T							A				G						Diminuée
NAT2*7A																			A	Lys268Arg	Diminuée
NAT2*7B				T															A		Diminuée
NAT2*12A															G					Lys268Arg	Accélérée
NAT2*12B				T											G						Accélérée
NAT2*13				T																	Accélérée
NAT2*14A			A																	Arg64Gln	Diminuée
NAT2*14B			A	T																	Diminuée
NAT2*17							C													Gln145Pro	Diminuée
NAT2*18																		C		Lys282Thr	Accélérée
NAT2*19		T																			Diminuée
NAT2*20												G									Inconnue
NAT2*21									T												Inconnue
NAT2*22															T						Inconnue
NAT2*23	A																				Inconnue
NAT2*24						G															Inconnue
NAT2*25															G						Inconnue
NAT2*26																		C			Inconnue
NAT2*27										T											Inconnue

Tableau 6: Principaux allèles du gène NAT2 humain [182]. (http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm)

Divers groupes alléliques sont désignés en fonction de la présence d'un SNP spécifique sur un de ses sites de fixation. Par exemple, les SNP aux positions 191 (Arg64Gln), 341 (Ile114Thr), 590 (Arg197Gln) et 857 (Gly286Glu); sont caractéristiques des groupes alléliques de la *NAT2*14*, **5*, **6* et **7* respectivement, selon la base de données de la nomenclature de NAT. (<http://nat.mbg.duth.gr/>). Leurs proportions connaissent d'importantes variations selon l'origine ethnique. C'est ainsi que les populations caucasiennes comptent en moyenne des proportions équivalentes d'acétyleurs rapides et d'acétyleurs lents [177]. Les populations nord-africaines comptent parmi les plus riches en acétyleurs lents, avec environ 90 % dans la population générale maghrébine [183-185]. La fréquence de distribution de chaque allèle est également différente selon la localisation géographique ; les allèles *NAT2*5* et *NAT2*6* comptent parmi les plus fréquents dans le monde, l'allèle *NAT2*7* semble spécifique de la population asiatique et l'allèle *NAT2*14* de la population africaine avec un gradient Est-Ouest (19 % en Guinée-Bissau, 3 % au Soudan et l'absence totale de cet allèle en Somalie) [177, 186, 187].

2.4. Méthodes de détermination du polymorphisme génétique de la NAT2

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

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

2.4.1. Le phénotypage

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

La détermination phénotypique *in vivo* du polymorphisme génétique de la NAT2 consiste à quantifier les métabolites plasmatiques ou urinaires produits après l'administration d'une sonde métabolique. Le phénotypage de la NAT2 a été longuement réalisé avec l'utilisation de médicaments comme la dapsonne et la sulfaméthazine. Ces composés-tests ont ensuite été exclus à cause des effets indésirables liés à leur consommation. L'introduction de la caféine

comme substrat test a ensuite considérablement facilité la procédure de phénotypage [188]. Cette méthode utilise le calcul du rapport urinaire des principaux métabolites de la caféine que sont l'5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile (AFMU) et la 1-méthylxanthine (1X).

Actuellement, la caféine est le substrat le plus communément utilisé comme sonde métabolique pour la détermination du statut d'acétylation. Elle est exempte de toxicité sur une large gamme de doses et permet de déterminer facilement, avec précision, et en toute sécurité le phénotype d'individus sains et malades [189-191].

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

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

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

Cependant, les méthodes de phénotypage présentent certains inconvénients (absence d'un substrat-test présentant toutes les qualités requises telles que la spécificité, l'innocuité ou les contre-indications) qui limitent leur utilisation. Le problème du phénotypage est qu'il est soumis aux facteurs de variation ayant un effet sur l'expression du génome et en particulier les facteurs environnementaux [192].

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

2.4.2. Le génotypage

Les méthodes de génotypage reposent sur l'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire, la technique de PCR ou réaction de polymérisation en chaîne étant généralement à la base des méthodes utilisées en routine. Ces méthodes nécessitent le recueil préalable, par des techniques peu ou non invasives, d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique de l'individu (plus rarement l'ARN). La stratégie de génotypage appliquée est en fonction d'un certain nombre de paramètres, en particulier la nature des mutations à identifier (mutations ponctuelles, délétion ou amplification du gène) et le nombre de mutations à identifier pour obtenir un taux d'efficacité de prédiction du phénotype le plus élevé possible (en fonction de la fréquence des polymorphismes dans la population étudiée). La stratégie adoptée tient également compte du contexte clinique dans lequel le test est prescrit, à savoir dans un cadre purement préventif, avant l'introduction d'un traitement médicamenteux chez les patients à risque (phénotype non connu *a priori*) ou dans un cadre diagnostique pour expliquer un accident iatrogène ou une absence de réponse à un médicament donné (suspicion d'un phénotype déficitaire ou ultrarapide par exemple) [193].

Enfin, il convient d'adapter la stratégie de génotypage en fonction de l'origine ethnique ou géographique des individus, des variations interethniques dans la nature et de la fréquence de nombreux polymorphismes génétiques ayant été décrits [194]. La stratégie de génotypage du *NAT2* a permis d'identifier actuellement 36 variants alléliques du gène *NAT2* humain (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>).

La présence des mutations de la *NAT2* (essentiellement des SNP) est recherchée à l'aide de tests simples de type PCR RFLP ou PCR-digestion enzymatique (quand la mutation crée ou abolit un site de restriction), ou Allèle Spécifique-PCR (basée sur l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques complémentaires de la séquence normale ou de la séquence mutée).

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

La prédiction du phénotype par génotypage présente l'avantage majeur de n'être pas soumise à l'influence de facteurs confondants (co-administration de médicaments, pathologies associées). Cependant, elle souffre encore de la nécessité d'appliquer un grand nombre de tests, au vu du nombre parfois élevé de mutations à détecter. De nouvelles technologies ont été développées de type chromatographie liquide à haute performance CLHP (CLHP en

condition dénaturante), ou la discrimination allélique par PCR en temps réel (TaqMan® ou Lightcycler®), ou encore les puces à ADN ou biopuces qui, par la miniaturisation et l'automatisation des méthodes d'hybridation, permettront des tests de génotypage à « haut débit » et à « grande échelle » de l'ensemble des gènes impliqués dans les variations de réponse aux médicaments [195-197].

2.5. Association du polymorphisme génétique de la NAT2 avec des pathologies

2.5.1. NAT2 et hépatotoxicité

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

Le polymorphisme génétique de la NAT2 est surtout associé à l'hépatotoxicité médicamenteuse, car la NAT2 étant la principale enzyme impliquée dans le métabolisme de l'isoniazide, est exprimée au niveau du foie. La diminution ou la perturbation de l'activité de la NAT2 pourrait entraîner l'accumulation des précurseurs, tels que l'hydrazine et l'acétylhydrazine dans le foie, conduisant à l'hépatotoxicité de ce médicament [198-200].

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

Trois allèles NAT2 acétyleurs lents sont principalement associés à l'hépatotoxicité de l'INH induite par l'enzyme NAT2 : NAT2*5B, NAT2*6A et NAT2*7B [24, 111, 167, 201-203].

Une équipe Espagnole a démontré, que les acétyleurs lents avaient un risque faible de développer la cirrhose du foie induite par l'INH, même chez les sujets alcoolodépendants [204].

L'association entre le polymorphisme génétique de la NAT2 et le carcinome hépatocellulaire a été mise en évidence, mais uniquement chez des patients fumeurs et exposés à d'autres toxiques de l'environnement via l'alimentation [205, 206]

En Asie, des études ont établi une association entre le phénotype acétyleur lent de la *NAT2* et l'hépatotoxicité médicamenteuse des antituberculeux [201], en particulier de l'INH chez des sujets Taïwanais [111, 207], indiens [208, 209] et japonais [210-212].

2.5.2. NAT2 et cancer de la vessie

L'implication du polymorphisme de la *NAT2* dans la carcinogenèse de la vessie a été très étudiée, depuis que les arylamines ont été reconnues comme des composés responsables de la forte incidence de cancer de la vessie chez les travailleurs de l'industrie des colorants [213]. Dans les années 1980, plusieurs investigations ont démontré que le phénotype acétyleur lent de la *NAT2* est plus fréquent chez les patients caucasiens atteints de cancer de la vessie exposés professionnellement et de façon permanente à des arylamines tels que les travailleurs des industries du caoutchouc, du textile, ou de la chimie [214-216].

Il existe un risque accru de cancer de la vessie, et le risque était plus grand chez les acétyleurs lents [217]. Ce risque n'est pas élevé chez les professionnels non exposés potentiellement aux arylamines, indépendamment du statut de l'acétyleur.

Des études basées sur le génotypage *NAT2*, ont également observé une surreprésentation considérable des phénotypes lents de *NAT2* chez les patients atteints de cancer de la vessie et exposés à des arylamines soit par leurs occupations professionnelles (exposition chimique aux arylamines) ou par leurs habitudes tabagiques [218-221].

2.5.3. NAT2 et cancer colorectal

Après le cancer de la vessie, le cancer colorectal est la maladie qui a été la plus étudiée en relation avec le polymorphisme génétique de la *NAT2*. Le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus fréquent dans les pays développés, et les preuves épidémiologiques confirment que la survenue de ces cancers colorectaux est aussi liée, au tabagisme, à l'exposition à des contaminants de l'environnement et à l'alimentation [222, 223]. Par exemple, des chercheurs ont fait la corrélation entre des taux plus élevés de cancer colorectal et le phénotype rapide de la *NAT2* en cas de consommation régulière et répétée de viande rouge cuite à très forte température comme lors de la cuisson au barbecue. Dans ces conditions, la cuisson va entraîner la formation d'arylamines à fort pouvoir cancérigène, par pyrolyse des acides aminés des protéines [222, 224, 225].

Mais, ces composés, le plus souvent impliqués dans le risque de cancer du côlon sont des amines hétérocycliques, qui sont relativement de mauvais substrats pour les enzymes NAT2. En effet, si les NAT2 parviennent quand même à *O*-acétyler les amines hétérocycliques au niveau du côlon, ces derniers sont majoritairement *N*-hydroxylés par les enzymes du cytochrome P450 pour donner naissance à des métabolites très réactifs [226, 227].

Les dérivés *N*-hydroxylés pourront ensuite être convertis par les enzymes NAT2 au niveau du côlon en métabolites *O*-acétylés, instables qui se décomposent spontanément en ions nitréniums très réactifs, alkylants puissants, qui forment des adduits à l'ADN pouvant produire des mutations et initier ainsi un processus cancéreux. Par conséquent, les acétyleurs rapides sont à risque plus élevé de cancer du côlon dû à la formation de ces métabolites réactifs. Toutefois, des différences interethniques ont également été démontrées pour ce type de cancer [228]. D'autres études suggèrent que l'interaction entre le génotype NAT2 et la consommation de viande rouge ne représente pas un facteur de risque pour le cancer colorectal [229].

3. Généralités sur les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes hépatiques clé de la fonction de détoxification. Ils sont impliqués dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, pesticides polluants, toxiques, cancérigènes..) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines...).

Il s'agit de monooxygénases localisées sur le réticulum endoplasmique, et ayant acquis au cours de l'évolution des espèces un degré de diversité leur permettant de métaboliser un grand nombre de corps chimiques.

Une des caractéristiques de ces enzymes est leur inductibilité, en particulier par certaines hormones, médicaments ou polluants chimiques. Paradoxalement, ces enzymes ont également un grand potentiel d'activation chimique de certains composés pouvant produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérigènes. Cette ambivalence et les conséquences majeures qui en découlent ont conduit à s'intéresser aux cytochromes P450. Chez l'homme, les familles les plus prépondérantes de CYP450 sont représentées par les familles CYP1A, CYP2C et CYP3A (Figure14) [230].

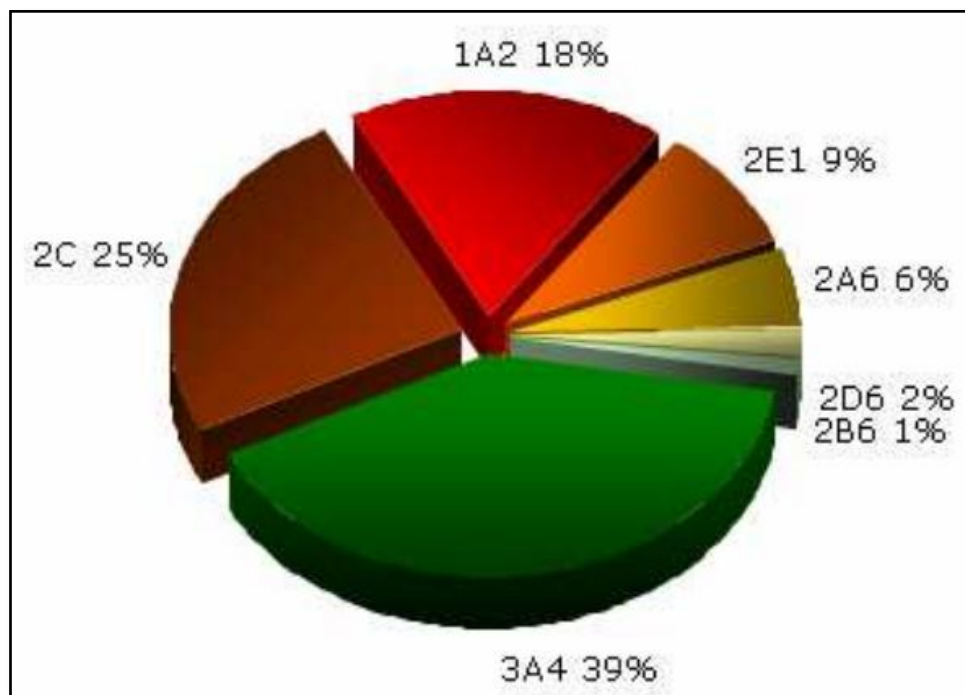


Figure 14 : Répartition des CYPs dans le foie Humain [231].

3.1. Classification et nomenclature

Nelson et al recensaient en 1995, 481 gènes codant pour les CYPs et 22 pseudogènes. Ces gènes été décrits chez 85 eucaryotes, incluant vertébrés, invertébrés, plantes et algues et 20 procaryotes. De nombreux autres cytochromes P450 ont été isolés depuis et plus de 1000 sont aujourd'hui clairement identifiés.

Depuis 1987, ces protéines sont répertoriées et désignées selon une nomenclature basée uniquement et strictement sur le pourcentage d'homologies entre les séquences en acides aminés, les similitudes en termes d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte.

Ainsi, si deux cytochromes P450 présentent plus de 40% d'homologie dans la séquence d'acides aminés, ils seront considérés comme appartenant à la même famille. Si l'homologie est supérieure à 55% les protéines font parties de la même sous famille. Les protéines ayant moins de 3% de divergence sont classées comme variants alléliques.

On dénombre actuellement chez l'homme, aux moins 17 familles différentes de cytochromes P450 incluant 26 sous familles organisées en 49 gènes hautement similaires et à localisation chromosomique différentes, et 15 pseudogènes. Pour désigner un gène chez l'homme on utilisera la forme italique *CYP* pour cytochrome *P450*, suivi du nombre arabe désignant la famille, puis une lettre désignant le sous famille et enfin d'un chiffre arabe désignant le gène. La lettre P après un gène désigne un pseudogène. Les ADNc, ARNm et protéines de toutes les espèces doivent être désignés en lettre capitale.

En se basant sur cette similitude entre les séquences en acides aminés, et dans certains cas en tenant compte des activités catalytiques, il a été possible de déterminer si deux gènes étaient issus ou non d'une duplication de gènes et d'établir des arbres phylogénétiques. En 1999, le nombre de famille est de 150 et la classification requiert un niveau supplémentaire de regroupement.

Les clans font alors leur apparition et rassemblent les familles qui appartiennent à un même groupe (issu d'un même gène ancestral) d'après les nombreux arbres phylogénétiques établis auparavant. Ces clans sont désignés par le chiffre le plus petit des familles qu'ils regroupent ou de celui comportant la famille majoritaire. Ainsi, le clan 2 regroupe la famille CYP2 de même que les familles CYP1, 17, 18 et 21.

Un certain nombre de cytochromes P450 sont maintenant connus pour leur polymorphisme d'expression ou de fonction, et pour certains d'entre eux les bases moléculaires de ces variations sont décrites.

La famille CYP1 comporte deux sous famille 1A et 1B. La sous famille 1A est composée de deux membres 1A1 et 1A2 dont les séquences nucléiques sont très proches (92% de similitude).

La forme 1A1 est présente à un taux très bas dans le foie: cette enzyme est essentiellement extra hépatique. La forme 1A2 est impliquée dans le métabolisme de procarcinogènes (amines aromatiques), ainsi que dans la survenue d'hépatites auto-immunes. Cette famille est inductible par les hydrocarbures aromatiques. La famille CYP2 est divisée en un très grand nombre de sous-famille: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F et 2J.

La sous-famille 2C comporte plusieurs membres (2C8, 2C9 et 2C19) qui sont impliqués dans le polymorphisme oxydatif de la méphénytoïne et du tolbutamide. La sous- famille 2D est responsable du polymorphisme de la débrisoquine hydroxylase. La sous famille 2E a un seul membre 2E1 inductible par l'alcool, l'isoniazide, l'acétone et les dérivés du pyrazole. Cette sous-famille est inductible, à des degrés variables, par le phénobarbital.

La famille CYP3 comporte une seule sous famille 3A. Trois membres de cette sous famille (3A4, 3A5 et 3A7) ont des séquences extrêmement proches (<5% de divergence). Ils sont inductibles par les glucocorticoïdes de synthèse, le phénobarbital et par deux types d'antibiotiques, les macrolides et la rifampicine.

La notion de polymorphisme génétique s'est étendue aux monooxygénases de la phase I avec la mise en évidence du polymorphisme de l'hydroxylation de la débrisoquine et de la spartéïne et d'environ soixante autres agents thérapeutiques.

D'autres parts de nombreuses études actuelles mettent en cause les cytochromes P450 dans la susceptibilité individuelle au cancer induit par les xénobiotiques tel que la fumée du tabac. Ces études montrent une prédisposition génétique dans la capacité à métaboliser les substances cancérigènes présentes.

Les familles les plus impliquées dans se genre d'études sont les CYP1A1, CYP2E1 et CYP2D6 [232].

3.2. Localisation et structure des CYP450

Localisation

C'est au niveau hépatique que la majorité des CYP sont identifiés. Ils sont situés dans le réticulum endoplasmique, retrouvé dans la fraction microsomale lors du fractionnement cellulaire. Chez l'homme, la distribution tissulaire des CYP est ubiquitaire. Ils sont prédominants dans le foie, mais aussi présents dans d'autres organes tels que les reins, les poumons, le cerveau, la peau, l'intestin et le placenta.

Structure

Les cytochromes P450 constituent un système enzymatique complexe de structure globulaire, fortement ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique ou les microsomes. Cette configuration leur permet d'avoir accès autant aux substrats lipophiles qu'aux composés hydrophiles[230].

Ce système est formé au minimum de trois composants : une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique liée à un atome de fer par quatre liaisons covalentes. La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée et positionnée dans le site catalytique. Enfin la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau et l'oxygène moléculaire. Les cytochromes P450 sont donc des protéines à hème –thiolates.

3.3. Principales fonctions des cytochromes P450

Fonctions biologiques des cytochromes P450

Les fonctions biologiques des CYPs peuvent se diviser en deux domaines d'importance égale: d'une part le métabolisme des substances endogènes, d'autres part le métabolisme des xénobiotiques. Il arrive que certains CYPs présentent des potentialités dans chacun des deux domaines.

Métabolisme des substances endogènes:

Les principales réactions catalysées par les P 450 ont trait à l'hydroxylation des stéroïdes, des vitamines A et D et des acides biliaires.

L'importance de ces voies métaboliques est soulignée par la gravité des symptômes relevés chez des patients déficients en certains des CYPs impliqués dans ces activités. Ces cytochromes sont localisés dans de très nombreux tissus tels que corticosurrénale, testicule, ovaire, placenta et tissus adipeux.

La spécificité d'expression tissulaire des CYP contrôle la production de différents stéroïdes dans différents tissus: aldosterone, cortisol dans les glandes surrénales, testostérone dans le testicule. En plus de cette distribution tissulaire, une distribution subcellulaire de ces enzymes a aussi été retrouvée.

Métabolisme des xénobiotiques

Les CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques montrent des spécificités larges et croisées pour de nombreux substrats. En effet, la spécificité de substrats des cytochromes P450 est relative et chevauchante (puisque'un CYP peut métaboliser plusieurs substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP).Malgré la proximité de leurs séquences protéiques, les isoenzymes d'une sous-famille montrent des activités catalytiques divergentes. Le tableau 7 présente quelques substrats des P 450 des familles 1 à 3 chez l'homme.

3.4. Expression et polymorphisme génétique du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)

3.4.1. Expression du CYP2E1

Le CYP2E1 est exprimé en grande quantité au niveau de l'hépatocyte, et en quantité 10 à 100 fois plus faible dans les cellules de Kupffer [233] et les tissus extrahépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau, lymphocytes) [234]. La répartition du CYP2E1 dans les hépatocytes n'est pas homogène. Les plus grandes concentrations sont retrouvées dans la région périveineuse du lobule hépatique là où l'induction par l'éthanol et la toxicité sont le plus prononcées [235].

CYP	Substrats
CYP1A1	Chlorzoxazone, théophylline, étoxyresorufine
CYP1A2	Acetaminophène, acétanilide, caféine, phénacétine, propranolol, tachine
CYP2A6	Coumarine
CYP2B6	cyclophosphamide, S-Méphénitoine (nirvanol)
CYP2C8	diclofenac, mephenitoine, toglitazone
CYP2C9	acide acethyl salicylique, diclofenac, ibuprofene, phenytoine, acide tielinique, tolbutamine, warfarine
CYP2C19	citalopram, cycloguanil, cyclophosphamide, diazepam, hexobarbital, omeprazol, proguanil, propranolol
CYP2D6	clozapine, codéine, débrisoquine, propranolol, spartéine.
CYP2E1	alcools, acetaminophen, chloroforme, halothane, acide launique, isoniazide
CYP3A4	acetaminophen, amiodarone, cocaine, codeine, diazepam, digitoxine, citalopram, chlorzoxazone, erythromicine, methadone, taxol, xarfarine, omeprazole.

Tableau 07: Liste de quelques substrats des cytochromes P450s.

3.4.2. Polymorphisme génétique du CYP2E1

Le gène *CYP2E1* est situé sur le chromosome 10. Il se compose d'environ 11 kb et 9 exons [236]. Plusieurs polymorphismes génétiques ont été décrits pour le *CYP2E1* chez l'homme [237], mais aucun polymorphisme important n'affecte la partie codante du gène [238]. Deux sites ont été plus particulièrement étudiés :

- le site de restriction *Rsa I*, en complet déséquilibre de liaison avec le site *PstI*, est situé dans la partie 5'-régulatrice du gène. Il permet de caractériser les allèles c1 (commun) et c2 (muté). [239]. Cette mutation augmente le taux de transcription *in vitro* d'un gène *reporter*, mais des résultats contradictoires concernant l'expression ou l'activité de l'enzyme ont été obtenus *in vivo* : dans certaines études, la présence de l'allèle muté est associée à une activité transcriptionnelle augmentée [240], alors que, dans d'autres études, aucune différence d'expression ou d'activité n'a été retrouvée [241, 242].

À l'inverse, certaines études ont montré que l'allèle muté était plutôt associé à une diminution de l'activité de la protéine [243] ou de son inductibilité [26];

- le site de restriction *Dra I*, situé dans l'intron 6, est partiellement lié au site *RsaI* et permet de caractériser les allèles D et C [244].

La fréquence des allèles mutés du *CYP2E1* diffère selon les ethnies (Tableau 8). Elle est relativement faible chez les Caucasoïdes (2 % à 8 %) comparativement aux Asiatiques (20 % à 28 %).

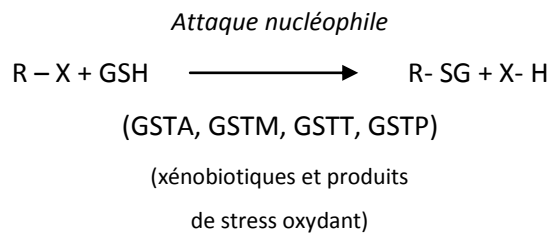
Auteurs	Ethnie	Fréquence (%)		
		<i>c2 (RsaI)</i>	<i>C (DraI)</i>	<i>CYP2E1*1D</i>
Lucas et coll., 1996 ; Plee-Gautier et coll., 2001 ; Mc Carver et coll., 1998	Caucasoïdes	2,5	7,9	1,5 à 6,9
Stephens et coll., 1994 ; Hu et coll., 1999	Asiatiques	28,0	24,0	20,0
Lucas, présentation personnelle	Indiens d'Amérique	12,0	17,0	-
Stephens et coll., 1994 ; Mc Carver et coll., 1998	Afro-Américains	1,0	8,0	20,0

Tableau 8 : Fréquence (%) des allèles rares *c2 (RsaI)* et *C (DraI)* et *CYP2E1*1D* (répétition) en fonction de l'ethnie.

4. Généralités sur les Gluthation-S-Transferases

4.1. Fonction, classification et nomenclature des GST

Les glutathion-S-transférases (GST) constituent une famille d'enzymes jouant un rôle clé dans la détoxification d'un grand nombre de composés hydrophobes et électrophiles endogènes et exogènes tels que les époxydes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (composants cancérigènes de la fumée de tabac, benzo[a]pyrène).



Tous les eucaryotes expriment plusieurs isoenzymes cytosoliques et membranaires. Elles constituent des enzymes métaboliques de phase II, puisqu'elles catalysent la conjugaison de leurs substrats, et particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), à un groupement glutathion réduit menant à la formation de métabolites hydrophiles excrétables.

Chez l'homme les GST sont préférentiellement synthétisés dans le foie, mais on les trouve également dans les reins, l'estomac et faiblement dans les muscles squelettiques et cardiaques. Elles sont caractérisées par leur présence aussi bien dans la fraction cytosolique que microsomale.

Les GST assurent leur fonction de conjugaison grâce à l'existence de deux sites enzymatiques de liaison [245]: un site de liaison pour le glutathion appelé G-site et un site de liaison pour le substrat appelé H-site. Actuellement, les GST humaines sont réparties en 6 groupes selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques, localisations et nature du substrat) biochimiques (point isoélectrique) et immunologiques. On distinguera ainsi les classes : alpha (α), mu (μ), kappa (κ), theta (θ), pi (π), sigma (σ) [246].

Chaque classe est représentée par un nombre précis de gènes. La classe alpha (*GSTA*) est représentée par 5 gènes (*GSTA1*, *A2*, *A3*, *A4* et *A5*). La classe thêta par 2 gènes *GSTT1* et *GSTT2*.

La classe mu comprend 5 gènes: *GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* et *M5*.

Enfin, un seul gène a été décrit dans chacune des classes kappa (*GSTK*) et pi (*GSTP*) nommés respectivement, *GSTK1* et *GSTP1*. La classe sigma reste mal connue [246].

Les gènes *GSTM1* et *GSTT1*, sont deux gènes appartenant respectivement aux classes mu et thêta. Il s'agit des gènes de la famille des glutathion S-transférases les plus étudiés. *GSTM1* est localisé sur le chromosome 1 et *GSTT1*, sur le chromosome 22.

4.2. *GSTM1*, gène et enzyme

Structure du gène *GSTM1*

Le gène *GSTM1* appartient à la classe μ qui renferme 4 autres gènes nommés *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* et *GSTM5* localisés sur le chromosome 1 au niveau de la région 1p13.3 [247]. La carte physique détaillée montre que le gène *GSTM1* est situé en aval des gènes *GSTM4* et *GSTM2* et en amont des gènes *GSTM5* et *GSTM3* (Figure 15).

Le gène *GSTM1* est constitué de 8 exons et 7 introns. Sa taille est de 5.92kb.

Des études ont montré que ce gène peut être dupliqué [248]. En effet, il peut présenter une autre copie sur le même chromosome, expliquant ainsi l'activité ultrarapide de l'enzyme *GSTM1* observée dans certains cas. Cette duplication du gène est due à un crossing over inégal entre les deux brins des deux chromosomes 1, ce qui permet l'introduction d'un deuxième gène *GSTM1* au voisinage du premier.

Selon certains auteurs [248, 249], il existe une autre classe mu, constituée de gènes ou de pseudo gènes, localisée au niveau du chromosome 3, probablement dans la région 3p24-3pter. Cette observation n'a pas été confirmée par d'autres auteurs.

4.3. polymorphisme de *GSTM1*

Deux polymorphismes ont été décrits au niveau de *GSTM1*:

- une délétion homozygote complète du gène, représentée par l'allèle *GSTM1*0/*0*. Cette forme allélique résulte d'un crossing over inégal entre deux régions répétées de 4.2kb, qui flanquent le gène *GSTM1* et qui provoquent une délétion de 15kb incluant le gène entier [250], conduisant au niveau phénotypique à un déficit enzymatique total (Figure 16). L'enzyme *GST μ* est donc inactive chez plus de 50% des individus allant de 45 à 58% selon diverses études menées sur des populations européennes.

Chromosome :1. position: 1p13.3

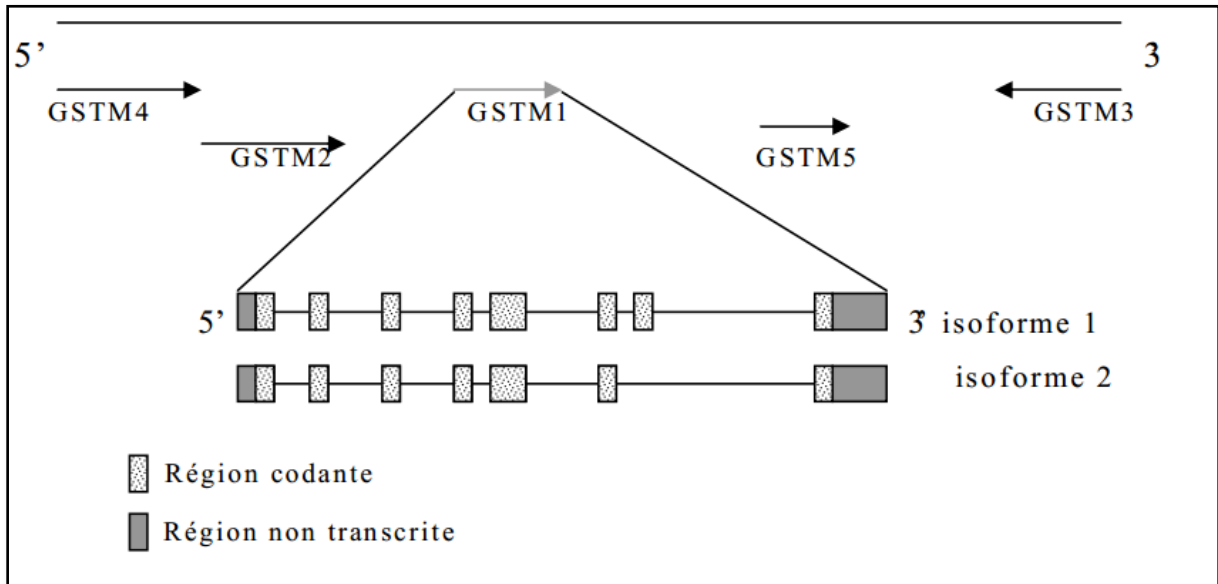


Figure 15: Position et structure du gène *GSTM1*.

L'isoforme 1 est constitué de 8 exons.

L'isoforme 2 est constitué de 7 exons et donne naissance à une protéine plus courte de 37 acides aminés

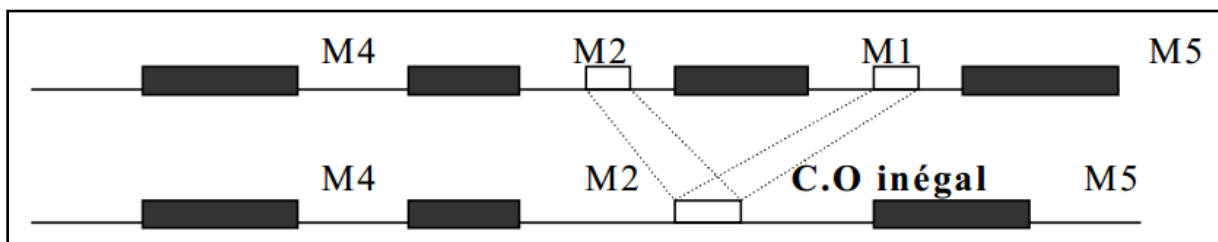


Figure16: Mécanisme d'apparition de la délétion *GSTM1*.

- Transversion C-G (en position 534 de l'exon 7 du gène) définissant ainsi les allèles GSTM1*A et GSTM1*B qui diffèrent seulement par 1 seul acide aminé K172N [251]. Les deux versions restent parfaitement fonctionnels, et sans expression phénotypique particulière. Ces deux allèles sont considérés comme les représentants du phénotype de conjugateur positif.

Il existe une relation de codominance entre ces deux allèles (GSTM1*A et GSTM1*B). Par contre, il existe une relation de dominance entre ces allèles et l'allèle nul.

L'activité catalytique de l'enzyme est normale chez les individus ayant l'un des génotypes suivant GSTM1*0/*A, GSTM1*0/*B, GSTM1*A/*A, GSTM1*A/*B et GSTM1*B/*B. Cependant, l'activité est complètement nulle chez les individus ayant le génotype GSTM1*0/*0 (Tableau 9).

Polymorphisme	Position nucléotidique polymorphe	Acides aminés changés	Activité Enzymatique
GSTM1*A	allèle sauvage	K172N	Normale
GSTM1*B	C534G -exon 7-		Normale
GSTM1*0	Délétion de 15 kb du gène		Nulle

Tableau 9 : Différentes formes alléliques du gène *GSTM1* humain.

4.4. *GSTT*, gène et enzyme

Chez l'homme, la classe thêta renferme deux gènes *GSTT1* et *GSTT2*. Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 22 et sont séparés par approximativement 50kb. Ils ont une structure similaire avec 5 exons et 4 introns. Les protéines issues de ces gènes sont identiques pour 55% de leurs séquences en acides aminés [252].

Structure du gène *GSTT1*

Le gène *GSTT1* est précisément localisé à la position 22q11.23. Il a une taille 8.1kb (Figure 17).

Structure du gène *GSTT2*

Le gène *GSTT2* a une taille de 3.7kb. Il est situé tête à tête avec un gène codant pour la D-dopachrome tautomerase (DDCT). La séquence qui se situe entre les deux gènes contient un promoteur bidirectionnel.

Le gène *GSTT2* peut être dupliqué. Les études montrent que ces duplications peuvent porter soit une mutation au niveau du site de la jonction entre l'exon2 et l'intron2 ou alors un codon stop prématuré au niveau du codon 196. Ces changements font de ces dupliquas des pseudogènes appelés: *GSTTP1* et *GSTTP2*(Figure 18) [252].

Chromosome:22; position: 22q11.23

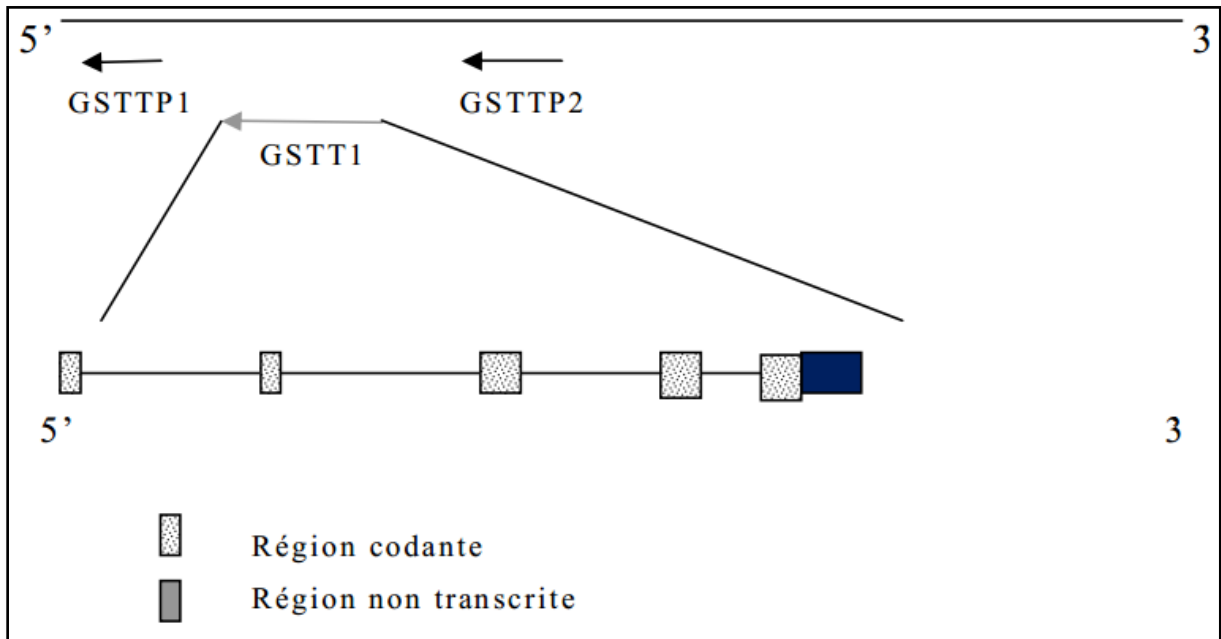


Figure 17: Position et structure du gène *GSTT1*.

Chromosome:22; position: 22q11.2

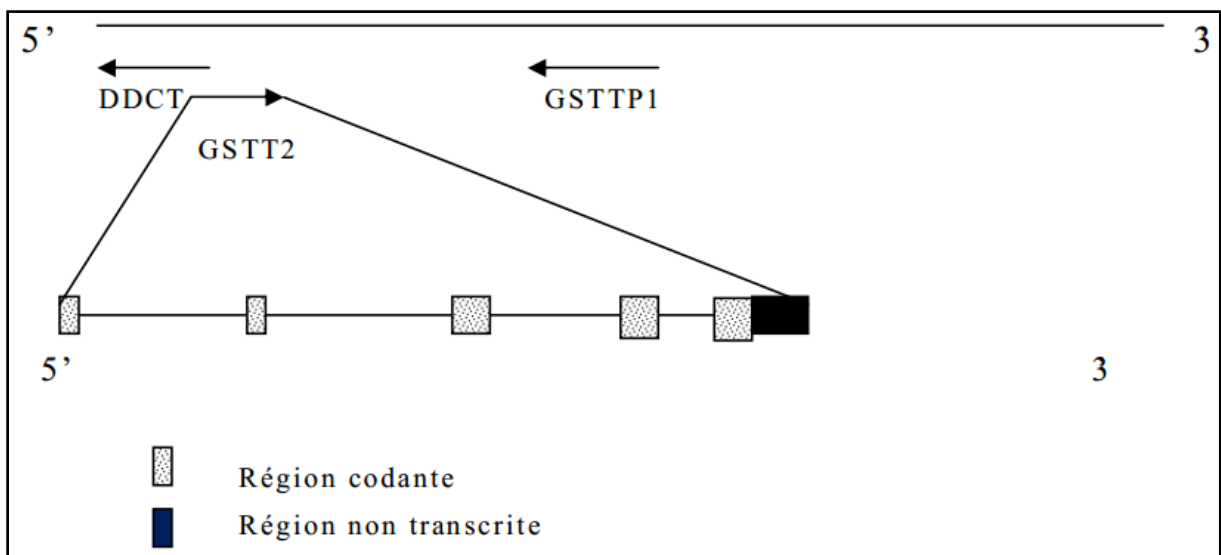


Figure18: Position et structure du gène *GSTT2*.

4.5. Polymorphisme de *GSTT1*

En 1989, une différence inter individuelle dans le métabolisme du méthyle chlorure a été observée, montrant l'existence de trois groupes d'individus différents par le degré d'élimination métabolique du produit. Cette élimination peut être absente pour les individus n'ayant pas une activité enzymatique correspondante, moyenne pour les individus ayant une faible activité enzymatique ou une élimination normale pour les individus ayant une activité enzymatique normale [253].

On a pu établir une variabilité dans le métabolisme du chlorure de méthylène dans le sang humain. Cette différence était attribuable à un polymorphisme génétique au sein de *GSTT1* correspondant à une délétion partielle de 54 251 paires de bases du gène *GSTT1* et confère trois phénotypes distincts (" *non conjugators*, *low conjugators* et *high conjugators* ") selon que deux, un seul ou aucun des deux allèles soit délété.

Le phénotype de non conjuguant est donc dû à une délétion homozygote de l'allèle fonctionnel de *GSTT1* et correspond par conséquent, au génotype $GSTT1^*0/0$ [254]. Le phénotype de moyen conjuguant est dû à une délétion hétérozygote de l'allèle fonctionnel de *GSTT1* et le phénotype très conjuguant est dû à la présence homozygote de l'allèle fonctionnel de *GSTT1*.

En ce qui concerne la fréquence de ce polymorphisme, on rapporte qu'entre 15 à 20 % des Caucasiens de descendance européenne sont $GSTT1^*0$ (donc homozygotes délétés sans activité de l'enzyme) [254].

Une étude récente a permis l'identification de deux autres allèles, l'allèle $GSTT1^*A$ et l'allèle $GSTT1^*B$, qui sont le résultat d'une substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) au niveau du nucléotide 310 (A310G) [255].

L'apparition de l'allèle $GSTT1^*B$ sous la forme homozygote cause l'inactivation de l'enzyme *GSTT1* (Tableau 10).

Le phénotype non conjuguant peut donc être due aux génotypes $GSTT1^*0/0$, $GSTT1^*B^*/B^*$ ou $GSTT1^*B^*/0$. Alors que le phénotype conjuguant moyen est dû à la présence du génotype hétérozygote $GSTT1^*A^*/0$ ou le génotype $GSTT1^*A^*/B^*$.

Le phénotype de fort conjuguant est dû à la présence homozygote de l'allèle $GSTT1^*A^*/A^*$.

Polymorphisme	Position nucléotidique polymorphe	Acides aminés changés	Activité Enzymatique
GSTT1*A	Allèle sauvage		Normale
GSTT1*B	A 310 G		Nulle
GSTT1*0	Délétion de 54251pb du gène		Nulle

Tableau 10 : Différentes formes alléliques du gène *GSTT1* humain.

MATERIEL ET METHODES

1. Contrôles et patients:

1.1. Population contrôle :

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de cordons ombilicaux de 163 nouveau-nés non apparentés. Ils sont issus de différentes régions du Maroc et l'origine marocaine de leurs parents et grands-parents a été confirmée. Le consentement éclairé des parents pour le prélèvement et l'analyse de l'ADN a été obtenu. L'approbation éthique pour cette étude a été obtenue auprès du comité scientifique de la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.

1.2. Patients étudiés :

Entre Mai 2014 et Juin 2015, une cohorte de 42 patients marocains tuberculeux ayant développé une hépatotoxicité sous antituberculeux a été incluse dans cette étude. L'âge des patients variait entre 13 et 80 ans (moyenne de 46 ans). Le sexe ratio était de 1,6 (16 femmes/26 hommes). Trente individus étaient atteints de tuberculose pulmonaire active et 12 de tuberculose extra pulmonaire. Ils avaient tous été traités selon le programme national de référence. Au cours de la période de traitement, les patients avaient été régulièrement interrogés sur les symptômes concernant les effets indésirables d'hépatotoxicité induite par les anti-tuberculeux (nausées, vomissements, douleurs abdominales, perte d'appétit, ictère, asthénie, fièvre, prurit, altération de l'état général...) [256]. Les 42 patients ont été diagnostiqués avec une hépatotoxicité induite par les médicaments anti-tuberculeux, en se basant sur des critères cliniques et biologiques. Les tests biologiques ont été effectués systématiquement pour tous les patients, même asymptomatiques. Une fiche clinique renseignant l'ensemble de ces données a été remplie pour chaque patient (Figure 19). L'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux a été définie comme une augmentation des taux sériques des transaminases (ALAT et/ou ASAT) supérieure deux fois à la normale [13]. Lorsqu'une hépatotoxicité due au traitement anti-tuberculeux (ATDH) était soupçonnée, les médicaments anti-tuberculeux ont été immédiatement arrêtés. Les patients ont donné leur consentement éclairé pour le prélèvement et l'analyse de l'ADN.

Etude moléculaire du gène <i>NAT2</i> (Hépatotoxicité sous traitement antituberculeux)			
Nom, Prénom :	N° du dossier clinique :		
Sexe :	Code patient HT* :		
Date de naissance :	Origine Père :	Mère :	
Tél (Patient) :			
Consanguinité : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	Médecin traitant	Service	Tél.
Antécédents personnels : Tuberculose pulmonaire <input type="checkbox"/> Extrapulmonaire <input type="checkbox"/> Antécédents familiaux : Pulmonaire <input type="checkbox"/> Extrapulmonaire <input type="checkbox"/> Localisation <input type="checkbox"/> Si forme familiale : arbre généalogique au verso de la fiche			
Localisation de tuberculose : Age du diagnostic : Traitement suivi : Durée du traitement :			
Hépatotoxicité : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Délai d'apparition de l'hépatotoxicité : Signes cliniques de l'hépatotoxicité : Signes biologiques de l'hépatotoxicité :			
Prélèvement sanguin pour étude moléculaire du gène <i>NAT2</i> (Sang total) <input type="checkbox"/> 1 tube EDTA (au moins 3ml)			
* HT : Hépatotoxicité			
Adresse et contacts : Département de Génétique Médicale. Institut National d'Hvaïène : 27.			

Figure 19 : Fiche de renseignements cliniques des patients atteints d'hépatotoxicité due aux antituberculeux.

2. Méthodes expérimentales

2.1. Recherche bioinformatique

La bioinformatique est la discipline d'analyse de l'information biologique, en majorité sous la forme de séquences génétiques et de structures de protéines. Elle est constituée par l'ensemble de concepts et techniques (méthodes et logiciels) nécessaires à l'interprétation de l'information génétique et structurale. Dans notre étude, nous avons utilisé les bases de données suivantes :

www.ncbi.nlm.nih.gov/omim : La première recherche a été faite dans une base de données qui présente un catalogue de gènes et de désordres génétiques et cliniques.

www.ensembl.org : Base de données à partir de laquelle, nous avons pu identifier toute l'information concernant la séquence précise des exons et des introns des gènes *NAT2* et *CYP2E1*, celle de leurs transcrits et la correspondance avec leur séquence protéique.

www.primer3.ut.ee : Logiciel à partir duquel, nous avons pu désigner les amorces de la séquence cible, ainsi toutes les informations nécessaires à la synthèse.

www.genome.ucsc.edu : C'est un site web généraliste au même titre qu'Ensembl. Il propose une synthèse des informations connues sur les génomes séquencés et de leurs annotations. Par exemple il permet de télécharger des données à partir de la base de données Genome Browser ([Table Browser](#)), de visualiser de manière interactive les données génomiques ([Genome Browser](#)) et d'aligner rapidement les paires d'amorces de PCR du génome ([In-Silico PCR](#)) et des séquences du génome ([BLAT](#)).

www.secure.ngri.org.uk/SNPCheck/docs.htm : Permet de vérifier les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) existants dans les régions de liaison d'amorce prédites trouvés dans les amorces conçues pour la PCR.

www.pharmgkb.org/: C'est une ressource de connaissance en pharmacogénomique qui englobe l'information clinique, y compris la posologie recommandée et les étiquettes des médicaments, elle fournit également des informations pratiques potentiellement et cliniquement, concernant les associations gène-médicament et les relations génotype-phénotype. PharmGKB recueille, organise et diffuse des connaissances sur l'impact de la variation génétique humaine et les réponses aux médicaments.

2.2. Prélèvements des échantillons biologiques

Les sangs du cordon de la population contrôle ont été prélevés au centre national de référence en néonatalogie et en nutrition, Hôpital d'enfants de Rabat, Maroc.

Les prélèvements sanguins des 42 patients ayant développé une hépatotoxicité due aux antituberculeux, ont été réalisés au service de Pneumologie hôpital Moulay Youssef du centre hospitalier Ibn Sina en coordination avec le laboratoire de Pharmacotoxicologie du centre Anti Poison et de Pharmacovigilance de Rabat et le département de Génétique Médicale de l'Institut National d'Hygiène.

Un échantillon de sang périphérique de 5 mL par ponction du sang du cordon (pour les nouveaux-nés) ou veineuse (pour les patients tuberculeux) a été réalisé sur tube contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) dissodique (solution à 5%) comme anticoagulant. Il présente l'avantage d'être également un inhibiteur des nucléases. L'hème est un puissant inhibiteur de la Taq polymérase, alors il est nécessaire d'être éliminé au cours de l'extraction. C'est la raison pour laquelle il est préférable de prélever stérilement le sang frais sur un anticoagulant du type EDTA, et éviter d'utiliser des tubes héparinés car l'héparine est un inhibiteur de la Taq polymérase. Quand c'est nécessaire, les prélèvements étaient parfois conservés à -20 °C pour une extraction ultérieure. Dans ces conditions, la décongélation douce des échantillons sanguins à +4 °C ou à température ambiante est souhaitable juste avant l'extraction d'ADN.

2.3. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique

De très nombreux procédés d'extraction de l'ADN génomique ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industries. L'objectif de ces méthodes de purification est de séparer le matériel génétique des résidus protéiques qui lui sont accrochés sans pour autant nuire à son intégrité, et également d'éliminer les contaminants qui pourraient perturber les techniques ou réactions effectuées par la suite. Les techniques d'extraction des acides nucléiques peuvent se classer en trois principales classes en fonction du principe auquel elles font appel : les méthodes utilisant des solvants organiques (cas d'extraction au phénol-chloroforme), les méthodes utilisant des solvants non organiques (cas d'extraction aux sels), les méthodes basées sur l'utilisation de kits commercialisés. L'extraction des acides nucléiques peut être réalisée à partir du sang périphérique fraîchement recueilli (de préférence) ou décongelé [257]. En cas d'impossibilité la technique d'extraction s'effectue sur

du sang stocké au maximum 1-2 jours à 25 °C (envoi possible par courrier) ou 7 jours à +4 °C, sous peine notamment de réduire le rendement de l'extraction d'au moins 15%. En effet, la cristallisation lors de la congélation suivie de la décongélation provoque des contraintes mécaniques qui se traduisent par de nombreuses cassures de la molécule d'ADN. Dans notre étude, nous avons utilisé deux méthodes d'extractions :

2.3.1. Extraction aux sels [258]

La technique d'extraction aux sels présente l'avantage, d'être simple, rapide et permet de donner de bonnes concentrations d'ADN et d'éviter les phases phénoliques toxiques puisque les produits utilisés sont moins dangereux et moins onéreux. Le rôle du sel est de casser l'interaction entre la molécule d'ADN et l'eau, en neutralisant ces charges de phosphate de sucre, ce qui rend l'ADN moins hydrophile et donc beaucoup moins soluble, permettant à l'ADN de sortir de la solution et d'être isolé facilement.

Lyse des globules rouges

Le sang est décongelé à +4 °C ou à température ambiante et la lyse cellulaire est effectuée immédiatement après la décongélation. Le sang total subit une lyse complète de globules rouges par ajout de 2 volumes d'une solution hypotonique à principe de choc osmotique (TE 20/5 : Tris-HCL 20 mM à pH 7,6 et 5 mM d'EDTA à pH 8), et incubation pendant 20 minutes dans la glace. Après une centrifugation à 664 G pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé pour se débarrasser des globules rouges. Le culot cellulaire est récupéré, est remis en suspension dans le même tampon et recentrifugé dans les mêmes conditions. Ces étapes sont répétées jusqu' à l'élimination de la totalité des globules rouges. Le culot blanchâtre ainsi obtenu, constitué essentiellement de leucocytes peut être directement utilisé pour une extraction d'ADN ou être conservé à -20 °C pour une extraction ultérieure.

Lyse des globules blancs

Le principe consiste à traiter le lysat cellulaire par une solution saline à haute force ionique (NaCl 5M) [259]. Dont le but de maintenir le SDS (Solution Dodécyl Sulfate) sous sa forme soluble lors de la précipitation de l'ADN par l'éthanol absolu. Les leucocytes sont soumis à une lyse après addition de 3 mL d'une solution de lyse des globules blancs, tampon SLB (Tris-HCl 10 mM à pH 7,6, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, le détergent SDS 0,2%).

Protéolyse

La protéinase K est ajoutée à raison de 0,2 mg/mL de sang, afin de digérer les protéines et les débris cellulaires qui lui sont associées, et donc de libérer l'ADN nucléaire dans le milieu. Les tubes sont ensuite incubés à 65 °C pendant 4 heures ou à 42 °C durant toute une nuit, sous agitation douce. Après protéolyse, les tubes sont additionnés de l'eau distillée stérile et d'une solution de NaCl à 5 M puis mélangées et centrifugées à 664 G pendant 30 min. seul le surnageant est ensuite récupéré.

Précipitation de l'ADN

La précipitation de l'ADN s'effectue à haute concentration de l'alcool éthylique (éthanol absolu stocké à -20 °C de forte force ionique -NaCl 5 M-), accélérée par le froid dont le but est de récupérer les acides nucléiques sous une forme solide. Ce qui permet d'une part de les protéger, et d'autre part, après séchage, de les resolubiliser à la concentration souhaitée. Cette étape consiste en un lavage par l'éthanol absolu froid à 2 volumes et 0,3 M de NaCl, puis alterné par un lavage à l'éthanol à 70% si nécessaire, et mélanger doucement pour éliminer les sels et précipiter l'ADN. A ce stade, l'ADN est bien visible sous forme de filament, pelote ou méduse.

Récupération de l'ADN

L'ADN est recueilli dans un tube eppendorf de 1,5 mL, puis séché au centrifugeur (speedvac) pendant 20 minutes. Il est par la suite dissout et conservé dans du tampon TE 10/1 (TrisHCl 10 mM à pH 7,6 et d'EDTA 1 mM à pH 8), dont le volume est ajouté en fonction de la taille de la méduse de l'ADN et maintenu en agitation douce jusqu'à une dissolution complète de l'ADN, puis conserver à +4 °C si les échantillons sont utilisés dans les jours qui suivent, ou à -20 °C pour une utilisation ultérieure. Généralement on ajoute 300 µL à 500 µL de TE 10/1.

2.3.2. Extraction de l'ADN par Kit QIAGEN (Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini)

Cette technique simple, plus rapide et fiable, à interaction minimale avec l'utilisateur, ce qui permet de manipuler les échantillons potentiellement infectieux en toute sécurité. Après recueil du sang total sur EDTA, l'extraction de l'ADN génomique est réalisée sur mini colonnes (Qiagen® : kit QIAamp DSP DNA Blood Mini) (<https://www.qiagen.com/ma/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/qiaamp-dsp-dna-blood-mini-kit/>). Le kit Qiagen est un système ayant recours à la technologie des membranes

de silice (QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques. Développer pour le traitement simultané de plusieurs échantillons de sang, il permet d'obtenir de l'ADN purifié prêt à l'emploi. Les procédures sont compatibles avec des échantillons de sang total et de sang frais ou congelé traités à l'EDTA ou au citrate.

Cette technique s'effectue en deux étapes permettant d'isoler et de purifier rapidement et en toute simplicité l'ADN génomique à partir de 200 µL de sang total (Il n'est pas nécessaire de séparer les leucocytes au préalable).

1^{ère} Etape de lyse :

Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes, à température élevée. Le sang est décongelé à +4 °C ou à température ambiante et la lyse cellulaire est effectuée immédiatement après la décongélation. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 200 µL du sang total est soumis à une lyse complète des globules rouges par incubation à 56 °C pendant 10 minutes après addition de 200 µL de tampon de lyse AL et 20 µL de protéinase K (Protéase QIAGEN - QP).

2^{ème} Etape de purification :

On ajoute 200 µL d'éthanol absolu et on centrifuge brièvement. Par la suite on prépare pour chaque échantillon une colonne QIAamp posée sur un tube collecteur, cette étape permet de fixer l'ADN génomique à la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini, on y dépose 620 µL de la solution obtenue, on centrifuge à 1771 G pendant 1 min puis on place la colonne sur un nouveau tube collecteur et on jette l'ancien tube et l'éluat. L'ADN génomique est adsorbé sur la membrane de silice alors que le lysat passe à travers la membrane sous l'effet d'une dépression ou de la force centrifuge. Par la suite, on procède à un lavage de la membrane par les tampons du kit AW1 et AW2. On dépose 500 µL de tampon AW1 fournis par le kit, on recentrifuge à 1771 G pendant 1 min et on replace la colonne sur un nouveau tube collecteur. On dépose 500 µL du tampon AW2 puis on centrifuge à 2877 G pendant 3 min. À cette étape, l'ADN est lavé. On place ensuite la colonne QIAamp sur un tube eppendorf de 1,5 mL, on dépose 50 µL de buffer AE et on centrifuge à 1771 G pendant 1 min. A cette étape, l'ADN est élué. On jette la colonne QIAamp et finalement on conserve le tube eppendorf contenant l'ADN extrait (volume final de 200 µL) à +4 °C si l'échantillon est utilisé dans les jours qui suivent l'extraction ou à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

Les procédures d'extraction par les kits commercialisées, sont conçues pour limiter la contamination croisée d'un échantillon à l'autre. Les extraits d'ADN purifié sont prêts à l'emploi pour l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou d'autres applications, et

peuvent être conservé à +4 °C si les échantillons sont utilisés dans les jours qui suivent, ou à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

2.4. Dosage et contrôle qualitatif de l'ADN

2.4.1. Dosage ou Contrôle quantitatif de l'ADN

L'estimation de la concentration d'ADN et sa pureté est effectuée par dosage au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop TM 2000 Spectrophotometer) adapté à la mesure de 1 µL de solution. La technologie NanoDrop est basée sur un système de rétention d'échantillon innovant qui utilise la tension de surface de détenir et de mesurer des micro-volumes d'ADN entre deux socles optiques sans l'utilisation des cuvettes ou des capillaires rapidement et facilement. Le cycle de mesure est également fortement réduit. L'ADN placé directement sur la surface de détection, une colonne de liquide est créée entre les extrémités des fibres optiques par la tension de surface. Cette colonne liquide forme un chemin optique vertical. Un flash au xénon lampe fournit la source de lumière et d'un spectromètre utilisant une matrice linéaire CCD est utilisée pour analyser la lumière qui traverse l'échantillon.

2.4.2. Contrôle qualitatif de l'ADN génomique

La qualité de la préparation est primordiale. Pour cela, il faut vérifier que l'ADN ainsi extrait est de haut poids moléculaire, c'est-à-dire qu'il n'a pas été dégradé au cours de différentes manipulations d'extraction et de purification. L'ADN génomique est analysé par migration sur un gel d'agarose horizontal. L'agarose est dissout à chaud dans le tampon TAE 1X (Tris 89 mM, acide acétique 89 mM, EDTA 2 mM ; pH 8). L'ADN est coloré au bromure d'éthidium (BET) (environ 0,5 µg/mL) qui est un agent intercalant entre les bases puriques et pyrimidiques des deux brins d'ADN permettent ainsi sa visualisation sous ultraviolet. Ainsi, on dépose 0,5 µg à 1 µg d'ADN. L'ADN de haut poids moléculaire, effectue une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE 1X pendant une heure et demi à 2 volts, une bande unique d'environ 50 Kb ou plus. Après migration très lente, l'ADN de haut poids moléculaire montre une bande unique. Si au contraire l'ADN a été dégradé au cours de ces différentes manipulations, on obtient un « smear » au niveau du gel d'électrophorèse. L'ADN peut être utilisé immédiatement ou stocké à +4 °C plus d'un an.

Dans cette étude, la qualité et la quantité de l'ADN ont été contrôlées et dosées par mesure d'absorbance A260/A280 en utilisant un Nanodrop spectrophotomètre (2000 Nanodrop; Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

NB : le BET est un agent mutagène, il faut le manipuler avec des gants.

2.5. Réaction d'amplification en Chaîne par Polymérisation (PCR)

La PCR est une technique d'amplification enzymatique in vitro de séquences d'ADN automatisée, fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985 [260]. Elle est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase particulière, la Taq polymérase. Aujourd'hui, c'est une technique incontournable et utilisée en routine dans les laboratoires. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques détectables à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

2.5.1. Principe

La PCR est une succession de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. L'efficacité des réactions d'amplification par PCR dépend de nombreux paramètres que constitue le mélange réactionnel qui comprend :

L'ADN :

Extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...), à partir de prélèvement veineux dans notre étude. Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

Les amorces :

Ce sont des fragments courts d'ADN, choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier, ils sont synthétisés par voie chimique. Ils vont servir d'amorces à l'ADN polymérase pour une réplification sélective en s'hybridant de façon spécifique, grâce à la complémentarité de bases, sur l'un des deux brins d'ADN, et avec leur extrémité 3' OH libre.

Chaque couple d'amorces est composé d'une oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire du brin anti-parallèle. La longueur de l'amorce est un facteur déterminant la spécificité de l'amplification, généralement d'une vingtaine (18-20) de désoxyribonucléotides. Plus l'amorce est longue, plus la probabilité que la séquence soit unique dans le génome augmente, afin de garantir une hybridation suffisamment spécifique. De plus, les amorces sont utilisées à des concentrations adéquates par rapport à celle de l'ADN à amplifier. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

- Les amorces doivent avoir une composition A+T et G+C équilibrée.
- Des T_m comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température [Le $T_m = 4(C+G)+2(A+T)$ avec A, T, G et C qui sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide].
- Des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles (en particulier dans la région 3'), au risque de générer au cours de la réaction des dimères d'amorces susceptibles de diminuer le rendement de la réaction.
- La distance séparant les deux amorces ne doit pas dépasser quelques centaines de paires de bases. Des distances plus grandes nécessitent des conditions de PCR très particuliers (longues PCR).
- Pas de complémentarité en 3' avec d'autres séquences du fragment à amplifier.
- Des séquences qui ne contiennent pas de séquences répétées inversées (pas de repliement intramoléculaire).

Les Déoxyribo Nucléotides Triphosphates (dNTPs : dATP, dCTP, dGTP, dTTP) :

Ce sont les molécules de base qui constituent l'ADN, et sont utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

Ions Magnésium ($MgCl_2$) :

Les ions magnésium vont permettre la neutralisation des charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. Ces ions interviennent aussi dans la spécificité de la reconnaissance des substrats nucléotidiques triphosphates (dNTP). Les concentrations relatives $MgCl_2/dNTP$ doivent être prises en compte. Un excès de $MgCl_2$ entraîne des amplifications non spécifiques, et une diminution de sa concentration diminue de façon importante la quantité des séquences amplifiées.

L'enzyme Taq polymérase :

Extraite à partir d'une archéobactérie qui vit dans les sources chaudes (80-90 °C) : *Thermus aquaticus*. En effet, c'est en 1969 que Thomas Brock découvre cette bactérie thermophile, dans le plus grand geyser du monde, le Steamboat Geysir, au parc de Yellowstone aux Etats Unis. C'est une ADN polymérase, qui peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce. C'est une enzyme thermorésistante, capable de résister à des températures allant jusqu'à 100 °C. En effet, sa température optimale d'action est de 72 °C et à demi-vie de 1,6h, ceci évite donc l'addition d'enzyme après chaque cycle. Le milieu réactionnel contient un tampon qui sert à maintenir le pH stable du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase, on utilise généralement des concentrations de 10 à 50 mM tampon Tris-HCL à un pH compris entre 8,3 et 8,8 pour le bon fonctionnement de l'enzyme. Ainsi soumis à des cycles de température répétés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur.

2.5.2. Différentes étapes d'une PCR

La réaction de PCR se fait dans un thermocycleur, qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100 °C. Il permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes. La PCR consiste à réaliser de nombreux cycles successifs d'amplification au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double brin qu'elles encadrent (Figure 20).

Cependant, avant de commencer les cycles de PCR proprement dits, une étape de chauffage (généralement quelques minutes à 95 °C) est réalisée. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes (Figure20).

✓ Dénaturation de l'ADN double brin (denaturation) : 94 °C

Le temps de dénaturation varie de 30 à 90 secondes selon la taille du fragment à amplifier. L'ADN est mis à température supérieure à sa température moyenne (T_m) et maximale supportée par l'enzyme Taq polymérase, qui est de 94 °C, dite température de dénaturation. A cette étape, l'ADN perd sa structure caractéristique de double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables. L'ADN double-brin (db) est dénaturé en ADN simple brin (sb) ou monocaténaire.

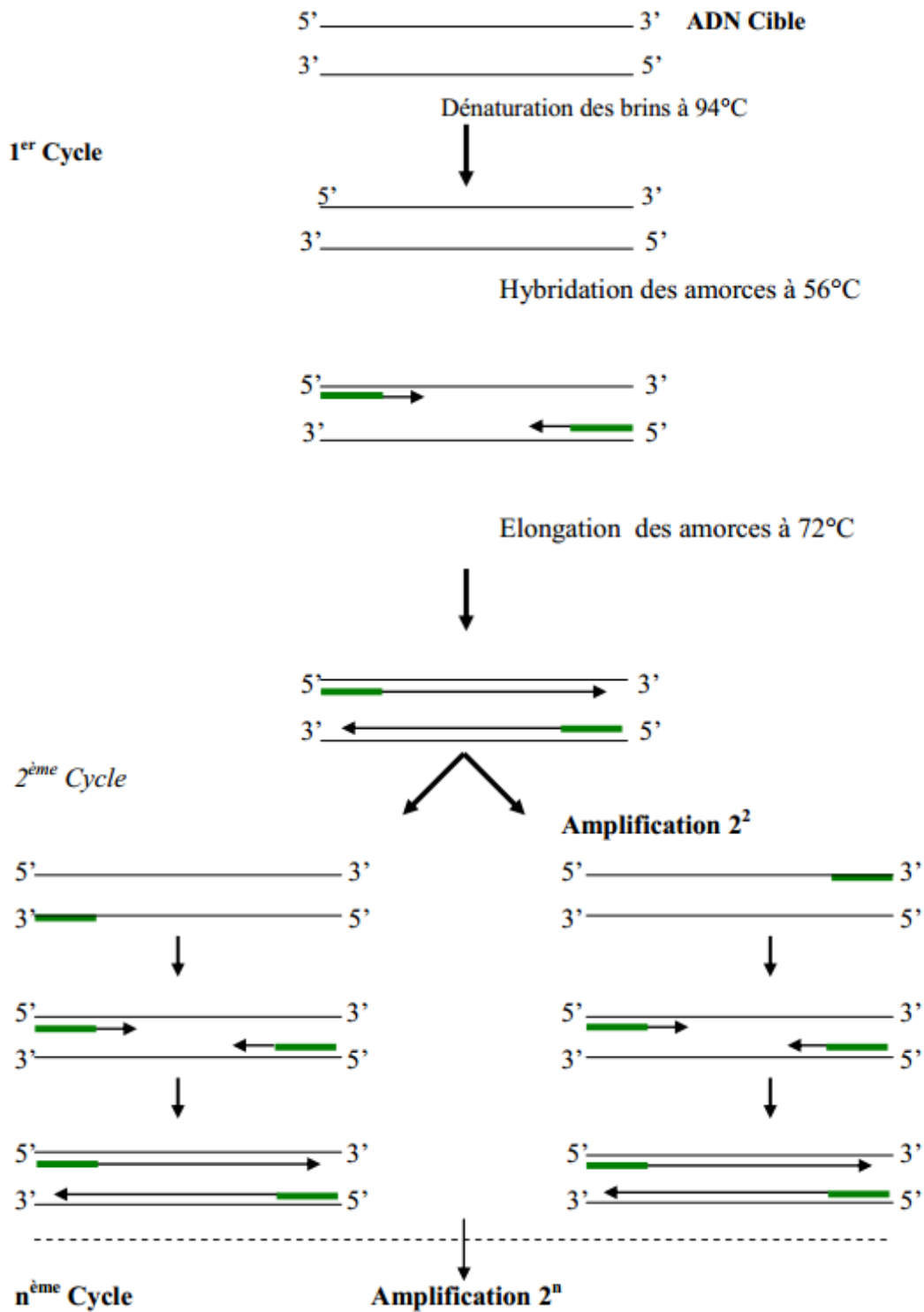


Figure 20: Différentes étapes de la réaction d'amplification de la PCR.

✓ Hybridation des amorces (annealing): 50 – 70 °C

La durée de l'hybridation est comprise entre 40 et 90 secondes. La température d'hybridation dépend du T_m (température de fusion) du couple d'amorces. Cette température de fusion des amorces est généralement comprise entre 50 et 70 °C et elle est en fonction de la composition en désoxyribonucléotides des amorces. Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN. Les amorces s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

✓ Elongation (Extension) : 72 °C

La durée de l'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier. La vitesse théorique de la Taq polymérase est égale à 50 nucléotides/seconde, dans le sens 5'-3'. Mais cette vitesse chute en cours d'amplification (baisse de l'activité, de la concentration en réactifs...etc). Classiquement l'élongation est de l'ordre de 15 à 30 secondes pour des fragments de 100 à 500 pb, 1 minute pour 500 pb à 2000 pb, et 3 à 5 minutes pour 2 à 4 Kb.

L'élongation est réalisée à 72 °C, température optimale d'activation de la Taq polymérase. En effet, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaux amorcés et catalyse la réplication en utilisant les dNTPs présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées. Chaque produit de la réaction d'élongation sert de matrice lors de la réaction suivante. Une série de 25 à 30 cycles d'élongation consécutifs conduit à l'accumulation exponentielle du fragment répliqué. Après le dernier cycle, une élongation de 5 à 7 minutes est ajoutée afin de s'assurer que la totalité de l'ADN amplifié est sous forme de double brin. La technique de PCR a été qualifiée de révolutionnaire car elle permet d'obtenir 2^n copies d'une cible d'ADN (n = le nombre de cycles). Après 25 à 30 cycles (variables selon les amorces), le ou les fragments d'ADN dont les extrémités sont définies par les amorces, est amplifié de 200000 à 1000000 fois. La technique est si sensible qu'il est possible d'utiliser comme matrice une quantité d'ADN purifié équivalent au contenu d'un seul noyau cellulaire ou un lysat de 200 à 500 cellules (ce qui évite parfois d'avoir à extraire l'ADN). Le fragment amplifié peut être directement visualisé par électrophorèse. Selon le type de séquence à amplifier, il est important de déterminer avec précision les paramètres suivants :

- La température d'hybridation des amorces.

- La quantité d'oligonucléotides.
- La concentration de MgCl₂ du tampon réactionnel.
- Le nombre de cycles.

2.5.3. Mise au point de la PCR

La mise au point de la technique pour le génotypage des polymorphismes rs1801280 (c.341T> C; NAT2*5), rs1799930 (c.590G> A, NAT2*6), rs1799931 (c.857G> A; NAT2*7) et rs1801279 (c.191G> A; NAT2*14) commence tout d'abord par déterminer la température moyenne d'hybridation compatible aux 2 amorces, cela s'effectue en se basant sur les données et les paramètres de fabrication des amorces.

Afin d'amplifier la région cible pour le génotypage des 4 polymorphismes du gène *NAT2* chez les patients avec hépatotoxicité due aux anti-TB, deux couples d'amorce NAT2-1F/NAT2-1R (pour génotyper NAT2*14, NAT2*5 et NAT2*6) et NAT2-2F/NAT2-2R (pour génotyper NAT2*7) ont été désigné de part et d'autre de la région cible de l'exon 2 du gène *NAT2* à partir du site <http://primer3.ut.ee/>.

NAT2-1F :5'GGCTGTTCCCTTTGAGAACC3' (T_m=61.0)

NAT2-1R :5'GCAAGGAACAAAATGATGTGG3' (T_m=60.4)

NAT2-2F :5'GAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGC3' (T_m=59.5)

NAT2-2R : 5'ACGTGAGGGTAGAGAGGATATC3' (T_m=56.4)

La réaction d'amplification PCR est réalisée à 60 °C pour NAT2-1 et à 58 °C pour NAT2-2, ce sont les températures idéales d'amplification de la région ciblée.

2.5.4. Réalisation pratique de la PCR

La réaction de PCR est réalisée avec un mélange réactionnel de 50 µL de volume total dans un tube de PCR de 200 µL en présence de : 1 µL d'ADN génomique, 0,5 mM de chacun des dNTP triphosphates (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), 0,5 mM de MgCl₂, 2 µM de chacune des amorces : NAT2-F et NAT2-R, 10% du tampon réactionnel 10X, 0,2 unités de Taq polymérase et une quantité suffisante d'eau distillée pour un volume total de 50 µL. Après avoir homogénéisé le mélange réactionnel on place les échantillons dans le thermocycleur (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, AppliedBiosystems). Le mélange est soumis à 3 étapes successives définissant un cycle. Trente ou trente cinq cycles sont généralement effectués :

- Dénaturation de l'ADN double brin par chauffage à 95 °C pendant 4 à 5 minutes en moyenne pour le premier cycle et 1 minute en moyenne pour les autres cycles.
- Hybridation des amorces de l'ADN simple brin pendant 1 minute en moyenne à une température proche du T_m du couple d'amorces.
- Polymérisation ou élongation à 72 °C généralement pendant 1 minute 30 secondes.
- Une étape de polymérisation plus longue, de 7 minutes est réalisée au dernier cycle.

2.5.5. Détection et analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Cette méthode très simple permet de confirmer la réussite de l'amplification génique et de vérifier la taille du fragment d'ADN amplifié ainsi que la spécificité de l'amplification. Pour cela on effectue une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du TAE 1X, en mélangeant 7 µL du produit de PCR avec 3 µL de la solution de dépôt au bromophénol. Le mélange obtenu est ainsi déposé dans les puits du gel, ainsi qu'un marqueur de taille permettant d'estimer la taille des amplimères obtenus. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TAE à voltage constant de 70-100V pendant 15 min. Cette technique est basée sur le déplacement des fragments d'ADN chargés en solution, sous l'influence d'un champ électrique généré par un courant continu. Les molécules d'ADN chargées négativement à pH neutre migrent vers l'anode (+) à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire donc leur taille. La bande correspondante à la séquence amplifiée est visualisée grâce à sa fluorescence en lumière ultraviolette en présence de bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases puriques et pyrimidiques rendant l'ADN fluorescent quand il est illuminé aux ultraviolets. A la fin de la migration, le gel est photographié avec un appareil d'analyse d'images sous lumière UV afin de conserver et d'analyser les résultats.

2.6. Séquençage de l'ADN

Après avoir amplifié le fragment d'ADN concerné, on procède à son séquençage. La technique de séquençage consiste d'abord à purifier le produit PCR, réaliser une réaction de séquence, la purifier et analyser le produit par séquençage direct.

2.6.1. Purification du produit PCR

Une purification du produit PCR est réalisée avant de procéder au séquençage d'ADN, dans le but de séparer la séquence amplifiée désirée des autres composants du milieu réactionnel et des sels. Cette purification peut être réalisée soit par l'éthanol, soit par l'enzyme Exosap, soit par des kits commercialisés. Une électrophorèse de contrôle permet ensuite de vérifier le bon déroulement de la purification. La méthode qu'on a utilisée dans cette étude est la purification par l'enzyme Exosap.

✓ Purification enzymatique à l'ExoSAP (Kit ExoSAPIT®) :

Cette méthode utilise deux enzymes hydrolytiques en une seule étape de nettoyage de PCR, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline rShrimp (RSAP), dans un tampon spécialement formulé pour supprimer les dNTPs et les amorces indésirables à partir des produits de la PCR. Exo-I supprime les amorces simple-brin résiduelles et tous les ADNs simple-brin étrangers produits dans la PCR. RSAP supprime les dNTPs restants dans le mélange de la PCR. Cette méthode est conçue pour exiger un minimum de temps de manipulation. Le réactif ExoSAP IT® (0.1U/ μ L) est ajouté directement au produit de PCR (6 μ L) est incubé à 37 °C pendant 15 minutes. Après le traitement de la PCR, le réactif ExoSAP-IT® est inactivé par un simple chauffage à 80 °C pendant 15 minutes. Cette technique permet de récupérer 100% des produits de PCR.

2.6.2. Réaction de séquence

Une fois qu'on a purifié le produit de PCR, on réalise une réaction de séquence dans un volume finale de 13 μ L qui consiste en une autre PCR du produit amplifié et purifié. Pour cela, dans un tube de PCR de 200 μ L, on mélange 2 μ L du produit de PCR purifié, 1 μ L du kit de séquençage (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems®), 0.3 μ M d'une des 2 amorces (primer sens ou antisens). La solution du Kit comprend les dNTP, les ddNTP marqués, l'Ampli Taq DNA polymérase et le tampon (Tris-Hcl pH 9 à 400 mM et MgCl₂ à 10 mM).

On place les tubes dans un thermocycleur et on applique le programme suivant :

96°C →	10 secondes	} 25 cycles
50°C →	5 secondes	
60°C →	4 minutes	
72°C →	7 minutes	

Le produit de séquence peut être analysé de suite ou conservé à +4°C à l'obscurité.

2.6.3. Purification du produit de la réaction de séquence

Le produit de la réaction de séquence doit être purifié afin d'éliminer les primers libres, les dNTPs, les ddNTPs non incorporés, et toutes les impuretés, qui peuvent altérer la lecture de la séquence. Dans ce travail, nous avons réalisé la purification de séquence par sephadex G50 :

✓Purification par le Séphadex G50 :

Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration des produits de réaction de séquence. Le Sephadex G50 utilisé permet de dé-saler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces en excès. La plaque 96 puits Multiscreen est utilisée comme support inerte de la résine G50. Charger le Sephadex G50 Superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen en utilisant le chargeur de colonne de 45 µL comme suit :

- Déposer le Sephadex G50 dans chaque puits du chargeur de colonne.
- Retirer l'excès de poudre avec la raclette.
- Placer la plaque MultiScreen à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer le Sephadex G50 vers la plaque.
- Ajouter 300 µL d'eau ultrapure dans chaque puit contenant du Sephadex G50.
- Fermer la plaque avec son couvercle
- Laisser reposer 2 heures à température ambiante (une fois les mini-colonnes gonflées, la plaque peut être stockée à +4 °C).
- Centrifuger 5 minutes à 553 G la plaque MultiScreen assemblée à une plaque récupératrice d'eau.
- Diluer les produits de réaction de séquence avec 15 µL d'eau ultrapure.

- Déposer délicatement les échantillons à purifier au centre des mini-colonnes.
- Placer la plaque MultiScreen sur une microplaque Thermo Fast 96 puits.
- Centrifuger 5 minutes à 553 G.

La microplaque Thermo Fast 96 puits est alors prête à être chargée sur un séquenceur automatisé. Les échantillons purifiés sont placés par la suite dans la plaque de séquenceur automatique (ABI Prism 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA) à 96 puits (format microplaque). Le logiciel 3130 Data Collection permet de saisir le nom et prénom du patient, les amorces utilisés (sens ou antisens, la température de migration (50 °C) et le temps d'injection. Les données sont ensuite analysées par le logiciel Sequencing Analysis 3.7, qui permet d'obtenir un électrophorégramme pour chaque réaction de séquence.

2.6.4. Principe de séquençage

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant. C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie moléculaire. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La technique fut inventée dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert [261], aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger en Grande-Bretagne [262]. Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés : l'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective.

Le séquençage utilisé dans notre travail repose sur le principe de la méthode enzymatique de Sanger selon lequel, la synthèse de l'ADN est interrompue quant à la place d'un désoxynucléotide normal (dNTP : dATP, dGTP, dCTP, dTTP), un didésoxynucléotide (ddNTP : ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) est incorporé. Un ddNTP diffère, par l'absence du groupe hydroxyle (OH, nécessaire à l'extension) et la présence d'hydrogène (H) en position 3' du carbone. A un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase, aucune liaison entre sa position 3' et le nucléotide suivant n'est possible. En conséquence, la synthèse de la nouvelle chaîne est interrompue à ce site. Il en résulte un ensemble de brins d'ADN de taille variable, selon l'endroit où un ddNTP s'est inséré stoppant ainsi la réaction. Le séquençage automatique nécessite quatre fluorophores (un par nucléotide). Les marqueurs fluorescents, base-spécifiques, sont liés aux

didésoxynucléotides triphosphates (ddNTP) appropriés. Chaque ddNTP est marqué par une couleur différente.

Les produits de réaction de séquence sont ensuite entraînés automatiquement dans le capillaire de séquençage contenant un gel d'électrophorèse. Au cours de leur migration électrophorétique dans le gel d'un capillaire, les chaînes marquées par un ddNTP passent devant un rayon laser fixe. Le laser induit un signal fluorescent qui dépend du marqueur spécifique représentant l'un des quatre nucléotides. Le signal fluorescent résultant est capté par une caméra CCD qui permet de transformer le signal lumineux en signal électrique, enregistré électroniquement, puis visualisé sous forme d'une succession de pics des quatre couleurs. Cette succession représente l'alternance des nucléotides au sein de la séquence (Figure 21-22).

2.7. PCR en temps réel :

La technologie de PCR en temps réel est devenue de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle (high-throughput) [263]. La PCR en temps réel est donc un puissant outil dans les différentes technologies de détection laissant entrevoir des applications plus innovatrices.

2.7.1. Principe

La PCR en temps réel combine l'amplification et la détection simultanée des produits amplifiés. Le principe de cette technique est fondé sur la détection et la mesure d'un signal fluorescent dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits formés pendant la PCR. A l'inverse des techniques utilisant la PCR « classique » dont les étapes d'amplification et d'analyse du produit amplifié sont séparées, la PCR en temps réel est réalisée en une seule étape. L'ouverture du tube en post-PCR n'est plus nécessaire et le risque de contamination devient extrêmement réduit [264]. La mise en œuvre de ce procédé est grandement facilitée par le développement et la commercialisation de nouvelles générations d'appareils.

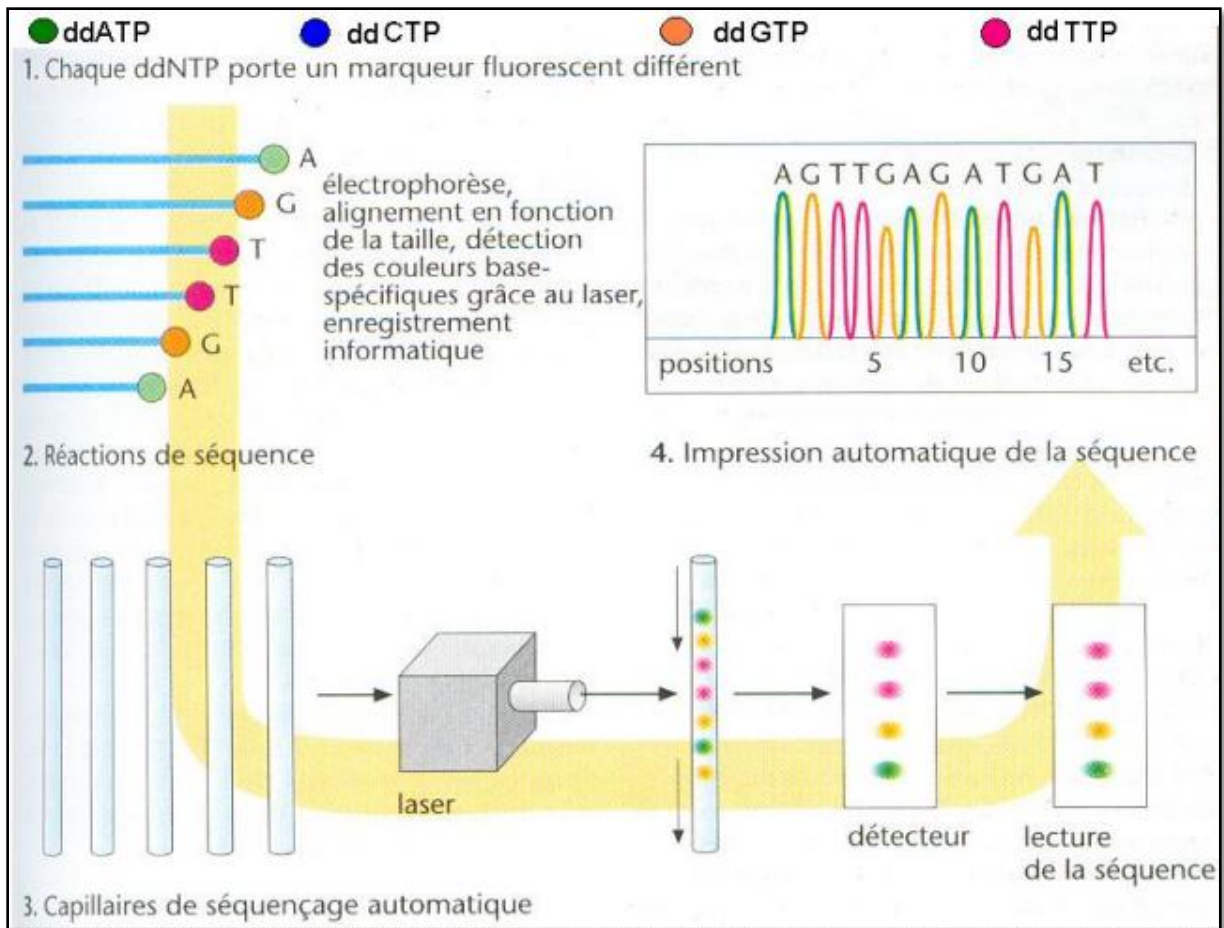


Figure 21 : Analyse du signal et élaboration de séquence.

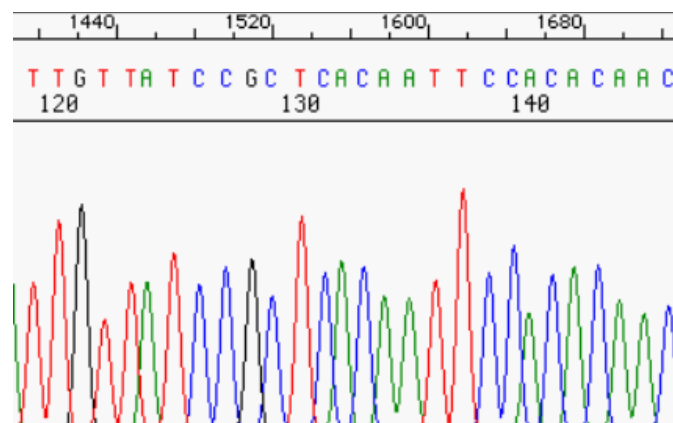


Figure 22 : Exemple de séquence obtenue par électrophorégramme.

Ces derniers permettent le suivi en temps réel de toutes les étapes de PCR à savoir dénaturation, hybridation et élongation, grâce à l'usage de sondes marquées par fluorescence autorisant la détection du produit au fur et à mesure de sa formation et son traitement informatique [265]. On enregistre une augmentation de la fluorescence au cours du temps. Cela se traduit par un profil classique comportant 3 étapes (Figure 23) :

- une première étape dite de bruit de fond
- une seconde étape de phase exponentielle de croissance
- une dernière étape de phase de plateau

Pendant la première étape, le signal de fluorescence généré par le bruit de fond est supérieur à celui dérivé de l'amplification du produit de PCR et par conséquent le produit amplifié reste de faible quantité pour être détectable d'un cycle à autre.

Pendant la phase exponentielle de la PCR, la quantité de produit de PCR est proportionnelle à la quantité de matrice de départ initialement ajoutée. Par conséquent, la phase exponentielle de la PCR est analysée afin de quantifier la concentration de matrice initiale. La méthode couramment utilisée est appelée la méthode du cycle seuil (Ct : Threshold cycle) [38]. Ce dernier correspond au cycle où la fluorescence atteint le niveau du signal seuil. La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence (Figure 24).

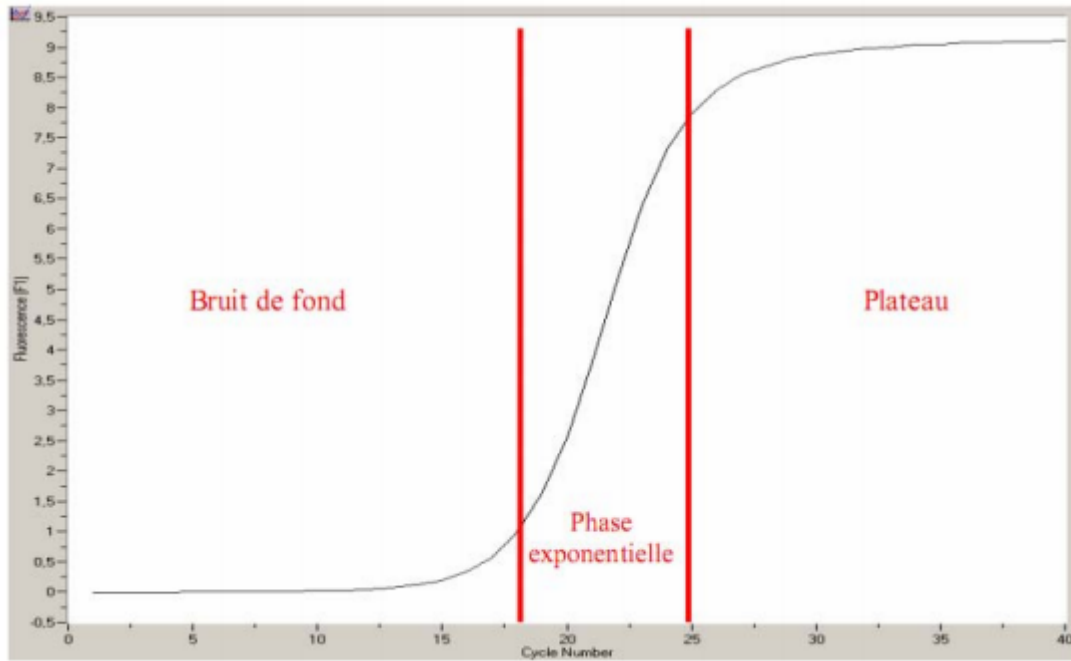


Figure 23 : Courbe reflétant les différentes étapes de la PCR en temps réel.

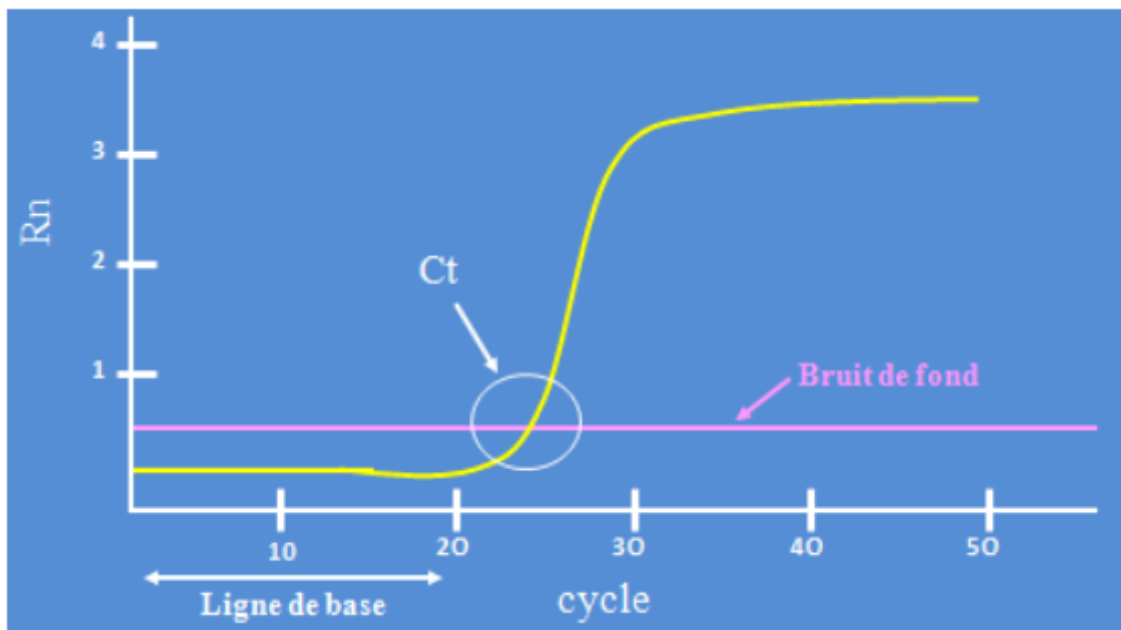


Figure 24: Le cycle seuil (Ct).

2.7.2. Technologies TaqMan: (Hydrolyse de sondes: Taqmanassay)

Les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan sont les sondes les plus fréquemment utilisées pour la détection de mutations ponctuelles ou la quantification de gènes. Ce sont des sondes d'environ 15 à 30 bases, monobrin et linéaires marquées par deux fluorophores. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocein) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (Quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Par ailleurs, ces sondes sont phosphorylées en position 3' pour éviter l'extension à partir de cette extrémité par l'ADN polymérase. Le principe de cette technique est basé sur l'activité 5'-exonucléasique de l'ADN polymérase : l'enzyme hydrolyse une sonde hybridée à la cible. Au cours de la PCR, pendant la phase combinée d'hybridation et de polymérisation généralement réalisée entre 60 – 64 ° C, l'enzyme rencontre la sonde hybridée. De manière générale, elle est située près d'une des deux amorces utilisées pour la PCR. Grâce à son activité exonucléasique, elle hydrolyse la sonde (dans la direction 5' → 3'). Le fluorophore donneur suffisamment éloigné de l'action du quencher émettra un signal fluorescent mesurable par l'instrument (Figure 25).

Pour la présente étude, nous avons génotypé les quatre variants rs1801280 (C.341T>C; NAT2*5), rs1799930 (c.590G>A; NAT2*6), rs1799931 (c.857G>A; NAT2*7) et rs1801279 (C.191G>A ; NAT2*14) du gène *NAT2* chez 163 échantillons d'ADN et le variant rs2031920 du gène *CYP2E1* chez 130 échantillons d'ADN par PCR en temps réel (Applied Biosystems 7500 Fast Step One TM Real-Time PCR Systems) parmi le groupe contrôle. Pour cela, nous avons utilisé cinq sondes TaqMan® (PE Applied Biosystems), une pour chaque allèle.

Pour le polymorphisme du *CYP2E1* les séquences de primers ont été obtenues par assays-by-designsSM du fabricant (Applied Biosystems).

Les allèles de rs2031920 étaient évalués en utilisant les amorces rs2031920_F: TGACTTTTATTTTCTTCATTTCTCATCATATTTTCTATTATACAT et rs2031920_R: GTTTTTCATTGTGTCTTCTAACTGGCAATAT et les sondes TaqMan rs2031920_V: VIC AGGTTGCAATTTTGTACTTT et rs2031920_F: FAM GTTGCAATTTTATACTTT (la position de SNP est soulignée).

Pour les quatre polymorphismes du gène *NAT2*, les séquences des amorces sont du test de génotypage du métabolisme des médicaments du fabricant (Drug metabolism genotyping assay of the manufacturer's) (Applied Biosystems) dont la référence est (p / n 4362038).

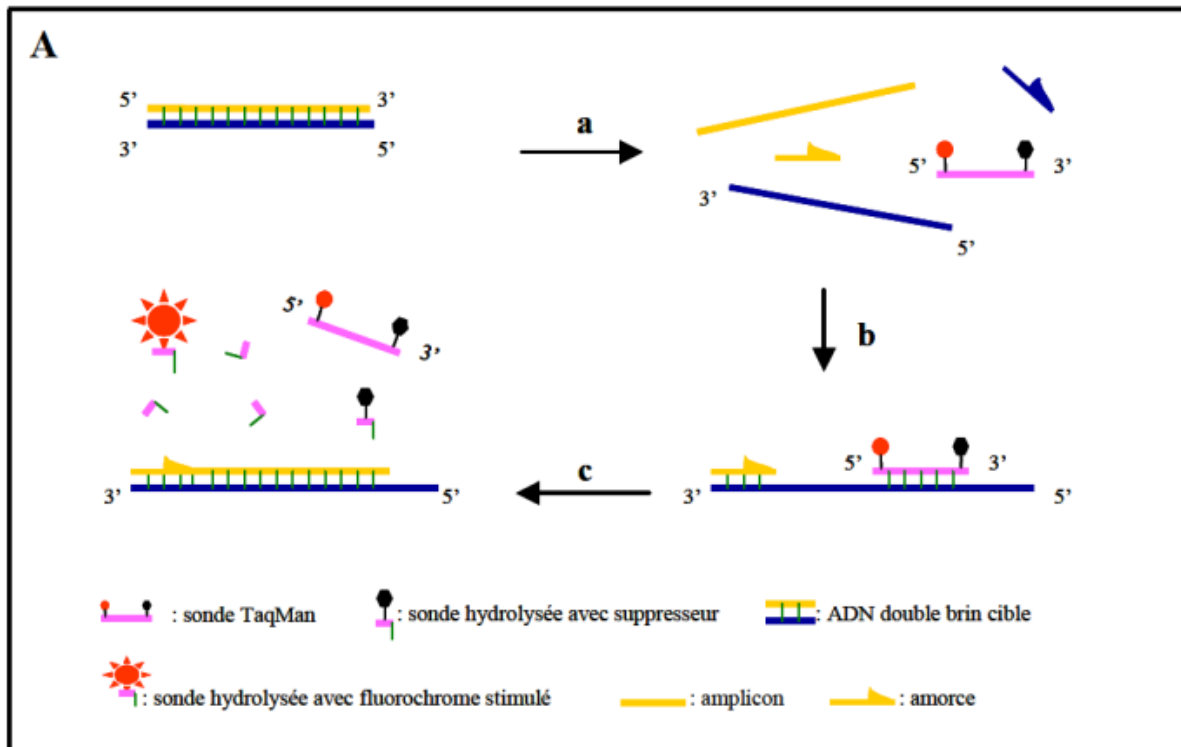


Figure 25 : Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay).

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du supprimeur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Les principes à respecter dans le design des sondes TaqMan sont aussi applicables aux autres sondes linéaires et comprennent comme règles générales :

- 1) Une longueur de 20 - 40 nucléotides,
- 2) Un contenu en G-C variant de 40 - 60%,
- 3) Aucun patron de séquence répétée,
- 4) Aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces,
- 5) Un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage et,
- 6) La majorité des sondes ont une température de dissociation (T_m) autour de 70°C ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Cela permet de s'assurer qu'elles s'hybrident avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation [264, 266].

Par ailleurs, le développement d'un nouveau type de sondes TaqMan : TaqMan® MGB, a permis de pallier certaines limites du système TaqMan [267]. L'introduction à l'extrémité 3' d'une molécule ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN ou noyau MGB (*minor groove binder*) augmente la T_m de la sonde et stabilise plus fortement son interaction avec la matrice ADN, ce qui permet de dessiner des sondes de plus petite taille (13 à 20 nucléotides) (Figure 26).

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). La technologie Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques [264, 266].

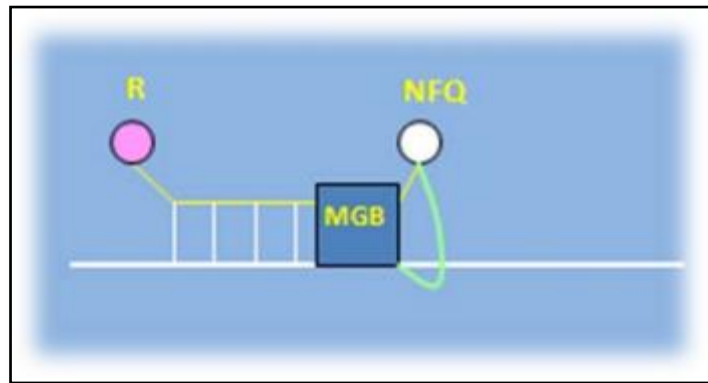


Figure 26 : Sonde TaqMan®MGB associée à non fluorescent quencher (NFQ).

2.7.3. Réalisation pratique : conditions et protocole

Le génotypage des polymorphismes rs2031920 du gène *CYP2E1* et rs1801280, rs1799930, rs1799931, et rs1801279 du gène *NAT2a* été effectué au département de génétique médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat par PCR en temps réel et discrimination allélique en utilisant une sonde TaqMan spécifique d'allèle (Applied Biosystems). Les allèles de ces polymorphismes ont été évalués en utilisant un mélange de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques et deux sondes :

Les deux sondes utilisées (par ex spécifiques de l'allèle C et de l'allèle T) sont des sondes d'hydrolyse type MGB marquées en 5' par le fluorochrome émetteur (reporter) VIC et FAM respectivement.

Nous avons utilisé un Mix prêt à l'emploi TaqMan® Genotyping Master Mix de Applied Biosystems, qui est un kit commercial contenant le tampon PCR, les dNTPs, la Taq polymérase et le MgCl₂.

La PCR a été réalisée dans un volume final de 20µL contenant pour chaque échantillon:

- 10µL du Master Mix.
- 0.5µL du mélange des deux sondes TaqMan® et deux amorces, cité précédemment.
- 8.5µL d'eau distillée stérile.

Après homogénéisation, le mélange réactionnel est distribué sous un volume de 19µL dans les puits d'une plaque spécifique. Enfin 1µL d'acides nucléiques de l'échantillon à tester est ajouté à chaque puit, à l'exception d'un puit où on y ajoute 1µL d'H₂O qui servira de blanc.

Le protocole d'amplification comprend trois étapes (Figure 27):

- Lecture Pré-PCR : 60°C pendant 1 minute.
- La PCR : qui comprend :
 - o Activation de la Taq polymérase : chauffage à 95°C pendant 10 minutes
 - o Suivie de 40 cycles d'amplification de 75 secondes chacun :
 - Dénaturation de l'ADN : 15 secondes à 92°C
 - Hybridation : 1 minute à 60°C
- Lecture post-PCR : 60°C pendant 1 minute.

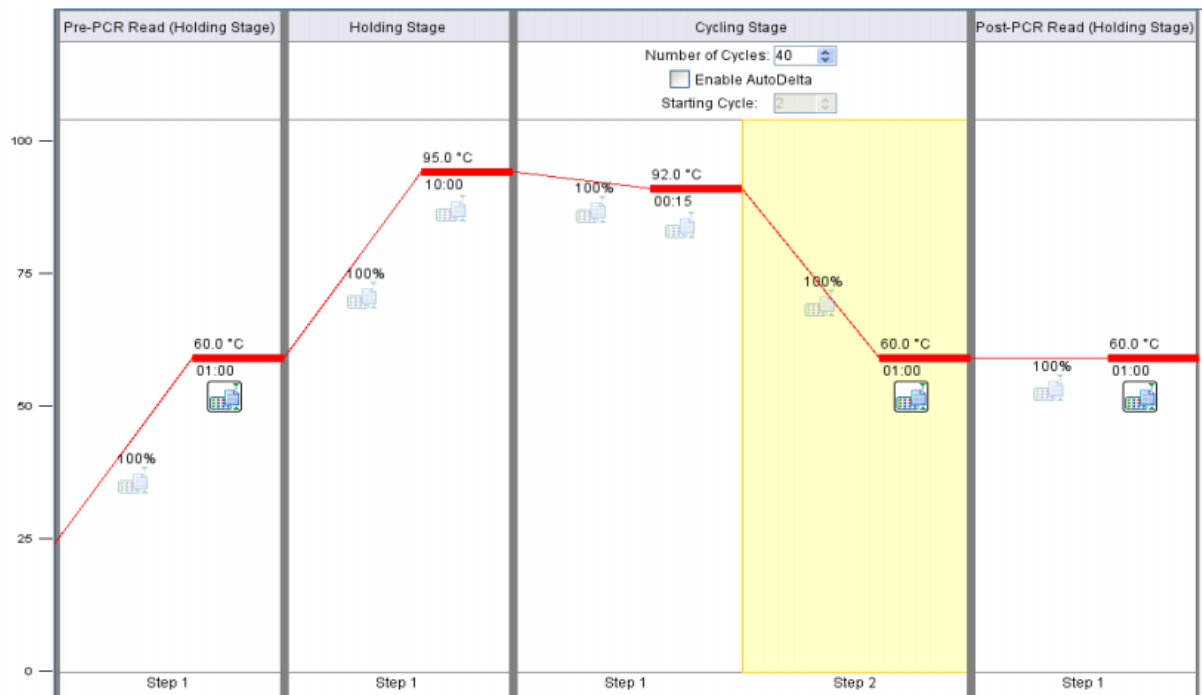


Figure 27 : Protocole d'amplification utilisé.

La PCR et l'analyse des résultats ont été réalisées sur l'appareil ABI Prism 7500. L'analyse post PCR donne une idée sur ce qui a été amplifié et permet de quantifier la fluorescence de chaque sonde. Cela permet de définir les allèles de chaque échantillon et par conséquent son génotype.

Un échantillon de génotype CC (c'est-à-dire ayant deux allèles C) est déterminé par l'enregistrement d'une fluorescence générée par la sonde spécifique de cet allèle marquée par le fluorochrome VIC et l'absence de fluorescence en rapport avec la sonde spécifique de l'allèle T marquée par le fluorochrome FAM (Figure 28)

A l'opposé, un échantillon de génotype TT (c'est-à-dire ayant deux allèles T) est déterminé par l'enregistrement d'une fluorescence générée par la sonde spécifique de l'allèle T marquée par le fluorochrome FAM et l'absence de fluorescence relative à la sonde spécifique de l'allèle C marquée par le fluorochrome VIC (Figure 28).

Un échantillon de génotype CT (c'est-à-dire ayant un allèle C et un allèle T) est déterminé par l'enregistrement d'une fluorescence générée en même temps par les deux sondes (Figure 28). Pour le blanc (NTC : No Template Control), aucune fluorescence n'est détectée.

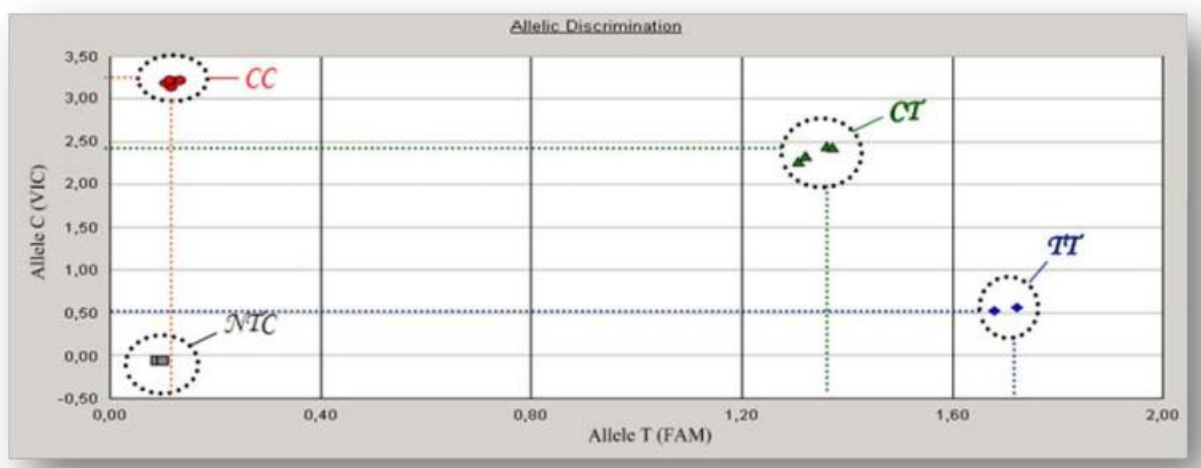


Figure 28: La discrimination allélique (Allelic discrimination plot).

2.8. Calculs des fréquences et exploitation statistique des résultats

Les fréquences génotypiques dans la population contrôle ont été calculées conformément à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les intervalles de confiance (IC) à 95% ont été calculés pour les différentes fréquences génotypiques, phénotypiques et alléliques.

L'exploitation et l'analyse des résultats ont été réalisées grâce au logiciel SPSS Version 17.0. Pour la première étude sur la population générale on a utilisé le test χ^2 pour déterminer s'il y a une différence significative entre les fréquences attendues et les fréquences observées par rapport à la distribution du gène *NAT2* dans le groupe étudié et dans d'autres populations. Pour la deuxième partie de ce travail, le test de χ^2 a été utilisé également pour déterminer s'il y a une différence significative entre les fréquences attendues et les fréquences observées par rapport aux génotypes codants pour le phénotype acétyleur lent du gène *NAT2* entre les patients avec hépatotoxicité et la population marocaine en général. La signification statistique a été supposée à $p < 0.05$.

RESULTATS

1ère partie :**Résultats de la population contrôle :**

Article 1: “Distribution of allelic and genotypic frequencies of *NAT2* and *CYP2E1* variants in Moroccan population. Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Siham Chafai Elalaoui, Iman Cherkaoui Jaouad, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. BMC Genet, 2014”

Dans la présente étude prospective, 163 ADN du sang de cordon ont été génotypés pour les quatre polymorphismes rs1801280 (c.341T>C; *NAT2**5), rs1799930 (c.590G>A; *NAT2**6), rs1799931 (c.857G>A; *NAT2**7), et rs1801279 (c.191G>A; *NAT2**14) du gène *NAT2* et 130 ADN pour le polymorphisme rs2031920 du gène *CYP2E1*.

Cette étude a abouti à la caractérisation de douze génotypes différents pour le gène *NAT2*. La plupart d'entre eux codent pour le phénotype acétyleur lent. Les génotypes des quatre variants du gène *NAT2* et leurs profils phénotypiques correspondants sont présentés dans le tableau 11. En ce qui concerne le phénotype, les résultats montrent que 72,39% [95% IC de 65,39 à 79,39] sont des acétyleurs lents (Slow acetylors SA), 21,48% [95% IC 15,04 à 27,91] des acétyleurs intermédiaires (Intermediate acetylors IA) et 6,13% [95% IC 2,38 à 9,88] des acétyleurs rapides (Rapid acetylors RA). Pour les quatre variants *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 et *NAT2**14 du gène *NAT2*, les fréquences alléliques dans le groupe étudié étaient de 53% [95% IC 47-58], 25% [95% IC 20-29], 2% [95% IC 3/1] et de 4% [95% IC 2-6], respectivement (Tableau 12).

Le tableau 12 montre les fréquences alléliques du gène *NAT2* dans la population marocaine comparées à d'autres populations rapportées dans la littérature.

La distribution allélique et génotypique du variant rs2031920 du gène *CYP2E1* a été rapporté dans le tableau 13. Le génotype c2/c2 n'a pas été trouvé dans le groupe de contrôles. Il semble que la majorité des marocains sont porteurs du génotype c1/c1 avec une fréquence de 98,5% [95% IC 96-100]. Les fréquences génotypiques de ce variant de notre population comparées à différentes populations du monde sont présentées dans le tableau 14.

Dans la figure 29, nous présentons un exemple du profil obtenu après génotypage par PCR en temps réel des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1*.

Génotype	Fréquence de Génotype	Phénotype
NAT2*4/*4	0.0613	RA
NAT2*4/*5	0.1166	IA
NAT2*4/*6	0.0859	IA
NAT2*4/*14	0.0123	IA
NAT2*5/*5	0.3313	SA
NAT2*5/*6	0.2209	SA
NAT2*5/*7	0.0184	SA
NAT2*5/*14	0.0368	SA
NAT2*6/*6	0.0797	SA
NAT2*6/*7	0.0184	SA
NAT2*6/*14	0.0123	SA
NAT2*14/*14	0.0061	SA

Tableau 11: Fréquence observée des génotypes *NAT2* codant pour les phénotypes d'acétylation rapide (RA), intermédiaire (IA) et lent (SA) dans la population marocaine contrôle étudiée.

Groupes ethniques	n	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	NAT2*14
Caucasiens[186]	3531	0.46	0.285	0.029	0.00
Allemands [268]	844	0.425	0.278	0.013	0.001
Américains[268]	387	0.437	0.266	0.019	0.001
Sud Coréens[268]	288	0.01	0.224	0.132	0.00
Espagnols[268]	258	0.47	0.25	0.006	0.004
Brésiliens [269]	254	0.289	0.104	0.021	0.014
Egyptiens [183]	199	0.497	0.26	0.028	-
Argentins [270]	185	0.37	0.256	0.08	0.013
Omaniens[271]	127	0.44	0.27	0.04	0.00
Sénégalais [268]	101	0.322	0.188	0.00	0.084
Tunisiens [272]	100	0.315	0.175	0.15	0.05
Sud-africains[268]	97	0.361	0.17	0.067	0.103
Japonais [177]	79	0.019	0.23	0.011	-
Indiens [177]	61	0.33	0.38	0.03	-
Marocains (cette étude)	163	0.53	0.25	0.02	0.04

Tableau 12 : Les fréquences des allèles *NAT2* parmi la population marocaine et d'autres groupes ethniques.

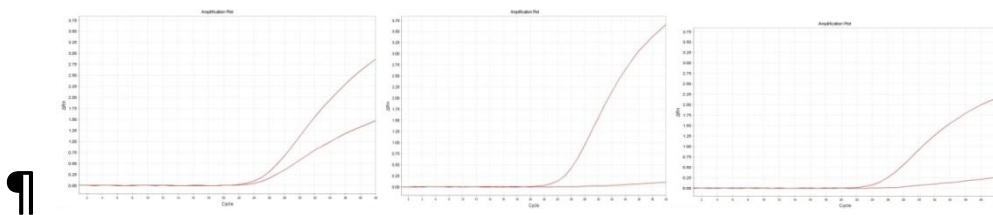
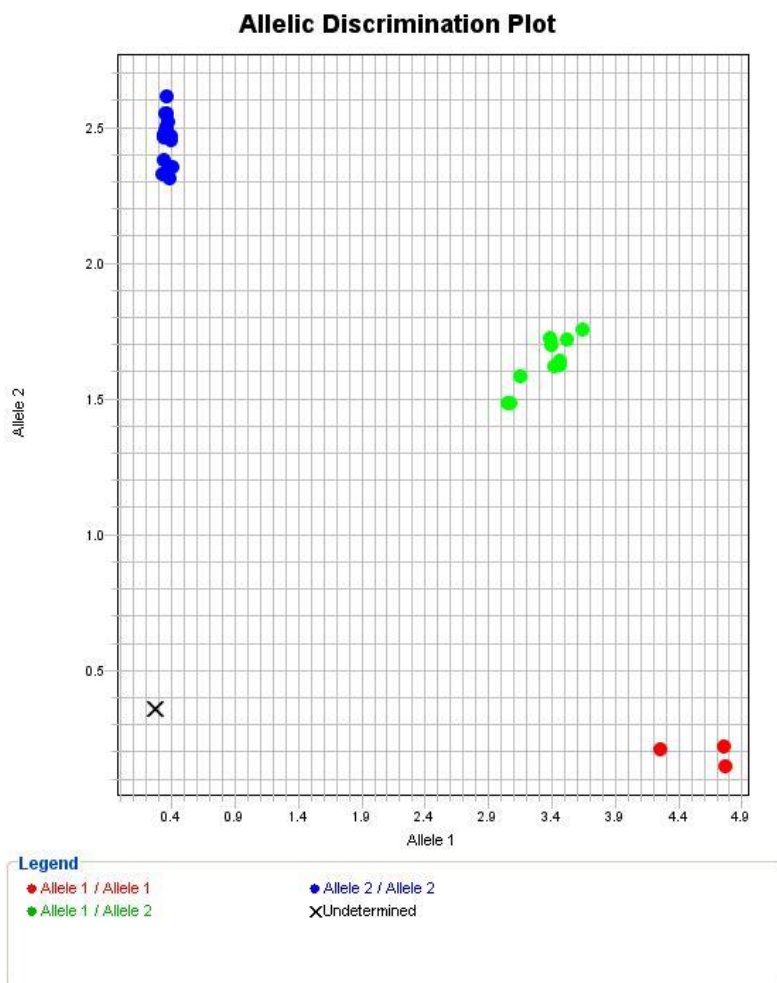
n : Taille de l'échantillon

	Allèle		Génotype	
	c1	c2	c1/ c1	c1/ c2
Fréquence	0.992	0.008	0.985	0.015

Tableau 13: Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme rs2031920 chez les individus contrôles marocains.

	Turques [273]	Allemands [274]	Taiwanais [207]	Serbes [275]	Français [276]	Anglais [277]	Brésiliens [269]	Chinois [186]	Indiens [278]	Espagnols [8]	Tunisiens [279]	Marocains (Cette étude)
c1/c1	0.947	0.949	0.55	0.904	0.916	0.968	0.908	0.598	0.98	0.879	0.944	0.985
c1/c2	0.053	0.044	0.402	0.09	0.047	0.032	0.092	0.374	0.02	0.121	0.056	0.015
c2/c2	0.000	0.007	0.048	0.006	0.000	0.000	0.000	0.028	0.00	0.000	0.000	0.000
n	302	297	269	177	172	155	141	107	100	58	71	130

Tableau 14 : Fréquences génotypiques de polymorphisme rs2031920 du gène *CYP2E1* dans différentes populations du monde.
n: Taille d'échantillon



Profil hétérozygote CT Profil homozygote CC Profil homozygote TT

Figure 29 : Exemple du profil obtenu après génotypage par PCR en temps réel des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1*.

2ème partie :**Résultats des patients marocains ayant développé une hépatotoxicité sous traitement anti-tuberculeux :**

Article 2: “NAT2 genotypes in Moroccan patients with hepatotoxicity due to antituberculosis drugs. Soukaina Guaoua , Ilham Ratbi , Omaima El Bouazzi , Sanaa Hammi , Amina Tebaa , Jamal Eddine Bourkadi , Rachida Soulaymani Bencheikh , Abdelaziz Sefiani. Genet Test Mol Biomarkers, 2016”

Parmi les 42 individus tuberculeux avec hépatotoxicité, 33 d'entre eux soit 78% [95% CI 65-91] ont été génotypés comme acétyleurs lents (SA) et 9 soit 22% [95% CI 9-35] comme acétylateurs intermédiaires (IA), alors que le phénotype acétylateur rapide (RA) n'a été retrouvé chez aucun patient (Tableau 15). Nous avons noté la présence de trois allèles acétyleurs lents NAT2*5, NAT2*6 et NAT2*14 représentés par les génotypes NAT2*4/*5, NAT2*4/*6, NAT2*5/*5, NAT2*5/*6, NAT2*6/*6 et NAT2*6/*14 (Tableau 15).

Dans le tableau 16, nous rapportons les fréquences alléliques des quatre variants NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14 retrouvés chez les 42 patients.

Dans la figure30, nous présentons les électrophorégrammes obtenus après séquençage des 4 variants du gène *NAT2*.

Notre étude a permis de réaliser la mise au point du génotypage des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1* par les techniques de PCR en temps réel et de Séquençage direct.

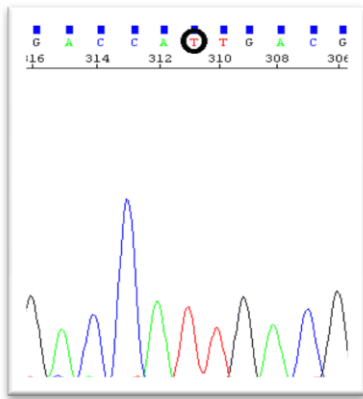
Patients marocains avec hépatotoxicité		
Génotype	Fréquence Génotype	Phénotype
NAT2*4/*5	0.10	IA
NAT2*4/*6	0.12	IA
NAT2*5/*6	0.33	SA
NAT2*5/*5	0.31	SA
NAT2*6/*6	0.12	SA
NAT2*6/*14	0.02	SA

Tableau 15: Fréquence observée des génotypes *NAT2* codant les phénotypes d'acétylation, intermédiaires (IA) et lents (SA) chez 42 patients marocains avec hépatotoxicité induite par des médicaments antituberculeux.

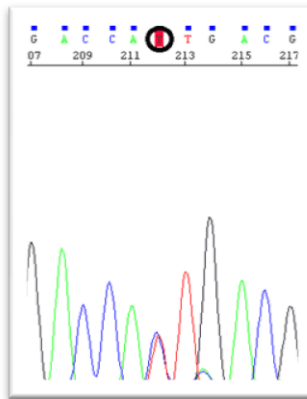
Allèle	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	NAT2*14
Fréquence	0.52	0.36	0.00	0.01

Tableau 16: les fréquences des allèles des quatre variants du gène *NAT2* parmi les 42 patients marocains avec hépatotoxicité due au traitement anti-tuberculeux.

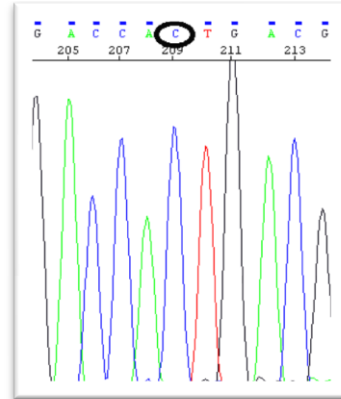
NAT2*5 ; c.341 T > C ; rs1801280



a. Homozygote normal

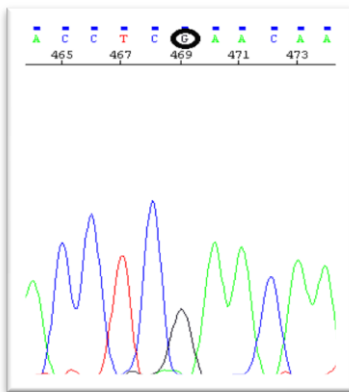


b. Hétérozygote

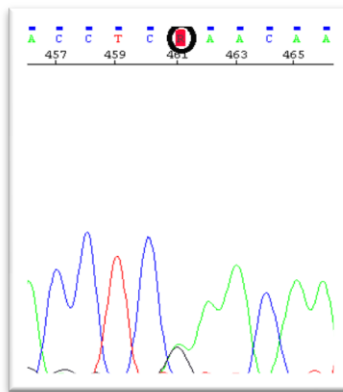


c. Homozygote muté

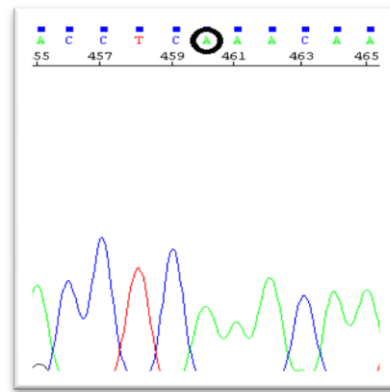
NAT2*6; c.590G > A; rs1799930



a. Homozygote normal

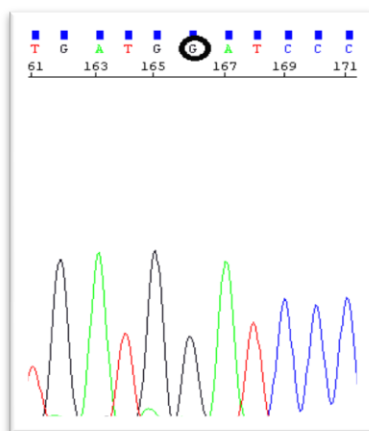


b. Hétérozygote

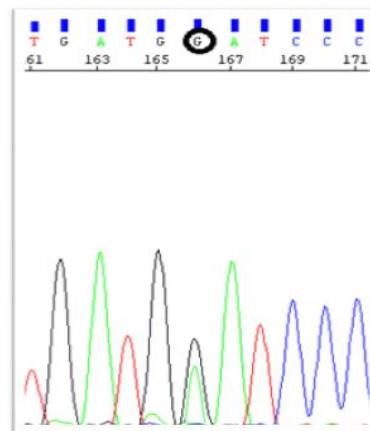


c. Homozygote muté

NAT2*7; c.857 G > A; rs1799931

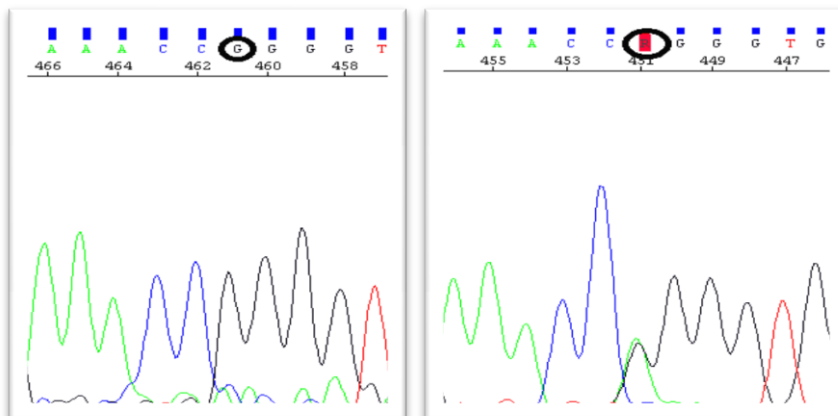


a. Homozygote normal



b. Hétérozygote

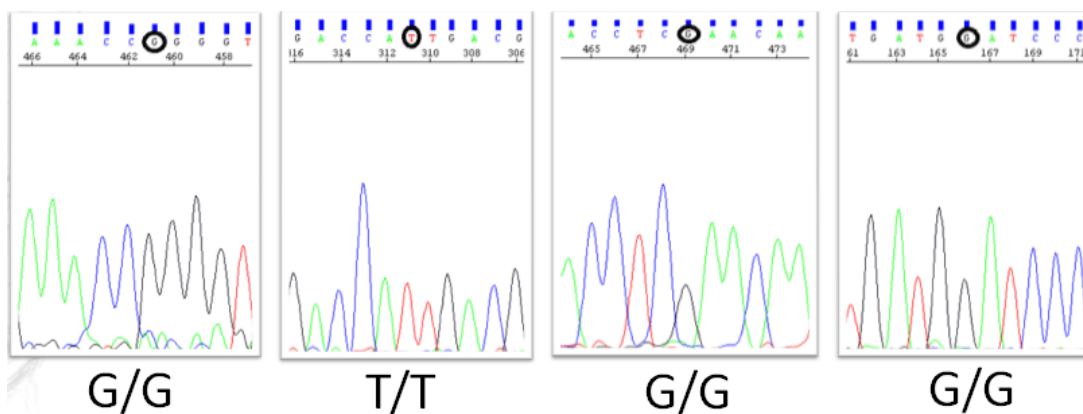
NAT2*14; c.191G > A; rs1801279



a. Homozygote normal

b. Hétérozygote

NAT2*4/*4



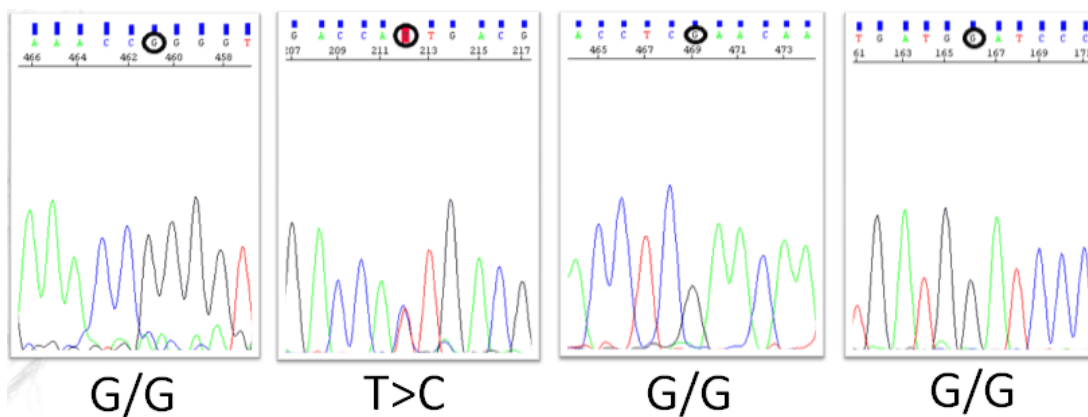
G/G

T/T

G/G

G/G

NAT2*4/*5



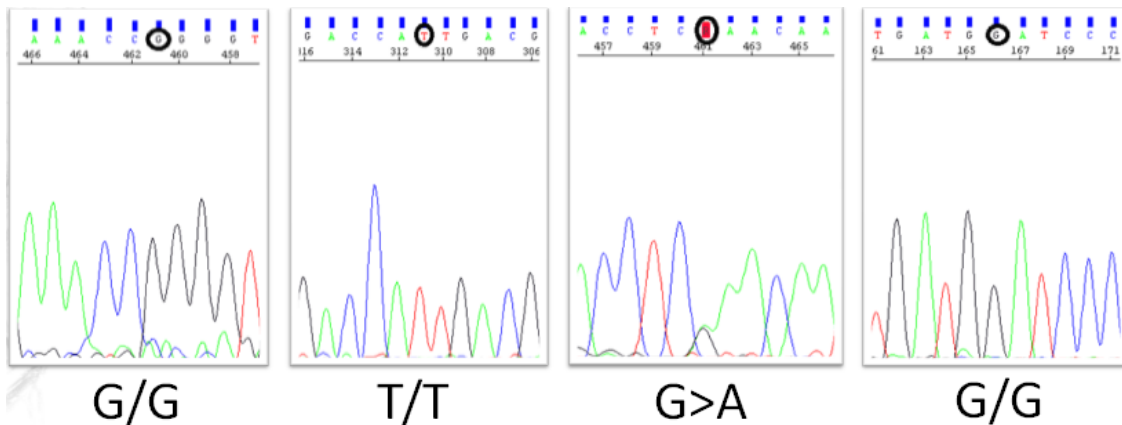
G/G

T>C

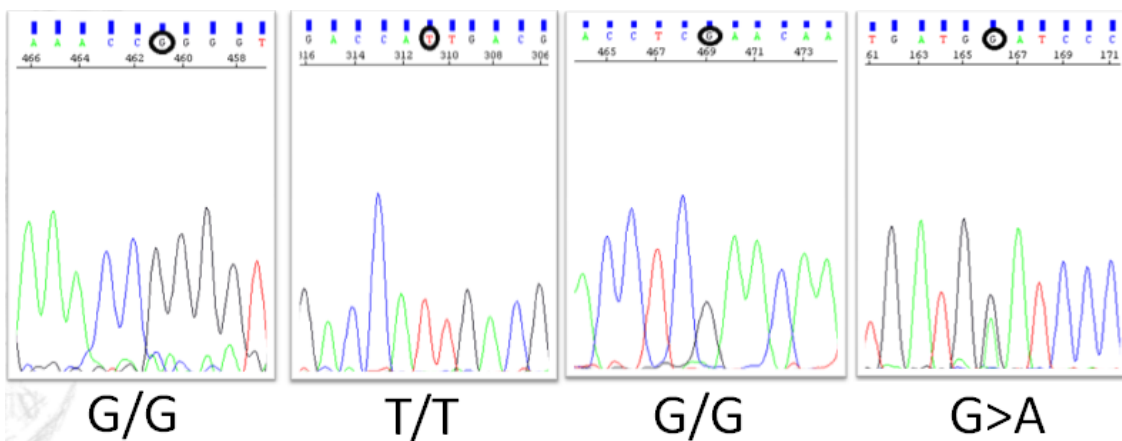
G/G

G/G

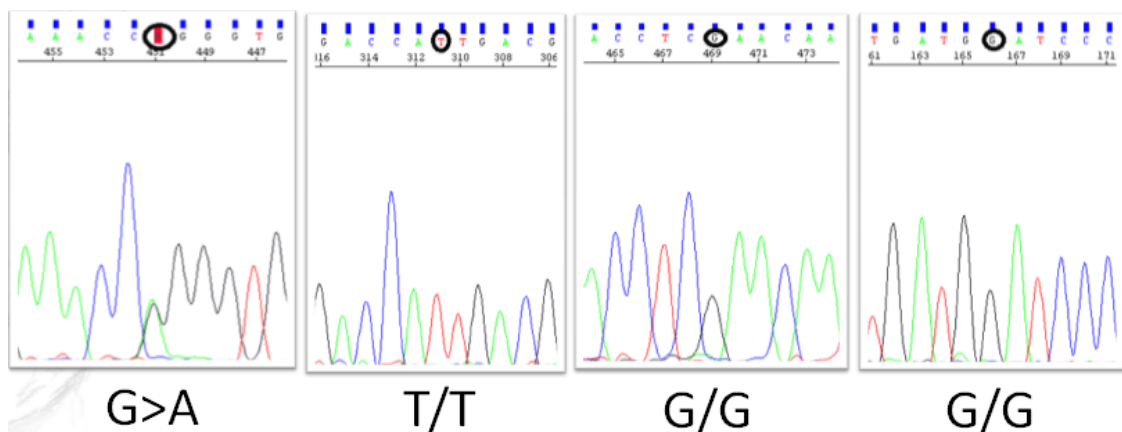
NAT2*4/*6



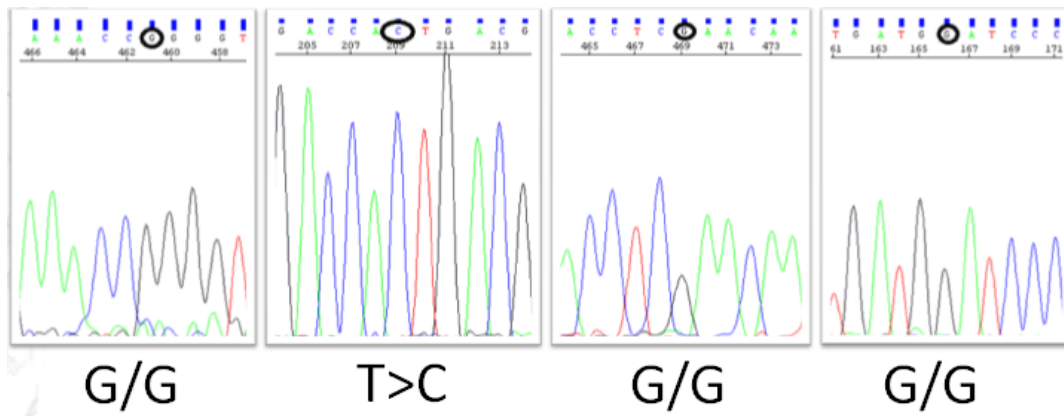
NAT2*4/*7



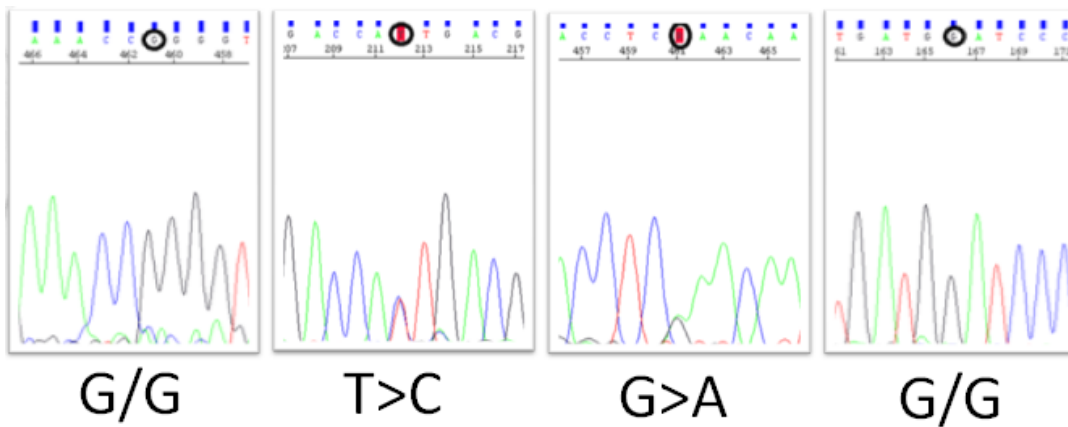
NAT2*4/*14



NAT2*5/*5



NAT2*5/*6



NAT2*6/*6

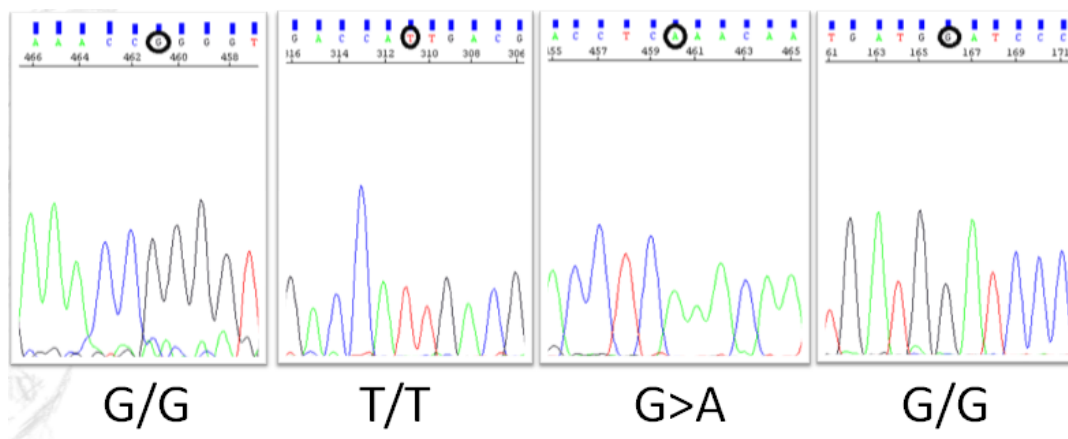


Figure 30 : Electrophorégrammes obtenus après séquençage des quatre variants du gène NAT2.

DISCUSSION

La tuberculose reste une cause majeure de mortalité et de morbidité mondiale, avec plus de 9 millions de nouveaux cas diagnostiqués et 1,5 million de décès liés à la tuberculose en 2014[43]. La Tuberculose est dépassée seulement par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) comme cause de décès associés à des maladies infectieuses dans le monde entier [280]. Il y a plus de vingt médicaments disponibles pour son traitement, et ils sont utilisés dans diverses combinaisons dans des circonstances différentes. Ainsi, par exemple, certains médicaments antituberculeux ne sont utilisés que pour le traitement de nouveaux patients quand il n'y a aucune suggestion d'une résistance aux médicaments, tandis que d'autres ne sont utilisés que pour le traitement de la tuberculose résistante aux médicaments [281]. Plus de 90% des personnes atteintes de tuberculose sensible aux médicaments peuvent être guéri en six mois en utilisant une combinaison de médicaments antituberculeux de première ligne [282].

Les principaux effets indésirables des médicaments antituberculeux qui ont une implication clinique comprennent l'hépatotoxicité, la toxicité oculaire, et les réactions d'hypersensibilité de la peau. L'hépatotoxicité est la plus grave réaction négative médicamenteuse des anti-tuberculeux, en particulier l'INH [16]. Les facteurs responsables de l'hépatotoxicité comprennent le phénotype d'acétylation, les doses de médicaments antituberculeux, l'état nutritionnel du patient et la gravité de la maladie [283]. La relation entre les facteurs génétiques et l'hépatotoxicité induite par l'INH a été approuvée dans les études précédentes [7, 284, 285]. Ces études ont montré que le phénotype acétylateur lent est corrélé à l'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux.

Le risque d'hépatotoxicité a été attribué à la variabilité génétique dans l'arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*), et le cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) [5-7, 17]. *NAT2*, une enzyme cytosolique de phase II de conjugaison, métabolise l'INH en acétylisoniazide dans le foie. L'acétylisoniazide est hydrolysé en acétylhydrazine, qui est oxydé par le cytochrome P450 2E1 pour former certains intermédiaires hépatotoxiques [13, 18]. L'élimination des acétylhydrazines dépend également plus de l'acétylation par *NAT2* pour former le diacétylhydrazine, un métabolite non toxique [19, 20].

Le premier objectif de ce travail était de déterminer, pour la première fois, la fréquence des acétyleurs lents dans la population marocaine par génotypage des quatre variants du gène *NAT2* et la détermination de la fréquence du génotype c1/c1 du gène *CYP2E1*, afin de prédire les effets indésirables du traitement de la tuberculose, en particulier l'hépatotoxicité.

Le deuxième objectif de cette étude était de vérifier le profil d'acétylation des patients qui ont développé une hépatotoxicité après le traitement de la tuberculose par le génotypage des quatre polymorphismes du gène *NAT2*.

Dans cette présente étude, nous avons déterminé la fréquence des allèles et des génotypes *NAT2* chez 163 sujets marocains (ADN du sang de cordon ombilical) par une stratégie de PCR en temps réel, et chez 42 patients marocains atteints de l'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux par une stratégie de PCR-séquençage.

Nous avons étudié les 4 variations de séquence (SNP) déjà connues et décrites dans la littérature (c.341T>C (rs1801280 ; *NAT2**5), c.590G>A (rs1799930 ; *NAT2**6), c.857G>A (rs1799931 ; *NAT2**7) et c.191G>A (rs1801279 ; *NAT2**14)) [286-290].

Ces différentes mutations ont des impacts connus sur l'activité de la *NAT2*. La mutation c.191G>A réduit nettement l'activité de la *NAT2* par la rupture du pont essentiel pour la formation de sels minéraux. Ce SNP est considéré comme la seule mutation réductrice de l'activité enzymatique dont l'impact sur la structure de *NAT2* peut être facilement expliqué [291]. Les mutations c.341T>C, c.590G>A, et c.857G>A sont également des mutations réductrices de l'activité de la *NAT2* par dégradation des protéines cytosoliques [202, 292].

La mutation c.590G>A est fréquente dans la plupart des populations sauf chez les amérindiens (américains natifs) où elle est très rare [268, 293, 294]. Les études fonctionnelles de ce variant chez les bactéries, les levures et les cellules de mammifères montrent une réduction de l'activité *NAT2* et du taux de protéines en raison de la thermostabilité des protéines hébergeant cette mutation [19, 176, 295, 296].

Nos résultats montrent que les acétyleurs lents sont les plus fréquents dans notre population marocaine (72,39%), et l'allèle *NAT2**5 est le plus représenté (53%) similaire aux populations caucasienne et iranienne [167, 297]. En comparant les fréquences alléliques des quatre variants du gène *NAT2* rapportées dans le tableau 12, la distribution de *NAT2**14 en Tunisie et *NAT2**6, *NAT2**7 dans les populations caucasiennes ne varie pas considérablement de notre population ($p > 0,05$). D'autre part, la distribution allélique dans la

population marocaine est différente des autres populations tels les tunisiens pour les trois allèles NAT2*5, NAT2*6 et NAT2*7 et les caucasiens pour les deux allèles NAT2*5 et NAT2*14, cette différence est statistiquement significative ($p < 0,05$) [186, 272].

Cette différence avec les voisins tunisiens pourrait être expliquée par les origines marocaines et tunisiennes. Depuis environ 8000 ans, les amazighs ont été le principal groupe qui constitue toute la population de la région d'Afrique du Nord, mais à travers les siècles, les amazighs ont été mélangé différemment avec beaucoup d'autres groupes ethniques dont les phéniciens, carthaginois, romains, vandales, byzantins, et les arabes alors que la domination ottomane a atteint la Tunisie seulement [298, 299]. Une autre explication de la différence entre notre population et les tunisiens pourrait être un biais de sélection, et la taille limitée de leur échantillon.

Des études ont montré une variation dans la distribution des allèles NAT2 entre les différentes populations, où quatre grands groupes pourraient être distingués en fonction de la fréquence des allèles NAT2*5 et NAT2*6 et en fonction de la présence des allèles NAT2*7 et NAT2*14. L'allèle NAT2*5 est le plus commun parmi les populations caucasienne, égyptienne et omanienne que dans notre population [183, 186, 271], tandis que les asiatiques comme les populations sud-coréenne et japonaise, ont moins de NAT2*5 et plus de NAT2*7 [177, 186, 268].

Le variant NAT2*6 est à la deuxième position dans notre population comme chez les caucasiennes [186]. L'allèle NAT2*14, est classé en troisième position dans notre population, et il est rare chez les caucasiens et absent dans les populations omanienne et sud coréenne [186, 268, 271]. La fréquence de l'allèle NAT2*7 était de 2% proche de celles trouvés chez les populations caucasienne, égyptienne et brésilienne [183, 186, 269].

L'implication de ces SNP dans les risques de survenue de certaines maladies a été déjà prouvée [19, 176, 292, 295]. Des études ont montré que la mutation c.341 T>C codant pour l'allèle NAT2*5, est fortement incriminée dans la survenue du cancer du sein chez les sujets fumeurs (tabagiques) due à une forte réduction de l'activité enzymatique de la protéine [300].

Pour le polymorphisme rs2031920 du gène *CYP2E1*, notre groupe étudié se composait de 130 contrôles, provenant de différentes régions du Maroc. De nos résultats, on remarque qu'il y a une fréquence élevée du génotype c1/c1 dans la population marocaine avec absence du

génotype *c2/c2* (Tableau 13), ce qui aggrave l'hépatotoxicité chez les patients acétyleurs lents sous traitement anti-tuberculeux [301]. Dans le tableau 14, nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autres populations signalées. Les fréquences des génotypes *c1/c1*, *c1/c2* et *c2/c2* chez les marocains étaient proches de celles trouvées chez les caucasiens, les tunisiens, les turques et les indiens [273, 274, 276-279] et différentes de celles trouvées chez les populations asiatiques [186, 207, 284, 301-303].

Parmi plusieurs polymorphismes génétiques du gène *CYP2E1*, le polymorphisme *RsaI* a été évalué principalement en association avec l'hépatotoxicité due aux anti-tuberculeux, expliquée par une activité *CYP2E1* plus élevée avec le génotype *c1/c1* et l'effet inhibiteur de l'INH [269, 304-307].

Huang et al. a démontré dans une population taïwanaise que le génotype *c1/c1* du gène *CYP2E1* augmentait le risque d'hépatotoxicité induite par les médicaments anti-tuberculeux, et des résultats similaires ont été montrés en Chine et trouvés dans d'autres études d'association [207, 308, 309].

Les résultats de notre étude sur les patients qui ont développé une hépatotoxicité sous traitement anti-tuberculeux montrent que les acétyleurs lents sont les plus fréquents, et que les allèles *NAT2*5* et *NAT2*6* sont les plus représentés, avec des fréquences de 52% [95% CI 41-63] et 36% [95% CI 26-46] respectivement (tableaux 15 et 16).

Sur la base de ces résultats, nous proposons i) de conforter nos résultats préliminaires par des études plus larges sur de plus grandes cohortes et ii) s'intégrer dans un 2^{ème} temps ces données dans la stratégie sanitaire nationale de lutte contre la tuberculose par la mise en place du génotypage des polymorphismes du gène *NAT2* comme analyse de première intention, systématiquement avant toute approche thérapeutique pour les patients marocains.

L'absence des acétyleurs rapides (RA) chez les patients tuberculeux de notre série soutient l'association déjà établie dans la littérature entre l'hépatotoxicité due à l'INH et le génotype acétyleur lent (SA), notamment *NAT2*5/*5*, *NAT2*5/*6* et *NAT2*6/*6*. Ces résultats concordent avec ceux décrits chez les iraniens, les brésiliens, les coréennes et les japonais [7, 284, 297, 310]. Par conséquent, il existe une nécessité d'ajuster la dose d'isoniazide en fonction du génotype et du phénotype trouvé chez le patient [269]. Une réduction de la dose de l'INH chez les patients tuberculeux porteurs de génotypes acétyleur lent devrait être

envisagé afin d'éviter l'hépatotoxicité et de diminuer le coût de la gestion des effets indésirables.

Le concept de la médecine personnalisée est apparu comme un des moyens d'améliorer la réponse thérapeutique et de minimiser les effets indésirables des médicaments. D'importantes variations fonctionnelles et polymorphiques de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments ont maintenant été identifiées avec une influence sur la concentration systémique du médicament. La *N*-acétyltransférase 2 est un élément important du métabolisme de biotransformation de l'INH, et a d'abord été reconnue chez les patients atteints de tuberculose traités avec cet antibiotique [311, 312].

Malgré ce succès fort appréciable dans la lutte contre la tuberculose qui place notre pays parmi les premiers en Afrique, la prise en charge de la maladie reste toutefois confrontée à plusieurs contraintes qui fragilisent les objectifs du programme sanitaire marocain de lutte antituberculeux centré autour d'un dépistage à hauteur de 70 % et d'une guérison frôlant le taux de 86 % [10]. L'absence de connaissances sur le profil du phénotype d'acétylation de l'isoniazide (INH) chez les marocains constitue une lacune qui peut altérer la bonne réussite du protocole de traitement de cette maladie.

En dépit des doses de médicaments prescrites avec un schéma thérapeutique multidrogue (pyrazinamide, isoniazide, éthambutol, rifampicine), les patients présentent une grande variation des concentrations plasmatiques et les réactions indésirables aux médicaments tels que l'hépatite médicamenteuse sont souvent observées [313]. Les patients qui sont acétyleurs lents sont connus pour être à risque de la plupart des toxicités induites par les médicaments, tandis que les acétyleurs rapides peuvent subir un échec thérapeutique. Par conséquent, les études de l'influence des génotypes de la *NAT2* sur la capacité de métabolisme de l'isoniazide peuvent aider à personnaliser et optimiser les schémas thérapeutiques en les rendant thérapeutiquement plus efficaces tout en réduisant les effets indésirables liés à l'utilisation de ce médicament [314].

La connaissance du profil d'acétylation de l'INH dans la population marocaine constitue donc un outil pharmacologique et toxicologique indispensable dans la lutte contre la tuberculose. Le débat a été toujours compliqué quand il est devenu clair qu'il y avait des différences significatives entre des individus dans leur capacité d'éliminer l'INH [315, 316]. Ainsi à cause

des différences considérables de réponse à l'exposition à l'INH, il est urgent pour chaque pays, d'étudier le profil d'acétylation de sa population dans l'intérêt de disposer des éléments de suivi des conséquences thérapeutiques et toxiques possibles liées à l'utilisation de certains médicaments et de certaines associations de drogues.

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

Junichi Azuma et al. 2013[317], ont proposé dans leur étude récente sur les génotypes NAT2 et leurs impact sur la dose de l'INH, d'augmenter la dose recommandée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 5 mg/kg à 7,5 mg/kg chez les acétyleurs rapides, maintenir cette dose chez les acétyleurs intermédiaires, et de la réduire à 2,5 mg/kg chez les acétyleurs lents. Comme les marocains sont principalement acétyleurs lents, nous proposons d'après nos résultats de réduire la dose de l'INH chez les patients tuberculeux porteurs de génotypes acétyleurs lents, afin d'éviter l'hépatotoxicité et de diminuer le coût de gestion d'éventuels événements indésirables.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'étude des polymorphismes des gènes *NAT2* et *CYP2E1* montre que plus de 70% des sujets marocains sont porteurs de génotypes composés d'allèles *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 et *NAT2**14 compatibles avec le statut acétyleur lent, et par conséquent, ils sont sensibles à des doses plus faibles de traitement de la tuberculose. Nous devrions tenir compte de cette forte prévalence des acétyleurs lents afin de diminuer les effets indésirables, surtout que la grande majorité des marocains sont également homozygotes pour l'allèle c1 du gène *CYP2E1*, qui est un facteur aggravant l'hépatotoxicité.

Nous avons également constaté que tous les patients tuberculeux qui ont développé une hépatotoxicité sont des acétyleurs lents ou intermédiaires porteurs de génotypes *NAT2**5/*5, *NAT2**5/*6, *NAT2**6/*6, *NAT2**6/*14, *NAT2**4/*5 et *NAT2**4/*6 et on note l'absence des acétyleurs rapides. Nous affirmons que ces génotypes sont un facteur de risque pour développer une hépatotoxicité sous traitement antituberculeux. Ainsi, le profil du génotype *NAT2* doit être pris en considération pour l'ajustement de la dose de l'INH administrée aux patients. Ceci contribuera à diminuer les effets indésirables sous traitement de la tuberculose chez les patients marocains.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont contribué à une meilleure connaissance des profils moléculaires à l'origine du polymorphisme d'activité de la *NAT2* au Maroc et permettent de proposer aux cliniciens une stratégie rapide et à faible coût pour l'analyse complète et réfléchie du gène *NAT2*, afin d'évaluer le risque individuel de développer des effets indésirables sous certains médicaments à médiation enzymatique comme l'isoniazide. L'activité de la *NAT2* d'un individu peut être prédite par des méthodes de génotypage. La connaissance du génotype *NAT2* d'un patient représente une véritable aide à la thérapeutique, qui permet aux cliniciens d'adapter la posologie des médicaments arylamines et hydrazines en fonction du statut métabolique de l'individu, voire d'opter pour un traitement alternatif.

Les recherches menées dans le domaine de la pharmacogénétique et de la toxicogénétique des traitements à base de médicaments potentiellement toxiques ou pouvant s'avérer inefficaces chez certains individus, présentent non seulement un intérêt purement médical, mais aussi économique. La connaissance prospective des patients à risque de développer des effets indésirables à un traitement médicamenteux devrait permettre de mieux maîtriser les coûts en terme de santé publique, en évitant la prescription de traitements longs, coûteux, voire inutiles ou dangereux pour un certain nombre de sujets.

La généralisation des tests de génotypage, en vue d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments, n'est certes pas encore une réalité, mais les différents acteurs du monde de la santé et les représentants des autorités de tutelle doivent prendre conscience de l'importance des phénomènes pharmaco-toxico-génétiques. Les variations de réponse aux médicaments, d'origine génétique, sont désormais reconnues comme un problème médical et de santé publique majeurs et des recommandations d'utilisation de tests pharmaco-toxico-génétiques ont été ajoutées dans les notices de plusieurs médicaments sur décision de certaines agences de régulation comme l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA, Food and Drug Administration).

Il serait intéressant de prévoir dans nos perspectives, de génotyper les polymorphismes *NAT2* dans une population de contrôles plus importante, ainsi que dans une population de malades atteints de tuberculose et d'étudier l'impact du polymorphisme génétique de la *NAT2* chez ces patients à long terme et l'implication du polymorphe de la *NAT2* dans la genèse de certaines pathologies sous-jacentes ou l'échec thérapeutique chez les tuberculeux traités par l'INH. Nous proposons aussi d'élaborer des protocoles thérapeutiques incluant les doses minimales efficaces d'INH, permettant d'obtenir une réponse clinique satisfaisante avec moins de risque de développer des effets indésirables notamment l'hépatite médicamenteuse.

RESUME

Le but de ce travail était d'étudier l'influence du polymorphisme des gènes *NAT2* et *CYP2E1* dans la survenue des effets indésirables du traitement avec de l'isoniazide au Maroc, pour cela nous avons déterminé dans un 1^{er} temps par génotypage, pour la première fois, la fréquence des acétyleurs lents des variants du gène *NAT2* et nous avons estimé la fréquence du génotype c1/c1 du gène *CYP2E1* dans la population marocaine. Dans un 2^{ème} temps, nous avons vérifié le caractère acétyleur lent des patients qui ont développé une hépatotoxicité suite au traitement antituberculeux.

Cette étude a porté sur 163 contrôles marocains et 42 patients ayant développé une hépatotoxicité sous traitement antituberculeux. Nous avons génotypé quatre polymorphismes sélectionnés *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7, et *NAT2**14 du gène *NAT2* et le polymorphisme rs2031920 du gène *CYP2E1* par PCR en temps réel chez les contrôles et par séquençage Sanger chez les patients.

Les fréquences des allèles *NAT2* sont de 53%, 25%, 2% et 4% pour *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 et *NAT2**14 respectivement. Le génotypage du polymorphisme du gène *CYP2E1*, a révélé des fréquences de 98,5% pour c1/c1 et 1,5% pour c1/c2. Les génotypes les plus répandus du gène *NAT2* chez les marocains sont ceux qui codent le phénotype d'acétylation lent (72,39%), conduisant à un risque élevé d'hépatotoxicité. La plupart des marocains sont homozygotes pour l'allèle c1 aggravant l'hépatotoxicité chez les acétyleurs lents.

La majorité des patients avec hépatotoxicité étudiés sont porteurs de génotypes acétyleurs lents *NAT2**5/*5, *NAT2**5/*6, *NAT2**6/*6, et *NAT2**6/*14 (78%), il n'y a pas de génotype acétyleur rapide observé chez ces patients. Cela confirme le fait que le phénotype acétyleur lent est responsable du développement de l'hépatotoxicité due au traitement antituberculeux. Ces données génétiques devraient être prises en compte pour déterminer la dose thérapeutique de l'isoniazide à administrer aux patients tuberculeux marocains, afin d'éviter des effets indésirables.

Mots clés : Tuberculose, hépatotoxicité, isoniazide, gène *NAT2*, gène *CYP2E1*, acétyleur lent.

Structure de recherche : Epidémiologie Moléculaire des Maladies Génétiques au Maroc : Maladies Rares et Cancers (EMMGM).

ABSTRACT

This work aimed to study the influence of *NAT2* and *CYP2E1* polymorphisms on the occurrence of adverse effects of treatment with isoniazid in Morocco. To this end, we first determined by genotyping, for the first time, the frequency of slow acetylators of *NAT2* gene variants and we estimated the frequency of c1/c1 genotype for *CYP2E1* gene in Moroccan population. Second, we verified the slow acetylator status of patients who developed hepatotoxicity after tuberculosis treatment using genotyping *NAT2* polymorphisms. Consequently, 163 Moroccan controls and 42 Moroccan patient subjects who developed hepatotoxicity after tuberculosis treatment have been studied. We genotyped four selected variants NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, and NAT2*14 of *NAT2* gene and the polymorphism rs2031920 of *CYP2E1* gene by Sanger sequencing for patients and real-time polymerase chain reaction for controls.

The frequencies of specific *NAT2* alleles are 53%, 25%, 2% and 4% for NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 and NAT2*14 respectively. Moreover, genotyping of *CYP2E1* gene, revealed frequencies of 98.5% for c1/c1 and 1.5% for c1/c2. The most prevalent genotypes of *NAT2* gene in Moroccans are those which encode slow acetylation phenotype (72.39%), leading to a high risk of hepatotoxicity. Most Moroccans are homozygous for c1 allele of *CYP2E1* gene which aggravates hepatotoxicity in slow acetylators. The majority of patients with hepatotoxicity are carriers of *NAT2* genotypes previously described as slow acetylators including NAT2*5/*5, NAT2*5/*6, NAT2*6/*6, and NAT2*6/*14 (78%) and none were genotyped as rapid acetylators. This finding confirm that slow acetylator phenotype is responsible for the development of tuberculosis treatment hepatotoxicity.

This genetic background should be considered to determine the therapeutic dose of Isoniazid needed to treat Moroccan tuberculosis patients, in order to avoid adverse effects.

Keywords: Tuberculosis, hepatotoxicity, isoniazide, *NAT2* gene, *CYP2E1* gene, slow acetylator.

Research structure: Molecular Epidemiology of Genetic Diseases in Morocco. Rare Diseases and Cancers (MEGDM).

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير تعدد أشكال الجينات *NAT2* و *CYP2E1* في حدوث آثار غير مرغوب فيها نتيجة المعالجة بالمضاد الحيوي الإيزونيازيد في المغرب. من أجل ذلك قمنا في مرحلة أولى بتحديد تردد المؤسطين البطينيين لتعدد أشكال الجين *NAT2* و قدرنا تردد النمط الجيني c1/c1 للجين *CYP2E1* للمرة الأولى عن طريق التتميط الجيني لعينة ممثلة للشعب المغربي.

في مرحلة ثانية تحققنا من النمط الظاهري مؤستل بطيء للمرضى الذين أصيبوا بتسمم الكبد نتيجة العلاج بمضادات السل. شملت هذه الدراسة 163 عينة ممثلة للمغاربة و 42 من المرضى الذين أصيبوا بتسمم الكبد أثناء العلاج بمضادات السل. لقد قمنا بالتتميط الجيني لأربعة من متعددات الأشكال المختارة *NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* و *NAT2*14* للجين *NAT2* و تعدد الأشكال rs2031920 للجين *CYP2E1* بإستعمال طريقة تضخيم ADN في الوقت الحقيقي للعينات الممثلة للمغاربة وطريقة تحديد التسلسل سانجر للمرضى.

ترددات الحليلات *NAT2* هي 53%، 25%، 2% و 4% ل *NAT2*5*، *NAT2*6*، *NAT2*7* و *NAT2*14* على التوالي. التتميط الجيني لتعدد أشكال الجين *CYP2E1*، كشف عن ترددات 98.5% ل c1/c1 و 1.5% ل c1/c2. الأنماط الجينية الأكثر شيوعا للجين *NAT2* في المغرب هي تلك التي تشفر النمط الظاهري مؤستل بطيء (72.39%)، مما يؤدي إلى ارتفاع مخاطر الإصابة بتسمم الكبد. معظم المغاربة هم متماثلون للحليل c1 مما يؤدي إلى تقاوم التسمم الكبدي عند المؤسطين البطينيين.

غالبية المرضى المدروسين الذين يعانون من تسمم الكبد هم حاملون للأنماط الجينية للمؤسطين البطينيين *NAT2*5/*5*، *NAT2*5/*6*، *NAT2*6/*6* و *NAT2*6/*14* بنسبة 78%، ونلاحظ عدم وجود أي مؤستل سريع من بين هؤلاء المرضى.

هذا يؤكد كون النمط الظاهري مؤستل بطيء هو المسؤول عن تطوير التسمم الكبدي نتيجة لعلاج السل، وبالتالي ينبغي أن تؤخذ هذه البيانات الجينية بعين الاعتبار عند تحديد الجرعة العلاجية من الإيزونيازيد التي ينبغي وصفها لمرضى السل المغاربة لتجنب الآثار الغير مرغوب فيها.

كلمات رئيسية: السل، تسمم الكبد، الإيزونيازيد، الجين *NAT2*، الجين *CYP2E1*، مؤستل بطيء.

هيكل البحث: علم الأوبئة الجزيئية للأمراض الوراثية في المغرب: الأمراض النادرة والسرطانات. EMMGM

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Evans WE, Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999, 286(5439):487-491.
2. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE: Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000, 14(4):567-572.
3. Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramirez J, Kim S, Di Rienzo A, Ratain MJ: Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1999, 65(5):576-582.
4. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *The Journal of clinical investigation* 1999, 104(3):263-269.
5. Weber WW, Hein DW: N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacological reviews* 1985, 37(1):25-79.
6. Kohno H, Kubo H, Takada A, Mori M, Arias TD: Isoniazid Acetylation Phenotyping in the Japanese: The Molar Metabolic Ratio INH/AcINH. *American journal of therapeutics* 1996, 3(1):74-78.
7. Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, Ribeiro AW, Cafrune PI, Picon PD, Santos AR, Teixeira RL, Gregianini TS, Hutz MH *et al*: Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol* 2008, 64(7):673-681.
8. Leiro-Fernandez V, Valverde D, Vazquez-Gallardo R, Constenla L, Fernandez-Villar A: Genetic variations of NAT2 and CYP2E1 and isoniazid hepatotoxicity in a diverse population. *Pharmacogenomics* 2010, 11(9):1205-1206; author reply 1207-1208.
9. Leiro-Fernandez V, Valverde D, Vazquez-Gallardo R, Botana-Rial M, Constenla L, Agundez JA, Fernandez-Villar A: N-acetyltransferase 2 polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasians. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011, 15(10):1403-1408.
10. Maroc MdI Sd: Situation Epidémiologique de la Tuberculose au Maroc, Année 2015. In. Morocco; 2015.
11. WHO(2004): Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD Global Project on Anti- Tuberculosis Drug Resistance Surveillance Report No. 3 Geneva: WHO. 2004.
12. Forget EJ, Menzies D: Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2006, 5(2):231-249.
13. Benichou C: Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *Journal of hepatology* 1990, 11(2):272-276.
14. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, Peloquin CA, Gordin FM, Nunes D, Strader DB *et al*: An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174(8):935-952.
15. Marra F, Marra CA, Bruchet N, Richardson K, Moadebi S, Elwood RK, Fitzgerald JM: Adverse drug reactions associated with first-line anti-tuberculosis drug regimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007, 11(8):868-875.
16. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R: Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23(2):192-202.

17. Gupta RC, Nair CR, Jindal SK, Malik SK: Incidence of isoniazid acetylation phenotypes in North Indians. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* 1984, 22(5):259-264.
18. Vatsis KP, Weber WW: Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Archives of biochemistry and biophysics* 1993, 301(1):71-76.
19. Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW: Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2001, 11(3):207-215.
20. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, Fujiwara P, Grzemska M, Hopewell PC, Iseman MD *et al*: American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167(4):603-662.
21. Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW: Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis* 2007, 28(8):1665-1671.
22. 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.
23. Cascorbi I, Brockmoller J, Bauer S, Reum T, Roots I: NAT2*12A (803A-->G) codes for rapid arylamine n-acetylation in humans. *Pharmacogenetics* 1996, 6(3):257-259.
24. 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(8):683-692.
25. Kolble K: Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225. *Genomics* 1993, 18(3):702-704.
26. Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodenez P, Joannet I, Hispard E, Bardou LG, Menez JF: Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 1995, 5(5):298-304.
27. Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B: Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009, 12(5-6):362-388.
28. Organization WH: Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data edn. Geneva; 2009.
29. Chretien J: La tuberculose Parcours Imagé, vol. 1, Auchel edn; 1995.
30. Sabbatani S: [Historical insights into tuberculosis. Girolamo Fracastoro's intuition on the transmission of tuberculosis and his opponents. History of an idea]. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive* 2004, 12(4):284-291.
31. Duffin J: To See with a Better Eye : A Life of R. T. H. Laennec: Princeton, NJ: Princeton University Press; 1998.
32. Daniel TM: Pioneers of medicine and their impact on tuberculosis. Rochester, NY: University of Rochester Press; 2000.
33. Daniel TM: Rene Theophile Hyacinthe Laennec and the founding of pulmonary medicine. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, 8(5):517-518.

34. Daniel TM: Captain of death: The story of tuberculosis. Rochester, NY, USA: University of Rochester Press; 1997.
35. Daniel TM: Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9(11):1181-1182.
36. Koch R: Uber bakteriologische forschung. In: *Verhandlungen des X internationalen medizenischen kongresses, Berlin; Berlin. Germany.* August Hirschwald 1890.
37. Davis A: History of the sanatorium movement. Rom WN, Garay SM, New York, NY: Little, Brown and Company; 1996.
38. Daniel TM: The history of tuberculosis. *Respiratory medicine* 2006, 100(11):1862-1870.
39. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C: The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of internal medicine* 2003, 163(9):1009-1021.
40. Walker NF, Meintjes G, Wilkinson RJ: HIV-1 and the immune response to TB. *Future virology* 2013, 8(1):57-80.
41. WHO WHO: Global Tuberculosis Control : Surveillance, Planning, Financing. In. Edited by WHO/CDS/TB/2002.295, WHO Report 2002 edn. Geneva, Switzerland; 2002.
42. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 1999, 282(7):677-686.
43. WHO WHO: Global tuberculosis report 2015. In., 20th edn; 2015.
44. Jürg Barben (SGPP) CBP, Thomas Bodmer (IFIK),, Jean-Marie Egger (LPS) GMMcT, Peter Helbling (OFSP),, Jean-Paul Janssens (HCUGE) DNS, Laurent Nicod (CHUV),, Alexander Turk (Zürcher Höhenklinik Wald) BVO, Jean-Pierre Zellweger (LPS) SZS: Manuel de la tuberculose, Ligue pulmonaire suisseSüdbahnhofstrasse 14cCase postale3000 Berne 14info@lung.ch edn: Ligue pulmonaire suisse | avril 2012; 2012.
45. McMurray DN, Collins FM, Dannenberg AM, Jr., Smith DW: Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Current topics in microbiology and immunology* 1996, 215:157-179.
46. Russell DG: Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, 2(8):569-577.
47. Fenton MJ, Vermeulen MW: Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infection and immunity* 1996, 64(3):683-690.
48. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998, 19(3):513-521.
49. Trinchieri G: Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Current opinion in immunology* 1997, 9(1):17-23.
50. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW: Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Advances in experimental medicine and biology* 2003, 531:241-247.
51. Kaufmann SH, McMichael AJ: Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature medicine* 2005, 11(4 Suppl):S33-44.
52. Aubert-Pivert EM, Chedevergne FM, Lopez-Ramirez GM, Colle JH, Scheinmann PL, Gicquel BM, de Blic JM: Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis: a study with bronchoalveolar cells. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2000, 80(6):249-258.

53. Schwander SK, Torres M, Carranza CC, Escobedo D, Tary-Lehmann M, Anderson P, Toossi Z, Ellner JJ, Rich EA, Sada E: Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *Journal of immunology* 2000, 165(3):1479-1485.
54. Flynn JL, Ernst JD: Immune responses in tuberculosis. *Current opinion in immunology* 2000, 12(4):432-436.
55. Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Gicquel B, Neyrolles O: The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 2003, 278(8):5513-5516.
56. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thomas-Uzynski S, Melian A, Bogdan C *et al*: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998, 282(5386):121-125.
57. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L: The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual review of microbiology* 2003, 57:641-676.
58. Dannenberg AM, Jr.: Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* 1994, 191(4-5):461-473.
59. McMurray RW, Sharp GC, Braley-Mullen H: Intrathyroidal cell phenotype in murine lymphocytic and granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity* 1994, 18(2):93-102.
60. Dannenberg AM, Jr.: Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hospital practice* 1993, 28(1):51-58.
61. Leemans JC, Juffermans NP, Florquin S, van Rooijen N, Vervoordeldonk MJ, Verbon A, van Deventer SJ, van der Poll T: Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *Journal of immunology* 2001, 166(7):4604-4611.
62. Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN, Bloom BR: The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 1999, 10(6):641-650.
63. Mostowy S, Behr MA: The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in chest medicine* 2005, 26(2):207-216, v-vi.
64. Bloom BR, Small PM: The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. *The New England journal of medicine* 1998, 338(10):677-678.
65. Hasaneen NA, Zaki ME, Shalaby HM, El-Morsi AS: Polymerase chain reaction of pleural biopsy is a rapid and sensitive method for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 2003, 124(6):2105-2111.
66. Diacon AH, Van de Wal BW, Wyser C, Smedema JP, Bezuidenhout J, Bolliger CT, Walzl G: Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *The European respiratory journal* 2003, 22(4):589-591.
67. Conde MB, Loivos AC, Rezende VM, Soares SL, Mello FC, Reingold AL, Daley CL, Kritski AL: Yield of sputum induction in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167(5):723-725.
68. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA: Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007, 131(3):880-889.

69. Waecker NJ: Tuberculous Meningitis in Children. *Current treatment options in neurology* 2002, 4(3):249-257.
70. Byrd T, Zinser P: Tuberculosis Meningitis. *Current treatment options in neurology* 2001, 3(5):427-432.
71. Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK: Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *The Lancet Infectious diseases* 2005, 5(7):415-430.
72. Hussain SF, Irfan M, Abbasi M, Anwer SS, Davidson S, Haqqee R, Khan JA, Islam M: Clinical characteristics of 110 miliary tuberculosis patients from a low HIV prevalence country. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, 8(4):493-499.
73. Wilcke JT, Kok-Jensen A: Diagnostic strategy for pulmonary tuberculosis in a low-incidence country: results of chest X-ray and sputum cultured for Mycobacterium tuberculosis. *Respiratory medicine* 1997, 91(5):281-285.
74. Graham S, Das GK, Hidvegi RJ, Hanson R, Kosiuk J, Al ZK, Menzies D: Chest radiograph abnormalities associated with tuberculosis: reproducibility and yield of active cases. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002, 6(2):137-142.
75. Zellweger JP, Heinzer R, Touray M, Vidondo B, Altpeter E: Intra-observer and overall agreement in the radiological assessment of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, 10(10):1123-1126.
76. Respiratoires FdA: Diagnostic et traitement de la tuberculose, manuel pratique, recommandations destinées au corps médical; septembre 2010.
77. WHO WHO: Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. In.; 2008: 293–300.
78. WHO WHO: LABORATORY DIAGNOSIS OF BURULI ULCER. A MANUAL FOR HEALTH-CARE PROVIDERS. In., Françoise Portaels edn; 2014.
79. DG Groothuis MY: Diagnostic and Public Health Mycobacteriology, 2nd edn. London, England; 1991.
80. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161(4 Pt 1):1376-1395.
81. Centers for Disease C, Prevention: Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2009, 58(1):7-10.
82. Palomino JC: Molecular detection, identification and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS immunology and medical microbiology* 2009, 56(2):103-111.
83. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R *et al*: Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England journal of medicine* 2010, 363(11):1005-1015.
84. Organization WH: Treatment of tuberculosis : guidelines 4th edn; 2010.
85. Hopewell PC, Pai M, Maher D, Uplekar M, Raviglione MC: International standards for tuberculosis care. *The Lancet Infectious diseases* 2006, 6(11):710-725.
86. Development GAfTD: TB drugs database. *Tuberculosis (Edinb)* 2008, 88:169.

87. Fox W, Ellard GA, Mitchison DA: Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, 3(10 Suppl 2):S231-279.
88. Mitchison DA: The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171(7):699-706.
89. J Chrétien FP: Traitement de la tuberculose pulmonaire. 1978, 3:266.
90. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. *Thorax* 2000, 55(3):210-218.
91. WHO WHO: Treatment of tuberculosis : Guidelines for national programmes. In., Third edn; 2003.
92. A controlled trial of 6 months' chemotherapy in pulmonary tuberculosis. Final report: results during the 36 months after the end of chemotherapy and beyond. British Thoracic Society. *British journal of diseases of the chest* 1984, 78(4):330-336.
93. Clinical trial of three 6-month regimens of chemotherapy given intermittently in the continuation phase in the treatment of pulmonary tuberculosis. Singapore Tuberculosis Service/British Medical Research Council. *The American review of respiratory disease* 1985, 132(2):374-378.
94. WHO WHO: Treatment of tuberculosis : guidelines. In., 4th edn; 2009.
95. WHO WHO: Rapid advice : Treatment of tuberculosis in children. In. Switzerland; 2010.
96. Snider DE, Graczyk J, Bek E, Rogowski J: Supervised six-months treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis using isoniazid, rifampin, and pyrazinamide with and without streptomycin. *The American review of respiratory disease* 1984, 130(6):1091-1094.
97. Trebucq A: Should ethambutol be recommended for routine treatment of tuberculosis in children? A review of the literature. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997, 1(1):12-15.
98. Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom: recommendations 1998. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. *Thorax* 1998, 53(7):536-548.
99. Donald PR, Schoeman JF, Van Zyl LE, De Villiers JN, Pretorius M, Springer P: Intensive short course chemotherapy in the management of tuberculous meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, 2(9):704-711.
100. Strang JI, Kakaza HH, Gibson DG, Girling DJ, Nunn AJ, Fox W: Controlled trial of prednisolone as adjuvant in treatment of tuberculous constrictive pericarditis in Transkei. *Lancet* 1987, 2(8573):1418-1422.
101. Strang JI, Kakaza HH, Gibson DG, Allen BW, Mitchison DA, Evans DJ, Girling DJ, Nunn AJ, Fox W: Controlled clinical trial of complete open surgical drainage and of prednisolone in treatment of tuberculous pericardial effusion in Transkei. *Lancet* 1988, 2(8614):759-764.
102. Humphries M: The management of tuberculous meningitis. *Thorax* 1992, 47(8):577-581.
103. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases: Chemotherapy for tuberculosis in infants and children. *Pediatrics* 1992, 89(1):161-165.

104. Sonnenberg P, Murray J, Glynn JR, Shearer S, Kambashi B, Godfrey-Faussett P: HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet* 2001, 358(9294):1687-1693.
105. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies MdS: Guide de la lutte anti-tuberculeuse : à l'usage des professionnels de la santé. In: *Programme National de Lutte Anti-tuberculeuse*. Troisième edn. Maroc; 2011.
106. Ormerod LP, Horsfield N: Frequency and type of reactions to antituberculosis drugs: observations in routine treatment. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1996, 77(1):37-42.
107. Schaberg T: The dark side of antituberculosis therapy: adverse events involving liver function. *The European respiratory journal* 1995, 8(8):1247-1249.
108. Dossing M, Wilcke JT, Askgaard DS, Nybo B: Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1996, 77(4):335-340.
109. Thompson NP, Caplin ME, Hamilton MI, Gillespie SH, Clarke SW, Burroughs AK, McIntyre N: Anti-tuberculosis medication and the liver: dangers and recommendations in management. *The European respiratory journal* 1995, 8(8):1384-1388.
110. Fernandez-Villar A, Sopena B, Fernandez-Villar J, Vazquez-Gallardo R, Ulloa F, Leiro V, Mosteiro M, Pineiro L: The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, 8(12):1499-1505.
111. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD: Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002, 35(4):883-889.
112. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Shepherd S, McLarty J, Griffith L, Wallace RJ, Jr.: Ethambutol ocular toxicity in treatment regimens for Mycobacterium avium complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172(2):250-253.
113. Hardman JG LL, Molinoff PB , Ruddon RW , Goodman AG: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edn: New York, NY: McGraw-Hill; 1996.
114. Prows CA, Prows DR: Medication selection by genotype: How genetics is changing drug prescribing and efficacy. *The American journal of nursing* 2004, 104(5):60-70; quiz 71.
115. Ingelman-Sundberg M: Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *Journal of internal medicine* 2001, 250(3):186-200.
116. Roses AD: Pharmacogenetics place in modern medical science and practice. *Life sciences* 2002, 70(13):1471-1480.
117. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL *et al*: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001, 409(6822):928-933.
118. Garibaldi RA, Drusin RE, Ferebee SH, Gregg MB: Isoniazid-associated hepatitis. Report of an outbreak. *The American review of respiratory disease* 1972, 106(3):357-365.
119. HY Xue YH, HC Liu The general investigation of the increased hepatotoxicity caused by isoniazid in combination with rifampin. *Chinese Journal Modern Applied Pharmacy* 2002, 19:463-465.

120. Lundkvist J, Jonsson B: Pharmacoeconomics of adverse drug reactions. *Fundamental & clinical pharmacology* 2004, 18(3):275-280.
121. Hug H, Bagatto D, Dannecker R, Schindler R, Horlacher O, Gut J: ADRIS--The Adverse Drug Reactions Information Scheme. *Pharmacogenetics* 2003, 13(12):767-772.
122. Larrey D: Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Seminars in liver disease* 2002, 22(2):145-155.
123. Omaima El Bouazzi SB, Latifa Ait Moussa, Rachida Soulaymani-Bencheikh, Narjis Badrane, Rachid Bengueddour: Suivi Thérapeutique Pharmacologique Des Antituberculeux : Quinze Ans d'Expérience. *European Scientific Journal* 2016, 12.
124. Lee WM: Drug-induced hepatotoxicity. *The New England journal of medicine* 2003, 349(5):474-485.
125. Nelson SD, Mitchell JR, Timbrell JA, Snodgrass WR, Corcoran GB, 3rd: Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science* 1976, 193(4256):901-903.
126. Timbrell JA MJ, Snodgrass WR, Nelson SD: Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1980, 213 364-369.
127. Mitchell JR, Snodgrass WR, Gillette JR: The role of biotransformation in chemical-induced liver injury. *Environmental health perspectives* 1976, 15:27-38.
128. Woodward KN, Timbrell JA: Acetylhydrazine hepatotoxicity: the role of covalent binding. *Toxicology* 1984, 30(1):65-74.
129. Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Attri S, Thakur S, Mehta S: Study of oxidative stress in isoniazid-induced hepatic injury in young rats with and without protein-energy malnutrition. *Journal of biochemical toxicology* 1996, 11(3):139-146.
130. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR: Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2005, 45:51-88.
131. Roy PD, Majumder M, Roy B: Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics* 2008, 9(3):311-321.
132. Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF: Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, 3(8):675-682.
133. Evans D: N-acetyltransferase. In: *Pharmacogenetics of drug metabolism*. Kalow W.ed: New York : Pergamon Press; 1992: 95-178.
134. Dalhoff K, Buus Jensen K, Enghusen Poulsen H: Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Methods in enzymology* 2005, 400:618-627.
135. Roemer HC, Weistenhofer W, Lohlein D, Geller F, Blomeke B, Golka K: N-acetyltransferase 1 in colon and rectal cancer cases from an industrialized area. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 2008, 71(13-14):902-905.
136. Weistenhofer W, Blaszkewicz M, Bolt HM, Golka K: N-acetyltransferase-2 and medical history in bladder cancer cases with a suspected occupational disease (BK 1301) in Germany. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 2008, 71(13-14):906-910.
137. Grant DM, Tang BK, Kalow W: Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1983, 33(5):591-602.
138. Hickman D RA, Buckle V, Spurr N, Jeremiah S: Chromosomal localization of human gene arylamine NAT. *Biochem* 1994, 297:441-445.

139. Boukouvala S, Fakis G: Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug metabolism reviews* 2005, 37(3):511-564.
140. Westwood IM, Kawamura A, Fullam E, Russell AJ, Davies SG, Sim E: Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Current topics in medicinal chemistry* 2006, 6(15):1641-1654.
141. Minchin RF, Hanna PE, Dupret JM, Wagner CR, Rodrigues-Lima F, Butcher NJ: Arylamine N-acetyltransferase I. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007, 39(11):1999-2005.
142. Sim E, Westwood I, Fullam E: Arylamine N-acetyltransferases. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2007, 3(2):169-184.
143. Sim E, Walters K, Boukouvala S: Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug metabolism reviews* 2008, 40(3):479-510.
144. Sim E, Lack N, Wang CJ, Long H, Westwood I, Fullam E, Kawamura A: Arylamine N-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology* 2008, 254(3):170-183.
145. Grant DM: Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Current drug metabolism* 2008, 9(6):465-470.
146. Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA: Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA and cell biology* 1990, 9(3):193-203.
147. 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.
148. Evans DA: N-acetyltransferase. *Pharmacology & therapeutics* 1989, 42(2):157-234.
149. Meyer UA ZU, Grant D, Blum M: Genetic polymorphisms of drug metabolism. In: Edited by research Aod. Testa B: Academic London; 1990.
150. Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA: Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88(12):5237-5241.
151. 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(8):1633-1638.
152. Sinclair JC, Sandy J, Delgoda R, Sim E, Noble ME: Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nature structural biology* 2000, 7(7):560-564.
153. Sandy J, Mushtaq A, Kawamura A, Sinclair J, Sim E, Noble M: The structure of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*--an enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, isoniazid. *Journal of molecular biology* 2002, 318(4):1071-1083.
154. Westwood IM, Holton SJ, Rodrigues-Lima F, Dupret JM, Bhakta S, Noble ME, Sim E: Expression, purification, characterization and structure of *Pseudomonas aeruginosa* arylamine N-acetyltransferase. *The Biochemical journal* 2005, 385(Pt 2):605-612.
155. Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E, Minchin RF: Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The pharmacogenomics journal* 2002, 2(1):30-42.
156. Walraven JM, Trent JO, Hein DW: Structure-function analyses of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 1. *Drug metabolism reviews* 2008, 40(1):169-184.

157. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Sinha R, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG: Breast cancer risk, meat consumption and N-acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphisms. *Int J Cancer* 1998, 75(6):825-830.
158. Rychlik-Sych M, Skretkiewicz J, Gawronska-Szklarz B, Gornik W, Sysa-Jedrzejowska A, Skretkiewicz-Szarmach K: Acetylation genotype and phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Pharmacological reports : PR* 2006, 58(1):22-29.
159. Grant DM: Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1993, 3(1):45-50.
160. Hein DW, Rustan TD, Doll MA, Bucher KD, Ferguson RJ, Feng Y, Furman EJ, Gray K: Acetyltransferases and susceptibility to chemicals. *Toxicol Lett* 1992, 64-65 Spec No:123-130.
161. Hein DW: Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1988, 948(1):37-66.
162. Grant DM, Blum M, Meyer UA: Polymorphisms of N-acetyltransferase genes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 1992, 22(9-10):1073-1081.
163. Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV *et al*: Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1995, 5(1):1-17.
164. Hickman D, Sim E: N-acetyltransferase polymorphism. Comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochemical pharmacology* 1991, 42(5):1007-1014.
165. Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW: Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis* 1993, 14(8):1689-1692.
166. Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S: Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics, and whites: application to metabolic epidemiology. *American journal of human genetics* 1993, 52(4):827-834.
167. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I: Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *American journal of human genetics* 1995, 57(3):581-592.
168. Doll MA, Fretland AJ, Deitz AC, Hein DW: Determination of human NAT2 acetylator genotype by restriction fragment-length polymorphism and allele-specific amplification. *Analytical biochemistry* 1995, 231(2):413-420.
169. Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Debuysere H, Fazio F, Lafitte LJ, Broly F: Molecular analysis of the N-acetyltransferase 1 gene (NAT1*) using polymerase chain reaction-restriction fragment-single strand conformation polymorphism assay. *Pharmacogenetics* 2000, 10(4):293-300.
170. Bigler J, Chen C, Potter JD: Determination of human NAT2 acetylator genotype by oligonucleotide ligation assay. *BioTechniques* 1997, 22(4):682-684, 686, 688 passim.
171. Wikman H, Thiel S, Jager B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Edler L, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P *et al*: Relevance of N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1, NAT2) genetic polymorphisms in non-small cell lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 2001, 11(2):157-168.

172. Doll MA, Hein DW: Comprehensive human NAT2 genotype method using single nucleotide polymorphism-specific polymerase chain reaction primers and fluorogenic probes. *Analytical biochemistry* 2001, 288(1):106-108.
173. Doll MA, Hein DW: Rapid genotype method to distinguish frequent and/or functional polymorphisms in human N-acetyltransferase-1. *Analytical biochemistry* 2002, 301(2):328-332.
174. Sotsuka T, Sasaki Y, Hirai S, Yamagishi F, Ueno K: Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients. *In vivo* 2011, 25(5):803-812.
175. Nyéki A BJ, Kesselring UW, Décosterd LA: Extraction less method for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary caffeine metabolites for N-acetyltransferase 2, cytochrome P450 1A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J chromatogr B* 2001, 755(1-2):73-84.
176. Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K: Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant, and chimeric NAT2 allozymes. *Human molecular genetics* 1994, 3(5):729-734.
177. Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S: Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 1994, 4(3):125-134.
178. Shishikura K, Hohjoh H, Tokunaga K: Novel allele containing a 190C>T nonsynonymous substitution in the N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Human mutation* 2000, 15(6):581.
179. Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Hein DW: Cloning, expression, and functional characterization of two mutant (NAT2(191) and NAT2(341/803)) and wild-type human polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) alleles. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 1994, 22(3):371-376.
180. Hickman D, Palamanda JR, Unadkat JD, Sim E: Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical pharmacology* 1995, 50(5):697-703.
181. Leff MA, Fretland AJ, Doll MA, Hein DW: Novel human N-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype. *J Biol Chem* 1999, 274(49):34519-34522.
182. Vatsis KP MK, Weber W: Diverse point mutations in the human gene for polymorphic NAT. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 88:6333- 6337.
183. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M: Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003, 55(6):560-569.
184. Furet Y, Bechtel Y, Le Guellec C, Bechtel PR, Autret-Leca E, Paintaud G: [Clinical relevance of N-acetyltransferase type 2 (NAT2) genetic polymorphism]. *Thérapie* 2002, 57(5):427-431.
185. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Kaaya S, Sayi J, Sommers DK, Snyman 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(1):55-58.
186. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P *et al*: Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10(12):1239-1248.

187. Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V: CYP3A4*1B and NAT2*14 alleles in a native African population. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2003, 41(4):606-609.
188. Grant DM, Tang BK, Kalow W: A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1984, 17(4):459-464.
189. 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. *Reproductive toxicology* 1998, 12(4):435-444.
190. Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A *et al*: Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *The New England journal of medicine* 2000, 343(25):1839-1845.
191. 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. *Obstetrics and gynecology* 2001, 98(6):1059-1066.
192. Lefebvre H T-KG, Toutain PL, Hatey F: Evaluating variability in drug response: pharmacogenetics. In. Edited by Charlotte: Am Acad Vet Pharmacol Toxicol; Juin 2002.
193. Allorge D LM: 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.
194. Gaedigk A: Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000, 38(2):61-68.
195. Shi MM: Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical chemistry* 2001, 47(2):164-172.
196. Gra O, Mityaeva O, Berdichevets I, Kozhekbaeva Z, Fesenko D, Kurbatova O, Goldenkova-Pavlova I, Nasedkina T: Microarray-based detection of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, NAT2, HLA-DQA1, and ABO allele frequencies in native Russians. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2010, 14(3):329-342.
197. Hein DW, Doll MA: Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics* 2012, 13(1):31-41.
198. Timbrell JA: Studies on the role of acetylhydrazine in isoniazid hepatotoxicity. *Archives of toxicology Supplement = Archiv fur Toxikologie Supplement* 1979(2):1-8.
199. Noda A, Hsu KY, Noda H, Yamamoto Y, Kurozumi T: Is isoniazid-hepatotoxicity induced by the metabolite, hydrazine? *Journal of UOEH* 1983, 5(2):183-190.
200. Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL, Mitchell JR: Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin Pharmacol Ther* 1985, 38(5):566-571.
201. 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.
202. Hein DW: Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002, 506-507:65-77.

203. Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK: Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166(7):916-919.
204. Rodrigo L, Alvarez V, Rodriguez M, Perez R, Alvarez R, Coto E: N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P450II1E1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case-control study. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1999, 34(3):303-307.
205. Yu MW, Pai CI, Yang SY, Hsiao TJ, Chang HC, Lin SM, Liaw YF, Chen PJ, Chen CJ: Role of N-acetyltransferase polymorphisms in hepatitis B related hepatocellular carcinoma: impact of smoking on risk. *Gut* 2000, 47(5):703-709.
206. Zhang J, Xu F, Ouyang C: Joint effect of polymorphism in the N-acetyltransferase 2 gene and smoking on hepatocellular carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2012, 33(4):1059-1063.
207. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD: Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003, 37(4):924-930.
208. Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK: Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax* 1996, 51(2):132-136.
209. Hussain Z, Kar P, Husain SA: Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian J Exp Biol* 2003, 41(11):1226-1232.
210. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K *et al*: Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, 4(3):256-261.
211. Shimizu Y, Dobashi K, Mita Y, Endou K, Moriya S, Osano K, Koike Y, Higuchi S, Yabe S, Utsugi M *et al*: DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity. *Tuberculosis (Edinb)* 2006, 86(5):374-381.
212. Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, Matsuura M, Narahara K, Inoue T, Hamdy SI, Endo N, Goto J, Mizugaki M: Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2002, 17(4):357-362.
213. Weisburger JH: A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. *Mutat Res* 1997, 376(1-2):261-266.
214. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA: Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 1982, 2(8303):842-845.
215. Risch A, Wallace DM, Bathers S, Sim E: Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Human molecular genetics* 1995, 4(2):231-236.
216. Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM: The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett* 2002, 128(1-3):229-241.

217. Vineis P, Marinelli D, Autrup H, Brockmoller J, Cascorbi I, Daly AK, Golka K, Okkels H, Risch A, Rothman N *et al*: Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10(12):1249-1252.
218. Filiadis IF, Georgiou I, Alamanos Y, Kranas V, Giannakopoulos X, Lolis D: Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case-control study. *The Journal of urology* 1999, 161(5):1672-1675.
219. Inatomi H, Katoh T, Kawamoto T, Matsumoto T: NAT2 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to bladder cancer in Japanese. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 1999, 6(9):446-454.
220. Katoh T, Inatomi H, Yang M, Kawamoto T, Matsumoto T, Bell DA: Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and risk of urothelial transitional cell carcinoma among Japanese. *Pharmacogenetics* 1999, 9(3):401-404.
221. Giannakopoulos X, Charalabopoulos K, Baltogiannis D, Chatzikiriakidou A, Alamanos Y, Georgiou I, Evangelou A, Agnantis N, Sofikitis N: The role of N-acetyltransferase-2 and glutathione S-transferase on the risk and aggressiveness of bladder cancer. *Anticancer research* 2002, 22(6B):3801-3804.
222. Brockton N, Little J, Sharp L, Cotton SC: N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 2000, 151(9):846-861.
223. Katoh T, Boissy R, Nagata N, Kitagawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T, Bell DA: Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000, 85(1):46-49.
224. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y: Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9(1):29-42.
225. Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME: The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutat Res* 1997, 376(1-2):153-160.
226. Vineis P, McMichael A: Interplay between heterocyclic amines in cooked meat and metabolic phenotype in the etiology of colon cancer. *Cancer causes & control : CCC* 1996, 7(4):479-486.
227. Stillwell WG, Kidd LC, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R: Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase activity. *Cancer research* 1997, 57(16):3457-3464.
228. Probst-Hensch NM, Haile RW, Ingles SA, Longnecker MP, Han CY, Lin BK, Lee DB, Sakamoto GT, Frankl HD, Lee ER *et al*: Acetylation polymorphism and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer research* 1995, 55(10):2017-2020.
229. Ananthakrishnan AN, Du M, Berndt SI, Brenner H, Caan BJ, Casey G, Chang-Claude J, Duggan D, Fuchs CS, Gallinger S *et al*: Red meat intake, NAT2, and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of 11 studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015, 24(1):198-205.
230. Guengerich FP: CytochromeP-450. *CompBiochphysiol* 1988, 80 1-4.

231. Guengerich FP: Human Cytochrome P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry*. Edited by P. R. E. r. E. (Ortiz de Montellano P: New York; 2005: 377-530.
232. Stern J: Cytochrome P 450 polymorphism and susceptibility to cancer. In: *Medical and workplace applications*. 1998: 211-226.
233. Koivisto T, Mishin VM, Mak KM, Cohen PA, Lieber CS: Induction of cytochrome P-4502E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcoholism, clinical and experimental research* 1996, 20(2):207-212.
234. Lieber CS: Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcoholism, clinical and experimental research* 1999, 23(6):991-1007.
235. Lindros KO, Cai YA, Penttila KE: Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 IIE1 in carbon tetrachloride-induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology* 1990, 12(5):1092-1097.
236. Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS, Gonzalez FJ: Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J Biol Chem* 1986, 261(35):16689-16697.
237. Nedelcheva V, Persson I, Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphism of human cytochrome P450 2E1. *Methods in enzymology* 1996, 272:218-225.
238. Itoga S, Nomura F, Harada S, Tsutsumi M, Takase S, Nakai T: Mutations in the exons and exon-intron junction regions of human cytochrome P-4502E1 gene and alcoholism. *Alcoholism, clinical and experimental research* 1999, 23(4 Suppl):13S-16S.
239. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K: Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *Journal of biochemistry* 1991, 110(4):559-565.
240. Watanabe J HS, Kawajiri KJ: Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem (Tokyo)* 1994, 116 321-326.
241. Carriere V, Berthou F, Baird S, Belloc C, Beaune P, de Waziers I: Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* 1996, 6(3):203-211.
242. Powell H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA, Park BK: Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 1998, 8(5):411-421.
243. Le Marchand L WG, Wilkens LR: Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity : a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 1999, 8 495-500.
244. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H: The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 1993, 14(1):85-88.
245. Mannervik B: The isozymes of GST. *Advances in Enzymology Areas mol biol* 1985, 57 357-417.
246. Board P CM, Johnston P, Suzuki T: Genetic heterogeneity of the human Gluthation S-Transferase. *Pharmacological Therapy* 1990, 48 357-369.
247. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, Patterson D: Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *American journal of human genetics* 1993, 53(1):220-233.

248. Roman A OM, Alexendrie A, Seidegard J, David A, Evans P: Characterization of a human GST m cluster containing a duplicated GSTM1 gene. *Pharmacology* 1997, 52:958-965.
249. Islam MQ, Platz A, Szpirer J, Szpirer C, Levan G, Mannervik B: Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu and pi. *Human genetics* 1989, 82(4):338-342.
250. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR: Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998, 273(6):3517-3527.
251. Board PG: Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *American journal of human genetics* 1981, 33(1):36-43.
252. Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P: Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *The Biochemical journal* 1998, 334 (Pt 3):617-623.
253. Peter H, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E: Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Archives of toxicology* 1989, 63(5):351-355.
254. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB: Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *The Biochemical journal* 1994, 300 (Pt 1):271-276.
255. Alexandrie AK, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M: Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Pharmacogenetics* 2002, 12(8):613-619.
256. Tostmann A, van den Boogaard J, Semvua H, Kisonga R, Kibiki GS, Aarnoutse RE, Boeree MJ: Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is uncommon in Tanzanian hospitalized pulmonary TB patients. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 2010, 15(2):268-272.
257. Maniatis T FE, Sambrook J: Molecular cloning : a laboratory manual 1982: Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
258. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 1988, 16(3):1215.
259. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW, Jr., Rary JM: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74(3):1245-1249.
260. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230(4732):1350-1354.
261. Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74(2):560-564.
262. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74(12):5463-5467.
263. Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J: High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *Journal of clinical microbiology* 1999, 37(2):327-332.

264. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 2000, 25(2):169-193.
265. Lamoril J, Bogard M: [Genomic medicine: the new way of thinking medicine present and future--Part two]. *Annales de biologie clinique* 2014, 72(1):25-48.
266. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A: Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* 2002, 30(6):1292-1305.
267. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA *et al*: 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research* 2000, 28(2):655-661.
268. Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES: Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet* 2008, 9:21.
269. Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, Muniz LM, Moreira Ada S, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, Miranda AB, Santos AR: Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106(6):716-724.
270. Chamorro JG, Castagnino JP, Musella RM, Frias A, Aranda FM, De Larranaga GF: The distribution of allelic and genotypic frequencies of N-Acetyltransferase-2 variants in an Argentine population. *J Infect Dev Ctries* 2012, 6(9):671-674.
271. Tanira MO, Simsek M, Al Balushi K, Al Lawatia K, Al Barawani H, Bayoumi RA: Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (nat2) genotypes among Omanis. *J Sci Res Med Sci* 2003, 5(1-2):9-14.
272. Bendjemana K, Abdennebi M, Gara S, Jmal A, Ghanem A, Touati S, Boussem H, Ladgham A, Guemira F: [Genetic polymorphism of glutathion-S transferases and N-acetyl transferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience]. *Bull Cancer* 2006, 93(3):297-302.
273. Kunak S, C AAO, Karacaoglan V, Soydas E, , Bilgen S, Iscan M: Drug/xenobiotic metabolizing enzyme polymorphisms in a Turkish population *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012, 6(27):2068-2074.
274. Neuhaus T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Brode P, Vetter H, Bolt HM, Pesch B, Bruning T: Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett* 2004, 151(1):273-282.
275. Brocic M, Supic G, Zeljic K, Jovic N, Kozomara R, Zagorac S, Zlatkovic M, Magic Z: Genetic polymorphisms of ADH1C and CYP2E1 and risk of oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, 145(4):586-593.
276. Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S: Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2000, 87(5):734-740.
277. Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN: Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol* 2001, 23(2):91-97.
278. Roy B, Ghosh SK, Sutradhar D, Sikdar N, Mazumder S, Barman S: Predisposition of antituberculosis drug induced hepatotoxicity by cytochrome P450 2E1 genotype and haplotype in pediatric patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21(4):784-786.

279. Ben Fredj N, Gam R, Kerkni E, Chaabane A, Chadly Z, Boughattas N, Aouam K: Risk factors of isoniazid-induced hepatotoxicity in Tunisian tuberculosis patients. *The pharmacogenomics journal* 2016.
280. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C: Tuberculosis. *Lancet* 2003, 362(9387):887-899.
281. WHO WHO: Guidelines for treatment of tuberculosis. In., Fourth edn; 2010: 147.
282. Lambregts-van Weezenbeek CS, Veen J: Control of drug-resistant tuberculosis. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1995, 76(5):455-459.
283. Chauhan LS, Arora VK, Central Tb Division DGoHSMoH, Family W, Indian Academy of P: Management of pediatric tuberculosis under the Revised National Tuberculosis Control Program (RNTCP). *Indian pediatrics* 2004, 41(9):901-905.
284. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, Lee SY: Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2007, 87(6):551-556.
285. Sun F, Chen Y, Xiang Y, Zhan S: Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, 12(9):994-1002.
286. Sabbagh A DP, Langaney A, Poloni ES: Haplotype tagging efficiency and tagSNP sets portability in worldwide populations in NAT2 gene. *Bull Mém Soc d'Anthrop de Paris* 2007, 19 (3-4):233-241.
287. Magalon H, Patin E, Austerlitz F, Hegay T, Aldashev A, Quintana-Murci L, Heyer E: Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *European journal of human genetics : EJHG* 2008, 16(2):243-251.
288. Teixeira RL, Silva FP, Jr., Silveira AR, Cabello PH, Mendonca-Lima L, Rabahi MF, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, de Miranda AB *et al*: Sequence analysis of NAT2 gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res* 2010, 683(1-2):43-49.
289. Talbot J, Magno LA, Santana CV, Sousa SM, Melo PR, Correa RX, Di Pietro G, Rios-Santos F: Interethnic diversity of NAT2 polymorphisms in Brazilian admixed populations. *BMC Genet* 2010, 11:87.
290. Ebeshi BU BO, Masimirembwa CM Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms' frequencies in Nigerian populations. *Afr J Pharm Pharmacol Res* 2011, 1:1-6.
291. Pompeo F, Brooke E, Kawamura A, Mushtaq A, Sim E: The pharmacogenetics of NAT: structural aspects. *Pharmacogenomics* 2002, 3(1):19-30.
292. Zang Y, Zhao S, Doll MA, States JC, Hein DW: The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation. *Pharmacogenetics* 2004, 14(11):717-723.
293. Spielberg SP: N-acetyltransferases: pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 1996, 24(5):509-519.

294. Xie HG, Xu ZH, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, Yan XD, Huang SL, Wang W, Zhou HH: Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics* 1997, 7(6):503-514.
295. Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Ferguson RJ: Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer research* 1995, 55(16):3531-3536.
296. Svensson CK HD: Metabolism and Transport: Molecular Methods and Mechanisms. In. Edited by LH L. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 173-195.
297. Khalili H, Fouladdel S, Sistanizad M, Hajiabdolbaghi M, Azizi E: Association of N-acetyltransferase-2 genotypes and anti-tuberculosis induced liver injury; first case-controlled study from Iran. *Current drug safety* 2011, 6(1):17-22.
298. Sefiani A: Genetic disorders in Morocco. In: *Genetic disorders Among Arab populations*. Edited by Teebi A: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010: 455-472.
299. L C: Genetic Disorders in Tunisia. In: *Genetic Disorders Among Arab*. Edited by Teebi SA, Second Edition edn: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010: 613-638.
300. van der Hel OL, Peeters PH, Hein DW, Doll MA, Grobbee DE, Kromhout D, Bueno de Mesquita HB: NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. *Pharmacogenetics* 2003, 13(7):399-407.
301. Lee SW, Chung LS, Huang HH, Chuang TY, Liou YH, Wu LS: NAT2 and CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to first-line anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, 14(5):622-626.
302. An HR, Wu XQ, Wang ZY, Zhang JX, Liang Y: NAT2 and CYP2E1 polymorphisms associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012, 39(6):535-543.
303. Tang SW, Lv XZ, Zhang Y, Wu SS, Yang ZR, Xia YY, Tu DH, Deng PY, Ma Y, Chen DF *et al*: CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: a nested case-control study. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 2012, 37(5):588-593.
304. Wang T, Yu HT, Wang W, Pan YY, He LX, Wang ZY: Genetic polymorphisms of cytochrome P450 and glutathione S-transferase associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese tuberculosis patients. *The Journal of international medical research* 2010, 38(3):977-986.
305. Kim SH, Kim SH, Bahn JW, Kim YK, Chang YS, Shin ES, Kim YS, Park JS, Kim BH, Jang JJ *et al*: Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and anti-TB drug-induced hepatitis. *Pharmacogenomics* 2009, 10(11):1767-1779.
306. Wu YM, Luo ZY, Zhang HM, Peng JF, Liu SY, Wang M: [The association between NAT2 polymorphism and anti-tuberculosis drug-induced hepatitis]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* 2010, 18(6):467-469.
307. Chen Y GM, Li SM, Zhang P, Hao JQ, *et al*: Study of the relationship between polymorphisms of cytochrome P4502E1 and antituberculosis drug induced hepatic injury. *Zhonghua Chuan Ran Bing Za Zhi* 2010, 28:748-752.
308. Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D: CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2006, 62(6):423-429.

309. Wang T, Wang W, Wang ZY, Pan YY, Su QQ, He LX: [Association of P450-2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms with susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* 2009, 32(8):585-587.
310. Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Niikawa N *et al*: NAT2 6A, a haplotype of the N-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. *World journal of gastroenterology* 2007, 13(45):6003-6008.
311. Evans DA, Manley KA, Mc KV: Genetic control of isoniazid metabolism in man. *British medical journal* 1960, 2(5197):485-491.
312. Kubota R, Ohno M, Hasunuma T, Iijima H, Azuma J: Dose-escalation study of isoniazid in healthy volunteers with the rapid acetylator genotype of arylamine N-acetyltransferase 2. *Eur J Clin Pharmacol* 2007, 63(10):927-933.
313. Eichelbaum M, Kroemer HK, Mikus G: Genetically determined differences in drug metabolism as a risk factor in drug toxicity. *Toxicol Lett* 1992, 64-65 Spec No:115-122.
314. Weinshilboum R: Inheritance and drug response. *The New England journal of medicine* 2003, 348(6):529-537.
315. Bönicke R RW: Enzymatische Inaktivierung von Isonikotinsäure hydrazide in menslichen und Tierschen Organismus. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1953, 220:321-333.
316. Hughes HB: On the metabolic fate of isoniazid. *J Pharmacol Exp Ther* 1953, 109(4):444-452.
317. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, Okuda Y, Takashima T, Kamimura S, Fujio Y *et al*: NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur J Clin Pharmacol* 2013, 69(5):1091-1101.

ANNEXE

Préparation des tampons et solutions mères

EDTA-Na₂ 0.5M

- EDTA-Na₂, 2H₂O : 186.12 g

-Eau distillé: qsp 1 L

Ajuster le pH avec la soude et autoclaver

NaCl 5M

- NaCl : 292.5 g

- Eau distillé : qsp 1 L

SDS 10% (Solution Dodécyl Sulfate)

- SDS : 50 g

- Eau distillé : qsp 1 L

Dissoudre et rajouter de l'eau distillé qsp 500 mL

Tampon TAE (Tris Acétate EDTA, solution stock 50X)

- Tris base : 242 g

- Acide acétique glacial : 57.1 mL

- EDTA 0.5M, pH 8.0 : 40 mL

- Eau distillé : qsp 1 L

Tampon TAE (Tris Borate EDTA, solution stock 10X)

- Tris base : 108 g

- Acide borique : 55 mL

- EDTA 0.5M, pH 8.0 : 40 mL

- Eau distillé : qsp 1 L

Solution de dépôt bleu de bromophénol

- Xylène-cyanol : 3 μ M
- Bleu de bromophénol : 1 μ M
- Sucrose : 1.5 μ M. Conserver la solution à +4°C

TE 20/5

- Tris HCl 20 mM
- EDTA- Na_2 5 mM
- pH 7.6

SLB (Solution de Lyse des Blancs)

- Tris HCl 10 mM à pH 7.6
- EDTA- Na_2 10 mM - pH 8.0
- NaCl 50 mM
- SDS à 0.2%

TE 10/1

- Tris HCl 10 mM
- EDTA 1 mM à pH 8.0

Tris-HCl 1M à pH 7.6 (Tris-hydroxymethyl aminométhane)

- Tris base : 121 g
- Eau distillé : qsp 1 L

Ajusté le pH avec du HCl concentré

Séquence cible des 4 polymorphismes du gène *NAT2* (exon2)

N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase) [Source: HGNC Symbole; Acc: HGNC:7646]

Synonyms : PNAT, NAT-2, AAC2

Location : Chromosome 8: 18,391,245-18,401,218 forward strand.

GRCh38 : CM000670.2

Transcript ID : ENST00000286479

RefSeq : NM_000015 ; NP_000006

>chromosome:GRCh38:8:18390645:18401818:1

```

CAATTGGAATCTCTTTTTTACTCATCACCAAGAACACCACAAACAAGTTGTTTACCATTT
GGCTCCTTATTTAATCTGGATTTCCAACCTCCTCATGCTTAAAAGACGGAAGATACAATAA
TACTTTCCCTTACAGGGTTCTGAGACTACTAAGAGAACTTATGCATGTAAAAGGGATTCAT
GCAGTAGAAATACTAACAAGAATTACTATGACAGATACTTATAACCATTGTGTTTTTA
CGTATTTAAAATACGTTATACCTATAATTAGTCACACGAGGAAATCAAATGCTAAAGTAT
GATATGTTTTTATGTTTTGTTTTTCTTGCTTAGGGGATCATGGACATTGAAGCATATTTT
GAAAGAATTGGCTATAAGAACTCTAGGAACAAATTGGACTTGGAAACATTAACCTGACATT
CTTGAGCACCAGATCCGGGCTGTTCCCTTTGAGAACCCTAACATGCATTGTGGCAAGCC
ATGGAGTTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGTAAGAAGAAACC GGGTGGGTGG
TGCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTGGGCTCTGACCACAATCGTTTTTCAGACCACA
ATGTTAGGAGGGTATTTTTACATCCCTCCAGTTAACAAATACAGCACTGGCATGGTTCAC
CTTCTCCTGCAGGTGACCATTTGACGGCAGGAATTACATTGTGCGATGCTGGGTCTGGAAGC
TCCTCCAGATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGCCT
TGCATTTTCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAAATCAGGAGAGAG
CAGTATATTACAAACAAGAATTTCTTAATTTCTATCTCCTGCCAAAGAAGAAACACCAA
AAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTCGAACAAATTGAAGATTTTGGATCTATGAATACA
TACCTGCAGAGCTCTCCAACATCTTCATTTATAACCACATCATTGTTGCTTGCAGACC
CCAGAAGGGGTTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCACCTATAGAAAATTCAATTATAAA
GACAATACAGATCTGGTTCGAGTTTAAAACCTCTCACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTCTG
AGAAATATATTTAAGATTTTCTTGGGGAGAAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGGATCC
CTTACTATTTAGAATAAGGAACAAAATAAACCTTGTGTATGTATCACCAACTCACTAA
TTATCAACTTATGTGCTATCAGATACCTCTCTACCCTCACGTATTTTGAAGAAAATCC
TAAACATCAAATACTTTTATCCATAAAAATGTCAGCATTATTTAAAAACAATAACTTTT
TAAAGAAACATAAGGACACATTTTCAAATTAATAAAAATAAAGGCATTTTAAGGATGGCC
TGTGATTATCTTGGGAAGCAGAGTGATTCATGCTAGAAAACATTTAATATTGATTTATTG
TTGAATTCATAGTAAATTTTTTACTGGTAAATGAATAAAGAATATTGTGGAAAAA C TCACT
GTCTCTAAAGTTTATGAAAACATTGTTGGCTAATATATTGTGAATCAAAGTTTTTCTTTA
GACGACTTAGGATATTATGGGGCTAGGCATTTTTTCTCAATAGAGTCTTCTCTCATCC
TCTTTCTTGTCTCCTAGTTACATTTTACTTCCATCCATACTTTGCCACAAGAGAAGG
AACATGAGCTTTATTGTGTAGATCTGATTTGAAATCCTGTGGACACGGGGTGAATTACTT
TTAAAATCTGTGGCTCTGATTCCTCAAAGATAAAAATGCAAATAATATTTATATAATTCAC
TGCCAGATATAAATTTTCAAACATTTTGTATATGGATGAATAACATCATTAATATTGT
GGTTGCTGGGCCAGCATTGCCCCAAAGTTCTCCTTCCATTTTGTCTTTATTTTCTGTAA

```

NAT2*5
rs1801280
c.341T>C

NAT2*14
rs1801279
c.191G>A

NAT2*6
rs1799930
c.590G>A

NAT2*7
rs1799931
c.857G>A

Séquence du polymorphisme rs2031920 (-1053) C>T (Rsa 1 c1>c2) du gène *CYP2E1*

Variant Aperçu

PharmGKB
Accession ID: PA166153990
Type: SNP
Classe: 5' Flanking
Gènes: *CYP2E1, DUX1*

Locus Primaire

Nom: [GRCh37]chr10:135339845
Location: 135339845 – 135339845C > T
Source: dbSNp

Noms Alternatifs

- NC_000010.10:g.135339845C>T
- NC_000010.11:g.133526341C>T
- NG_008383.1:g.3979C>T
- NM_000773.3:c.-1055C>T ; -1053C>T
- XM_005252665.1:c.-512C>T

>gn1|dbSNP|rs2031920|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=147

```

CCCCGCCAGG CCTGGCTGGG CCCACACAGG ACAACAGGGT TCAGGGGTCT GGACAGCTGT
TTCTGCCCAG GGAATTGTCC CTGCCACCTC AACTGGCCA CTGGAAAGGA AAGAGAGGAG
GAGGCGGCAG GCTAACCCAC CCGTGAGCCA GTCGAGTCTA CATTGTCAGT TCTCACCTCG
AGGGGTGCCA AAAACCAGAG GGAAGCAAAG GCCCCTGAAG CCTCTGCCAG AGGCCAACGC
CCCTTCTTGG TTCAGGAGAG GTGCAGTGTT AGGTGCAGCA CAACCAATGA CTTGCTTATG
TGGCTAATAA ATTGTCAAGA GAAAACTGG GTTAGAATGC AATATATAGT ATGTAGTCTC
ATTTTTGTAT AAATACAAGT ATAGAATGGC ATAAC TCAA ATCCACAAGT GATTTGGCTG
GATTGTAAAT GACTTTTATT TTCTTCATTT CTCATCATAT TTTCTATTAT ACATAAAGAT
TCATTGTAA TATAAAGTA

```

Y

```

AAAATTGCAA CCTATGAATT AAGAACTTCT ATATATTGCC AGTTAGAAGA CAGAATGAAA
AACATTCTCT TCATTCTAAC CACACACACA AAAAAGCTCC ACAAATACC TATGGACTAC
CTTCATAGAA GGTGGAAGAG GGTCTGTATG AAGAAAATAA TTAATACATG AAAGAAGAAG
CTAGTCAATG TGGAGCTCTA TTGTGTCCCG GGATCAACAA AGACAAGATA TCTTTAAAAAT
CGTCTTCTAA ATTTACCCTA ATGTAAAACA AATCCAATAA AACTCTAATG TAATTTTTTA
AGAATTTAAA TTTGGAATAA TTCCAAAGAA CAATTTTTCT TAATTTTCTA CAGCCAGAAT
ATATACCTTT AAAAAAATG AAAACAGAGA TTAAC TTTCT CAGAATTGGT TGA TCACTC
TTTCCTTTTA TTTTCTTCC ATGGAATTTT CCAGT TAACT TGAGAAAGTG GAATCGAATT
CCGATGTTGA ATTTTCCTC

```

Les différents génotypes NAT2 et CYP2E1 trouvés chez la population contrôle

Référence individu contrôle	CYP2E1	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	NAT2*14	Génotype
SC03	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC04	C/T	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC05	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC06	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC07	C/T	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC12	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC14	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC17	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC20	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC24	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC25	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC26	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC27	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC33	C/C	T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC22	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC34	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC23	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC35	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC36	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC38	C/C	T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC41	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC42	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC62	C/C	T/C	G/G	G/A	G/G	NAT2*5/*7
SC57	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC52	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC51	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC49	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC43	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC202	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC203	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC207	C/C	T/C	G/G	G/A	G/G	NAT2*5/*7
SC209	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC210	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC211	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC213	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC215	C/C	T/T	G/A	G/A	G/G	NAT2*6/*7
SC216	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC217	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6

SC218	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC219	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC220	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC221	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC224	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC225	C/C	T/T	G/G	G/G	G/A	NAT2*4/*14
SC226	C/C	T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC227	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC232	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC228	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC230	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC235	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC236	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC240	C/C	T/C	G/G	G/A	G/G	NAT2*5/*7
SC242	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC243	C/C	T/T	G/A	G/A	G/G	NAT2*6/*7
SC244	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC245	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC246	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC247	C/C	T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC249	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC250	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC251	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC252	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC253	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC254	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC255	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC256	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC258	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC259	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC260	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC261	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC262	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC263	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC265	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC266	C/C	T/T	G/A	G/G	G/A	NAT2*6/*14
SC267	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC268	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC270	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC271	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC194	C/C	T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC193	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC192	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC191	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC130	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	NAT2*14/*14

SC190	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC189	C/C	T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC188	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC186	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC185	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC184	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC183	C/C	T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC180	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC179	C/C	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC170	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC177	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC176	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC175	C/C	T/T	G/A	G/G	G/A	NAT2*6/*14
SC174	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC172	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC169	C/C	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC167	C/C	T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC196	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC152		T/T	G/A	G/A	G/G	NAT2*6/*7
SC17639	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC19278	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC10969	C/C	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC9713	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC14557	C/C	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC17695	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC154		T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC155		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC156		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC157		T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC158		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC159		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC160		T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC100		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC102		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC104		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC105		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC106		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC107		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC108		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC109		T/C	G/G	G/G	G/A	NAT2*5/*14
SC111		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC112		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC113		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC116		T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC117		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5

SC118		T/T	G/G	G/G	G/A	NAT2*4/*14
SC119		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC120		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC123		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC124		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC125		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC127		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC128		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC129		T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
SC131		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC132		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC133		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC134		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC135		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC136		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC137		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC139		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC140		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC141		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC142		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC143		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC144		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC145		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC146		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC147		T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC148		T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
SC149		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC150		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC151		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC156		T/T	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*4
SC161		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
SC162		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC164		T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
SC165		C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
SC166		T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5

Les différents génotypes NAT2 trouvés chez les 42 patients marocains ayant développé une hépatotoxicité sous traitement anti-tuberculeux

Référence patient	Age	Sexe	Tuberculose (localisation primitive)	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	NAT2*14	Génotype
HT01	54	F	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT02	47	F	Extrapulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT03	52	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT04	56	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT05	28	F	Pulmonaire	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
HT06	25	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT07	62	M	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
HT08	70	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT09	34	M	Pulmonaire	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
HT10	40	F	Extrapulmonaire	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
HT11	80	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT12	27	F	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT13	54	M	Extrapulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT14	45	M	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT15	34	M	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT16	51	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT17	72	M	Extrapulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT18	13	F	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT19	41	M	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT20	84	F	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT21	26	F	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT22	36	F	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT23	40	M	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT24	76	F	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT25	30	M	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT26	31	F	Pulmonaire	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
HT27	74	M	Pulmonaire	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
HT28	32	F	Pulmonaire	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
HT29	62	F	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
HT31	43	M	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT32	50	F	Pulmonaire	T/C	G/A	G/G	G/G	NAT2*5/*6
HT33	58	M	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
HT34	35	M	Pulmonaire	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
HT37	70	M	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5

HT38	58	M	Pulmonaire	T/T	A/A	G/G	G/G	NAT2*6/*6
HT39	49	F	Extrapulmonaire	T/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*4/*5
HT30	19	M	Pulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT35	18	M	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5
HT36	53	M	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/A	NAT2*6/*14
HT40	39	M	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
HT41	44	M	Pulmonaire	T/T	G/A	G/G	G/G	NAT2*4/*6
HT42	45	F	Extrapulmonaire	C/C	G/G	G/G	G/G	NAT2*5/*5

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Distribution of allelic and genotypic frequencies of *NAT2* and *CYP2E1* variants in Moroccan population

Soukaina Guaoua^{1*}, Ilham Ratbi¹, Fatima Zahra Laarabi², Siham Chafai Elalaoui^{1,2}, Imane Cherkaoui Jaouad^{1,2}, Amina Barkat³ and Abdelaziz Sefiani^{1,2}

Abstract

Background: Several pathogenesis and genetic factors influence predisposition to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity (ATDH) especially for isoniazid (INH). However, the major susceptibility genes for ATDH are N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) and cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*). *NAT2* gene determines the individual's acetylator status (fast, intermediate or slow) to metabolize drugs and xenobiotics, while *CYP2E1* c1/c1 genotype carriers had an increased risk of ATDH.

Polymorphisms of the *NAT2* and *CYP2E1* genes vary remarkably among the populations of different ethnic origins. The aim of this study was to determine, for the first time, the frequency of slow acetylators in Moroccan population by genotyping of *NAT2* gene variants and determining the genotype c1/c1 for *CYP2E1* gene, in order to predict adverse effects of Tuberculosis treatment, particularly hepatotoxicity.

Results: The frequencies of specific *NAT2* alleles were 53%, 25%, 2% and 4% for *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 and *NAT2**14 respectively among 163 Moroccan studied group. Genotyping of *CYP2E1* gene, by real-time polymerase chain reaction using TaqMan probes, revealed frequencies of 98.5% for c1/c1 and 1.5% for c1/c2 among 130 Moroccan studied group.

Conclusion: The most prevalent genotypes of *NAT2* gene in Moroccans are those which encode slow acetylation phenotype (72.39%), leading to a high risk of ATDH. Most Moroccans are homozygous for c1 allele of *CYP2E1* gene which aggravates hepatotoxicity in slow acetylators.

This genetic background should be taken into account in determining the minimum dose of INH needed to treat Moroccan TB patients, in order to decrease adverse effects.

Keywords: Tuberculosis, *CYP2E1* gene, *NAT2* gene, Polymorphism, Acetylators, Adverse effects, Moroccans

Background

Pharmacogenetics refers to genetic differences in metabolic pathways which can affect individual responses to drugs, both in terms of therapeutic effect as well as adverse effects. Pharmacogenetics is generally regarded as the study or clinical testing of genetic variation that gives rise to differing responses to drugs. Its purpose is to optimize the therapeutic decisions based on the genome of the individual and the target molecule. Medicines are

developed and used together with pharmacodiagnosis tools to achieve desired drug efficacy and safety.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis*. TB remains to date one of the major public health problems in the world, with 8.6 million of incident cases, 12.0 million prevalent cases and 1.3 million deaths in 2012 [1]. In Morocco, 27,429 new cases of TB were reported in 2012, an incidence of 83 new cases per 100,000 inhabitants, according to the epidemiological services of the Moroccan Ministry of Health (Unpublished data).

The main drugs to treat TB are isoniazid (INH), rifampicin (RMP) and pyrazinamide (PZA), ethambutol (EMB) and/or streptomycin used in combination for 6 months or

* Correspondence: soukainaguaoua@gmail.com

¹Centre de génomique humaine, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Guaoua et al.; licensee Biomed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

more [2]. Tuberculosis treatment cause adverse drug reactions (ADRs), including hepatitis, gastrointestinal intolerance, kidney failure, cutaneous and hematological reactions, which can lead to therapy discontinuation or more serious morbidity and mortality [3]. Among first-line anti-TB drugs, INH is the most effective but also the one that can easily cause hepatotoxicity.

The incidence of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity ranges from 1% to 36% [3-6]. Genetic factors have been reported as a risk for hepatotoxicity [7-10]. These factors were attributed to genetic variability in arylamine N-acetyltransferase2 (*NAT2*) gene, a cytosolic phase II conjugation enzyme primarily responsible for the deactivation of INH [7-11]. INH is metabolized to acetylisoniazid via hepatic *NAT2* [12]. On the other hand, acetylisoniazid is hydrolyzed to acetylhydrazine, which is oxidized by cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) to form some hepatotoxic intermediates [13,14]. Disposal of acetylhydrazine also depends on further acetylation by *NAT2* to form a non-toxic metabolite, diacetylhydrazine [15,16].

NAT2 gene on 8p22 is a key human enzyme in drug detoxification and elimination. Variants in *NAT2* gene affect the activity of anti-tuberculosis drugs and result in three different phenotypes: rapid (RA), intermediate (IA) and slow acetylators (SA). Most SNPs reported to date are found within the 873 bp intronless coding region of *NAT2* gene. Among the seven most common SNPs, four result in amino acid changes leading to a significant decrease in acetylation capacity and are associated to slow acetylator phenotype rs1801280 (c.341 T > C; *NAT2**5), rs1799930 (c.590G > A; *NAT2**6), rs1799931 (c.857 G > A; *NAT2**7), and rs1801279 (c.191G > A; *NAT2**14) [17,18]. The three others rs1041983 (c.282C > T; *NAT2**I3A), rs1799929 (c.481C > T; *NAT2**I1A), rs1208 (c.803A > G; *NAT2**I2A) are synonymous SNPs or do not alter the phenotype [17,18]. They have been identified as fast alleles [19,20].

*NAT2**4 is considered as the reference allele in the case of absence of all the known SNPs, and is designated as a fast allele [19,20]. A heterozygous compound genotype (*NAT2**4/*14 or *NAT2**4/*5 or *NAT2**4/*6 or *NAT2**4/*7) is considered as intermediate acetylator. The pharmacogenetic interest of these data lies in adjusting the dose of isoniazid based on genotype and phenotype found in the patient in order to prevent hepatotoxicity [21].

In humans, the *CYP2E1* enzyme is encoded by the *CYP2E1* gene on 10q24.3qter [22]. Various polymorphisms have been identified in the *CYP2E1* gene, of which the *CYP2E1* *RsaI/PstI* polymorphism (rs2031920; -1053 C > T (Rsa 1 c1 > c2)) in its 50-flanking region may affect the activity or inductibility of the enzyme [23,24].

Polymorphisms of the *NAT2* and *CYP2E1* genes vary remarkably among the populations of different ethnic origins. Acetylators phenotypes in Moroccan population were previously reported to have a higher frequency of phenotypic slow acetylators [25].

The aim of this study was to determine the distribution of allelic and genotypic frequencies of *NAT2* and *CYP2E1* variants in Moroccan controls in order to estimate the prevalence of slow acetylators among Moroccans, who are facing the risk to develop hepatotoxicity after TB treatment.

Results

In this study we identified twelve different genotypes for *NAT2* gene. The most of them encode for the slow acetylator phenotype. Genotypes of the four variants of *NAT2* gene and their corresponding phenotypic profiles are presented in Table 1. With regard to phenotype, the results show that 72.39% [95% CI 65.39-79.39] of the studied group were SA, 21.48% [95% CI 15.04-27.91] were IA and 6.13% [95% CI 2.38-9.88] were RA. For the four variants *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 and *NAT2**14 of *NAT2* gene, the allelic frequencies in the studied group were 53% [95% CI 47-58], 25% [95% CI 20-29], 2% [95% CI 1-3] and 4% [95% CI 2-6], respectively (Table 2). *NAT2* alleles frequencies of Moroccans compared with other populations are shown in Table 2.

The allelic and genotypic distribution of the rs2031920 variant of *CYP2E1* in the studied group is reported in Table 3. The c2/c2 genotype was not found in the studied group. It seems that the majority of Moroccans are carriers of c1/c1 genotype with a frequency of 98.5% [95% CI 96-100]. *CYP2E1* genotypic frequencies of Moroccans compared with different populations of the world are shown in Table 4.

Table 1 Observed frequency of *NAT2* genotypes encoding fast (RA), intermediate (IA) and slow (SA) acetylation phenotypes among Moroccan population studied

Genotype	Genotype frequency	Phenotype
<i>NAT2</i> *4/*4	0.0613	RA
<i>NAT2</i> *4/*5	0.1166	IA
<i>NAT2</i> *4/*6	0.0859	IA
<i>NAT2</i> *4/*14	0.0123	IA
<i>NAT2</i> *5/*5	0.3313	SA
<i>NAT2</i> *5/*6	0.2209	SA
<i>NAT2</i> *5/*7	0.0184	SA
<i>NAT2</i> *5/*14	0.0368	SA
<i>NAT2</i> *6/*6	0.0797	SA
<i>NAT2</i> *6/*7	0.0184	SA
<i>NAT2</i> *6/*14	0.0123	SA
<i>NAT2</i> *14/*14	0.0061	SA

Table 2 NAT2 alleles frequencies among Moroccan population and other ethnic groups

Ethnic groups	n	NAT2*5	NAT2*6	NAT2*7	NAT2*14
Caucasians [26]	3531	0.46	0.285	0.029	0.00
Germanians [27]	844	0.425	0.278	0.013	0.001
Americans [27]	387	0.437	0.266	0.019	0.001
Southern Korean [27]	288	0.01	0.224	0.132	0.00
Spanish [27]	258	0.47	0.25	0.006	0.004
Southern Brazil [28]	254	0.289	0.104	0.021	0.014
Egyptian [29]	199	0.497	0.26	0.028	-
Argentine [30]	185	0.37	0.256	0.08	0.013
Omanians [31]	127	0.44	0.27	0.04	0.00
Senegaliens [27]	101	0.322	0.188	0.00	0.084
Tunisians [32]	100	0.315	0.175	0.15	0.05
South Africa [27]	97	0.361	0.17	0.067	0.103
Japanese [33]	79	0.019	0.23	0.011	-
Indians [33]	61	0.33	0.38	0.03	-
Moroccans (This study)	163	0.53	0.25	0.02	0.04

n: sample size.

Discussion

This results show that slow acetylators are the most frequent in our Moroccan population, and the NAT2*5 allele is the most represented. Comparing the allele frequencies of the four NAT2 variants reported in Table 2, the distribution pattern of NAT2*14 in Tunisian and NAT2*6, NAT2*7 in Caucasians populations did not vary significantly from our population ($p > 0.05$). On the other side, the allelic distribution in our population is different from other populations as Tunisians for the three alleles NAT2*5, NAT2*6 and NAT2*7 and from Caucasians for two alleles NAT2*5 and NAT2*14, this difference is statistically significant ($p < 0.05$) [26,32].

This difference with Tunisian neighbors could be explained by the origins of the Moroccan and Tunisian populations. Since about 8000 years ago native Berbers have been the major population group in all the North African regions, but through the centuries, Berbers have mixed differently with many other ethnic groups, Phoenicians, Carthaginians, Romans, Vandals, Byzantines, and Arabs whereas Ottoman rule reached Tunisia only [41,42]. Other explanation of the difference between our population and Tunisians could be a selection bias, and the limited size of their group controls.

Table 3 Allele and genotype frequencies of rs2031920 polymorphism in Moroccan controls

	Allele		Genotype	
	c1	c2	c1/ c1	c1/ c2
Frequency	0.992	0.008	0.985	0.015

Studies have shown variation in the distribution of NAT2 alleles among different populations, where four major groups could be distinguished according to the frequency of NAT2*5 and NAT2*6 alleles and according to the presence of NAT2*7 and NAT2*14 alleles. NAT2*5 allele is the most common among Caucasian, Egyptian and Omani populations as in our population [26,29,31], while Asians such as South Korean and Japanese populations, have less NAT2*5 and more NAT2*7 [26,27,33]. NAT2*6 variant is at the second position in our population similarly to Caucasians [26]. NAT2*14 allele, at the third position in our population, is rare in Caucasians and absent in Omani and Southern Korea populations [26,27,31].

Junichi Azuma et al. 2012 [21], proposed in their recent study about NAT2 genotypes and impact on doses of INH to increase the recommended dose of 5 mg/kg by the World Health Organization (WHO) to 7.5 mg/kg in rapid acetylators, maintain it in intermediate acetylators, and reduce it to 2.5 mg/kg in slow acetylators. As Moroccans are mainly slow acetylators, we propose according to our results to reduce the dose of INH in TB patients carrying slow acetylators genotypes, in order to prevent hepatotoxicity and to decrease the cost of managing adverse events.

For the polymorphism rs2031920 of the CYP2E1 gene, our studied group consisted of 130 controls, originated from different regions of Morocco. From our results, it appears that there is a high frequency of c1/c1 genotype in Moroccan population (Table 3), which aggravates hepatotoxicity in slow acetylators patients under TB treatment. In Table 4, we compared our results with

Table 4 Genotypic frequencies of rs2031920 polymorphism of *CYP2E1* gene in different populations of the world

	Turkish [34]	Germanians [35]	Taiwanese [9]	Serbians [36]	French [37]	English [38]	Brazilians [28]	Chinese [26]	Indians [39]	Spanish [40]	Moroccans (This study)
c1/c1	0.947	0.949	0.55	0.904	0.916	0.968	0.908	0.598	0.98	0.879	0.985
c1/c2	0.053	0.044	0.401	0.09	0.047	0.032	0.592	0.374	0.02	0.121	0.015
c2/c2	0.000	0.007	0.048	0.006	0.000	0.000	0.000	0.028	0.00	0.000	0.000
n	302	297	269	177	172	155	141	107	100	58	130

n: sample size.

those of other reported populations. The frequencies of c1/c1, c1/c2 and c2/c2 genotypes in Moroccans were close to those found in Caucasians [35,37,38].

Conclusion

In conclusion, this preliminary study shows that more than 70% of Moroccan subjects are carriers of NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 and NAT2*14 genotypes compatible with a slow acetylators status, and therefore, they are sensitive to lower doses of TB treatment. We should take into account this high prevalence of slow acetylators in order to decrease adverse effects, especially knowing that a vast majority of Moroccans are also homozygous for the c1 allele of *CYP2E1* gene, which aggravates hepatotoxicity.

Methods

Studied population

Blood samples were collected from umbilical cords of 163 unrelated newborns. They originated from different regions of Morocco and the Moroccan origin of their parents and grandparents was confirmed. Informed consent for DNA analysis was obtained from the parents. Ethics approval was obtained from the local committee of National institute of Hygiene in Rabat for this study.

Genotyping protocol

Genomic DNA was extracted from three mL of blood using the salting-out method [43]. The quality and quantity of the DNA were controlled by A260/A280 using a Nanodrop spectrophotometer (2000/2000c Nanodrop; Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and aliquots (50-100 μ L) of packed blood cells were stored at 4°C until analyses. One hundred nanograms of extracted DNA was amplified in a final volume of 20 μ L. Real time PCR mixture contained 10 μ L of Master Mix (2X, TaqMan Genotyping Master Mix, Applied Biosystems), 0.5 μ L of a specific probe (40 X, TaqMan, Applied Biosystems). The amplification protocol involves three steps, PCR which includes activation of Taq polymerase heating at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of amplification of 75 seconds each cycle (DNA denaturation for 15 seconds at 92°C, Hybridization for 1 minute

at 60°C) and ends with Post-PCR Read at 60°C for 1 minute.

We genotyped 163 DNA samples for the four SNPs with strongest impact on the acetylation profile: rs1801280 (c.341 T > C; NAT2*5), rs1799930 (c.590G > A; NAT2*6), rs1799931 (c.857 G > A; NAT2*7), and rs1801279 (c.191G > A; NAT2*14) polymorphisms of *NAT2* gene and 130 DNA samples for the rs2031920 polymorphism of *CYP2E1* gene.

Genotyping of SNPs of both genes was performed with an allele-specific probe of SNP using allele-specific real-time polymerase chain reaction (StepOne Real-Time PCR System; Applied Biosystems7500, Foster City, CA, USA) using TaqMan (Applied Biosystems, Warrington, UK) probes. This method combines PCR and mutation detection in a single step. A hybridization probe is cleaved by the 5' nuclease activity of *Taq* DNA polymerase only if the specific sequence is successfully amplified. Two TaqMan probes are used, one for each allele. TaqMan probes consist of a 18–22 bp oligonucleotide probe which is labeled with a reporter fluorophore at the 5' end and a quencher fluorophore at the 3' end. Allelic discrimination was obtained by the post-PCR read of fluorescence intensity.

For the *CYP2E1* polymorphisms the primers sequences were from assays-by-designsSM of the manufacturer's (Applied Biosystems). Alleles of rs2031920 were assessed using primers rs2031920_F: TGACTTTTATTTCTTCATTTCTCATCATATTTTCTATTATACAT and rs2031920_R: GTTTTTCATTCTGTCTTCTAACTGGCAATAT and the Taqman probes rs2031920_V: VICAGGTTGCAATTTTGTACTTT and rs2031920_F: FAMGTTGCAATTTTATACTTT (SNP position highlighted).

For the four polymorphisms of *NAT2* gene, the primers sequences were from Drug metabolism genotyping assay of the manufacturer's (Applied Biosystems) which reference is (p / n 4362038).

Genotype frequencies in our population were calculated in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. Intervals confidence 95% were calculated for phenotypic genotypic and allelic frequencies.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 17.0 for

windows. The chi-square test was used to determine whether there is a significant difference between the expected frequencies and the observed frequencies relative to *NAT2* gene distribution in the studied group versus other populations. Statistical significance was assumed at the $p < 0.05$.

Abbreviations

ATDH: Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity; INH: Isoniazid; *NAT2*: N-acetyltransferase 2; *CYP2E1*: Cytochrome P450 2E1; TB: Tuberculosis; INH: Isoniazid; RMP: Rifampicin; PZA: Pyrazinamide; EMB: Ethambutol; ADRs: Adverse drug reactions; RA: Rapid acetylator; IA: Intermediate acetylator; SA: Slow acetylator; WHO: World Health Organization; SPSS: Statistical package for the social sciences; n: Sample size.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SG molecular study, redaction of the manuscript, statistic study. IR analysis of data, redaction of the manuscript. FZL contribution to molecular study. SCEA preparation of the controls data. CJL contribution to statistic study. AB recruitment of controls. AS conception of the study, analysis of data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the staff of the Medical Genetics Department of the National Institute of Health for their support. The authors would like to thank also Dr Jaoud El Kharraz for his careful reading of the paper.

Author details

¹Centre de génomique humaine, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco. ²Département de génétique médicale, Institut National d'Hygiène, Rabat, Morocco. ³Centre National de Référence en Néonatalogie et en Nutrition, Rabat, Morocco.

Received: 20 May 2014 Accepted: 18 December 2014

Published online: 29 December 2014

References

1. Data WOHLC-IP: **Global tuberculosis report 2013**. In *Book Global tuberculosis report, 2013*. Edited by Global tuberculosis report 2013. Switzerland: World Health Organization (WHO); 2013.
2. WHO: **Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance Report No. 3**. Geneva: WHO; 2004.
3. Forget EJ, Menzies D: **Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs**. *Expert Opin Drug Saf* 2006, **5**:231–249.
4. Marra F, Marra CA, Bruchet N, Richardson K, Moadebi S, Elwood RK, Fitzgerald JM: **Adverse drug reactions associated with first-line anti-tuberculosis drug regimens**. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007, **11**:868–875.
5. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, Peloquin CA, Gordin FM, Nunes D, Strader DB, Bernardo J, Venkataramanan R, Sterling TR: **An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy**. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**:935–952.
6. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R: **Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review**. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, **23**:192–202.
7. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, Ito M, Yamamoto Y, Ogura T, Maeda K, Komuta K, Igarashi T, Azuma J: **Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity**. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, **4**:256–261.
8. Hussain Z, Kar P, Husain SA: **Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management**. *Indian J Exp Biol* 2003, **41**:1226–1232.
9. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD: **Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis**. *Hepatology* 2003, **37**:924–930.
10. Sharma SK, Balamurugan A, Saha PK, Pandey RM, Mehra NK: **Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment**. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**:916–919.
11. Shimizu Y, Dobashi K, Mita Y, Endou K, Moriya S, Osano K, Koike Y, Higuchi S, Yabe S, Utsugi M, Ishizuka T, Hisada T, Nakazawa T, Mori M: **DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity**. *Tuberculosis (Edinb)* 2006, **86**:374–381.
12. Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, Snodgrass WR, Nelson SD: **Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis**. *Ann Intern Med* 1976, **84**:181–192.
13. Farrell GC: **Drug-induced acute hepatitis**. In *Drug-induced liver disease*. Edited by Farrell G. Edinburgh Churchill Livingstone; 1994: 247–299.
14. Ryan DE, Ramanathan L, Iida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS, Levin W: **Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid**. *J Biol Chem* 1985, **260**:6385–6393.
15. Mitchell JR, Thorgeirsson UP, Black M, Timbrell JA, Snodgrass WR, Potter WZ, Jollow HR, Keiser HR: **Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydranize metabolites**. *Clin Pharmacol Ther* 1975, **18**:70–79.
16. Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL, Mitchell JR: **Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans**. *J Pharmacol Exp Ther* 1985, **235**:566–570.
17. Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW: **Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms**. *Pharmacogenetics* 2001, **11**:207–215.
18. Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW: **Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2**. *Carcinogenesis* 2007, **28**:1665–1671.
19. Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HL, 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**:1717–1722.
20. Cascorbi I, Brockmoller J, Bauer S, Reum T, Roots I: **NAT2*12A (803A->G) codes for rapid arylamine n-acetylation in humans**. *Pharmacogenetics* 1996, **6**:257–259.
21. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, Okuda Y, Takashima T, Kamimura S, Fujio Y, Kawase I: **NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy**. *Eur J Clin Pharmacol* 2013, **69**:1091–1101.
22. Kolbe K: **Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225**. *Genomics* 1993, **18**:702–704.
23. Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodenez P, Joannet I, Hispard E, Bardou LG, Menez JF: **Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects**. *Pharmacogenetics* 1995, **5**:298–304.
24. Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B: **Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity**. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009, **12**:362–388.
25. Ait Moussa L, Khassouani CE, Hue B, Jana M, Begaud B, Soulaymani R: **Determination of the acetylator phenotype in Moroccan tuberculosis patients using isoniazid as metabolic probe**. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002, **40**:548–553.
26. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskyar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Orto M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildsheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, et al: **Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**:1239–1248.
27. Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES: **Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history**. *BMC Genet* 2008, **9**:21.
28. Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, Muniz LM, Moreira Ada S, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, Miranda AB, Santos AR: **Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**:716–724.
29. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M: **Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST,**

- SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003, **55**:560–569.
30. Chamorro JG, Castagnino JP, Musella RM, Frias A, Aranda FM, De Larranaga GF: **The distribution of allelic and genotypic frequencies of N-Acetyltransferase-2 variants in an Argentine population.** *J Infect Dev Ctries* 2012, **6**:671–674.
 31. Tanira MO, Simsek M, Al Balushi K, Al Lawatia K, Al Barawani H, Bayoumi RA: **Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (nat2) genotypes among Omanis.** *J Sci Res Med Sci* 2003, **5**:9–14.
 32. Bendjemana K, Abdennebi M, Gara S, Jmal A, Ghanem A, Touati S, Boussen H, Ladgham A, Guemira F: **Genetic polymorphism of glutathion-S transferases and N-acetyl transferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience.** *Bull Cancer* 2006, **93**:297–302.
 33. Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S: **Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene.** *Pharmacogenetics* 1994, **4**:125–134.
 34. Kunak SC, Ada AO, Karacaoglan V, Soydas E, Bilgen S, Iscan M: **Drug/xenobiotic metabolizing enzyme polymorphisms in a Turkish population.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012, **6**(27):2068–2074.
 35. Neuhaus T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Brode P, Vetter H, Bolt HM, Pesch B, Bruning T: **Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer.** *Toxicol Lett* 2004, **151**:273–282.
 36. Brocic M, Supic G, Zeljic K, Jovic N, Kozomara R, Zagorac S, Zlatkovic M, Magic Z: **Genetic polymorphisms of ADH1C and CYP2E1 and risk of oral squamous cell carcinoma.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, **145**:586–593.
 37. Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S: **Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract.** *Int J Cancer* 2000, **87**:734–740.
 38. Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN: **Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis.** *Alcohol* 2001, **23**:91–97.
 39. Roy B, Ghosh SK, Sutradhar D, Sikdar N, Mazumder S, Barman S: **Predisposition of antituberculosis drug induced hepatotoxicity by cytochrome P450 2E1 genotype and haplotype in pediatric patients.** *J Gastroenterol Hepatol* 2006, **21**:784–786.
 40. Leiro-Fernandez V, Valverde D, Vazquez-Gallardo R, Constenla L, Fernandez-Villar A: **Genetic variations of NAT2 and CYP2E1 and isoniazid hepatotoxicity in a diverse population.** *Pharmacogenomics* 2010, **11**:1205–1206. author reply 1207–1208.
 41. Sefiani A: **Genetic disorders in Morocco.** In *Genetic disorders Among Arab populations*. Edited by Teebi A: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010: 455–472.
 42. L C: **Genetic Disorders in Tunisia.** In *Genetic Disorders Among Arab*. 2nd edn. Edited by Teebi SA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010: 613–638.
 43. Sambrook JFE, Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual.** In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Edited by Sambrook J. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



NAT2 Genotypes in Moroccan Patients with Hepatotoxicity Due to Antituberculosis Drugs

Soukaina Guaoua,^{1,2} Ilham Ratbi,¹ Omaira El Bouazzi,^{3,4} Sanaa Hammi,⁵ Amina Tebaa,³ Jamal Eddine Bourkadi,⁶ Rachida Soulaymani Bencheikh,³ and Abdelaziz Sefiani^{1,2}

Aim: Isoniazid (INH) is the most effective drug used as first-line tuberculosis (TB) treatment besides rifampicin, pyrazinamide, and ethambutol. It is also the most commonly associated with hepatotoxicity. Differences of toxicity induced by INH have been attributed to genetic variability of the N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene which encodes a drug-metabolizing enzyme. The aim of this study was to characterize the acetylation profile of patients who developed hepatotoxicity after TB treatment by genotyping *NAT2* polymorphisms. **Patients and Methods:** This study included 42 Moroccan patients who developed hepatotoxicity after TB treatment and 163 Moroccan controls without TB. We genotyped four selected variants of the *NAT2* gene (*NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7, and *NAT2**14) by Sanger sequencing for patients and real-time polymerase chain reaction for controls. **Results:** The majority of patients had *NAT2* genotypes previously described as slow acetylators including *NAT2**5/*5, *NAT2**5/*6, *NAT2**6/*6, and *NAT2**6/*14 (78%) and none were genotyped as rapid acetylators. Controls were slow, intermediate, and rapid acetylators with frequencies of 72.39%, 21.48%, and 6.13%, respectively. **Conclusion:** There were no fast acetylator genotypes found among the patients having INH-hepatotoxicity. This finding suggests that slow acetylator phenotype may contribute to the development of TB treatment hepatotoxicity.

Introduction

TUBERCULOSIS (TB) IS AN INFECTIOUS DISEASE that remains to date one of the major public health problems worldwide. Following the epidemiological services of the Moroccan Ministry of Health, 28,955 new cases of TB were reported in 2015, with an incidence of 89 new cases per 100,000 inhabitants (Ministry of Health of Morocco, Epidemiology Branch and Disease Control, "Epidemiological Situation of Tuberculosis in Morocco in 2015," unpublished data). According to the national Moroccan program for TB control, standardized frontline regimen for new TB consists of 2 months of four antitubercular—rifampicin (RIF), isoniazid (INH), pyrazinamide (PYZ), and ethambutol (ETB), followed by 4 months of maintenance treatment with RIF and INH in patients with positive pulmonary TB, or TB acute or severe (e.g., miliary, multifocal, extensive bronchopneumonia, in-

testinal, renal, and extensive pericardial TB in individuals with human immunodeficiency virus [HIV]). In patients with meningeal or osteoarticular TB, treatment consists of 2 months of INH, PYZ, and RIF besides streptomycin, followed by 7 months of maintenance treatment with RIF and INH. Recommended posologies of TB drugs are 5 mg/kg/day for INH, 10 mg/kg/day for RIF, 25 mg/kg/day for PYZ, and 15 mg/kg/day for ETB (Guidelines of Moroccan Public Health, 2011). Despite the availability of effective chemotherapeutic agents to treat TB, adverse drug reactions (ADRs) may arise. Hepatotoxicity is the most serious adverse effect, responsible for significant morbidity. The incidence of anti-TB drug-induced hepatotoxicity (ATDH) ranges from 1% to 36% (Forget and Menzies, 2006; Saukkonen *et al.*, 2006; Marra *et al.*, 2007; Tostmann *et al.*, 2008). Among first-line anti-TB drugs, INH is the most effective but also the one that can easily cause hepatotoxicity. It is revealed by an increase

¹Centre de Génomique Humaine, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

²Département de Génétique Médicale, Institut National d'Hygiène, Rabat, Morocco.

³Laboratoire de Pharmacotoxicologie, Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

⁴Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, Morocco.

⁵Faculté de Médecine, Université Abdel Malek Essaadi, Tanger, Morocco.

⁶Département de Pneumologie, Hôpital Moulay Youssef - Centre Hospitalier Ibn Sina Rabat, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

of more than twice the upper limit of the normal range in the levels of serum alanine aminotransferase (ALT) or conjugated bilirubin, or a combined increase in the levels of aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, and total bilirubin, provided that one of these was more than twice the upper limit of the normal range (Benichou, 1990). Usually, the time of onset to acute injury is within months of the initiation of treatment (Saukkonen *et al.*, 2006). Increased ALT twice to normal level in serum and its decline after cessation of treatment confirm the diagnosis of hepatotoxicity due to anti-TB (Benichou, 1990). The risk of hepatotoxicity has been attributed to genetic variability in the arylamine N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene and cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) gene (Gupta *et al.*, 1984; Weber and Hein, 1985; Kohno *et al.*, 1996; Possuelo *et al.*, 2008). *NAT2*, a cytosolic phase II conjugation enzyme, metabolizes INH to acetylisoniazid in the liver. Acetylisoniazid is hydrolyzed to acetylhydrazine, which is oxidized by *CYP2E1* to form some hepatotoxic intermediates (Benichou, 1990; Vatsis and Weber, 1993). Disposal of acetylhydrazine also depends on further acetylation by *NAT2* to form a nontoxic metabolite, diacetylhydrazine (Fretland *et al.*, 2001; Blumberg *et al.*, 2003). The *NAT2* gene spans 9.9 kb (Chr 8 positions 18,293,034–18,302,961 in NCBI B35 assembly) and consists of a noncoding exon at the 5' end, separated by a 9 kb intron from an uninterrupted coding region of 873 bp. Variants in *NAT2* gene affect the activity of anti-TB drugs and result in three different phenotypes, the fast acetylation phenotype that consists of two copies of wild-type allele (WT), an intermediate phenotype with one WT allele and a mutant allele, and a slow acetylator phenotype comprising two mutated alleles. Among the seven most common SNPs, four result in amino acid changes leading to a significant decrease in acetylation capacity and are associated to slow acetylator phenotypes rs1801280 (c.341T>C;NAT2*5), rs1799930 (c.590G>A;NAT2*6), rs1799931 (c.857G>A;NAT2*7), and rs1801279 (c.191G>A;NAT2*14) (Fretland *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2007). The three others rs1041983 (c.282C>T;NAT2*13A), rs1799929 (c.481C>T;NAT2*11A), rs1208 (c.803A>G;NAT2*12A) are synonymous SNPs or do not alter the phenotype (Fretland *et al.*, 2001; Zang *et al.*, 2007).

The proportion of different acetylator phenotypes differs between ethnic groups (Gupta *et al.*, 1984; Weber and Hein, 1985; Vatsis and Weber, 1993; Kohno *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1999; Possuelo *et al.*, 2008). We previously estimated that 72.39%, 21.48%, and 6.13% of Moroccans are, respectively, slow, intermediate, and fast acetylators (Guaoua *et al.*, 2014). We also showed that most Moroccans are homozygous for c1 allele of *CYP2E1* gene (98.5%), which aggravates hepatotoxicity in slow acetylators (Guaoua *et al.*, 2014).

To support this first preliminary study, we investigated *NAT2* genotypes of 42 patients with hepatotoxicity due to anti-TB treatment.

Patients and Methods

Patients

A cohort of 42 Moroccan TB patients who developed hepatotoxicity and 163 Moroccan controls randomly selected were enrolled in this study. Age of patients ranged from 13 to 80 years, whose gender was formed by 16 females and 26 males, including 30 individuals with active pulmonary TB and

12 with extra pulmonary TB. They were treated according to the national reference program. During the treatment period, patients were questioned about symptoms regarding adverse effects of ATDH (one or several signs, e.g., nausea, vomiting, abdominal pain, loss of appetite, jaundice, asthenia, fever, pruritus, and alteration of the general condition) (Tostmann *et al.*, 2010). All cases were diagnosed with hepatotoxicity induced by anti-TB drugs on the basis of clinical and biological criteria. Laboratory examinations were performed systematically for all patients, even without symptoms. ATDH was defined as an increase in the serum level of ALT or AST greater than two times of the upper limit of normal (Benichou, 1990). When ATDH was suspected, anti-TB medications were discontinued promptly. Controls consisted of DNA samples extracted from umbilical cord blood of 163 unrelated newborns. They originated from different regions of Morocco and the Moroccan origin of their parents and grandparents was confirmed as previously described by Guaoua *et al.* (2014).

Methods

The study was approved by the local ethics committee, patients and legal guardians provided informed consent for DNA analysis. Genomic DNA was extracted from leukocytes isolated from ethylenediaminetetraacetic acid–anticoagulated blood using the Qiagen DNA Isolation Kit. The quality and quantity of DNA were controlled by A260/A280 using a NanoDrop spectrophotometer (Fisher Scientific, Wilmington, DE) and aliquots (50–100 μ L) of packed blood cells were stored at 4°C until analysis.

We carried out genotyping for four polymorphisms rs1801280 (c.341T>C;NAT2*5), rs1799930 (c.590G>A;NAT2*6), rs1799931 (c.857G>A;NAT2*7), and rs1801279 (c.191G>A;NAT2*14) of *NAT2* gene by polymerase chain reaction (PCR), followed by direct sequencing for patients. An allele-specific TaqMan probe of SNP was used to genotype controls by real-time PCR as previously reported (Guaoua *et al.*, 2014).

PCR was carried out in a volume of 50 μ L. The PCR mixture contained 10 μ L of 5 \times buffer (2 mM MgCl₂), 0.1 mM each of the deoxynucleotide triphosphates, 1.5 U of Go Taq (Promega), and 0.6 μ M of each primer.

The forward and reverse primers were, respectively, 5'GAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGC3' and 5'ACGTGAGGGTAGAGAGGATATC3' for NAT2*7 polymorphism and 5'GGCTGTTCCCTTTGAGAACC3' and 5'GCAAGG AACAAAATGATGTGG3' for NAT2*14, NAT2*5, and NAT2*6 polymorphisms. The PCR conditions were 1 min denaturation at 95°C; 35 cycles of 15 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 30 s at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 min. Two microliters of purified product was amplified using a Big Dye kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) as indicated in the manufacturer's protocol in a final volume of 13 μ L. The PCR consisted of an initial denaturation step at 96°C for 10 s, 25 cycles at 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 4 min. The final product was sequenced using an ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 for Windows. The chi-square test was used to determine whether

there is a significant difference between the expected frequencies and the observed frequencies relative to NAT2 slow genotypes between the patients with hepatotoxicity and the general Moroccan population. Statistical significance was assumed at the $p < 0.05$.

Results

According to genetic analysis results, out of 42 cases with hepatotoxicity, 78% (95% CI 65–91) were genotyped as slow acetylators and 22% (95% CI 9–35) as intermediate acetylators, whereas rapid acetylator was not found (Table 1). We noted the presence of three slow acetylator alleles NAT2*5, NAT2*6, and NAT2*14 represented by NAT2*4/*5, NAT2*4/*6, NAT2*5/*5, NAT2*5/*6, NAT2*6/*6, and NAT2*6/*14 genotypes (Table 1). While controls comprised different slow acetylator alleles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, and NAT2*14, coding for 12 different genotypes (Table 1). In Table 2, we report allele frequencies of four variants NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, and NAT2*14 found in these patients and controls. By comparing slow allelic and genotypic frequencies between patients who developed hepatotoxicity after TB treatment and Moroccan controls, it was found that the difference was not statistically significant at the $p \leq 0.05$.

Discussion

TB remains a leading cause of global mortality and morbidity, with an estimated 9 million new TB cases and 1.5

TABLE 1. OBSERVED FREQUENCY OF NAT2 GENOTYPES ENCODING FAST, INTERMEDIATE, AND SLOW ACETYLATION PHENOTYPES AMONG 42 MOROCCAN PATIENTS WITH HEPATOTOXICITY INDUCED BY ANTITUBERCULOSIS DRUGS AND 163 MOROCCAN CONTROLS

<i>Moroccan patients with hepatotoxicity</i>		
<i>Genotype</i>	<i>Genotype frequency</i>	<i>Phenotype</i>
NAT2*4/*5	0.10	IA
NAT2*4/*6	0.12	IA
NAT2*5/*6	0.33	SA
NAT2*5/*5	0.31	SA
NAT2*6/*6	0.12	SA
NAT2*6/*14	0.02	SA
<i>Moroccan controls</i>		
<i>Genotype</i>	<i>Genotype frequency</i>	<i>Phenotype</i>
NAT2*4/*4	0.0613	RA
NAT2*4/*5	0.1166	IA
NAT2*4/*6	0.0859	IA
NAT2*4/*14	0.0123	IA
NAT2*5/*5	0.3313	SA
NAT2*5/*6	0.2209	SA
NAT2*5/*7	0.0184	SA
NAT2*5/*14	0.0368	SA
NAT2*6/*6	0.0797	SA
NAT2*6/*7	0.0184	SA
NAT2*6/*14	0.0123	SA
NAT2*14/*14	0.0061	SA

IA, intermediate acetylator; NAT2, N-acetyltransferase 2; RA, rapid acetylator; SA, slow acetylator.

TABLE 2. ALLELE FREQUENCIES OF NAT2 VARIANTS AMONG 42 MOROCCAN PATIENTS WITH HEPATOTOXICITY DUE TO ANTITUBERCULOSIS DRUGS AND 163 MOROCCAN CONTROLS

<i>Allele</i>	<i>NAT2*5</i>	<i>NAT2*6</i>	<i>NAT2*7</i>	<i>NAT2*14</i>
Patients	0.52	0.36	0.00	0.01
Controls	0.53	0.25	0.02	0.04

million TB-related deaths in 2013 (WHO, 2015). TB is surpassed only by HIV as a cause of infectious disease-associated deaths worldwide (Frieden *et al.*, 2003). There are more than 20 drugs available for TB treatment and they are used in various combinations in different circumstances. So, for example, some TB drugs are only used for treatment of new patients when there is no suggestion of any drug resistance, whereas others are only used for treatment of drug-resistant TB (WHO, 2010). More than 90% of people with drug-susceptible TB can be cured in 6 months using a combination of first-line TB drugs (Lambregts-van Weezenbeek and Veen, 1995).

The major side effects of anti-TB drugs that have clinical implication include hepatotoxicity, ocular toxicity, and skin hypersensitivity reactions. Hepatotoxicity is the most serious ADR of anti-TB drugs, especially INH (Tostmann *et al.*, 2008). The factors held responsible for hepatotoxicity include acetylator phenotype, doses of anti-TB drugs, nutritional status of the patient, and severity of the disease (Chauhan *et al.*, 2004). Relationship between genetic factors and INH-induced hepatotoxicity has been approved in previous studies (Cho *et al.*, 2007; Possuelo *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). These studies have shown that slow acetylator phenotype is correlated to anti-TB hepatotoxicity.

Our results show that slow acetylators are the most frequent in patients who developed hepatotoxicity under anti-TB drugs, and that NAT2*5 and NAT2*6 alleles are the most represented, with frequencies of 52% (95% CI 41–63) and 36% (95% CI 26–46), respectively (Table 2). Our findings indicate that there is an association between slow acetylator status and hepatotoxicity induced by anti-TB drugs in Moroccan TB patients. This result agrees with reports described by other researchers from Iran, Tunisia, and other Asian and European countries (Lee *et al.*, 2010; Khalili *et al.*, 2011; Leiro-Fernandez *et al.*, 2011; Ben Fredj *et al.*, 2016). Based on these results, we suggest integrating genotyping as analysis of first intention, systematically before any therapeutic approach for Moroccan patients.

Studies have shown variation in the distribution of NAT2 alleles among different populations (Lin *et al.*, 1994; Hamdy *et al.*, 2003; Tanira *et al.*, 2003; Bendjemana *et al.*, 2006; Sabbagh *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2011). We estimated previously that the most prevalent genotypes of NAT2 gene in the Moroccan population are those that encode slow acetylation phenotype (72.39%), leading to a high risk of ATDH (Guaoua *et al.*, 2014). The two alleles NAT2*5 and NAT2*6 are the most prevalent with frequencies of 53% and 25%, respectively (Guaoua *et al.*, 2014). This high prevalence of slow acetylators in Moroccans could explain the nonsignificant difference of slow allelic and genotypic frequencies found in this study between patients and Moroccan controls.

The absence of RA in TB patients supports the association of hepatotoxicity due to INH and the SA genotype, in particular, NAT2*5/*5, NAT2*5/*6, and NAT2*6/*6. Therefore, there is a necessity of adjusting the dose of INH based on the genotype and phenotype found in the patient (Teixeira *et al.*, 2011). A reduction of the dose of INH in TB patients carrying SA genotypes should be considered to prevent hepatotoxicity and to decrease the cost of managing adverse events.

Conclusion

In this study, we found that all TB patients who developed hepatotoxicity are slow or intermediate acetylators carrying NAT2*5/*5, NAT2*5/*6, NAT2*6/*6, NAT2*6/*14, NAT2*4/*5, and NAT2*4/*6 genotypes and we note the absence of rapid acetylators. We support that those genotypes are a risk factor for developing hepatotoxicity under TB treatment. Thus, genotype profile of NAT2 gene should be taken into account for adjusting the dose of INH administered to patients. It will lead to decrease adverse effects under TB treatment among Moroccans.

Acknowledgments

The authors thank all the staff of the Medical Genetics Department of the National Institute of Health for their support. The authors also thank Dr. Afaf Lamzouri for her help in recruitment of patients.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ben Fredj N, Gam R, Kerkni E, *et al.* (2016) Risk factors of isoniazid-induced hepatotoxicity in Tunisian tuberculosis patients. *Pharmacogenomics J.* [Epub ahead of print]; DOI: 10.1038/tpj.2016.26.
- Bendjemana K, Abdennebi M, Gara S, *et al.* (2006) [Genetic polymorphism of glutathion-S transferases and N-acetyl transferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience]. *Bull Cancer* 93:297–302.
- Benichou C (1990) Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 11:272–276.
- Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, *et al.* (2003) American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:603–662.
- Chauhan LS, Arora VK, Central TB Division, Directorate General of Health Services, Ministry of Health and Family Welfare, *et al.* (2004) Management of pediatric tuberculosis under the Revised National Tuberculosis Control Program (RNTCP). *Indian Pediatr* 41:901–905.
- Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, *et al.* (2007) Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 87:551–556.
- Forget EJ, Menzies D (2006) Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf* 5:231–249.
- Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, *et al.* (2001) Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics* 11:207–215.
- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, *et al.* (2003) Tuberculosis. *Lancet* 362:887–899.
- Gross M, Kruiesselbrink T, Anderson K, *et al.* (1999) Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:683–692.
- Guaoua S, Ratbi I, Laarabi FZ, *et al.* (2014) Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC Genet* 15:1273.
- Guidelines of Moroccan Public Health. (2011) Guide of Tuberculosis control; third edition: April 2011.
- Gupta RC, Nair CR, Jindal SK, *et al.* (1984) Incidence of isoniazid acetylation phenotypes in North Indians. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 22:259–264.
- Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, *et al.* (2003) Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 55:560–569.
- Khalili H, Fouladdel S, Sistanizad M, *et al.* (2011) Association of N-acetyltransferase-2 genotypes and anti-tuberculosis induced liver injury; first case-controlled study from Iran. *Curr Drug Saf* 6:17–22.
- Kohno H, Kubo H, Takada A, *et al.* (1996) Isoniazid acetylation phenotyping in the Japanese: the molar metabolic ratio INH/AcINH. *Am J Ther* 3:74–78.
- Lambregts-van Weezenbeek CS, Veen J (1995) Control of drug-resistant tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 76:455–459.
- Lee SW, Chung LS, Huang HH, *et al.* (2010) NAT2 and CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to first-line anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:622–626.
- Leiro-Fernandez V, Valverde D, Vazquez-Gallardo R, *et al.* (2011) N-acetyltransferase 2 polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Caucasians. *Int J Tuberc Lung Dis* 15:1403–1408.
- Lin HJ, Han CY, Lin BK, *et al.* (1994) Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 4:125–134.
- Marra F, Marra CA, Bruchet N, *et al.* (2007) Adverse drug reactions associated with first-line anti-tuberculosis drug regimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:868–875.
- Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, *et al.* (2008) Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol* 64:673–681.
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, *et al.* (2008) Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet* 9:21.
- Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, *et al.* (2006) An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 174:935–952.
- Sun F, Chen Y, Xiang Y, *et al.* (2008) Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:994–1002.
- Tanira MO, Simsek M, Al Balushi K, *et al.* (2003) Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (nat2) genotypes among Omanis. *J Sci Res Med Sci* 5:9–14.
- Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, *et al.* (2011) Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis

- in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 716–724.
- Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, *et al.* (2008) Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol* 23:192–202.
- Tostmann A, van den Boogaard J, Semvua H, *et al.* (2010) Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is uncommon in Tanzanian hospitalized pulmonary TB patients. *Trop Med Int Health* 15:268–272.
- Vatsis KP, Weber WW (1993) Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch Biochem Biophys* 301:71–76.
- Weber WW, Hein DW (1985) N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 37:25–79.
- WHO (2010) *Guidelines for treatment of Tuberculosis*. Geneva, p 147.
- WHO (2015) *Global Tuberculosis Report*. 20th edition. 2015.22. Geneva Switzerland.
- Zang Y, Doll MA, Zhao S, *et al.* (2007) Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis* 28:1665–1671.

Address correspondence to:
Soukaina Guaoua, MSc
Département de Génétique Médicale
Institut National d'Hygiène
Avenue Ibn Batouta
Rabat B.P. 769
Morocco

E-mail: soukainaguaoua@gmail.com

**PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES**

Publications Internationales:

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Omaima El Bouazzi, Sanaa Hammi, Amina Tebaa, Jamal Eddine Bourkadi, Rachida Soulaymani Bencheikh, Abdelaziz Sefiani. NAT2 genotypes in Moroccan patients with hepatotoxicity due to antituberculosis drugs. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016 Aug 19. Volume 00, Number 00, 2016^a Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 1–5 doi: 10.1089/gtmb.2016.0060.

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Siham Chafai Elalaoui, Iman Cherkaoui Jaouad, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. Distribution of allelic and genotypic frequencies of *NAT2* and *CYP2E1* variants in Moroccan population. *BMC Genet*. 2014 Dec 29;15(1):156. doi: 10.1186/s12863-014-0156-x.

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Jaber Lyahyai, Siham Chafai El Alaoui, Fatima Zahra Laarabi, Abdelaziz Sefiani. Novel nonsense mutation of *BRCA2* gene in a Moroccan man with familial breast cancer. *Afr Health Sci*. 2014 Jun;14(2):468-71. doi: 10.4314/ahs.v14i2.25.

Iman Cherkaoui Jaouad, **Soukaina Guaoua**, Aicha Hajjioui, Abdelaziz Sefiani. Hyaline fibromatosis syndrome with mutation c.1074delT of the *CMG2* gene: a case report. *J Med Case Rep*. 2014 Sep 3;8:291. doi: 10.1186/1752-1947-8-291.

Siham Chafai Elalaoui, Wafae Jdioui, **Soukaina Guaoua**, Imane Cherkaoui Jaouad, Tarik Madhi, Abdelaziz Sefiani. Report of the first Moroccan case of fusion of metacarpals 4/5 and review of the literature. *Int J Clin Pediatr*. 2014;3(4):117-120.

Ilham Ratbi, Kim D. Falkenberg, Manou Sommen, Nada Al-Sheqaih, **Soukaina Guaoua**, Geert Vandeweyer, Jill E. Urquhart, Kate E. Chandler, Simon G. Williams, Neil A. Roberts, Mustapha El Alloussi, Graeme C. Black, Sacha Ferdinandusse, Hind Ramdi, Audrey Heimler, Alan Fryer, Sally-Ann Lynch, Nicola Cooper, Kai Ren Ong, Claire E.L. Smith, Christopher F. Inglehearn, Alan J. Mighell, Claire Elcock, James A. Poulter, Marc Tischkowitz, Sally J. Davies, Abdelaziz Sefiani, Aleksandr A. Mironov, William G. Newman, Hans R. Waterham, and Guy Van Camp. Heimler syndrome is caused by hypomorphic mutations in the peroxisome-biogenesis genes *PEX1* and *PEX6*. *The American Journal of Human Genetics* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.08.011>.

Meriem Baziz , Zohra Hamouli-Said, Ilham Ratbi , Mohamed Habel, **Soukaina Guaoua**, Aziza Sbiti, Abdelaziz Sefiani . Cytogenetic investigation in a group of ten infertile men with non-obstructive azoospermia: first Algerian 46, XX syndrome. Iran J Public Health. 2016 Jun;45(6):739-47.

Articles Soumis:

Ilham Ratbi, Yun Li, Nawfal Fejjal, Holger Thiele, Siham Chafai Elalaoui, Janine Altmüller, **Soukaina Guaoua**, Peter Nürnberg, Bernd Wollnik, Abdelaziz Sefiani. Exome sequencing reveals a novel nonsense mutation of *WTN10B* gene in a Moroccan family with split-hand foot malformation. European Journal of Medical Genetics.

Imane Cherkaoui Jaouad, Jaber Lyahyai, **Soukaina Guaoua**, Mustapha El Alloussi, Abdelali Zrhidri, Yassamine Doubaj, Abdelkrim Boulanouar, Abdelaziz Sefiani. Novel splice site mutation in *CNNM4* gene in a family with Jalili syndrome. European Journal of Medical Genetics (EJMG). (Accepté sous réserve de modifications mineures).

Mariam Tajir, Jaber Lyahyai, **Soukaina Guaoua**, Mustapha El Alloussi, Abdelaziz Sefiani. Ankyloblepharon-Ectodermal Defects-Cleft Lip/Palate Syndrome due to a new heterozygous missense mutation in the SAM domain of *P63*. Journal of Dermatological Case Reports.

Communications Orales Nationales:

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Siham Chafai El Alaoui, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. Les fréquences génotypiques des variants des gènes *NAT2* et *CYP2E1* et leur impact potentiel sur la dose d'isoniazide chez les patients tuberculeux. Les 5èmes Journées Scientifiques organisées le 21 et 22 mars 2014, à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, sous le thème: « Le Doctorant A La Recherche D'un Statut ». (**Le prix de la meilleure Communication Orale**)

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Siham Chafai El Alaoui, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. Distribution des fréquences génotypiques des variants des gènes *NAT2* et *CYP2E1* impliqués dans la survenue de l'hépatotoxicité chez les patients sous

traitement antituberculeux. « 3e Edition des Journées Jeunes Chercheurs de la SMCTle 20-22 Novembre 2014 à l'institut scientifique, Rabat, Maroc ».

Communications Affichées Internationales:

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Siham Chafai Elalaoui, Iman Cherkaoui Jaouad, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. Distribution of allelic and genotypic frequencies of *NAT2* and *CYP2E1* variants in Moroccan population. The European Conference of Human Genetics (ESHG), organisé du 21 au 24 Mai 2016 à CCIB, Centre de Convencions Internacional de Barcelona, Espagne.

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Jaber Lyahyai, Siham Chafai El Alaoui, Fatima Zahra Laarabi, Abdelaziz Sefiani. Novel nonsense mutation of *BRCA2* gene in a Moroccan man with familial breast cancer. "Spring Course in Hereditary Cancer Genetics Meeting" organisé du 10 au 13 Avril 2016 au Centre Résidentiel Universitaire de Bertinoro, (Forli-Cesena), Italie.

Soukaina Guaoua, Wafae Jdioui, Ilham Ratbi, Omaira El Bouazzi, Sanaa Hammi, Amina Tebaa, Jamal Eddine El Bourkadi, Rachida Soulaymani Bencheikh, Abdelaziz Sefiani. *NAT2* genotypes in Moroccan patients with hepatotoxicity due to antituberculosis drugs. Les 8èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale, organisées le 3, 4 et 5 Février 2016, Cité internationale, Lyon, France.

Soukaina Guaoua, Mariam Tajir, Jaber Lyahyai, Mustapha El Alloussi, Abdelaziz Sefiani. Nouvelle mutation hétérozygote faux sens dans le domaine SAM du gène *P63* chez une patiente marocaine avec le syndrome de Hay-Wells : Implication pour la prise en charge et le conseil génétique. Les 7èmes assises scientifiques de génétique humaine et médicale organisées le 29-30-31 Janvier 2014 au palais des congrès Bordeaux, France.

Communications Affichées Nationales:

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Omaira El Bouazzi, Sanaa Hammi, Amina Tebaa, Jamal Eddine Bourkadi, Rachida Soulaymani Bencheikh, Abdelaziz Sefiani. Etude comparative des fréquences génotypiques de *NAT2* chez des patients ayant développé une hépatotoxicité suite

à un traitement antituberculeux. Les 6èmes journées scientifiques du Cedoc SVS le 04 et 06 Mars 2015 à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat sous le thème « Femme et recherche ».

Soukaina Guaoua, Maria Mansouri, Ilham Ratbi, Abdelaziz Sefiani. Glycogénose Type Ia : Données cliniques et moléculaires d'une famille marocaine et mise en place d'une stratégie de diagnostic moléculaire au Maroc. Les 6èmes journées scientifiques du Cedoc SVS le 04 et 06 Mars 2015 à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat sous le thème « Femme et recherche ».

SoukainaGuaoua, Wafae Jdioui, Maria Mansouri, Abdelaziz Chemlal, Abdelaziz Sefiani. Identification de la mutation arabe c.2254C>T du gène *DDR2* chez une patiente marocaine atteinte d'une dysplasie spondylo-épimétaphysaire-anomalies de calcification. La 4ème édition des doctoriales 2015 de la FSR durant le 19, 20 et 21 Février 2015, sous le thème « L'employabilité, la création d'entreprises et la formation par la recherche ».

Soukaina Guaoua, Iman Cherkaoui Jaouad, Aicha Hajjioui, Abdelaziz Sefiani. Mutation Hot-spot chez un patient marocain atteint de la fibromatose systémique infantile. Les 5èmes Journées Scientifiques organisées le 21 et 22 Mars 2014, à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, sous le thème : « Le Doctorant A La Recherche D'un Statut »

Soukaina Guaoua, Fatima ZahraLaarabi, Ilham Ratbi, Siham Chafai El Alaoui, Jaber Lyahyai, Abdelaziz Sefiani. "Novel nonsense mutation of *BRCA2* gene in hereditary breast cancer family from Morocco: implications for management and genetic counseling. The Third Annual Meeting of the Middle Eastern Association for cancer Research, December 5-7 2013, Rabat-Morocco".

Soukaina Guaoua, Ilham Ratbi, Fatima Zahra Laarabi, Amina Barkat, Abdelaziz Sefiani. Estimation de la prévalence dans la population Marocaine du génotype c1/c1 du gène *CYP2E1* associé à une hépatotoxicité chez les patients tuberculeux. 10èmes Journées Scientifiques d'internat et de résidanat de Pharmacie organisées le 26-27 Avril 2013 au Conseil National de l'Ordre des Médecins (Rabat) sous le thème : « l'industrie du diagnostic in vitro : Quelles perspectives pour le Maroc ? ».